



Aplicació de la detecció electroquímica a l'estudi de fitoquelatines i dels seus complexos metàl·lics en mostres sintètiques i naturals

Àngela Dago Busquets

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de Química
Departament de Química Analítica

Programa de Doctorat
Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

Aplicació de la detecció electroquímica a
l'estudi de fitoquelatines i dels seus complexos
metàl·lics en mostres sintètiques i naturals

Memòria presentada per
Àngela Dago Busquets

per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Direcció
Dra. Cristina Ariño Blasco
Universitat de Barcelona



Cristina Ariño Blasco, Professora Titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona,

FAIG CONSTAR

Que la Tesi Doctoral que porta per títol “*Aplicació de la detecció electroquímica a l’estudi de fitoquelatines i dels seus complexos metàl·lics en mostres sintètiques i naturals*”, ha estat realitzada per la Sra. Àngela Dago Busquets sota la meva direcció al Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona i que tots els resultats presentats són fruit de la recerca realitzada per l’esmentada doctoranda.

Barcelona, gener de 2014

Dra. Cristina Ariño Blasco

Professora Titular del Departament de Química Analítica
Universitat de Barcelona

Als meus pares,

*El cel estrellat és un espectacle fascinant.
Però hi ha tantes estrelles que, abans que
res, és necessari aprendre a orientar-se.
Per a aconseguir-ho cal saber localitzar la
constel·lació més famosa, l'Ossa Major. Un
cop l'haguem trobat, podrem localitzar
sense problemes l'Estrella Polar.*

Índex

Pròleg	xv
---------------	-----------

Objectius

Estructura i continguts de la memòria

Abstract

Agraïments

Sigles i acrònims

I. INTRODUCCIÓ

1. Els metalls pesants	5
-------------------------------	----------

1.1. L'home i la industrialització

1.2. Terminologia

1.3. Legislació de metalls pesants

- 1.4. Els metalls pesants a la biosfera
- 1.5. Fonts de contaminació de metalls pesants
 - 1.5.1. Fonts naturals
 - 1.5.2. Fonts antropogèniques
- 1.6. Dinàmica dels metalls pesants a la biosfera
 - 1.6.1. Biodisponibilitat dels metalls pesants
- 1.7. Toxicitat dels metalls pesants
 - 1.7.1. El mercuri
 - 1.7.2. El cadmi
 - 1.7.3. L'arsènic
 - 1.7.4. El plom

2. Fitoremediació de metalls pesants

51

- 2.1. Remediació de sòls contaminats
- 2.2. Definició de fitoremediació
- 2.3. Tècniques de fitoremediació
- 2.4. Tipus de plantes emprades en fitoremediació
 - 2.4.1. Fitostabilització mitjançant l'ús de plantes exclusores
 - 2.4.2. Fitoextracció mitjançant l'ús de plantes hiperacumuladores
- 2.5. Valoració i índexs de tolerància als metalls
- 2.6. Mecanismes cel·lulars de tolerància i desintoxicació de metalls pesants en plantes
 - 2.6.1. Micorizes
 - 2.6.2. Paret cel·lular i exsudat de les arrels
 - 2.6.3. Membrana plasmàtica
 - 2.6.4. Biotransformació i mecanismes de reparació cel·lular
 - 2.6.5. Quelació dels metalls
 - 2.6.6. Compartimentació vacuolar
 - 2.6.7. Transport dels metalls
- 2.7. Les fitoquelatines
 - 2.7.1. Estructura

2.7.2.	Biosíntesi	
2.7.3.	Mecanisme d'actuació	
2.8.	Altres biomolècules amb grups tiol	
3.	Estudi de biomolècules amb grups tiols i les seves interaccions amb els metalls	73
3.1.	Metodologies analítiques: perspectiva general	

II. METODOLOGIA APLICADA

4.	Tècniques instrumentals	81
4.1.	Cromatografia	
4.1.1.	Cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC)	
4.2.	Espectrometria de masses	
4.2.1.	ESI-MS-TOF	
4.2.2.	ICP-MS-Q	
5.	Tècniques quimiomètriques	95
5.1.	Anàlisi per components principals (PCA)	

III. EXPERIMENTAL

6.	Instrumentació i reactius	101
6.1.	Instrumentació	
6.2.	Reactius i dissolucions	
7.	Procediments experimentals	109
7.1.	Anàlisi amb HPLC	

- 7.1.1. Fase mòbil
- 7.1.2. Patrons cromatogràfics
- 7.1.3. Elèctrodes de treball
- 7.2. Preparació de mostres de plantes
 - 7.2.1. Cultiu semi-hidropònic
 - 7.2.2. Cultiu hidropònic
 - 7.2.3. Plantes procedents de la zona d'Almadén
 - 7.2.4. Preparació dels extractes de plantes
- 7.3. Anàlisi de les mostres de sòls
- 7.4. Anàlisi amb ICP-OES/ICP-MS
- 7.5. Anàlisi amb ESI-MS
- 7.6. Determinació dels paràmetres de qualitat
 - 7.6.1. Linealitat
 - 7.6.2. Sensibilitat
 - 7.6.3. Veracitat
 - 7.6.4. Precisió

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

8. Establiment del mètode analític 141

- 8.1. Introducció
- 8.2. *Liquid chromatographic analysis of Hg(II) binding by thiol-rich peptides using both UV-vis and electrochemical detection*
- 8.3. *Characterization of Hg(II) binding with different length phytochelatins using liquid chromatography and amperometric detection*
- 8.4. Discussió de resultats

9. Anàlisi de plantes sotmeses a estrès per Hg(II) i/o Cd(II) 177

- 9.1. Introducció

- 9.2. *Analysis of phytochelatins and Hg-phytochelatin complexes in Hordeum vulgare plants stressed with Hg and Cd: HPLC study with amperometric detection*

- 9.3. Discussió de resultats

10. Inducció de PCs en plantes sotmeses a diferents metalls pesants **205**

- 10.1. Introducció

- 10.2. *Chemometrics applied to the analysis of induced phytochelatins in Hordeum vulgare plants stressed with various toxic non-essential metals and metalloids*

- 10.3. Discussió de resultats

11. Anàlisi de plantes de la zona d'Almadén **233**

- 11.1. Introducció

- 11.2. *Evaluation of mercury stress in plants from the Almadén mining district by analysis of phytochelatins and their Hg complexes*

- 11.3. Discussió de resultats

12. Glutathione study in silver-based electrodes **257**

- 12.1. Introduction

- 12.2. Results and discussion

- 12.2.1. Study of the response of silver-based electrodes

- 12.2.2. Analysis of metal-GSH mixtures

V. CONCLUSIONS

VI. BIBLIOGRAFIA

VII. APÈNDIX

PRÒLEG

Objectius

L'objectiu general de la present Tesi Doctoral és la separació i la detecció de molècules d'interès biològic que contenen grups tiols i dels seus complexos metàl·lics en mostres sintètiques i naturals utilitzant la cromatografia de líquids en fase inversa amb detecció electroquímica.

La fitoremediació és una tecnologia basada en l'ús de plantes per eliminar contaminants del medi ambient o reduir-ne la seva toxicitat fins a fer-los innocus. Les fitoquelatines són pèptids rics en cisteïna que sintetitzen les plantes, les algues i alguns fongs i que s'enllacen als metalls pesants mitjançant el grup tiol. Les fitoquelatines estan involucrades en la desintoxicació i l'homeòstasi dels metalls pesants, i és per això que l'estudi de la complexació d'aquestes molècules amb els metalls pesants és d'especial interès.

Per tal d'assolir l'objectiu general, es divideix la Tesi en dos parts ben diferenciades: la primera dirigida al desenvolupament de la metodologia de separació i detecció de les fitoquelatines sintètiques i dels seus complexos amb Hg(II); i la segona

dedicada a l'aplicació d'aquesta metodologia a sistemes naturals. Per a aquesta segona part, es seleccionen plantes cultivades en presència de diversos metalls pesants, ja sigui de forma artificial com natural.

Aquesta Tesi es presenta com l'inici d'una nova línia de recerca del grup d'Electroanàlisi dedicada a l'estudi de la complexació de metalls pesants tòxics per les fitoquelatines utilitzant la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) en fase inversa acoblada a la detecció electroquímica. Aquesta metodologia es presenta com un mètode selectiu, sensible, senzill i econòmic desenvolupat paral·lelament a les tècniques voltamperomètriques estàtiques, àmpliament utilitzades al grup de recerca, i com una alternativa més econòmica a la detecció per espectrometria de masses globalment utilitzada en estudis de fitoremediació.

Estructura i continguts de la memòria

La idea principal d'aquesta Tesi Doctoral és la separació i la detecció de fitoquelatines i altres molècules relacionades, així com dels seus complexos amb mercuri. Per tant, la primera part de la memòria (**I. Introducció**) que consta de tres capítols, està dedicada a la presentació del tema per situar-nos dins de context. Al capítol 1 s'exposen els diferents aspectes rellevants dels metalls pesants, com ara la seva toxicitat per al medi ambient i la població, la presència i la dinàmica dels metalls pesants a la biosfera i les principals fonts emissores de metalls pesants. Al capítol 2 es detalla la importància de la remediació de sòls contaminats i es presenta la fitoremediació com una tècnica aplicable a grans àrees de terreny i que preserva el medi ambient. En aquest capítol també s'esmenten els diferents mecanismes de les plantes per combatre la toxicitat dels metalls pesants, així com el paper que juguen les fitoquelatines en la descontaminació de sòls contaminats amb metalls pesants. En el capítol 3 es fa una breu pinzellada de les metodologies analítiques utilitzades fins a l'actualitat en: *i)* l'estudi d'aquestes biomolècules sintètiques, *ii)* l'estudi de la complexació d'aquestes biomolècules sintètiques amb els metalls pesants o *iii)* l'estudi

de mostres naturals, generalment plantes, on s'hi han induït les fitoquelatines per l'acció dels metalls pesants.

A la segona part (**II. Metodologia aplicada**) s'explica amb detall els fonaments de les tècniques instrumentals i quimiomètriques utilitzades en la present Tesi Doctoral. És en aquesta part també on es descriuen detingudament les bases de la detecció electroquímica i els elèctrodes de treball com la part fonamental d'aquesta tècnica de mesura.

A la tercera part (**III. Experimental**) es repassa la instrumentació, els reactius i els procediments de treball utilitzats. En aquest apartat es posa especial èmfasi en el cultiu de les plantes i la preparació d'aquestes mostres per a l'anàlisi per cromatografia.

Aquesta memòria de Tesi Doctoral es presenta com a compendi de publicacions. Els treballs publicats i la discussió dels resultats obtinguts es disposa a la quarta part de la memòria (**IV. Resultats i discussió**). En aquesta part es consideren tres grans blocs:

- El primer bloc (**capítol 8**) es basa en el desenvolupament de la metodologia analítica per a la separació i detecció de les fitoquelatines, d'algunes molècules relacionades i dels seus complexos amb metalls pesants, bàsicament el mercuri(II), utilitzant cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) en fase inversa, amb detecció electroquímica emprant un elèctrode de carboni vitrificat i comparant-la amb la detecció òptica àmpliament utilitzada. Entre tots els metalls pesants, s'escull el Hg(II) per als estudis de complexació de fitoquelatines degut a l'elevada estabilitat dels complexos formats, a més de ser un metall altament tòxic amb greus efectes perjudicials per a la salut i per al medi ambient. En aquest bloc s'inclouen dos treballs de recerca: en el primer (treball 8.2) s'aplica el mètode desenvolupat a la separació de glutatió (precursor de les fitoquelatines), els seus fragments i els complexos d'aquests amb mercuri; i, en el segon (treball 8.3), s'amplia l'estudi a la separació de fitoquelatines i dels seus complexos amb Hg(II).
- El segon bloc recopila els resultats de l'aplicació d'aquesta metodologia a l'anàlisi de plantes cultivades en presència de metalls pesants. En un primer treball (**capítol 9**) es consideren plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* cultivades en presència de Hg(II) i en presència simultània de Hg(II) i Cd(II), i

s'avalua la síntesi de fitoquelatines provocada per aquests metalls tòxics. En un segon treball (**capítol 10**) s'avalua la capacitat inductora de fitoquelatines de diversos metalls pesants, com són el Hg(II), el Cd(II) el Pb(II) i l'As(III) i es compara la seva capacitat per induir fitoquelatines. I, en un darrer treball (**capítol 11**), s'estudien plantes contaminades amb Hg de forma natural, procedents de la zona d'Almadén, mundialment coneguda per les mines de Hg.

Cal esmentar que aquesta Tesi opta a la Menció Internacional de Doctorat per haver realitzat una estada de 3 mesos a la Facultat de Farmàcia de la *Université Libre de Bruxelles* (Bèlgica) sota la tutela del Professor Jean-Michel Kauffmann. La temàtica de l'estada efectuada en aquest centre europeu s'emmarca perfectament dins el projecte de tesi, doncs amplia els sistemes de detecció de compostos tiòlics amb la utilització d'elèctrodes de plata. Malauradament, aquest estudi no es va poder acabar degut a la brevetat de l'estada. No obstant això, a la quarta part de la memòria es presenten els resultats obtinguts arrel d'aquesta estada (**capítol 12**).

Finalment, a la cinquena part de la memòria (**V. Conclusions**) es presenten les conclusions generals d'aquesta Tesi i a la sisena i última part (**VI. Bibliografia**) les referències bibliogràfiques consultades.

Els treballs presentats a la memòria de la Tesi són:

1. *Liquid chromatographic analysis of Hg(II) binding by thiol-rich peptides using both UV-vis and electrochemical detection.*
A. Dago, O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban
Journal of Chromatography A 1.216 (2009) 6.752-6.757
2. *Characterization of Hg(II) binding with different length phytochelatin using liquid chromatography and amperometric detection.*
A. Dago, O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban
Analytica Chimica Acta 695 (2011) 51-57

3. *Analysis of phytochelatins and Hg-phytochelatine complexes in Hordeum vulgare plants stressed with Hg and Cd: HPLC study with amperometric detection.*

A. Dago, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban

International Journal of Environmental Analytical Chemistry (2013)

DOI: 10.1080/03067319.2013.864649

4. *Chemometrics applied to the analysis of induced phytochelatins in Hordeum vulgare plants stressed with various toxic non-essential metals and metalloids.*

A. Dago, I. González, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban

Talanta 118 (2014) 201-209

5. *Evaluation of mercury stress in plants from the Almadén mining district by analysis of phytochelatins and their Hg complexes.*

A. Dago, I. González, C. Ariño, A. Martínez-Coronado, P. Higuera, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban

Manuscrit enviat per a la seva publicació

Abstract

The main objective of this Thesis is the separation and detection of molecules of biologic interest that contain thiol groups and their metal complexes in natural and synthetic samples using reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. Phytoremediation technology is based on the use of plants to remove pollutants from the environment or to reduce their toxicity to make them harmless. Plants have different strategies to fight against heavy metal toxicity. Among them, the synthesis of thiol-rich compounds, such as phytochelatins, is the main procedure. Phytochelatins (PCs) are small, cysteine-rich peptides which are synthesised in plants, algae and some fungi in response to heavy metal stress. Phytochelatins are involved in detoxification and homeostasis of heavy metals by chelating these ions through the thiol group in the cytosol and sequestering the metal-PC complexes in vacuoles. This is the reason why the study of complexation of these molecules with heavy metals is of special interest. Among all heavy metals, Hg(II) is selected for the phytochelatin complexation studies due to the stability of the formed complexes, its high toxicity and the harmful effects that it has on health and on environment.

To achieve the overall objective the Thesis is divided into two distinct parts: the first deals with the development of a methodology for the separation and detection of synthetic phytochelatin and their complexes with Hg(II), and the second is dedicated to the application of this methodology to the study of natural samples. For this second part, plants grown in the presence of various heavy metals, either *in vitro* or *in vivo* are selected.

Several methodologies have been developed to analyse phytochelatin and related peptides. Among all, mass spectrometry is the most widely used technique. This Thesis aims to develop a new analytical methodology which combines the HPLC with the electrochemical detection on a glassy carbon electrode as a sensible and cheap technique. With this methodology not only several phytochelatin and related peptides are separated and detected but also their Hg complexes.

In the second part of the Thesis, this methodology has been applied to the study of plants subjected to stress by several toxic metals. First of all, *Hordeum vulgare* plants that have been grown in the presence of Hg(II), or in the simultaneous presence of Hg(II) and Cd(II), have been considered, and the phytochelatin induced by Hg(II) or by both metals have been studied. Likewise, the induction of PCs by different heavy metals has been analysed in *Hordeum vulgare* plants treated with Hg(II), Cd(II), As(III) or Pb(II). Finally, plants from the Almadén mining district have been considered. This zone is known for the largest deposits of mercury in the world yet discovered. For this reason, this study is of special interest since it permits to deep insight into the natural mechanisms that plants have developed to fight against Hg toxicity.

The last chapter presents the work carried out during a 3-month stay at the *Université Libre de Bruxelles* (Brussels, Belgium) under the supervision of Professor Jean-Michel Kauffmann. The work done in this European centre framed perfectly in the Thesis, since it expands the detection of thiol compounds by the use of silver electrodes. Unfortunately, this study could not be finished due to the brevity of the stay. However, the results obtained during this stay are presented and discussed in this Thesis.

As a result of the research carried out in the Thesis, four articles have been published in peer-reviewed journals of significant impact factor and another manuscript is in preparation. These publications form the basis of the work presented herein.

This Thesis is presented as the beginning of a new research line in the group of Electroanalysis dealing with the studies of toxic heavy metal complexation by phytochelatins using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with electrochemical detection. This methodology is presented as a selective, sensitive, simple and economical method developed in parallel to static voltammetric techniques widely used in the research group and as a cheaper alternative to mass spectrometry detection globally used in phytoremediation studies.

In order to allow English readers to understand this Thesis, the main conclusions, in addition to this abstract, have been written in English. Furthermore, the four published papers and the submitted manuscript have been included in their original English version.

Agraïments

Ja ric... i ploro a la vegada. Fa tants dies que espero aquest moment que m'omple d'alegria la seva arribada. L'escriptura dels agraïments no deixa de ser un símbol del final d'una etapa, una etapa de la meua vida de la qual em sento molt orgullosa i satisfeta. No només han estat anys d'esforç i dedicació els que m'han conduït a assolir aquest repte, sinó també el suport i l'empenta de molta gent a la que vull expressar la meua gratitud.

En primer lloc, vull donar les gràcies a la Dra. Cristina Ariño, la directora d'aquesta Tesi, per haver dipositat en mi la confiança necessària per tirar endavant aquest projecte. També vull agrair-li totes les hores destinades, la seva paciència i tot el que m'ha ensenyat i he pogut aprendre a nivell científic, docent i personal. Així mateix, vull agrair al Dr. Miquel Esteban i al Dr. José Manuel Díaz les seves aportacions científiques i l'ajuda proporcionada en la orientació de la investigació.

A tots els companys, presents i passats, del grup d'Electroanàlisi que fan o que han fet que aixecar-se cada matí per venir al laboratori fos molt menys dur: a la Núria

per animar-me dia a dia a seguir endavant, per la seva inestimable ajuda i per totes les bones estones compartides al laboratori; a la Olga per guiar-me en els inicis d'aquest treball i per transmetre'm els seus coneixements; a l'Aris, l'Elena i el Rui per les seves aportacions professionals i morals que m'han ajudat tant; al Santi per les estones de discussions científico-filosòfiques i per "enredar-me" per anar al bar quan necessitava un descans; a la Inma per la seva vitalitat i entusiasme i pel seu esplèndid treball; a la Velia per compartir intenses jornades de feina interminable; i als que han estat de passada al laboratori amenitzant les hores de feina i deixant un inoblidable record. A tots moltes gràcies per poder deixar la vostra feina de banda quan necessitava la vostra ajuda, opinió o col·laboració. He après molt de tots vosaltres.

L'equip de persones que m'han ajudat i amb qui hem col·laborat per fer el treball experimental han estat una peça clau. Gràcies al Pablo Higuera i a l'Alba Martínez de la *Universidad de Castilla-La Mancha* per donar-nos l'oportunitat de treballar amb mostres de la zona d'Almadén i per ajudar-nos sempre que ho hem necessitat; al Toni Padró, la Maite Romero, la Irene Fernández i la Laura Ortiz dels Serveis Científics i Tecnològics de la UB pel seu suport tècnic; al Santi de la Iglesia i a tota la Unitat de Fisiologia Vegetal per cultivar-nos mostres d'ordi i per introduir-nos i guiar-nos en el món del cultiu vegetal.

A la Maria i a l'Andrea, les cosinetes més artistes que tinc, per ajudar-me en el disseny de la portada.

I owe special gratitude to Prof. Jean-Michel Kauffmann from the *Université Libre de Bruxelles* for giving me the opportunity to work in his laboratory and for his hospitality which helped me to feel like at home from the first day. It was an unforgettable time where I learned so much and I acquired great and priceless experience. I am also thankful to all people in the lab who helped me during my stay in Brussels, especially to Ana and Laura for our Spanish dinners and for the large number of unforgettable moments lived and which I hope to repeat someday. I also want to extend my acknowledgement to all my friends I had the chance to meet there.

També vull agrair el suport econòmic de la beca APIF de la Universitat de Barcelona que m'ha permès fer aquesta Tesi amb dedicació completa, així com el suport econòmic dels diversos projectes del *Ministerio de Educación y Ciencia*, del *Ministerio*

de Ciencia e Innovación i del *Ministerio de Economía y Competitividad* (CTQ2006-14385-C02-01/BQU, CTQ2009-09471, CTQ2012-32863) i de la Generalitat de Catalunya (2005SGR00186) als que he participat durant aquests anys.

Hi ha un gran nombre de companys i amics que no han intervingut directament en el treball de laboratori, però sí que han participat del meu dia a dia durant aquests mesos. Moltes gràcies a tota la gent del Departament amb qui he tingut l'oportunitat de treballar, a tots els professors amb qui he coincidit i que han estat una font inesgotable de coneixements i a tots els qui hem compartit les estones de dinar. Aprofito també per agrair a tots els meus amics que tant s'han interessat per la meva feina sempre amb un bon consell; especialment, als companys d'universitat que són els que realment comprenen aquest llarg camí, i en particular a la Noemí, la Glòria i el Jordi pel suport moral rebut en els moments de crisi que han estat imprescindibles perquè això arribés a bon port. I tampoc vull oblidar-me de tots els companys que han passat pel pis i que han contribuït a que la convivència sigui més amena i que d'una manera o altra han aguantat els meus mals de cap i les estones de mal humor.

Aquesta tesi no hagués tingut cap sentit per a mi sense el suport i l'estima de la família i, especialment, dels meus pares i el meu germà. No tinc paraules per expressar l'emoció que tinc mentre escric aquestes línies. Sé que ja ho sabeu. GRÀCIES en majúscules per tot. Us estimo molt. També al Joan, el meu company de viatge, que al llarg d'aquests anys ha tingut molta paciència amb mi, mai m'ha pressionat, ni quan sentia que podia defallir, sempre m'ha deixat seguir el meu pas i no ha deixat d'animar-me en cap moment.

A tots i a totes, moltes gràcies.

Sigles i acrònims

Atomic absorption spectroscopy	AAS	Espectroscòpia d'absorció atòmica
Auxiliary electrode	AE	Elèctrode auxiliar
Cold vapour atomic fluorescence spectroscopy	AFS-CV	Espectroscòpia de fluorescència atòmica de vapor fred
Silver-modified carbon paste electrode	AgCPE	Elèctrode de pasta de carboni modificat amb plata
Anodic stripping voltammetry	ASV	Voltamperometria de redissolució anòdica
United States agency for toxic substances and disease registry	ATSDR	Agència per al registre de substàncies tòxiques i malalties dels Estats Units

Cation exchange capacity	CEC	Capacitat d'intercanvi de cations
Carbon paste electrode	CPE	Elèctrode de pasta de carboni
Composite solid electrode	CSE	Elèctrode sòlid compost
Dropping mercury electrode	DME	Elèctrode de gotes de mercuri
United States Environmental protection agency	EPA	Agència de protecció ambiental dels Estats Units
Electrospray ionization mass spectrometry	ESI-MS	Espectrometria de masses d'ionització per electronebulització
Flow injection analysis	FIA	Anàlisi per injecció en flux
Global positioning system	GPS	Sistema de posicionament global
High molecular weight	HMW	Elevat pes molecular
High performance liquid chromatography	HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
High performance liquid chromatography with electrochemical detection	HPLC-ED	Cromatografia líquida d'alta resolució amb detecció electroquímica
High performance liquid chromatography with ultraviolet detection	HPLC-UV	Cromatografia líquida d'alta resolució amb detecció ultraviolada
Inductively coupled plasma mass spectrometry	ICP-MS	Espectrometria de masses de plasma acoblat inductivament
Inductively coupled plasma optic emission spectroscopy	ICP-OES	Espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament

International union of pure and applied chemistry	IUPAC	Unió internacional de química pura i aplicada
Low molecular weight	LMW	Baix pes molecular
Limit of detection	LOD	Límit de detecció
Limit of quantification	LOQ	Límit de quantificació
Mass spectrometry	MS	Espectrometria de masses
	NCA-CMA	Norma de qualitat ambiental, concentració màxima admissible
	NCA-MA	Norma de qualitat ambiental, mitjana anual
	NGR	Nivell genèric de referència
Principal component analysis	PCA	Anàlisi de components principals
Polyether ether ketone	PEEK	Polièter èter cetona
Polyvinyl chloride	PVC	Clorur de polivinil
Quadrupole mass analyser	Q	Analitzador de masses quadrupolar
Reference electrode	RE	Elèctrode de referència
Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals	REACH	Registre, avaluació, autorització i restricció de substàncies químiques
Reversed phase high performance liquid chromatography	RP-HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució en fase inversa

Sequential extraction procedure	SEP	Procediment d'extracció seqüencial
Static mercury drop electrode	SMDE	Elèctrode de gotes de mercuri estàtiques
Solid phase extraction	SPE	Extracció en fase sòlida
Synthetic precipitation leaching procedure	SPLP	Procediment sintètic de lixiviació per precipitació
Time of flight mass analyser	TOF	Analitzador de masses de temps de vol
United States geological survey	USGS	Departament d'estudis geològics dels Estats Units
Ultraviolet visible	UV-vis	Ultraviolada visible
Working electrode	WE	Elèctrode de treball
World health organisation	WHO	Organització mundial de la salut
Zeeman atomic absorption spectroscopy	ZAAS	Espectroscòpia d'absorció atòmica d'efecte Zeeman

Substàncies

ACN	Acetonitril
AcNH₄	Acetat d'amoni
ADP	Difosfat d'adenosina
ATP	Trifosfat d'adenosina
Cys	Cisteïna
Cys-Gly	Cisteinil-glicina

DMPS	Àcid 2,3-dimercapto-1-propanosulfònic
DMSA	Àcid dimercaptosuccínic
DTNB	Àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic)
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
GCS	Enzim γ -glutamilcisteín sintetasa
Glu	Àcid glutàmic
Gly	Glicina
GS	Enzim glutatió sintetasa
GSH	Glutatió (forma reduïda)
GSSH	Disulfur de glutatió (forma oxidada)
HSP	Proteïnes de xoc
M	Metall
mBrB	Monobromobimane
MeOH	Metanol
M-PC_n	Complex metall-fitoquelatina n (n=2-5)
MTs	Metal·lotioneïnes
NAC	N-acetil-cisteïna
PC_n	Fitoquelatina n (n=2-5)
PCs	Fitoquelatines
PCS	Enzim fitoquelatin sintasa
TFA	Àcid trifluoroacètic
γ-Glu-Cys	γ -Glutamil-cisteïna

Part I

INTRODUCCIÓ

La biosfera és el medi d'hàbitat dels éssers vius que envolta la Terra i inclou les interaccions d'aquests amb la hidrosfera, la litosfera i l'atmosfera terrestre. Així doncs, una adequada preservació del medi ambient és essencial per a la supervivència d'un organisme en un determinat ecosistema.

La contaminació ambiental per metalls pesants va començar possiblement amb el descobriment del foc i ha estat gradualment agreujada fins als alarmants nivells actuals amb el desenvolupament industrial i l'avenç tecnològic de la societat. Els sòls i les aigües contaminades representen un problema important per a la salut humana i el medi ambient que pot ser minimitzat, en algunes circumstàncies, per les plantes gràcies a la fitoremediació. Aquest enfocament rendible basat en la utilització de plantes per a la remediació de sòls contaminats, aprofita la notable capacitat de les plantes per concentrar i metabolitzar els elements i compostos perjudicials per al medi ambient en els seus teixits. La fitoremediació s'aplica bàsicament a la remediació de sòls contaminats amb metalls pesants o amb contaminants orgànics. En el cas dels metalls pesants, la presència d'aquests a les plantes indueix la síntesi de fitoquelatines que són uns pèptids sintetitzats a partir del glutatió. És per això que els processos de complexació de les fitoquelatines amb els metalls pesants juguen un paper important en l'homeòstasi de les plantes en presència d'aquests elements.

Malgrat els avantatges aparents de la fitoremediació, es continua investigant en el camp per tal de, per una banda, conèixer els processos implicats en aquest procés i, per altra, seleccionar les varietats de plantes més eficients per a cada tipus de contaminant i optimitzar així els procediments agronòmics utilitzats per cultivar-les. Una altra millora a llarg termini seria poder aïllar i modificar els gens de diverses plantes o bacteris per augmentar l'acumulació de metalls o la degradació de contaminants orgànics. Tanmateix, només el futur dirà si la fitoremediació es convertirà en una tecnologia àmpliament acceptada o no. Això no obstant, està clar que la utilització de la propietat que les plantes tenen per acumular elements i compostos perjudicials per al medi ambient i per dur a terme transformacions bioquímiques s'està convertint en una part important de la biologia vegetal.

Els metalls pesants

1.1. L'home i la industrialització

L'home ha fet grans passos cap al desenvolupament industrial i de la civilització que han millorat sens dubte les condicions i les comoditats de la vida humana. Però inconscientment, en el procés, ha trencat l'equilibri fonamental del medi ambient establert per la naturalesa des de fa més de 3.500 milions d'anys. L'activitat humana i els consegüents desenvolupaments han provocat la degradació de gairebé tots els factors de l'entorn natural, ja siguin físics, químics, biològics o socials. Paradoxalment, la qualitat de vida està essent negativament afectada a través dels mateixos mitjans que estan destinats a millorar-la. Afortunadament, la consciència sobre els problemes ambientals està creixent a tot el món i la preocupació mundial sobre els riscos de salut involucrats i la necessitat d'adoptar mesures preventives està en augment. Durant el procés d'evolució, els organismes han desenvolupat la seva bioquímica en estreta relació amb la composició de l'ambient extern. No obstant això, tant l'home com els animals són incapaços d'adaptar-se fàcilment a canvis sobtats en la composició química del seu entorn.

La contaminació mediambiental, especialment per substàncies químiques, és un dels factors més efectius en la destrucció dels components de la biosfera. La

concentració i el model de distribució dels elements en un ecosistema és especialment important. Dels 114 elements coneguts segons la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC), 89 pertanyen al grup dels metalls, 7 als metal·loides (semi-metalls) i 18 als no-metalls. Els metalls a més de ser el grup més nombrós, són els més tòxics perquè un cop introduïts a l'ecosistema, no poden ser fàcilment eliminats i són una amenaça durant molts anys. Entre tots els contaminants químics de sòls i aigües subterrànies, una de les categories més preocupants i, desafortunadament, la categoria més abundant és la que engloba els metalls pesants (Figura 1). Els metalls pesants són presents en una gran varietat de formes: com a ions, compostos i complexos, ja sigui en el medi aquàtic, aerí o terrestre.

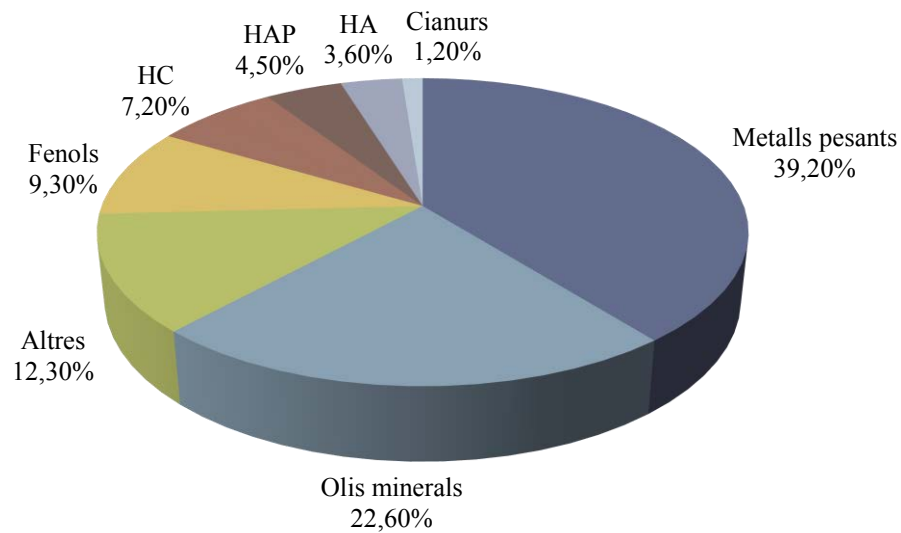


Figura 1. Visió general dels principals contaminants de sòls i aigües subterrànies a Europa al 2009. HC: hidrocarburs clorats; HAP: hidrocarburs aromàtics policíclics; HA: hidrocarburs aromàtics (adaptat de [1]).

El desenvolupament i l'increment de la mineria i l'activitat industrial han augmentat la concentració de metalls al medi ambient; incrementant, a la vegada, les probabilitats de l'exposició humana mitjançant la ingesta, la inhalació o el contacte amb la pell. A més a més, els animals i les plantes, que són la principal font d'energia per als éssers humans, també estan exposats a altes concentracions de metalls pesants de l'aire, l'aigua i el sòl.

1.2. Terminologia

El terme “metall pesant” es relaciona sovint amb metalls que són tòxics. A primera vista, definir un “metall pesant” semblaria ser una qüestió bastant simple que seria un metall que és “pesat”. Malauradament, un examen més a fons revela una gran quantitat de problemes amb aquesta simple definició. Aquest concepte pretén suggerir que la densitat d'un metall pesant és alta, però aquesta propietat física té poc sentit en el context de la toxicitat en plantes i altres organismes vius [2, 3].

Els metalls un cop incorporats als teixits de plantes i animals entren a la cadena tròfica, i per tant als aliments, que constitueixen una de les principals vies a través de les quals arriben a l'ésser humà. En el cas de les plantes, aquestes no interaccionen amb els metalls en les seves formes elementals (valència 0), sinó que ho fan amb les que estan dissoltes a la solució de sòl ja sigui en forma iònica o formant compostos amb altres espècies. Quan aquest compost químic es forma (per exemple una sal), la densitat del metall no juga cap paper, en canvi el caràcter iònic podria ser de més interès. No es coneix cap correlació entre la densitat d'un metall i els seus efectes fisiològics o toxicològics, o fins i tot les propietats químiques dels compostos. A més, no tots els metalls d'elevada densitat són especialment tòxics a concentracions normals, alguns d'ells fins i tot són necessaris per a l'ésser humà.

Els metalls sovint es caracteritzen i es distingeixen dels no-metalls per les seves propietats físiques: l'habilitat per conduir el calor i la resistència elèctrica, que és directament proporcional a la temperatura, la mal·leabilitat, la ductilitat i, fins i tot, la brillantor. Aquestes propietats, especialment la conductivitat, ens permeten definir què és un metall a diferència dels no-metalls i metal·loides. És ben sabut que les propietats dels elements químics es poden determinar a partir de les seves posicions a la taula periòdica dels elements. En general, els elements químics poden resultar més metàl·lics a mesura que avancem cap a l'extrem inferior esquerre de la taula i no-metàl·lics cap a l'extrem superior dret (Figura 2). En altres paraules, el caràcter metàl·lic disminueix d'esquerra a dreta i des de la part inferior a la part superior de la taula. Els metal·loides (elements amb propietats intermèdies entre els metalls i els no-metalls) es troben prop de la frontera diagonal entre metalls i no-metalls a la taula periòdica. Per altra banda, un element es pot classificar d'acord amb l'última subcapa electrònica del seu àtom. Així doncs, hi ha el bloc *s*, els elements del qual es poden subdividir en elements alcalins

(primer grup) i alcalinoterris (segon grup). Tots els elements del bloc *s* són metalls a excepció de l'hidrogen (el primer element del primer grup). El primer element del segon grup, el beril·li, també és especial (els seus òxids són amfòters), però tot i això es considera un metall. El bloc *d* (elements de transició) està íntegrament format per metalls. Molts d'ells formen compostos amb diferents estats d'oxidació, que és un factor important en la seva toxicitat. Alguns dels òxids d'elements de transició tenen propietats lleugerament amfòters, però tot i així encara són considerats metalls. Després hi ha els elements del bloc *f*, també coneguts com les terres rares, que es subdivideixen en la sèrie dels lantànids (incloent el lantani) i la sèrie dels actínids (incloent l'actini). Tots aquests elements de terres rares són també metalls i per això s'anomenen metalls de terres rares. El següent grup, el bloc *p*, es troba cap al costat dret de la taula periòdica i per tant, constitueix un grup mixt de metalls, metal·loides i no-metalls. Aquest inclou els elements del grup tretze al disset de la taula periòdica, però exclou els gasos nobles (el grup divuit). Els membres metàl·lics d'aquest grup inclouen el gal·li, l'indi, el tal·li, l'estany, el plom, l'antimoni, el bismut, el tel·luri i el poloni. Tots ells (excepte el bismut) formen òxids amfòters. El silici, el germani, l'arsènic i el tel·luri són considerats metal·loides, de vegades el bor, l'antimoni i el poloni també s'hi inclouen (Figura 2) [3].

Grup → ↓ Període	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1 H	Bloc s	Bloc d										Bloc p					2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba		72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra		104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
Lantànids			57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu	
Actínids			89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr	
Bloc f																		

Figura 2. Taula periòdica dels elements.

Així doncs, tot i que no hi ha una definició universal acceptada, generalment s'anomenen “metalls pesants” els metalls amb una elevada electronegativitat, una densitat superior a 5 g cm^{-3} i que presenten una toxicitat elevada [2]. Sovint aquesta definició pot incloure algun lantànid o actínid o algun metal·loide com ara l'arsènic, que tot i ser força lleuger i de caràcter semi-metàl·lic, s'engloba en el grup dels metalls pesants degut als seus efectes químic-ecològics semblants als dels metalls pesants. Tampoc hi ha un llistat oficial de tots els elements considerats metalls pesants, això no obstant, l'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units (EPA) inclou a la llista dels metalls pesants més comuns l'arsènic, el cadmi, el coure, el crom, el mercuri, el níquel, el plom i el zinc, entre d'altres [4]. Tots els metalls pesants tenen una mida catiònica relativament petita degut al seu pesat nucli i als electrons cada vegada més comprimits. Aquesta “set d'electrons” fa que molts d'ells anhelin els electrons lliures de la capa externa del sofre, formant sulfurs com el de plom, zinc, coure o mercuri o bé els impedeix cedir electrons als elements acceptors d'electrons com ara l'oxigen (oxidació) i preservar la seva “noblesa” com l'or, el platí o la plata. És aquesta afinitat dels metalls pesants pel sofre que amenaça la formació de ponts disulfur entre proteïnes als organismes vius.

Sovint el concepte de metall pesant es creua amb el de metall traça o metall tòxic perquè alguns dels membres d'aquests grups són metalls pesants. Això no obstant, no tots els metalls pesants es troben en concentracions traça (per exemple el Mn, el Fe o l'Al, tot i ser metalls, formen part dels elements majoritaris que constitueixen els sòls) i no tots els metalls pesants són tòxics (per exemple, el Fe, el Co o el Zn són necessaris per als organismes vius en petites concentracions).

1.3. Legislació de metalls pesants

El que s'ha exposat anteriorment posa de manifest la creixent preocupació que ha suscitat en les últimes dècades a nivell mundial, el problema de la contaminació. Segons la Unió Europea (Directiva 2008/1/CE) es defineix la contaminació com “la introducció directa o indirecta, mitjançant l'activitat humana, de substàncies, vibracions, calor o soroll a l'atmosfera, l'aigua o el sòl que puguin tenir efectes perjudicials per a la salut humana o per a la qualitat del medi ambient, o que puguin causar danys als béns

materials o deteriorar o perjudicar el gaudiment o altres utilitzacions legítimes del medi ambient” [5]. L’objectiu d’aquesta directiva és la prevenció i la reducció de la contaminació procedent d’unes activitats determinades, mitjançant la reducció de les emissions a l’atmosfera, l’aigua o els sòls. Entre els principals agents contaminants podem trobar la categoria de “metalls i els seus compostos”, encara que no s’estableix un límit d’emissions.

Pel que fa a l’aigua, la Directiva 2008/105/CE del Parlament Europeu i del Consell de la Unió Europea relativa a les normes de qualitat ambiental en l’àmbit de la política de l’aigua [6], estableix les normes de qualitat ambientals (NCA) per a les substàncies prioritàries i per altres contaminants. A la Taula 1 es relacionen tots els metalls pesants que apareixen en l’esmentada directiva.

Taula 1. Normes de qualitat ambiental en aigües establides per la Directiva 2008/105/CE per als metalls pesants [6]. Els valors s’expressen en $\mu\text{g L}^{-1}$.

Substància	Aigües superficials continentals ^a		Altres aigües superficials	
	NCA-MA ^b	NCA-CMA ^c	NCA-MA ^b	NCA-CMA ^c
Cadmi i els seus compostos ^d	0,25	1,5	0,2	1,5
Mercuri i els seus compostos	0,05	0,07	0,05	0,07
Níquel i els seus compostos	20	NA ^e	20	NA ^e
Plom i els seus compostos	7,2	NA ^e	7,2	NA ^e

^a Les aigües superficials continentals comprenen els rius, llacs i altres masses d’aigua artificials.

^b NCA-MA: Norma de qualitat ambiental expressada com a mitjana anual.

^c NCA-CMA: Norma de qualitat ambiental expressada com a concentració màxima admissible.

^d Els valors de cadmi i els seus compostos varien en funció de la duresa de l’aigua. A la taula es mostren només els valors màxims que corresponen a aigües molt dures ($\geq 200 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$).

^e NA: No aplicable. Es considera que els valors de NCA-MA protegeixen contra els pics de contaminació.

Per a l’aigua potable, a Espanya existeix el Reial Decret 140/2003 del Ministeri de Presidència que estableix els criteris sanitaris de la qualitat de l’aigua per al consum humà i de les instal·lacions que en permeten el subministrament [7]. A la Taula 2 es mostren els valors dels paràmetres químics referents als metalls pesants. Aquests valors contrasten amb els recomanats per la Organització Mundial de la Salut (WHO) a la “Guia sobre la qualitat de l’aigua de consum” [8] on s’estableixen els valors guia per a

les substàncies químiques que són significants per a la salut en aigües de consum (Taula 2). A la normativa espanyola, generalment els valors per a tots els metalls són inferiors o iguals als recomanats per la WHO excepte el cadmi.

Taula 2. Valors guia per als metalls pesants en aigües de consum establerts pel Reial Decret 140/2003 i per la Organització Mundial de la Salut a la “Guia sobre la qualitat de l’aigua de consum” [7, 8]. Els valors s’expressen en $\mu\text{g L}^{-1}$.

Element químic	Valor Reial Decret 140/2003	Valor guia WHO
Arsènic	10	10 ^{a,b}
Cadmi	5	3
Coure	2	2.000
Crom	50	50 ^c
Mercuri	1	6
Níquel	20	70
Plom	10	10 ^{a,b}
Seleni	10	40 ^c

^a El valor guia calculat és inferior al límit de quantificació del mètode analític.

^b El valor guia calculat és inferior al nivell que es pot aconseguir mitjançant la tecnologia de tractament.

^c Hi ha incerteses científiques significatives respecte al valor guia.

Pel que fa als sòls, a Espanya s’està duent a terme un important pla d’acció nacional. A partir del 1991 el Ministeri d’Obres Públiques Transports i Medi Ambient va començar la realització d’un primer Inventari d’Espais Contaminats que, abastant tot el territori, servís d’aproximació inicial. L’inventari nacional tenia com a objectius la identificació, sota l’experiència dels països pioners en aquest camp, de les activitats potencialment contaminants per generar residus tòxics i perillosos i dels emplaçaments presumptament contaminats per aquests, així com també la caracterització *in situ* d’un nombre determinat de llocs contaminats, l’avaluació tècnica i econòmica dels sistemes de tractament i de les necessitats d’infraestructures i la instauració de programes d’actuació a curt, mitjà i llarg termini [9]. El primer inventari va servir a més, per demostrar la urgència de continuar investigant i caracteritzant nous emplaçaments i, en aquesta línia, es va procedir a la seva ampliació.

Així doncs, al 1995 es va posar en marxa el “*Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados*” que duraria fins al 2005 [9] amb els objectius de preveure la contaminació, continuar amb la identificació de sòls contaminats i amb la caracterització de 1.650 emplaçaments identificats anteriorment, recuperar 275 sòls caracteritzats, desenvolupar tecnologies de recuperació de sòls i elaborar normes específiques a nivell estatal. Els resultats d’aquest estudi es van publicar al Reial Decret 9/2005 que estableix la relació d’activitats potencialment contaminants del sòl i els criteris i estàndards per a la declaració de sòls contaminats [10].

Es defineix nivell genèric de referència (NGR) com “la concentració d’una substància contaminant al sòl que no comporta un risc superior al màxim acceptable per a la salut humana o els ecosistemes”. La normativa inclou un llistat dels NGR per a certes substàncies orgàniques i estableix que les comunitats autònomes els puguin estendre, de forma justificada, a altres substàncies no incloses. La formulació general dels NGR per a substàncies de naturalesa orgànica presents a la mencionada normativa, es deu a què en la majoria dels casos són substàncies originades per l’activitat humana i, per tant, la seva presència als sòls és deguda gairebé sempre a algun tipus de procés contaminant. No obstant això, al parlar de contaminants geogènics, com els metalls pesants, la valoració dels NGR és molt més complexa, atès que no existeix necessàriament una relació causa-efecte entre la presència d’aquests metalls als sòls i l’existència d’un episodi de contaminació degut a l’activitat humana. A més, la distribució de la concentració dels metalls en sòls, resulta fortament dependent del substrat geològic que es consideri, per això pot variar en gran mesura d’una zona geogràfica a una altra. A Catalunya s’han definit els NGR per als metalls i metal·loides tant per a la protecció dels ecosistemes com per a la protecció de la salut humana i pels diferents usos del sòl [11, 12] (Taula 3).

Continuant amb la recuperació de sòls contaminats, actualment s’està duent a terme el “*II Plan Nacional de Suelos Contaminados*” que comprèn el període des del 2008 fins al 2015 i s’engloba dins el “*Plan Nacional Integrado de Residuos 2008-2015*” [13].

Taula 3. Nivells genèrics de referència (NGR) a Catalunya per als metalls pesants i metal·loides en sòls per a la protecció dels ecosistemes [11] o per a la protecció de la salut humana [12], en funció dels usos del sòl. Els valors s'expressen en mg kg⁻¹.

Element	Protecció dels ecosistemes		Protecció de la salut humana		
	Zona agropecuària i forestal	Altres zones	Ús industrial	Ús urbà	Altres usos
Antimoni	6,0	6,0	30	6	6
Arsènic	30	30	30	30	30
Bari	500	270	1.000	880	500
Beril·li	10	4,5	90	40	10
Cadmi	2,5	0,6	55	5,5	2,5
Cobalt	25	25	90	45	25
Coure	90	55	1.000	310	90
Crom(III)	400	85	1.000	1.000	400
Crom(VI)	1,0	1,0	25	10	1
Estany	50	7	1.000	1.000	50
Mercuri	2,0	2,0	30	3	2
Molibdè	3,5	3,5	70	7	3,5
Níquel	45	45	1.000	470	45
Plom	60	60	550	60	60
Seleni	0,7	0,5	70	7	0,7
Tal·li	1,5	1,5	45	4,5	1,5
Vanadi	135	135	1.000	190	135
Zinc	170	110	1.000	650	170

Finalment, per a la qualitat ambiental existeix el Reial Decret 102/2011 relatiu a la millora de la qualitat de l'aire que estableix objectius de qualitat de l'aire respecte a concentracions de diverses substàncies, regula l'avaluació, la qualitat i la millora de l'aire en relació a les substàncies anomenades i estableix mètodes i criteris comuns per avaluar-les [14]. Així doncs, en aquest Reial Decret es determinen els valors límit d'alguns metalls per a la protecció de la salut en condicions ambientals, més concretament de l'arsènic, el cadmi i el plom (Taula 4). Aquests valors els podem

comparar amb els subministrats per la WHO a la “Guia per a la Qualitat de l’Aire a Europa” on s’estableix uns valors guia per alguns metalls pesants per sota dels quals no hi ha risc per a la salut per inhalació [15].

Taula 4. Valors límit per als metalls pesants en l’ambient establerts pel Reial Decret 102/2011 [14] i per la Organització Mundial de la Salut a la “Guia sobre la qualitat de l’aire a Europa” [15]. Els valors s’expressen en $\mu\text{g m}^{-3}$.

Element	Valor límit Reial Decret 102/2011	Valor guia WHO
Arsènic	6	ND ^a
Cadmi	5	0,3
Mercuri	-	1
Plom	0,5	0,5

^a No es defineix un nivell segur per inhalació.

1.4. Els metalls pesants a la biosfera

La biosfera és el medi d’hàbitat dels éssers vius que envolta la Terra i conté la part superficial de la litosfera, la part més baixa de l’atmosfera i la hidrosfera. Molts dels nutrients minerals essencials per als organismes vius són subministrats bàsicament pel sòl de les capes superficials de la litosfera. L’atmosfera és la font de només alguns nutrients essencials (N_2 , O_2 i CO_2) i la hidrosfera és l’origen principal de l’aigua.

La major part de la matèria orgànica està formada principalment per compostos orgànics i aigua, és a dir, dels elements químics C, H, O i N. Altres elements com ara K, P, Ca, Mg, S, Na i Cl són presents als organismes vius en proporcions més petites i variables. Tots aquests elements són fàcilment mòbils a la biosfera i poden formar compostos volàtils o solubles que són incorporats als principals cicles ambientals [16].

Els organismes vius, per tal de sobreviure amb la complexa composició geoquímica de la biosfera, han desenvolupat mecanismes per seleccionar els elements involucrats en els processos vitals i per rebutjar els excessos tòxics d’altres elements. Aquests processos són fonamentals per l’homeòstasi, que és un requisit principal per a la supervivència dels organismes. Encara que tots els organismes vius mostren una

habilitat natural per a la selecció dels elements químics, també són altament dependents de la geoquímica que els envolta. Qualsevol factor mediambiental que tingui un efecte advers sobre els éssers vius pot causar un canvi dràstic o evolutiu posant en perill la vida de l'espècie. Així doncs, una preservació del medi ambient és essencial per a la supervivència d'un organisme en un determinat ecosistema [16].

És molt difícil definir uns nivells basals de metalls a la biosfera en general, ja que, com s'ha vist anteriorment, depenen fortament de la composició natural del terreny i també de les activitats industrials que s'hi desenvolupen, fent inapropiat l'ús universal de concentracions basals de referència. A més, degut al transport aeri de contaminants metàl·lics a llarga distància, especialment dels elements volàtils com ara As, Se, Sb o Hg, l'estimació dels nivells basals per alguns elements traça és especialment difícil. Així doncs, per definir aquestes concentracions parlarem d'una zona concreta i d'un temps definit.

1.5. Fonts de contaminació de metalls pesants

La contaminació ambiental per metalls pesants va començar possiblement amb el descobriment del foc i ha estat gradualment agreujada fins als actuals nivells alarmants amb el desenvolupament industrial i l'avenç de la societat. La societat moderna utilitza molts béns i serveis que impliquen una gamma creixent de productes metàl·lics. L'alt consum i la freqüent eliminació i substitució d'articles d'un sol ús estan generant diversos tipus de deixalles metàl·liques. Aquests residus són invariablement abocats al medi ambient i per tant estan enverinant la biosfera. El medi ambient ens afecta a tots en l'aire que respirem, la terra on vivim, l'aigua i el menjar que prenem per mantenir les nostres vides, etc. Per tant, és inevitable l'exposició als metalls pesants. Encara que la concentració de metalls pesants al medi ambient és força variable, hi ha zones amb valors altament anòmals causats per fonts naturals o antropogèniques.

1.5.1. Fonts naturals

Les principals fonts naturals de metalls pesants són els minerals i les roques. Els processos geoquímics que originen les roques determinen el seu contingut de metalls pesants. En les roques magmàtiques, alguns metalls pesants, com ara Co, Ni, Zn o Cr,

són incorporats com a elements traça a l'estructura dels minerals primaris formats durant el refredament del magma per substitució isomòrfica de Fe i Mg. Per exemple, el crom cristal·litza en el mineral cromita (FeCr_2O_4), o el níquel en la forsterita ($\text{Mg}_2[\text{Ni}]\text{SiO}_4$). La majoria dels metalls pesants però, es concentren en els fluids residuals calents que es formen en les últimes etapes de la diferenciació del magma. Aquests fluids poden infiltrar-se a les roques circumdants donant lloc a diverses reaccions químiques entre els fluids hidrotermals i aquestes roques, i els minerals formats precipiten com a menes. El mercuri, per exemple, precipita com a cinabri (HgS), l'arsènic com a arsenopirita (FeAsS), el plom en la galena (PbS), el zinc en l'esfalerita (ZnS) i el coure en la calcopirita (CuFeS_2), entre d'altres. A més, alguns metalls poden substituir altres elements en l'estructura cristal·lina, com és el cas del cadmi que pot substituir el zinc en l'esfalerita ($\text{Zn}[\text{Cd}]\text{S}$).

L'alteració dels minerals en les condicions superficials de la Terra afavoreix l'enriquiment de metalls pesants a les roques sedimentàries. Les més abundants són les argil·lites, constituïdes majoritàriament per minerals secundaris del grup de les argiles. Les argiles incorporen elements com el Fe, Zn, Cr i Mn al substituir l'Al dels octaedres, i a més, absorbeixen grans quantitats de Cu, Co, Mn, Ni i Zn gràcies a la seva gran superfície específica. L'adsorció o la complexació de metalls pesants amb la matèria orgànica, en ambients deposicionals reduïts rics en restes orgàniques, és una de les principals causes de concentració elevada de metalls pesants en les roques típiques d'aquests ambients sedimentaris. Finalment, les roques metamòrfiques, formades en diferents condicions de pressió i temperatura, tenen pràcticament els mateixos continguts de metalls pesants que les roques a partir de les quals es formen.

La formació del sòl a partir del material parental comprèn dos etapes. La primera és l'alteració dels constituents minerals de la roca mare per mitjà de processos físics i químics de desgast (litogènesi). La segona etapa (pedogènesi) comprèn la formació del perfil de sòl a partir de la roca desgastada, com a resultat de diversos processos com ara l'addició o la pèrdua de matèria orgànica o minerals dels sòls, la transformació o el transport d'aquests materials verticalment o horitzontalment en el sòl. Els processos de desgast i de pedogènesi són simultanis i sovint es troben interrelacionats i és per això que moltes vegades no es poden distingir. En aquests processos, els minerals solubles són dissolts per interacció amb l'àcid carbònic i l'aigua, mentre que els minerals relativament insolubles com ara el quars (SiO_2) es desintegren en petites partícules. El

resultat final d'aquest desgast dóna lloc al què coneixem com a sòl. El sòl és un dels elements clau en tots els ecosistemes terrestres. Proveeix dels nutrients necessaris per a la vida vegetal i és essencial per a la degradació i la transferència de biomassa. El sòl és un medi heterogeni molt complex que consisteix en diferents fases sòlides (la matriu del sòl) que contenen minerals i matèria orgànica, i fases fluides (l'aigua i l'aire intersticials) que interaccionen entre elles. La formació del sòl o pedogènesi és influenciada per factors climàtics (principalment la temperatura i les precipitacions), la vegetació i els organismes vius del sòl, la topografia, el tipus de roca mare, el temps de desgast o d'interacció i les activitats antropogèniques (com ara la contaminació, la degradació o el cultiu). Durant el desenvolupament dels sòls es formen diferents capes o horitzons que composen el perfil del sòl. La Figura 3 mostra els principals horitzons que es formen en una zona climàtica temperada.

La primera capa s'anomena horitzó O, és l'horitzó orgànic (o humus) i consisteix principalment en matèria orgànica descomposta com ara fulles, branques i altres substàncies húmiques. El subjacent horitzó A és, per definició, un horitzó que conté a la vegada minerals i matèria orgànica. És resultat principalment de la lixiviació per filtració d'aigua de pluja i d'una mescla mecànica feta pels organismes vius dins del sòl (cucs, insectes...) o per la llaurada en sòls cultivats. L'horitzó E apareix per la pèrdua d'argila, ferro o matèria orgànica per lixiviació i es reconeix per la concentració d'elements més gruixuts, en particular de sorres i llims. El seu color és sovint més clar. L'horitzó B és un horitzó enriquit o horitzó al·luvial. S'enriqueix de diversos constituents, com ara argila, elements químics dissolts (ferro, calci, magnesi i altres metalls pesants), matèria orgànica, etc. L'horitzó B es caracteritza per un ampli contingut de minerals argilosos i oxihidròxids de ferro, que són capaços d'absorbir metalls pesants. Aquest horitzó és també la font principal de nutrients per a les plantes. Finalment, l'horitzó C es compon de roca mare parcialment erosionada, i és sota seu on es troba la roca mare inalterada. D'acord al tipus de roca mare, el clima, el temps i els organismes del sòl, la composició del sòl varia en una forma molt extensa. La composició química i les concentracions naturals o geogèniques de metalls pesants varien significativament d'una àrea a una altra. Si un sòl deriva del basalt, per exemple, estarà enriquit en crom, cobalt i níquel, a diferència d'un sòl de granit que tindrà menys proporció d'aquests elements. Hi ha tres components bàsics que són clau per les

propietats característiques d'un sòl: la matèria orgànica, els minerals argilosos i els òxids de ferro, alumini i manganès [17].

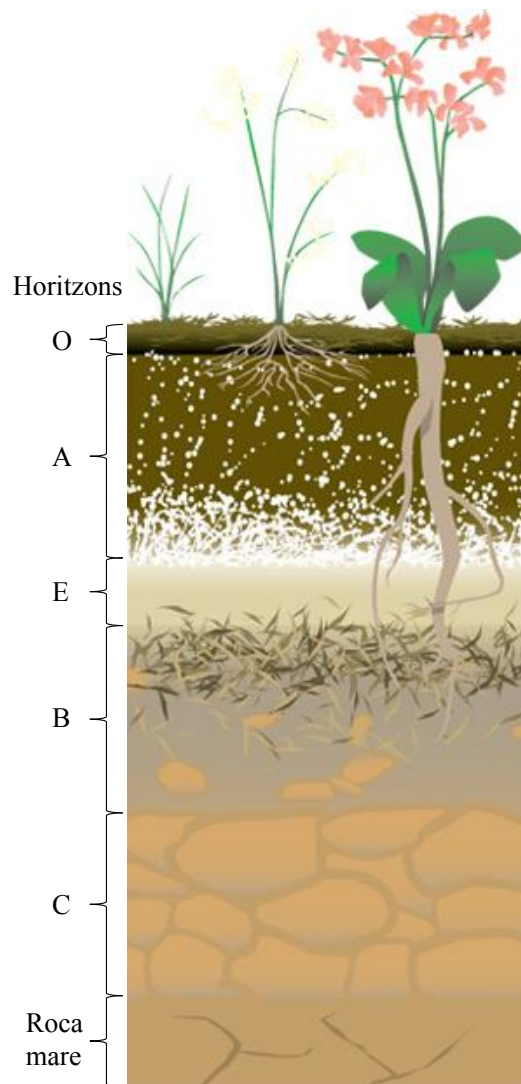


Figura 3. Principals horitzons del sòl que es desenvolupen en una zona humida i temperada (adaptat de [18]).

També podem trobar fonts naturals de metalls pesants en l'aire com poden ser les partícules de pols de les emissions volcàniques, les gotes d'aigua que s'evaporen dels oceans, l'erosió del sòl o de les roques i els incendis forestals. La biodegradació dels animals morts i de les plantes també contribueix significativament a l'augment dels nivells de metalls en aigües i sòls. En aigua, la contaminació natural per metalls pesants es produeix bàsicament mitjançant el transport d'aquests metalls dissolts procedents del desgast, l'erosió o la lixiviació dels sòls i les roques.

1.5.2. Fonts antropogèniques

Malgrat la presència natural de metalls pesants a la biosfera, l'home és el major contribuïdor a la contaminació d'aquest tipus. Els metalls pesants poden ser alliberats al medi ambient per moltes fonts antropogèniques, entre les quals s'hi troben les activitats agrícoles, on els fertilitzants, els adobs naturals i els plaguicides que contenen metalls són àmpliament utilitzats. El fet que la població mundial estigui en constant creixement requereix un ús més intensiu de la terra per a la producció d'aliments que implica la utilització repetida i excessiva de fertilitzants, pesticides i esmenes del sòl. Aquests suplementos normalment contenen metalls pesants com ara cadmi o zinc en els fertilitzants i coure, arsènic, plom, mercuri o zinc en els pesticides. Altres sòlids com ara els llots de depuradora o els residus animals també són utilitzats en la millora de les qualitats dels sòls ja que incrementen el contingut de nutrients i de matèria orgànica però, en contrapartida, també aporten metalls pesants procedents dels abocaments al sistema de tractament d'aigües residuals, en el cas dels llots de depuradora o dels suplementos administrats als animals, en els fems i residus animals [19]. En general es considera que la mobilitat dels metalls pesants en els sòls es molt baixa, quedant acumulats en els primers centímetres de sòl. La lixiviació als horitzons subsuperficials és, per tant, molt petita. És per això que la presència d'altres concentracions en l'horitzó superficial seguida d'un dràstic descens als pocs centímetres de profunditat és un bon criteri de diagnòstic de contaminació antròpica.

Generalment, les activitats metal·lúrgiques i de producció d'energia són la principal font antropogènica de metalls pesants a la biosfera. Les principals activitats industrials mitjançant les quals els metalls pesants són introduïts al medi ambient són la mineria, la combustió del carbó i l'eliminació de deixalles (Figura 4).

Mineria

La mineria metal·lica s'ha practicat des de temps ancestrals. La mina més antiga reportada als registres arqueològics és *Lion Cave* a Swazilàndia (Àfrica). Fa quaranta-tres mil anys, els homes del Paleolític excavaven aquesta mina en busca d'hematites, mineral de ferro, que extreien per produir un pigment ocre.

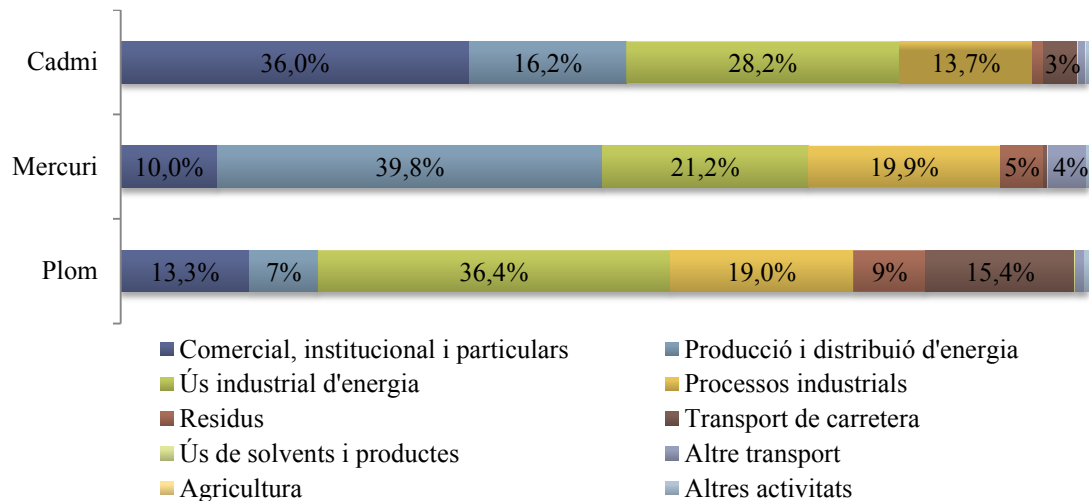


Figura 4. Contribució dels diferents sectors a les emissions de cadmi, mercuri i plom a Europa al 2012 (adaptat de [20]).

Això no obstant, es creu que el coure és un dels primers metalls en ser utilitzat ja que pot trobar-se a la naturalesa en estat natiu. Els primers registres del tractament metal·lúrgic de minerals per a la seva obtenció daten del mil·lenni V a. de C. S'han trobat proves d'exploració de mines de carbonats de coure tant a Tràcia (Europa meridional) com a la península del Sinaí (Egipte). A la península ibèrica existeixen les mines de Rio Tinto (Huelva) des del temps de les primeres civilitzacions de l'època pre-romànica [21]. El desenvolupament de la mineria i la metal·lúrgia ha estat un fet tan important que ha marcat la història de la humanitat en el què anomenem l'Edat dels Metalls, que engloba l'Edat del Coure (a Europa a partir de l'any 4000 a. de C.), l'Edat del Bronze (que s'inicia al 2000 a. de C.) i l'Edat del Ferro (que s'inicia pels volts de l'any 1000 a. de C.).

Però és a partir del segle XIX amb la revolució industrial que la metal·lúrgia s'expandeix ràpidament i el desenvolupament i la millora de la maquinària i dels mètodes d'extracció van donar lloc a les produccions a gran escala. Aquesta industrialització de la mineria ha contribuït de manera important a la pèrdua dels ecosistemes, degut a l'aportació d'elevades quantitats de substàncies tòxiques al medi ambient.

Les activitats mineres afecten àrees relativament petites, però poden tenir un gran impacte local en el medi ambient. Durant el procés d'extracció de metalls dels minerals, es produeixen gran quantitat de residus de roca (ganga) que encara contenen traces de

metalls pesants que no han estat extrets de la mena. Les roques residuals se solen emmagatzemar com a residus miners o despulles de roca, però les condicions àcides poden mobilitzar els metalls pesants de la roca de rebuig.

L'alliberament de metalls dels jaciments miners es produeix principalment a través del drenatge àcid de les mines i de l'erosió dels abocadors i dipòsits de deixalles tòxiques de subproductes. Aquesta mobilització pot causar greus problemes ambientals i de salut a través de la respiració, per beure i cuinar amb aigua contaminada i per menjar aliments cultivats en sòls influenciats pel reg. Quan aquests lixiviats arriben als rius, es produeix una dispersió dels metalls, tant en solució com en forma de partícules. L'erosió dels dipòsits de residus miners o l'abocament directe de subproductes tòxics als rius produeix la introducció dels metalls als ecosistemes aquàtics. La fosa o la trituració dels minerals provoca l'alliberament de metalls a l'atmosfera no només a escala local sinó també a desenes o centenars de quilòmetres de distància [22].

Combustió del carbó i del petroli

L'ús de combustibles fòssils per generar energia elèctrica contribueix en gran mesura a l'alliberament de metalls pesants al medi ambient, especialment a l'atmosfera. Només un terç de la cendra volant es recicla mitjançant el seu ús per a la fabricació de ciment, formigó de barreja ceràmica, etc. El tipus i la concentració de metalls pesants als residus de carbó depèn de diversos paràmetres com ara la composició de la matriu de carbó, les condicions durant la combustió, l'eficiència dels dispositius de control d'emissions, l'emmagatzematge i el maneig dels subproductes i el clima. Els metalls pesants més habituals en els residus de carbó són l'arsènic, el cadmi, el molibdè, el seleni i el zinc. Les centrals tèrmiques de combustió de petroli són fonts d'emissió de plom, níquel i vanadi als sòls.

Anys enrere, la gasolina contenia additius amb grans quantitats de Pb que s'alliberaven a l'atmosfera per la crema de combustibles per al transport. L'ús de combustibles fòssils, fusta o biomassa per a la calefacció són també una via d'introducció de metalls pesants procedents de la combustió. A la llum d'una població humana en creixement i d'una major necessitat d'energia, l'alliberament de metalls pesants derivats d'aquestes activitats continuarà produint-se.

Ambients interiors i urbans

Les grans ciutats i zones urbanes estan creixent constantment arreu del món. Aquestes àrees es caracteritzen per una densitat de població molt alta, un consum excessiu d'energia i una gran varietat d'activitats industrials i de transport. El resultat d'aquests factors és una contaminació ambiental extrema.

L'aire dels ambients interiors és sobretot contaminat amb compostos orgànics volàtils i gasos dels teixits, revestiments de sòls, colorants, pesticides, refrigerants i combustibles per a calefacció. Les canonades de plom fabricades antigament i les pintures que contenen plom es poden afegir als nivells elevats de plom a què estan sotmesos els éssers humans a les zones urbanes. Els gasos d'escapament dels automòbils són responsables de la contaminació amb metalls pesants dels sòls i de la vegetació, que inclouen plom, zinc, cadmi, coure i níquel, així com elements del grup del platí procedents de convertidors catalítics. Les zones contaminades es poden estendre fins a diversos centenars de metres de la carretera en funció de la intensitat del trànsit i de la ubicació. L'ús d'incineradores de residus per al tractament tèrmic dels residus sòlids també sembla ser una de les principals fonts atmosfèriques de metalls pesants, com ara plom i mercuri, en moltes ciutats [17]. El fum del tabac també és una font important de metalls pesants a l'ambient. S'han detectat metalls pesants com l'arsènic, el cadmi i el plom al fum de les cigarretes, i s'ha demostrat que aquests elements tòxics poden viatjar llargues distàncies a través de l'aire.

Els residus municipals, incloent les aigües residuals, el paper, el vidre, l'alumini i el plàstic, estan augmentant a un ritme molt elevat i això contribueix també a l'augment de contaminants i, en particular, de metalls pesants.

Altres fonts de contaminació per metalls pesants importants poden ser els additius per pintures que contenen pigments de diòxid de titani (TiO_2), silicat de zinc (ZnSiO_3), fosfat de zinc [$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$], òxid d'antimoni (Sb_2O_3) i altres metalls pesants com el coure, el crom, l'alumini o el plom, entre d'altres. Les fàbriques de bateries, poden emetre quantitats considerables de plom en els sòls pròxims.

Per poder parlar d'ambients contaminats, és necessari tenir una referència de quan estan lliures de contaminants. El nivell basal o *background* es defineix com la concentració natural d'un element al sòl, l'aigua o l'aire que no ha sigut alterat per

l'activitat humana. Per tant, un ambient estarà lliure de contaminants quan es trobi dins d'aquests nivells basals. Aquests nivells són altament dependents de la composició del material parental, dels processos de mineralització que porten a la formació del sòl, així com dels fenòmens naturals de la geografia del terreny, fent inapropiat l'ús universal de concentracions basals genèriques.

Es coneixen nombrosos exemples de contaminació per metalls pesants com ara l'arsènic, el cadmi, el coure i el mercuri. A Espanya hi ha tres zones altament contaminades per metalls pesants: la zona d'Almadén coneguda per les mines naturals de mercuri, l'àrea de Riotinto coneguda pels jaciments de pirita i la d'Aznalcóllar contaminada a causa d'un vessament de materials pirítics.

Almadén

El mercuri és ben conegut com un dels metalls més tòxics a la natura, i el districte miner d'Almadén constitueix la major concentració natural al món d'aquest element. Per aquesta raó, el districte d'Almadén es pot considerar com un dels llocs més contaminats amb mercuri de la Terra (contaminació induïda natural i antropogènica), i com a tal suposa clarament un perill per a la salut humana i per al medi ambient. El districte d'Almadén s'estén en una àrea d'uns 300 km² al centre d'Espanya, a Ciudad Real, i en els seus anys d'activitat ha produït un terç de la producció mundial total d'aquest element químic (285.000 tones de Hg). El districte conté una sèrie de dipòsits minerals, principalment de cinabri (HgS) i, en menor quantitat, pirita (FeS₂). El mineral de mercuri s'ha extret durant més de 2.000 anys i Almadén, la mina principal del districte, ha estat activa des de l'època romana fins al 2002, gairebé sense interrupcions, excepte per aquelles causades per desastres miners (inundacions, incendis, etc.) o factors externs com per exemple les guerres [23].

Com a resultat del procés d'extracció del mercuri, la majoria dels compostos de mercuri esdevenen mercuri metàl·lic (Hg⁰). Una part significativa d'aquest mercuri metàl·lic es perd en l'ambient circumdant o resta en els residus miners que es rebutgen. Aproximadament el 25% del mercuri total recuperat de les mines es pot perdre, contaminant l'ambient en un radi de 100 km des de la font. Fins i tot després de molts anys d'inactivitat, les àrees destinades a la mineria del Hg en contenen elevades concentracions, principalment com a resultat dels procediments de mineria inefficients i

de l'extracció incompleta del mercuri. A més, als residus miners també s'han observat sals de mercuri altament reactives i solubles amb aigua, com ara clorur de mercuri (Hg_2Cl_2) i oxiclorurs de mercuri (Hg_2ClO o $\text{Hg}_4\text{Cl}_2\text{O}$), formades probablement durant l'extracció del mercuri. A causa de la grandària del districte d'Almadén, de les emissions i de la dispersió del mercuri a les aigües, una part significativa del medi ambient circumdant està potencialment contaminada [24]. A la Taula 5 es mostren els nivells de concentració de Hg trobats en sediments, sòls, aigües i aire a la zona d'Almadén.

Taula 5. Nivells de mercuri trobats a la zona d'Almadén [23-25].

	Concentració de Hg
Sediments fluvials ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,5 - 16.000
Sòls ($\mu\text{g g}^{-1}$)	6 - 8.889
Aigua corrent ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6 - 11.200
Atmosfera ($\mu\text{g m}^{-3}$)	2 - 9.485

Riotinto

El cinturó pirític ibèric és una zona amb elevada concentració de sulfurs del sud de la península ibèrica. Té prop de 250 km de llarg i entre 30 i 50 km d'ample i va des del nord-oest de Portugal fins a la província de Sevilla. Fa 350 milions d'anys l'activitat volcànica que va tenir lloc a la zona va donar lloc a vuit dipòsits gegants de sulfurs polimetàl·lics en forma de pirita, calcopirita, blenda, galena i cassiterita. El cinturó pirític ibèric ha contingut la major quantitat de reserves de metalls no fèrrics del món.

El riu Tinto és un riu coster del cinturó pirític ibèric que discorre al llarg de la província de Huelva (Andalusia). El riu és conegut pel color rogenc de les seves aigües que té el seu origen en la meteorització de minerals que contenen sulfurs de metalls pesants trobats als jaciments al llarg del riu.

Les mines de Riotinto van ser una de les primeres mines de la zona que es van explotar. Les primeres evidències de la presència humana a la zona daten del IV mil·lenni a. de C., però els assentaments permanents estan datats dos mil·lennis després. Amb els Tartessis començà una època d'esplendor de la mineria que els romans van

continuar amb l'explotació de les mines a gran escala. Després dels romans començaren uns segles de decadència que van acabar a principis del segle XVIII quan es va reprendre l'explotació industrial de les mines. Però no és fins al 1873, any en què una companyia anglesa comprà les mines a l'Estat, quan es va produir el gran canvi en les formes i els sistemes de producció minera: instal·lacions a cel obert, transport per ferrocarril i necessitat de gran quantitat de mà d'obra. Després d'ésser explotades per varies empreses, al 2001 cessà l'activitat a les mines.

La intensa activitat minera de l'àrea de Riotinto ha generat grans quantitats d'escòria, pols de pirita i altres materials lixiviables que continuen causant l'acidesa de les aigües i elements contaminants que entren a les conques dels rius Tinto i Odiel. Les mines i els residus abandonats no només afecten la qualitat de l'aigua, sinó que causen contaminació dels sòls per deposició atmosfèrica o per l'aigua mitjançant els lixiviats o els vessaments [26]. A la Taula 6 es mostren les concentracions dels principals metalls trobats als sòls agrícoles propers a les mines.

Taula 6. Mitjana, valor màxim i valor mínim ($\mu\text{g g}^{-1}$) dels principals metalls pesants trobats en sòls agrícoles propers a les mines de pirita [26].

	Mitjana	Valor màxim	Valor mínim
As	227	994	19
Co	27	70	10
Cr	129	236	35
Ni	46	75	14
Cu	260	1.160	27
Pb	810	4.890	41
Zn	303	897	95
Al ₂ O ₃	15,0	18,4	10,1
Fe ₂ O ₃	8,0	12,6	5,0

Aznalcóllar

L'enfonsament del mur de contenció de la llacuna de la mina d'Aznalcóllar al 1998 va representar un dels pitjors desastres ecològics registrats a Espanya. Una mina

situada prop d'un dels afluents del riu Guadalquivir utilitzava àcid sulfúric per extreure metalls de la pirita i emmagatzemava els residus del procés, altament contaminats amb metalls, en un estany. Quan part de la presa de la llacuna de la mina es va ensorrar, va alliberar una quantitat estimada de 5 milions de metres cúbics d'aquests residus àcids rics en metalls tòxics, matant, al seu pas, la major part de la vida silvestre i suposant una amenaça a llarg termini per a l'ecosistema del Guadalquivir que abasta el Parc Natural i Nacional de Doñana [27, 28].

A Aznalcóllar s'extreia la pirita rica en zinc, plom, coure i manganès i el riu Agre rebia l'aigua del drenatge dels dipòsits de sulfurs polimetàl·lics i dels residus de la mina. El riu Agre s'uneix al Guadiamar, que és un important afluent del Guadalquivir. Després de l'accident els llots i aigües àcides van arribar al riu Guadiamar inundant les terres de cultiu properes, fins a arribar a les vores del Parc Nacional de Doñana, 45 km més al sud. Unes 4.400 hectàrees de cultius, pastures i boscos van estar afectades i també 800 hectàrees de rius i pantans. El fang tenia un pH de 2 i concentracions de metalls de 0,6% d'arsènic, 1,2% de plom i 0,8% de zinc, entre altres metalls [27]. A la Taula 7 es mostren els nivells d'alguns dels metalls en sediments, sòls i aigua al llarg del riu Guadiamar després del vessament d'Aznalcóllar.

Les mesures de remediació dutes a terme immediatament després de l'accident miner d'Aznalcóllar (neteja del terreny mitjançant extracció de la capa superficial del sòl seguit de l'addició de matèria orgànica i esmenes riques en calci i el repoblament de 4.500 hectàrees amb espècies autòctones) va permetre l'establiment d'una coberta vegetal densa i l'estabilització de la contaminació en els sòls remediats. Sense aquestes mesures, la capa més profunda del sòl hauria patit un enriquiment d'oligoelements, amb el consegüent risc per a les fonts d'aigua subterrània. Aquestes fonts d'aigua subterrània són crucials per a la sostenibilitat dels sistemes naturals i agrícoles a la zona de la Mediterrània. Dotze anys després de l'accident, el sòl no remediat mostrava una penetració uniforme dels elements menys mòbils As i Pb, fins a 40-60 cm i fins a 1 m de profunditat els elements més mòbils Cd, Cu i Zn, amb una acumulació màxima a la profunditat de 40-80 cm. Per contra, el sòl sanejat mostrava un pH bàsic al llarg de tot el perfil. Actualment s'ha observat una colonització espontània per plantes herbàcies al sòl no remediat amb una important alcalinització de la capa superior (0-10 cm). Aquest fet demostra que la remediació natural d'un sòl contaminat és un procés lent que necessita

una ràpida correcció assistida per evitar la lixiviació dels contaminants a través del perfil del sòl i la consegüent contaminació dels aquífers [29].

Taula 7. Concentració d'alguns metalls en sediments, sòls i aigua al llarg del riu Guadiana després del vessament d'Aznalcóllar [27, 30, 31]. ND significa valor no documentat.

	Sediments (mg kg ⁻¹)	Sòl (mg kg ⁻¹)	Aigua (mg L ⁻¹)
As	1.028 - 4.022	9,38 - 1.684	ND
Cd	15,1 - 36,4	0,12 - 22,0	0,4 - 881
Cu	715 - 2.035	12,5 - 958	0,1 - 40,2
Mn	393 - 954	290 - 940	ND
Pb	3.664 - 9.692	25,3 - 4.969	5 - 2.500
Zn	4.424 - 10.950	56,8 - 5.283	0,02 - 270

1.6. Dinàmica dels metalls pesants a la biosfera

El destí de diversos metalls, com el crom, el níquel, el coure, el manganès, el mercuri, el cadmi i el plom, i d'alguns metal·loides, com l'arsènic, l'antimoni i el seleni, a l'entorn natural és de gran preocupació, no només prop de les antigues mines, dipòsits de residus de mines i embassaments, sinó també a les zones urbanes i als centres industrials. El sòl, els sediments i l'aigua en aquestes àrees podrien contenir grans quantitats d'aquests elements, en alguns casos a causa de la mineria del passat i/o de l'activitat industrial actual. Per tal de conèixer les abundàncies elementals basals, s'han d'obtenir dades del sòl i de les conques hidrogràfiques adjacents a aquests llocs, i els valors de control, influïts per la geologia de la roca mare o per la interacció aigua-roca, han d'estar ben definits.

El cicle biogeoquímic dels metalls pesants i metal·loides s'accelera per les activitats humanes. L'acumulació d'ions metàl·lics i metal·loides en diferents compartiments de la biosfera i la seva mobilització en condicions ambientalment canviants pot induir a una pertorbació en l'estructura i la funció de l'ecosistema, causant efectes adversos per a la salut de la biota. Com s'ha discutit anteriorment, els metalls pesants i metal·loides s'introdueixen en un ecosistema a través de processos naturals o antropogènics. S'ha trobat que alguns sòls tenen concentracions elevades d'elements

que són tòxics per a les plantes i la vida animal a causa de les concentracions extremadament altes d'aquests elements en els materials originals (roca mare). Els processos antropogènics, tal com s'ha descrit anteriorment, inclouen les aportacions de metalls pesants a través de l'ús de fertilitzants i adobs orgànics, les deixalles industrials i municipals, el reg i els dipòsits humits i/o secs. Aquests processos contribueixen a l'aportació de quantitats variables de metalls pesants a l'ecosistema. Ara bé, només una petita part dels metalls pesants i metal·loides als sòls és biodisponible. La biodisponibilitat és la proporció de metalls totals que estan disponibles per a la incorporació a la biota.

Com ja s'ha dit, els metalls es poden trobar principalment en sòls i sediments, dissolts en aigües superficials i subterrànies, suspesos com a partícules a la superfície de l'aigua, en els fluids intersticials dels sediments i a l'atmosfera en forma de gasos, aerosols o partícules. A més, els metalls es poden dispersar segons el cicle geoquímic natural, per altres processos antropogènics o per les activitats microbianes.

Els contaminants s'alliberen a la font i són transportats pels corrents d'aire predominants. Durant el transport, poden ser diluïts, precipitats o transformats mitjançant reaccions químiques. Elements volàtils com ara seleni, mercuri, arsènic i antimoni es poden transportar tant en forma gasosa com enriquits en partícules. Altres metalls com ara coure, plom i zinc només es transporten en forma de partícules. Així doncs, la deposició atmosfèrica és un mitjà important de contaminació per metalls en plantes i sòls [17].

1.6.1. Biodisponibilitat dels metalls pesants

Per tal d'estimar els efectes i els riscos potencials associats a concentracions elevades d'aquests elements que resulten del desgast natural dels jaciments minerals o de les activitats mineres, cal identificar la fracció que és biodisponible respecte al contingut total d'aquests elements en aigua, sediments i sòls. En les ciències mediambientals, es defineix la biodisponibilitat com la fracció o percentatge d'un element que pot passar d'un compartiment qualsevol del medi ambient (sòl, aigua o aire) a un ésser viu, travessant la membrana cel·lular. La determinació del contingut total de metall dels sòls no és una bona mesura de la biodisponibilitat i no és una eina molt útil per quantificar la contaminació i els possibles riscos per a la salut ambiental i

humana. També és un mal indicador de la toxicitat dels metalls ja que aquests existeixen en diverses formes que difereixen en la seva biodisponibilitat. Per exemple, els minerals de sulfur es poden encapsular en minerals químicament inerts de quars o d'un altre tipus i, tot i les altes concentracions totals de metalls en sediments i sòls que contenen aquests minerals, aquests no estan fàcilment disponibles per a la incorporació a la biota. En els ambients aquàtics on hi poden prevaler condicions químicament reductores, aquests metalls associats a minerals de sulfur són bastant immòbils, sempre que es mantinguin en un entorn químicament reductor i, per tant, poden tenir poc impacte sobre la biota tot i les concentracions de metalls anòmales. En conseqüència, l'impacte ambiental global provocat per la mineria d'aquestes roques pot ser molt menor que la mineria d'un altre tipus de dipòsit mineral que conté minerals més reactius en menor abundància [16].

La majoria dels reglaments o directrius que estableixen les concentracions màximes permissibles de metalls utilitzades per definir els llocs contaminats, per establir objectius de remediació i per limitar la concentració de metalls als sòls a través de fertilitzants i residus, encara es basen en l'avaluació de la concentració total de metalls presents als sòls. Recentment, alguns països han començat a introduir el concepte de biodisponibilitat a la seva normativa en matèria de protecció ambiental i remediació.

Els metalls pesants de major interès en els estudis de biodisponibilitat, segons la EPA, són l'arsènic, el beril·li, el cadmi, el crom, el coure, el mercuri, el níquel, el plom, el seleni i l'antimoni. Altres metalls de menys interès per la EPA són la plata, el bari, el cobalt, el manganès, el molibdè, el sodi, el tal·li, el vanadi i el zinc. Aquests metalls han estat seleccionats pel seu potencial tòxic per a l'exposició humana i per l'elevat risc per a la salut [32].

La persistència dels contaminants als sòls és molt més elevada que a altres compartiments de la biosfera i la seva contaminació, especialment per metalls pesants, sembla ser permanent. Els nivells de metall acumulat al sòl disminueixen molt lentament per mitjà de fenòmens naturals com ara la lixiviació, l'absorció per les plantes, l'erosió o la deflació. L'estimació del temps de residència dels metalls pesants en sòls de clima temperat és de 75 a 380 anys pel Cd, de 500 a 1.000 anys pel Hg i de 1.000 a 3.000 anys pel Cu, Ag, Ni, Pb, Se i Zn. Aquestes estimacions indiquen

clarament que l'eliminació completa dels contaminants metàl·lics dels sòls és pràcticament impossible [16].

La mobilitat i la disponibilitat d'aquests contaminants estan controlades per molts processos químics i bioquímics com ara la precipitació-dissolució, la sorció-desorció, la complexació-dissociació i l'oxidació-reducció. No tots els processos són igualment importants per a cada element, però tots ells estan afectats per l'especiació, per algunes propietats del sòl i pels processos biològics. Per tant, és crucial entendre algunes de les reaccions que controlen l'alliberament d'un element traça específic al sòl i al medi ambient per tal de superar els problemes relacionats amb el defecte o l'excés d'aquests elements.

Els bioacumuladors són organismes vius dotats de la capacitat d'absorbir determinades substàncies de l'ambient i emmagatzemar-les a l'interior dels seus teixits sense eliminar-les mitjançant processos metabòlics. En aquest context, es defineix la bioacumulació com el procés d'acumulació de substàncies químiques en organismes vius de forma que aquestes arriben a concentracions més elevades que les concentracions del medi ambient o dels aliments. Les substàncies propenses a la bioacumulació assoleixen concentracions creixents a mesura que s'avança en el nivell tròfic de la cadena alimentària, procés conegut com a biomagnificació.

L'absorció de metalls pesants per la planta és generalment el primer pas de la seva entrada a la cadena agroalimentària. L'absorció de metalls pesants a les plantes depèn de: 1) el moviment dels elements del sòl a l'arrel de la planta, 2) dels elements que creuen la membrana de les cèl·lules epidèrmiques de l'arrel, 3) del transport dels elements de les cèl·lules epidèrmiques al xilema, en el qual una solució d'elements es transporta des de les arrels als brots, i 4) de la possible mobilització, de les fulles als teixits d'emmagatzematge utilitzats com a aliments (llavors, tubercles i fruites). Després de l'absorció per la planta, els metalls estan disponibles per als herbívors i els éssers humans, tant de forma directa com a través de la cadena alimentària. Aquest procés mostra com el pas limitant de l'entrada de metalls a la cadena alimentària és en general des del sòl fins a l'arrel. Aquest pas crític normalment depèn de les concentracions dels elements a les solucions dels porus del sòl que estan controlades per les condicions físiques i químiques del sòl com ara el pH, la capacitat d'intercanvi de cations (CEC), el

potencial redox, la textura del sòl, el contingut d'òxids o hidròxids de Fe i Mn, el contingut d'argila i el contingut de matèria orgànica [16, 33].

L'activitat dels ions hidrogen (pH) és probablement el factor més important que determina l'especiació de metalls, la solubilitat de les superfícies minerals, el transport i, eventualment, la biodisponibilitat dels metalls en solucions aquoses. El pH afecta tant la solubilitat dels minerals d'hidròxid de metall com els processos d'adsorció-desorció. La majoria dels minerals d'hidròxid de metall tenen solubilitats molt baixes en condicions de pH de l'aigua natural. Atès que l'activitat dels ions hidròxid està directament relacionada amb el pH, la solubilitat dels minerals d'hidròxid de metall augmenta amb la disminució de pH i els metalls dissolts estaran potencialment disponibles per a la incorporació als processos biològics en disminuir el pH. La presència de carbonats garanteix el manteniment d'alts valors de pH, els quals tendeixen a precipitar els metalls pesants. En general, la solubilitat de molts metalls pesants és baixa en sòls neutres o bàsics i elevada en sòls lleugerament àcids.

El potencial d'oxidació-reducció del sòl és responsable de l'estat d'oxidació i del canvi de valència d'alguns metalls. Generalment, les condicions redox afecten indirectament a la seva mobilitat, essent més solubles en medis reduïts. La mobilitat dels metalls pesants, especialment Cd, Cu, Cr i Zn augmenta en sòls pobrament airejats amb un estat d'oxidació baix [16].

Tant l'estructura com la textura dels sòls juguen un paper important en l'entrada, la infiltració, l'adsorció i/o la pèrdua dels metalls pesants als sòls. Les argiles poden retenir els metalls pesants a les posicions d'intercanvi, impedit el pas als nivells freàtics. En canvi, la capacitat d'intercanvi de cations és mínima per als minerals del grup de la caolinita, baixa per a les miques, alta per a les esmectites i màxima per a les vermiculites. Per tant, els sòls argilosos, amb un clar predomini de minerals d'argila, presenten una major capacitat de retenció d'aigua i de contaminants, una major microporositat i, per tant, una reducció del drenatge intern del sòl. Per contra, als sòls arenosos, amb menor capacitat de fixació i una macroporositat dominant, els metalls pesants s'infiltren ràpidament al subsòl i poden contaminar els nivells freàtics [34].

La matèria orgànica té una gran importància en tots els processos d'adsorció del sòl. Actua com a lligand mitjançant la cessió d'electrons de certes molècules a cations

metàl·lics que accepten aquests electrons formant quelats. Per tant, la complexació d'aquests metalls per la matèria orgànica del sòl és un dels processos que governen la solubilitat i biodisponibilitat dels metalls pesants. Així doncs, un contingut de matèria orgànica elevat significa una major immobilització dels metalls als sòls, ja que aquests s'enllacen als àcids húmics i fúlvics.

La capacitat d'intercanvi de cations (CEC) es defineix com la quantitat de cations reversiblement adsorbits (expressats com a mols de càrrega positiva) per unitat de pes de mineral i està molt condicionada per la quantitat i el tipus d'argila i la matèria orgànica. En general, com més gran sigui la capacitat d'intercanvi catiònica, major serà la capacitat del sòl de fixar metalls. El poder d'adsorció dels diferents metalls pesants depèn de la seva valència i del radi iònic: a major mida i menor valència, menys quedaran retinguts [16].

Els òxids i hidròxids de Fe i Mn també juguen un paper important en la retenció dels metalls pesants. Tenen una elevada capacitat per fixar els metalls i immobilitzar-los. Els mecanismes de sorció impliquen la substitució isomòrfica de cations divalents o trivalents, les reaccions d'intercanvi catiònic i els efectes d'oxidació a la superfície dels precipitats d'òxids.

La temperatura exerceix un efecte important en l'especiació de metalls, perquè la velocitat de la majoria de reaccions químiques és altament sensible a canvis de temperatura. El clima i les precipitacions també influeixen molt en el tipus de sòl i, juntament amb les seves condicions fisicoquímiques, controlen en gran part la mobilitat i la biodisponibilitat dels metalls i metal·loides.

L'espècie de planta i l'abundància relativa i la disponibilitat dels elements necessaris (oligoelements) també controlen la captació de metalls. Concentracions grans de nutrients essencials biodisponibles, incloent fòsfor i calci, poden disminuir l'absorció per part de la planta d'elements no essencials però químicament similars, com l'arsènic o el cadmi.

Un punt important a considerar en l'estudi dels sòls és que són sistemes dinàmics, on existeix un equilibri molt delicat entre el contingut de metall immobilitzable (inactiu o inert), la fracció mòbil (soluble, biodisponible i molt activa) i la fracció mobilitzable (potencialment biodisponible, lixiviable i parcialment activa). Aquest equilibri

fraccionament dels cations dels metalls pesants en espècies definides de forma operacional sota l'acció seqüencial de determinats reactius amb creixent agressivitat; entenent com a fraccionament la classificació d'un anàlit o d'un grup d'anàlits d'una mostra determinada en funció de les seves propietats físiques o químiques, d'acord amb la recomanació de la IUPAC [36].

Els extractants utilitzats en els SEPs estan destinats a simular les condicions sota les quals els metalls associats a certes fases mineralògiques es poden alliberar [22, 35, 37-42].

El procediment d'extracció seqüencial més àmpliament utilitzat és el proposat per Tessier *et al.* (1979) [39]. En aquest procediment, els metalls poden ser dividits generalment en sis fraccions en funció de la seva forma química o el lligand al qual estan enllaçats: 1) dissolts com a ió metàl·lic lliure o com a complexos metàl·lics solubles o col·loïdes, 2) adsorbits als llocs intercanviables dels constituents inorgànics del sòl, 3) associats a minerals de carbonat o roques carbonatades, 4) adsorbits a partícules d'òxids o hidròxids de ferro i manganès, 5) units a les diverses formes de matèria orgànica i 6) en forma cristal·lina o residual; el sòlid residual pot estar format principalment de minerals primaris i secundaris que poden contenir metalls incrustats en la seva estructura cristal·lina [22, 37]. Els metalls es distribueixen de manera diferent entre aquestes fraccions tal com es pot veure per procediments d'extracció seqüencial. La mobilitat relativa i la biodisponibilitat dels metalls associades a les diferents fraccions, així com els extractants més utilitzats es mostren a la Taula 8. L'elecció dels extractants i l'ordre en el qual s'utilitzen depèn del tipus de sòl, de les condicions ambientals i dels metalls d'interès.

No obstant això, aquestes extraccions seqüencials són “operacionals”, és a dir que no són totalment específiques per metalls o fases químiques. Per tant qualsevol determinació de la biodisponibilitat ha de ser acuradament calibrada, per mesurament directe amb el comportament real dels metalls als sòls i a les plantes.

La suma de la fracció soluble i la fracció intercanviable correspon bàsicament a les espècies de metalls mòbils als sòls. La mobilització dels metalls d'aquestes fraccions, o la transformació d'espècies mòbils a altres immòbils és sovint un procés lent i fortament controlat per la cinètica de les reaccions [16].

Taula 8. Mobilitat relativa i disponibilitat dels metalls pesants (adaptat de [22, 35, 37-42]).

Fracció metàl·lica extreta	Mobilitat fisicoquímica	Extractant
Metalls dissolts o complexos solubles	Mòbil. Solubles en aigua.	H ₂ O
Cations fàcilment intercanviables	Mòbil. Els canvis en la composició iònica de l'aigua poden afectar els processos de sorció causant-ne l'alliberament.	Sals neutres (tamponades o no): CaCl ₂ , NaNO ₃ , NH ₄ NO ₃ , CH ₃ COONa, CH ₃ COONH ₄ , Ca(NO ₃) ₂ , MgCl ₂ , BaCl ₂ ...
Metalls associats a carbonats	Fàcilment mobilitzable. Aquesta fracció és susceptible a canvis de pH.	Solucions tamponades lleugerament àcides: CH ₃ COOH/CH ₃ COONa, CH ₃ COOH, HCl...
Metalls associats a òxids de Fe i Mn	Fàcilment mobilitzable. Els canvis en les condicions redox poden causar un alliberament, però alguns metalls precipiten si el sulfur del mineral és insoluble.	Solucions reductores o altres: H ₂ O ₂ /HNO ₃ , NH ₂ OH·HCl/CH ₃ COOH, Na ₂ S ₂ O ₄ (tampó citrat), (NH ₄) ₂ C ₂ O ₈ /H ₂ C ₂ O ₈ , EDTA...
Metalls associats a matèria orgànica	Pobrament mobilitzable. Amb el temps o sota condicions oxidants, es produeix la degradació/oxidació de la matèria orgànica.	Agents oxidants: NaClO, Na ₄ P ₂ O ₇ , H ₂ O ₂ /àcid ascòrbic, H ₂ O ₂ /HNO ₃ /CH ₃ COONH ₄ , KClO ₃ /HCl...
Metalls residuals fixats a la fase cristal·lina	Difícilment mobilitzable. Només disponible després del desgast o de la descomposició.	Àcids forts: HF/HClO ₄ , HNO ₃ /H ₂ O ₂ , HCl/HF/HNO ₃ , aigua règia...

1.7. Toxicitat dels metalls pesants

Abans de descriure els efectes tòxics d'alguns metalls pesants, és necessari recordar dos punts importants. El primer, un metall pesant no és tòxic per si mateix, sinó que només és tòxic quan la concentració a l'organisme supera un cert llindar ("el verí està en la dosi" Philippus von Hohenheim, metge, alquimista i astròleg suís del segle XVI). I el segon, alguns metalls pesants són micronutrients essencials per als animals, les plantes o alguns microorganismes, actuant de catalitzadors d'algunes reaccions o bé activant nombrosos enzims. Formen part dels metalls essencials o micronutrients l'arsènic, el bor, el ferro, el cobalt, el crom, el coure, el molibdè, el manganès, el níquel i el zinc [3]. Per exemple, la molècula d'hemoglobina, responsable del transport de l'oxigen a l'organisme, conté Fe(II) enllaçat al grup hemo, o la vitamina B₁₂ (cianocobalamina) que és un complex de Co(III) essencial per al metabolisme, la formació de glòbuls vermells i el manteniment del sistema nerviós central. Altres metalls com ara el zinc, el manganès o el coure són necessaris per al funcionament de molts enzims. Aquests metalls pesants, tot i ésser essencials, en altes dosis han demostrat tenir efectes tòxics per als organismes vius o, fins i tot, causar malalties incurables en una etapa avançada. El cobalt, per exemple, pot causar trastorns hepato-renals i insuficiència cardíaca congestiva. El manganès es manifesta en una malaltia coneguda com la "bogeria mangànica", un trastorn neurològic paralitzant similar a la malaltia del Parkinson.

Hi ha un altre grup de metalls pesants que no tenen una funció biològica coneguda per als éssers vius però que es troben presents al medi ambient de forma natural o per causes antropogèniques. En aquest grup de metalls no essencials hi podem trobar el Cd, el Hg i el Pb, entre d'altres. La perillositat d'aquests metalls pesants resideix, com s'ha descrit anteriorment, en el fet que no poden ser degradats, ni química ni biològicament i, a més, tendeixen a bioacumular-se i biomagnificar-se, que significa que s'acumulen als organismes vius aconseguint concentracions més elevades que les del medi ambient o dels aliments, i que aquestes concentracions augmenten a mesura que ascendim en la cadena tròfica, provocant efectes tòxics de caràcter molt divers.

Així doncs, poden influir en la toxicitat dels metalls pesants les condicions ambientals, els factors naturals i biològics, com ara l'edat o el sexe, les diferents espècies, l'estrès, la relació d'un metall amb un altre metall i els desequilibris dels ions

metàl·lics en els sistemes biològics que poden augmentar significativament el nivell d'estrès oxidatiu. La toxicitat produïda pels metalls pesants es deu a la incapacitat inherent dels sistemes biològics per fer-los innocus. La toxicitat és sovint deguda a la capacitat de certs ions metàl·lics per contrarestar els efectes dels metabòlits essencials, produir canvis conformacionals irreversibles a l'estructura de les macromolècules i alterar la permeabilitat de la membrana cel·lular. L'acumulació de quantitats excessives de metalls essencials a causa del funcionament inadequat dels òrgans excretors homeostàtics o per l'absorció excessiva de la dieta també poden induir certa toxicitat.

Avui en dia l'exposició de les persones i dels animals als metalls és gairebé inevitable i segueix sent un problema ambiental global. En general, la població no està exposada a nivells prou alts de metalls pesants com per produir efectes tòxics. No obstant això, s'han produït epidèmies agudes, subagudes i cròniques d'intoxicació per metalls i seguiran produint-se en el futur, ja que els metalls es troben àmpliament distribuïts i utilitzats. Els estudis experimentals suggereixen que els fetus en desenvolupament, els nadons i els nens petits són més sensibles que els adults als efectes adversos dels metalls pesants i que, per tant, en aquests casos la toxicitat induïda és de particular importància. Si bé el mercuri és l'únic metall teratogen provat, el plom, l'arsènic i el cadmi també poden produir una varietat d'efectes sobre el desenvolupament. Per tant, es recomana que les dones en edat fèrtil, les embarassades i els nens petits limitin la seva exposició a possibles fonts de metalls tòxics. Altres precaucions que s'han de prendre són la deficiència nutricional de metalls essencials (per exemple ferro, calci, seleni, etc.) i l'exposició simultània d'altres metalls (per exemple plom i mercuri, cadmi i plom, etc.) per eliminar la interacció sinèrgica o additiva.

L'Agència per al Registre de Substàncies Tòxiques i Malalties dels Estats Units (ATSDR) elabora de forma bianual una llista de substàncies tòxiques prioritàries que s'utilitza com a guia per a legislar sobre la protecció ambiental. Aquesta llista es basa no solament en la toxicitat inherent de cada substància química, sinó també en la seva concentració al medi ambient i en el nivell d'exposició de la població. En la última llista publicada al 2011 [43], els primers quatre metalls que hi apareixen corresponen a l'arsènic, el plom, el mercuri i el cadmi, ocupant els llocs 1, 2, 3 i 7 de la llista, respectivament.

A continuació es descriuran les característiques principals i els efectes tòxics d'aquests quatre metalls que són els que més endavant es consideraran en aquest treball.

1.7.1. El mercuri

El mercuri (número atòmic 80) és un metall líquid de color platejat brillant amb símbol químic “Hg” i pes atòmic $200,59 \text{ g mol}^{-1}$. El mercuri, que té els punts de fusió i d'ebullició més baixos de tots els metalls (-39°C i 357°C , respectivament), és l'únic metall pur que és líquid a temperatura ambient. El mercuri elemental (Hg^0) és volàtil a temperatura ambient i allibera un gas monoatòmic que normalment es coneix com a vapor de Hg. És estable a l'aire i pot romandre a l'atmosfera durant mesos, fins i tot anys. Exerceix un paper clau al cicle global del mercuri (Figura 6) i es pot oxidar per passar als seus dos principals estats d'oxidació: +1 i +2 [44-47]. A causa dels seus diversos avantatges físics i químics, com ara la fàcil vaporització, el mercuri ha estat un material important en molts productes industrials fins a la restricció del seu ús al 2007.

El primer estat d'oxidació és l'ió mercurós, Hg(I) , i es troba normalment en forma de calomelans o clorur de mercuri(I) (Hg_2Cl_2) ja que l'ió Hg^+ no és estable en condicions ambientals i dismuta en Hg^0 i Hg^{2+} . El Hg(II) , o ió mercúric, forma l'estat divalent del Hg, i és responsable de la formació de pràcticament tots els compostos inorgànics i orgànics del mercuri. El Hg(II) també és un producte del metabolisme del vapor de Hg, dels compostos orgànics de Hg i de l'alliberament a partir de l'ió mercurós. A causa d'aquestes propietats, aquesta espècie juga un paper clau al cicle del Hg i en la toxicologia d'aquest metall pesant als organismes vius (Figura 6). El Hg(II) té una elevada afinitat pels grups tiol, més específicament per l'anió R-S^- . La facilitat de moviment entre els grups tiol és deguda a l'elevada velocitat de les reaccions d'equilibri [44]. El mercuri es combina amb altres elements, com ara el clor, el sofre o l'oxigen, per formar compostos inorgànics de mercuri o sals, que normalment són pols o cristalls blancs, a excepció del sulfur de mercuri (també conegut com a cinabri) que és de color vermell i es torna negre després de l'exposició a la llum. A més, el mercuri també pot formar amalgames (aliatges) amb la majoria dels metalls, excepte el ferro i el platí [47].

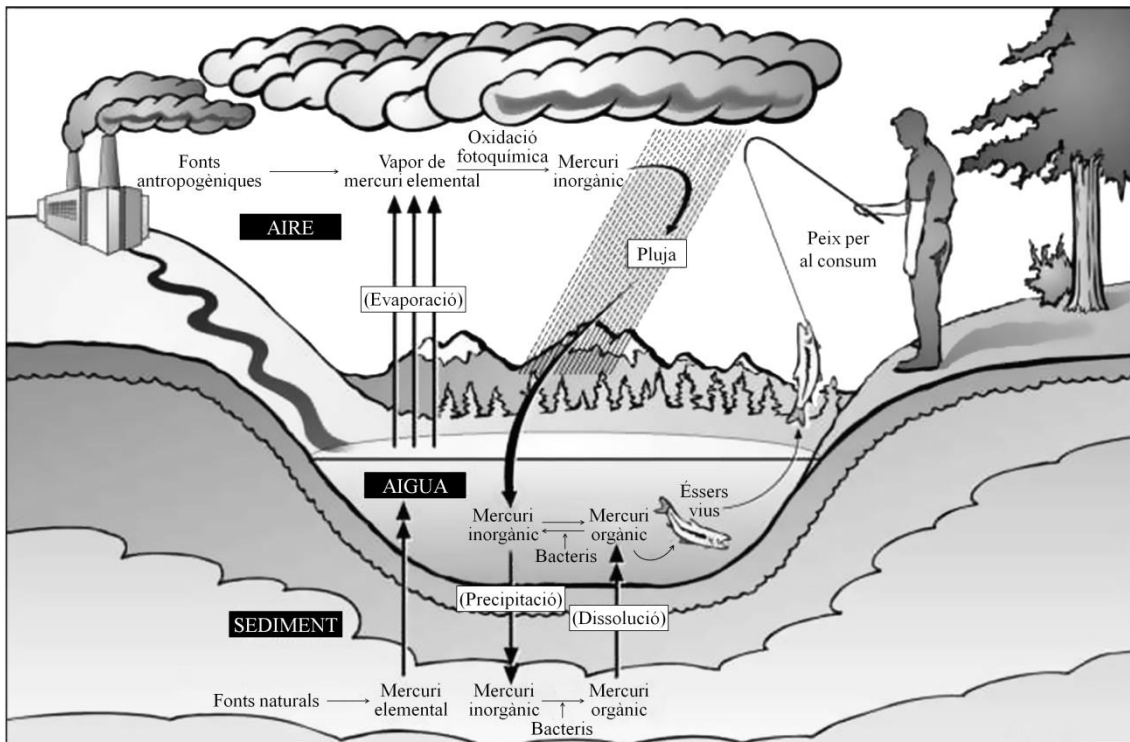


Figura 6. Cicle biogeoquímic del mercuri (adaptat de [48]).

Alguns organismes, com ara els bacteris o els fongs, poden modificar el Hg disponible a l'entorn (Hg(II)) per metilació d'aquest ió, fent el producte final més perillós i tòxic que el seu precursor. Així doncs, el mercuri es combina amb el carboni per formar compostos orgànics de mercuri. Hi ha un nombre potencialment gran de compostos orgànics de mercuri, però, el més comú en el medi ambient és el metilmercuri (també conegut com monometilmercuri). El metilmercuri és el compost de Hg orgànic més tòxic i, en els éssers humans, és capaç de causar danys al sistema nerviós, al fetge i també provocar la mort per fallada multiorgànica. Es produeix per biometilació i pot ser incorporat a la cadena tròfica, principalment a través dels animals aquàtics. Altres compostos orgànics de mercuri bastant comuns són l'etilmercuri que, tot i les diferències químiques que presenta respecte al metilmercuri, té propietats similars i el dimetilmercuri que s'utilitza en petites quantitats com a estàndard de referència per a algunes proves químiques.

El Hg inorgànic arriba als ecosistemes com a resultat del cicle del mercuri i, en les condicions adequades, el Hg(II) es pot transformar en les formes orgàniques. El canvi d'especiació de Hg inorgànic a orgànic és el primer pas en el procés de bioacumulació en els organismes aquàtics. Quan els peixos petits mengen aliments amb metilmercuri,

aquest entra als seus teixits. Quan els peixos més grans mengen petits peixos o altres organismes que tenen metilmercuri, la major part del metilmercuri originalment present al peix petit, s'emmagatzema en els cossos dels peixos més grans. Com a resultat, els peixos més grans i de més edat de les aigües contaminades acumulen majors quantitats de metilmercuri en els seus cossos (biomagnificació).

Així doncs les formes més comunes del mercuri al medi ambient són el mercuri metàl·lic, el sulfur de mercuri (cinabri), el clorur de mercuri(II) i el metilmercuri.

El mercuri pot ser transportat pel medi ambient a través de l'aire i l'aigua, així com a través dels organismes biològics mitjançant la cadena tròfica. L'alta solubilitat en aigua i la facilitat amb la qual es desplaça a la fase gasosa (2.500 km en només 72 h) són dues de les propietats més importants d'aquest metall pesant. Aquestes propietats permeten explicar la capacitat i l'eficàcia que té el mercuri per moure's en diversos ecosistemes i romandre a l'atmosfera durant llargs períodes de temps (des de 6 dies fins a 6 anys), depositant-se posteriorment als sòls o a l'aigua per la pluja o altres episodis climatològics [46, 49].

Es pot dir, per tant, que el mercuri és un contaminant persistent al medi ambient amb elevada capacitat de bioacumular-se en peixos, animals i éssers humans i biomagnificar-se a través de la cadena tròfica. Les sals de mercuri i els compostos orgànics de mercuri, el grau de toxicitat dels quals depèn principalment del tipus de compost i de l'estat redox del mercuri, es troben entre les substàncies més tòxiques del medi ambient [50].

El mercuri metàl·lic s'extreu del sulfur de mercuri (cinabri) escalfant la mena a temperatures aproximades de 600°C. Aquest procés vaporitza el mercuri del mineral i els vapors són després condensats per obtenir mercuri metàl·lic líquid. El Hg i els seus compostos han estat utilitzats per la humanitat des de les civilitzacions antigues. El Hg ha estat extret de les mines durant segles i existeixen jaciments importants d'aquest mineral arreu del món, entre els quals podem trobar la Xina, Kirguizistan, Xile, Mèxic, Perú, Rússia, Eslovènia, Espanya, Ucraïna i Estats Units. Espanya va ser el líder mundial de producció de mercuri durant més de 2.000 anys quan les mines d'Almadén estaven en plena producció. Almadén (que prové de l'àrab i significa "el metall") és una de les mines de mercuri més grans del món, i s'ha utilitzat per extreure Hg des de

l'època de l'Imperi Romà fins a l'any 2002 quan va cessar l'activitat, tal com s'ha dit anteriorment.

El mercuri també s'ha anat distribuint al llarg del temps a l'atmosfera mitjançant processos naturals, com ara les activitats volcàniques, els incendis, el moviment d'aigua dels rius i llacs, l'evaporació dels oceans i els processos biològics. S'estima que com a mínim el 50% les emissions anuals de Hg de la superfície de la Terra a l'atmosfera prové de fonts antropogèniques, les emissions oceàniques contribueixen en un 30% i el 20% restant prové de les emissions continentals (sòls i vegetació) [51]. Entre les emissions antropogèniques, aproximadament el 80% és mercuri elemental alliberat a l'aire, principalment de la combustió de combustibles fòssils, la mineria i la fosa i la incineració de residus sòlids. Al voltant del 15% del total s'allibera als sòls en forma de fertilitzants, fungicides i residus sòlids municipals (per exemple, a partir de residus que contenen bateries, interruptors elèctrics o termòmetres). Un 5% addicional s'allibera a les aigües provinent d'aigües residuals industrials [47].

Antigament, els egipcis van usar aquest metall pesant com a compost medicinal i com a conservant a les tombes. En medicina, els compostos de Hg han estat utilitzats en tractaments per a la sífilis, en diversos trastorns de la pell, com a antisèptic o per tractar problemes diürètics i quimioteràpics. Els compostos de mercuri també es van emprar per produir barrets d'alta qualitat, en cosmètica i per a fins agrícoles [47]. Des de l'era de la industrialització, s'ha utilitzat el mercuri en equips elèctrics, bateries i explosius. Les activitats com la fosa de coure i plom i l'extracció de metalls preciosos (per exemple, or i plata) han contribuït en gran mesura a la contaminació dels sistemes aquàtics. La crema de combustibles fòssils, les indústries de clor-àlcali, la producció d'aparells elèctrics i la pintura han estat també dels majors consumidors de Hg [48].

Tot i que el mercuri ha estat àmpliament utilitzat des d'èpoques remotes, actualment el seu ús es troba restringit o, en alguns casos, prohibit. Des de 2007 i amb la implementació del Reglament REACH [52-54] es va prohibir l'ús dels compostos de mercuri en preparats destinats a impedir les incrustacions de microorganismes, plantes o animals, en la protecció de la fusta, en el tractament d'aigües industrials, etc. També es va restringir l'ús del mercuri en la comercialització de piles, acumuladors i bateries així com de termòmetres, baròmetres i altres dispositius per a la mesura. La Unió Europea

[55] va prohibir l'exportació de mercuri metàl·lic, altres compostos i mescles de mercuri i l'emmagatzematge de mercuri metàl·lic al 2008.

Algunes de les fonts domèstiques de mercuri més comunes inclouen els desinfectants, els productes químics àcids o càustics (per exemple, àcids de les bateries, lleixiu, àcid clorhídric, hidròxid de sodi i àcid sulfúric), instruments que contenen mercuri (per exemple, instruments mèdics, termòmetres, baròmetres i manòmetres), amalgames dentals (empastaments), pintures de làtex, bateries, enllumenat elèctric (tubs fluorescents, filaments incandescents de cables, làmpades de vapor de mercuri, làmpades de raigs ultraviolats), pesticides, productes farmacèutics (per exemple, aerosols nasals, cosmètics, productes per a lents de contacte), detergents i productes per a la neteja de la llar, tintes i recobriments de paper, olis lubricants, dispositius de cablejat i interruptors i tèxtils. Encara que actualment l'ús de mercuri en molts dels elements anteriors està restringit o prohibit, encara existeixen alguns d'aquests productes en ús [45].

Els estudis sobre toxicitat de Hg fets majoritàriament en animals i éssers humans relacionen aquest element amb malalties autoimmunes, principalment. La toxicitat de les formes inorgàniques del Hg és en part explicada per la gran afinitat de l'element per les biomolècules que contenen sulfhidrils (-SH) i per una menor afinitat pels grups carboxil, amida i amina. El Hg arriba als humans principalment a través del consum d'altres éssers vius contaminats amb Hg o per la inhalació de vapor de mercuri provinent de les fonts d'emissió citades anteriorment [49]. El mercuri i els seus compostos són acumulatius i perillosos per a la salut humana fins i tot en petites quantitats. Els principals efectes de la intoxicació per mercuri es manifesten com a trastorns renals i neurològics, ja que fàcilment pot passar la barrera sang-cervell produint greus efectes al cervell. També pot causar efectes tòxics en la reproducció humana [56].

1.7.2. El cadmi

El cadmi (nombre atòmic 48) és un element metàl·lic de color blanc blavós amb símbol químic "Cd" i pes atòmic de 112,41 g mol⁻¹. El cadmi existeix només amb un estat d'oxidació (+2) i generalment no pateix reaccions d'oxidació-reducció a l'ambient.

Mentre que la majoria de compostos inorgànics de cadmi són solubles amb aigua, el sulfur de cadmi (CdS) i l'òxid de cadmi (CdO) són pràcticament insolubles [57, 58].

El cadmi és un element comú a l'escorça terrestre i és comunament associat a minerals de zinc, plom o coure. El cadmi també és un constituent natural de l'aigua dels oceans. El cadmi, com la resta dels metalls, pot ser alliberat a l'atmosfera mitjançant fonts naturals o antropogèniques. Les emissions naturals de cadmi al medi ambient poden ser resultat d'erupcions volcàniques, incendis forestals, generació d'aerosols de sals marines o altres fenòmens naturals. Les emissions antropogèniques són majors que les provinents de fonts naturals. Alguns dels usos i, per tant, de les fonts antropogèniques de cadmi als sòls, aigües i aire poden ser la mineria i la refinaria de metalls no ferrosos (zinc, plom, coure i cadmi), la fabricació i aplicació de plaguicides i fertilitzants fosfatats, la combustió de combustibles fòssils, la incineració i eliminació de residus, els revestiments metàl·lics i aliatges, les soldadures, les bateries de níquel i cadmi, la galvanotècnia, l'esmalt de la ceràmica envernissada amb pigments a base de cadmi i l'ús com a estabilitzador en plàstics en contacte amb aliments. La principal font de contaminació en sòls agrícoles és a través dels fertilitzants fosfatats. A Europa les majors fonts d'emissió de cadmi són la producció de Zn, l'activitat volcànica, la indústria de l'acer i la incineració de residus [58].

El cadmi s'extreu generalment com a subproducte en minerals que contenen zinc i que poden contenir petites quantitats d'altres elements, com ara l'esfalerita (ZnS) que és el mineral més econòmicament viable per a l'obtenció de cadmi. Els principals països productors de cadmi són la Xina, Corea del Sud, Japó, Canadà, Mèxic i Kazakhstan, entre d'altres.

Un cop alliberat al medi el cadmi es distribueix per sòls i aigües, des d'on passa amb molta facilitat als vegetals, que són una de les principals vies d'entrada del contaminant a la cadena tròfica. El cadmi existeix a l'aire com a òxid, clorur, sulfit i sulfat, ja sigui en forma de partícules o vapors. Pot ser transportat llargues distàncies a l'atmosfera, des d'on es dipositarà en sòls i superfícies d'aigua. Un cop al sòl, la mobilitat del cadmi depèn de diversos factors com ara el pH i la quantitat de matèria orgànica, la qual variarà en funció de l'entorn local. En l'aigua, el cadmi existeix tant com a ió hidratat com en forma de complexos iònics amb substàncies orgàniques o inorgàniques. Els complexos solubles del cadmi poden migrar a través de les aigües,

mentre que les formes insolubles són immòbils i es dipositaran i seran absorbides pels sediments.

Una de les principals vies d'exposició de la població al cadmi és a través de la inhalació de vapors de cadmi que poden provenir principalment del fum del tabac, de les indústries emissores de cadmi i de les incineradores. S'estima que entre un 5 i un 50% del cadmi que respirem pot ser absorbit pels pulmons, entrant així al nostre organisme. Aquesta ruta d'exposició és la font predominant d'entrada de cadmi a l'organisme de les persones fumadores i dels treballadors exposats a vapors de cadmi. Respirar aire amb nivells molt elevats de cadmi pot danyar severament els pulmons i pot causar la mort. Així mateix, respirar aire amb nivells més baixos de cadmi durant llargs períodes de temps (anys) resulta en una acumulació de cadmi als ronyons i, si la concentració és prou alta, pot arribar a causar malalties renals. L'exposició a baixos nivells de cadmi durant molt de temps també pot fer que els ossos es tornin fràgils i es trenquin amb facilitat. S'ha detectat càncer de pulmó en alguns estudis fets a treballadors exposats al cadmi de l'aire i en estudis de rates que van respirar cadmi [58].

Una altra via d'exposició important és la oral. El cadmi s'introdueix a la cadena alimentària a través dels sòls agrícoles, que poden contenir cadmi de forma natural, o bé de fonts antropogèniques. En ingerir aliments o aigua contaminada, petites quantitats de cadmi poden ser absorbides a través del tub digestiu. Els nivells de cadmi més alts en aliments es troben normalment en vegetals de fulla com ara enciam i espinacs, a les patates, els cereals, els cacauets i a la carn, majoritàriament al fetge i als ronyons. Menjar aliments o prendre aigua amb nivells de cadmi molt alts produeix irritació greu de l'estómac, fet que porta a vòmits i diarrea i, a vegades, pot produir la mort. Igualment, ingerir nivells més baixos de cadmi durant un llarg període de temps pot conduir a una acumulació de cadmi als ronyons que pot arribar a danyar-los.

La major part del cadmi que entra a l'organisme passa als ronyons i al fetge i pot romandre allà durant molts anys. Una petita part del cadmi que entra al cos surt lentament en l'orina i la femta. Quan els éssers humans estan exposats a petites quantitats de cadmi, l'organisme és capaç de metabolitzar la majoria del cadmi absorbit en una forma que no és perjudicial, però una exposició a grans quantitats de cadmi pot sobrecarregar la capacitat del fetge i els ronyons per metabolitzar-lo a una forma inofensiva.

1.7.3. L'arsènic

L'arsènic (nombre atòmic 33) és un element inodor i insípid amb símbol químic “As” i pes atòmic de $74,92 \text{ g mol}^{-1}$. L'arsènic existeix habitualment en la forma metàl·lica (α)-cristal·lina que és de color gris acer i de naturalesa fràgil, i en la forma β , un sòlid amorf gris fosc [59]. L'arsènic metàl·lic es manté estable a l'aire sec, però la seva superfície s'oxida quan s'exposa a aire humit, creant un pel·lícula superficial de color daurat que es torna negra amb una exposició prolongada. Pertany al grup dels semi-metalls o metal·loides i, per tant, pot tenir tant característiques metàl·liques com no-metàl·liques. Això no obstant, com s'ha discutit anteriorment, degut a l'elevada toxicitat d'aquest element i les propietats similars a les dels metalls, sovint s'inclou en el terme “metall pesant”. Posseeix una baixa conductivitat tèrmica i una electronegativitat també baixa. L'arsènic és l'element químic de major toxicitat segons l'ATSDR, ocupant així el primer lloc a la llista de substàncies tòxiques prioritàries [43].

L'arsènic existeix en diversos estats d'oxidació (-3, 0, +3 i +5) i es pot combinar amb altres elements per formar compostos. El pH, les condicions redox, la composició mineral circumdant i les activitats microbianes poden afectar la forma i l'estat d'oxidació de l'arsènic. Així doncs, la toxicitat de l'arsènic depèn principalment de l'espècie química. Tant des del punt de vista biològic com del toxicològic, els compostos d'arsènic es poden classificar en tres grans grups: els compostos inorgànics d'arsènic (quan es combina principalment amb oxigen, clor i sofre), els compostos orgànics d'arsènic (quan es combina amb carboni i oxigen) i el gas arsina. Les espècies d'arsènic més comunes inclouen àcids arseniosos, àcids arsènics, arsenit, arsenat, àcid metilarsènic, àcid dimetilarsínic i arsina. Les dues formes més comuns en la majoria dels ambients són l'arsenit (AsO_3^{3-}) i l'arsenat (AsO_4^{3-}), coneguts com a As(III) i As(V), respectivament, encara que els compostos orgànics també hi poden ser presents [45, 60].

L'arsènic es troba en petites quantitats en tots els éssers vius, l'atmosfera, l'aigua i els sòls [62]. En general s'obté dels minerals que contenen or, plata, coure, plom, cobalt, níquel i antimoni. Hi ha més de 150 minerals coneguts que porten arsènic. La quantitat d'arsènic trobat en minerals de plom i coure pot variar des de traça fins a un 2-3%. S'ha extret arsènic del realgar i de l'orpiment, dos minerals de sulfur d'arsènic, a la Xina, el Perú i les Filipines, dels minerals de coure i or a Xile i s'ha associat també a minerals d'or a Canadà. Les erupcions volcàniques i els incendis també contribueixen a

l'alliberament d'arsènic a l'atmosfera. Les principals fonts antropogèniques d'arsènic inclouen l'aplicació de pesticides i l'eliminació de residus sòlids procedents de la combustió de combustibles fòssils i processos industrials [45]. Es creu que les emissions antropogèniques d'arsènic són tres vegades més grans que no pas les emissions naturals [57].

Un cop alliberat a la biosfera, el transport i la compartimentació de l'arsènic dependrà de la seva forma química, així com de les interaccions amb altres materials presents. Qualsevol de les formes solubles es mourà a l'aigua i podrà ser transportada llargues distàncies a través dels rius. No obstant això, l'arsènic també es pot adsorbir als sediments i sòls, particularment a les argiles, òxids de ferro, hidròxids d'alumini, compostos de manganès i material orgànic. Una vegada als sediments, l'arsènic pot ser alliberat de nou a l'aigua a través d'interconversions químiques i biològiques de les espècies d'arsènic. Hi ha dos tipus d'oxidació conegudes que són responsables de la transformació dels compostos d'arsènic al medi ambient; una destrueix l'enllaç carboni-arsènic i s'associa a l'activitat microbiana, mentre que l'altra provoca un canvi en l'estat d'oxidació que pot ser causat o no per l'activitat microbiana. Les transformacions de l'arsènic als sòls són similars a les observades als sistemes aquàtics; l'As(V) predomina en sòls aeròbics, l'As(III) en sòls lleugerament reduïts (per exemple sòls temporalment inundats) i l'arsina, l'arsènic metilat i l'arsènic elemental en condicions molt reduïdes (per exemple, pantans i aiguamolls). A més, l'arsenat pot reduir-se a arsenit en funció del potencial de reducció-oxidació en els sediments o sòls inundats anaeròbics sota certes condicions ambientals. A l'aire les partícules d'arsènic poden ser transportades pel vent i els corrents d'aire fins que són retornades al sòl per deposició humida o seca [59].

Entre els usos comercials de l'arsènic podem trobar: la protecció de la fusta (per exemple l'arsenat de crom i coure), l'electrònica (per exemple els semiconductors d'arseniür de gal·li), els productes medicinals, botànics i agrícoles (fungicides, herbicides, pesticides...), els dessecants, els aliatges no ferrosos, els additius per a pinsos, els decolorants en la fabricació del vidre i la ceràmica, etc. La forma elemental, l'arsènic metàl·lic, s'utilitza com a additiu en aliatges metàl·lics (especialment de plom i coure), reixetes de bateries, fundes de cables i tubs de calderes.

En general, l'arsina és el compost més tòxic d'arsènic i els compostos inorgànics d'arsènic es consideren més tòxics que les formes orgàniques. Els compostos trivalents (arsenits) són més tòxics que els compostos pentavalents (arsenats). Això és degut a que l'As(III) és més mòbil i de 4 a 10 vegades més soluble en aigua que l'As(V) i a més, és termodinàmicament més estable pel fet que predomina en condicions normals [45]. La toxicitat de l'As(V) ve donada pel mimetisme estructural existent entre l'arsenat i el fosfat, de manera que l'arsenat suplantara el fosfat dels processos bioquímics i metabòlics. En el cas de l'As(III) la seva toxicitat és molt més gran, ja que aquest compost és capaç d'oxidar els grups tiol (-SH) presents a les cisteïnes de les proteïnes cel·lulars, així com de potenciar l'aparició d'espècies reactives a l'oxigen.

Els éssers humans poden estar exposats a l'arsènic a partir d'una varietat de fonts ambientals, però l'alimentació constitueix la font més gran de la ingesta, amb petites contribucions de la inhalació d'aire i del consum d'aigua potable. Aproximadament del 5 al 15% de l'arsènic ingerit pels éssers humans és absorbit i els seus compostos es distribueixen al fetge, als ronyons, als pulmons, a la melsa i a la paret del tracte gastrointestinal en les 24 hores següents a l'absorció. Alguns compostos d'arsènic també es poden dipositar als ossos, al cabell, a les ungles i a la pell. Els efectes de la intoxicació aguda i crònica d'arsènic en éssers humans varien en funció del sexe, l'edat, la dosi i la durada de l'exposició i la forma química i l'estat d'oxidació del compost d'arsènic. La inducció de càncer de pulmó sembla ser l'efecte més comú a llarg termini d'una exposició crònica a arsènic inorgànic. Els compostos orgànics que s'acumulen en mariscs i animals marins semblen plantejar pocs riscos per a la salut dels animals i dels éssers humans, ja que els compostos d'arsènic ingerits s'excreten ràpidament. Hi ha moltes manifestacions clíniques de la intoxicació per arsènic, però els símptomes més comunament observats són melanosi, conjuntivitis i hiperkeratosi [15, 60-62].

1.7.4. El plom

El plom (nombre atòmic 82) és un metall blavós o gris platejat amb símbol químic "Pb" i pes atòmic 207,19 g mol⁻¹. Malgrat que el plom té quatre electrons a la seva capa de valència, el seu estat d'oxidació típic és +2 en lloc de +4, ja que només dos dels quatre electrons s'ionitzen fàcilment. A part del nitrat, clorat i clorur, la majoria de les sals inorgàniques de Pb(II) tenen escassa solubilitat en aigua [45].

El plom existeix en moltes formes a la naturalesa i és un dels metalls pesants més uniformement distribuït. Els sòls i les plantes poden ser contaminats per plom provinent de diverses fonts com ara la combustió de combustibles de plom, els tubs d'escapament dels cotxes, els gasos procedents de diverses fonts industrials, les antigues canonades de plom o, fins i tot, els horts on s'utilitzava arsenat de plom com a insecticida. El plom s'acumula als primers 20 centímetres del sòl aproximadament i és poc mòbil. La contaminació per plom es dona generalment a llarg termini. Sense mesures correctives, els alts nivells de plom en sòls difícilment tornen a la normalitat [45].

El plom ocorre de forma natural a l'ambient, però les majors concentracions trobades són resultat de les activitats humanes. Durant molt de temps, la principal font antropogènica de plom van ser les emissions dels vehicles, ja que la gasolina contenia plom (actuant com a antidetonant). La comercialització de benzines amb plom es va prohibir a Espanya l'any 2000 amb el Reial Decret 403/2000 [63]. A causa d'aquestes fonts antropogèniques de contaminació, es crea un cicle no natural del plom que per al cas de les benzines, per exemple, comença als motors dels cotxes on es generen sals de plom (clorurs, bromurs, òxids). Aquestes sals de plom entren a l'ambient a través dels tubs d'escapament dels cotxes, de manera que les partícules grans precipiten al sòl o a la superfície de les gotes d'aigua i les partícules petites poden viatjar llargues distàncies per l'aire i romandre a l'atmosfera durant un temps fins que part d'aquest plom cau de nou sobre el sòl amb la pluja. El plom també pot acabar a l'aigua i als sòls com a conseqüència de la corrosió de les canonades de plom antigues i a través de la corrosió de pintures que contenen plom. Altres activitats humanes, com la combustió del petroli, els processos industrials i la combustió de residus sòlids, també contribueixen a l'entrada de plom a l'ambient. Aquest cicle del plom causat per la producció humana està molt més estès que el cicle natural del plom.

Industrialment, els compostos de plom més importants són els òxids de plom i el tetraetilplom. El plom forma aliatges amb molts metalls i, en general, s'utilitza en aquesta forma en la major part de les seves aplicacions. Tots els aliatges formats amb estany, coure, arsènic, antimoni, bismut, cadmi i sodi tenen importància industrial.

El plom rares vegades es troba en el seu estat elemental, el mineral més comú és el sulfur de plom (galena), els altres minerals d'importància comercial són el carbonat de plom (cerussita) i el sulfat de plom (anglesita), però són molt més rars. També es

troba plom en diversos minerals d'urani i de tori, ja que prové directament de la desintegració radioactiva. Els minerals comercials poden contenir poc plom (3%), però el més comú és un contingut aproximat del 10%. Els minerals es concentren fins a aconseguir un contingut de plom del 40% o més abans de fondre [64]. Els principals països productors de plom són la Xina, Austràlia, Estats Units, Mèxic, Perú, Bolívia i Rússia, que l'extreuen principalment de minerals de zinc, plata o coure.

Del plom utilitzat per la indústria, un 40% es fa servir en forma metàl·lica i un 25% en aliatges. El 35% restant s'empra en forma de diferents compostos químics, tant inorgànics (mini o biòxid de plom) com orgànics (tetraetil i tetrametil de plom, emprats en benzines). L'ús més ampli del plom, com a tal, es troba en la fabricació d'acumuladors i bateries. Altres aplicacions importants són la fabricació de plaguicides, cristall, ceràmiques, folres per a cables, elements per a la construcció, colorants, pintures o esmalts, pigments, aliatges, soldadura suau i municions. S'estan desenvolupant compostos organoplúmbics per a aplicacions com són la de catalitzadors en la fabricació d'escuma de poliuretà, tòxics per a les pintures navals per tal d'inhibir la incrustació d'organismes marins en els cascos, agents biocides contra els bacteris grampositius, protecció de la fusta contra l'atac dels corcs i els fongs marins, preservadors per al cotó contra la descomposició i la floridura, agents mol·lusquicides, agents antihelmíntics, agents reductors del desgast en els lubricants i inhibidors de la corrosió en l'acer.

El plom és un element químic particularment perillós i es pot acumular en organismes individuals, però també pot entrar a la cadena alimentària. El Pb(II) té una toxicitat aguda per als éssers humans quan està present en altes quantitats. Degut a que el Pb(II) no és biodegradable, un cop s'ha contaminat el sòl, continua sent una font d'exposició durant un llarg període [45].

El plom pot entrar al cos humà a través del menjar, l'aigua ingerida i l'aire inhalat. Els aliments com la fruita, els vegetals, la carn, els cereals, el marisc, els refrescos i el vi poden contenir quantitats significants de plom. El fum del tabac també conté petites quantitats de plom. El plom pot contaminar l'aigua potable a través de la corrosió de les canonades antigues, encara que això és més comú que ocorri quan l'aigua és lleugerament àcida.

Els compostos de plom són tòxics i han produït enverinament pel seu ús inadequat i per una exposició excessiva. Tanmateix, actualment l'enverinament per plom és estrany degut a l'aplicació industrial de controls moderns, tant d'higiene com relacionats amb l'enginyeria. El major perill prové de la inhalació de vapor o pols. En el cas dels compostos organoplúmbics, l'absorció a través de la pell pot arribar a ser significativa. Els seus efectes solen sentir-se després d'haver-se acumulat a l'organisme durant un llarg període de temps. Alguns dels símptomes d'enverinament per plom són dolors de cap, anèmia, debilitat, restrenyiment, paràlisi en canells i turmells, vertigen i insomni. En els casos aguts, comunament es presenta estupor que progressa fins al coma i acaba en la mort. Les escates de pintures amb base de plom i les joguines fabricades amb compostos de plom es consideren molt perilloses per als nens, per als quals el plom resulta especialment nociu, fins i tot a nivells que abans es consideraven innocus. El plom pot produir disminució de la intel·ligència, retard en el desenvolupament motor, deteriorament de la memòria i problemes d'audició i equilibri. En adults, el plom pot augmentar la pressió sanguínia [64].

Fitoremediació de metalls pesants

2.1. Remediació de sòls contaminats

La contaminació de sòls per metalls pot ser remediada mitjançant tècniques tèrmiques, fisicoquímiques o biològiques. Els tractaments tèrmics utilitzen la calor per incrementar la volatilització, cremar, descompondre o fondre els contaminants en un sòl. Els tractaments fisicoquímics aprofiten les propietats físiques o químiques dels contaminants i/o dels sòls per separar, destruir o contenir la contaminació. Entre aquest tipus de tècniques podem trobar la lixiviació dels contaminants per rentat amb aigua o amb algun agent quelant, la solidificació o estabilització dels contaminants mitjançant interaccions físiques o químiques entre l'agent estabilitzant i el contaminant, la migració de les espècies iòniques cap a elèctrodes inserits als sòls (tractament electrocinètic) o bé la oxidació o reducció química dels contaminants fins a aconseguir espècies químiques de menor toxicitat i que siguin més estables i menys mòbils. Finalment, els tractaments biològics utilitzen les activitats metabòliques de diversos organismes (plantes, fongs, bacteris, etc.) per eliminar, degradar o transformar els contaminants a productes innocus [65, 66].

Tant els tractaments fisicoquímics com els tèrmics suposen tècniques altament costoses que poden afectar irreversiblement les propietats dels sòls, destruir la

biodiversitat i, fins i tot, inutilitzar el sòl com a mitjà de creixement de plantes. En canvi, els tractaments biològics utilitzen tecnologies que són més beneficioses per al medi ambient, tot i que requereixen majors temps de tractament.

La selecció de la tècnica de remediació apropiada per a cada sòl o sediment depèn de les característiques del sòl a tractar, de la concentració i el tipus de contaminants que cal eliminar i de l'ús final del medi contaminat. Els mètodes inclouen l'aïllament, la immobilització, la reducció de la toxicitat, la separació física o l'extracció del contaminant [66].

Una altra classificació de les tècniques de remediació de sòls, fa referència al lloc on es realitzen els tractaments; així doncs, les podem classificar en tècniques realitzades al mateix lloc on es troba el sòl contaminat (*in situ*) o bé quan és necessari extreure el sòl (*ex situ*). A més, entre les tècniques *ex situ* podem diferenciar les *on site* que es realitzen al mateix lloc on es troba el sòl contaminat després d'extreure'l i les *off site* quan el sòl contaminat es transporta a un altre lloc per tractar-lo. Els tractaments *ex situ* presenten la necessitat d'excavar el sòl, fet que fa augmentar els costos encara que normalment requereixen menor temps de tractament. En canvi, les tècniques *in situ*, tot i que requereixen majors temps de tractament, permeten tractar el sòl sense necessitat d'excavar-lo ni transportar-lo abaratint així els costos del tractament.

Entre els tractaments biològics *in situ* podem trobar la fitoremediació que implica l'ús de plantes per eliminar, transferir, estabilitzar, concentrar o destruir contaminants en sòls, llots i sediments. Entre els avantatges de la fitoremediació, podem dir que és aplicable a grans àrees de sòls contaminats tant amb compostos orgànics en general com amb metalls pesants o elements radioactius. A més, disposa de tots els avantatges de ser una tècnica biològica *in situ*, és a dir, que preserva el medi ambient i permet tractar grans àrees de sòls contaminats sense extreure el sòl. El principal inconvenient però, és que requereix llargs períodes de temps en comparació amb altres mètodes i que cal un procés de tractament posterior per eliminar la biomassa recol·lectada.

2.2. Definició de fitoremediació

El terme fitoremediació (del grec antic *phyto* que significa planta, i el sufix llatí *remedium*, que vol dir netejar o restaurar) es refereix a una col·lecció diversa de tecnologies basades en l'ús de plantes per eliminar contaminants del medi ambient o reduir-ne la seva toxicitat fins a fer-los innocus. Cal dir que algunes plantes que creixen en sòls miners han desenvolupat la capacitat d'acumular grans quantitats de metalls en els seus teixits sense símptomes de toxicitat [67].

La idea que les plantes es poden utilitzar per a la remediació ambiental és molt antiga i no pot localitzar-se'n la font concreta. Una sèrie de descobriments científics, combinats amb la investigació interdisciplinària, ha permès que la fitoremediació esdevingués una tecnologia prometedora, rendible i respectuosa amb el medi ambient. Això no obstant, és necessària una investigació més profunda i, fins i tot, modificar la genètica de les plantes o fongs per millorar l'extracció de contaminants, a més de seleccionar les espècies més eficients i amb un creixement ràpid.

La fitoremediació pot ésser aplicada tant a contaminants orgànics com als inorgànics, presents en substrats sòlids (per exemple els sòls), líquids i l'aire.

2.3. Tècniques de fitoremediació

Depenent dels contaminants, les condicions ambientals, el nivell de remediació desitjat i el tipus de plantes utilitzat, es pot utilitzar la fitoremediació per contenir o immobilitzar el contaminant (fitofiltració i fitostabilització) o bé eliminar-lo (fitovolatilització i fitoextracció) [67].

- *Fitofiltració*

La fitofiltració es basa en l'ús de les arrels (rizofiltració) o els brots (blastofiltració) per absorbir contaminants, principalment metalls, de l'aigua o els corrents residuals contaminats.

Les arrels de les plantes o els brots cultivats en aigua airejada poden absorbir, precipitar i concentrar metalls tòxics d'efluents contaminats. La rizofiltració

utilitza plantes terrestres enlloc de plantes aquàtiques ja que presenten sistemes més grans d'arrels fibroses cobertes amb pèls radiculars de superfícies molt grans. Els contaminants metàl·lics més comunament extrets per precipitació o floculació són els que es troben en aigües procedents de processos industrials i en aigües subterrànies, seguit per una etapa de sedimentació i eliminació del fang resultant. El procés consisteix en el cultiu de plantes hidropòniques per trasplantar-les a aigües contaminades amb metalls on les plantes absorbeixen i concentren els metalls a les seves arrels i els brots.

- *Fitostabilització*

La fitostabilització consisteix en l'ús de certes espècies de plantes que, bé per absorció o bé per precipitació, immobilitzen el metall a les arrels. Aquest procés redueix la mobilitat dels contaminants i n'evita la migració a través del vent, el transport dels sòls superficials contaminats, la lixiviació del sòl i les aigües subterrànies.

- *Fitovolatilització*

Alguns metalls contaminants com ara As, Hg i Se poden existir com a espècies gasoses al medi ambient. Recentment, els investigadors han buscat plantes d'origen natural o modificades genèticament capaces d'absorbir formes elementals d'aquests metalls del sòl, convertir-los biològicament a espècies gasoses dins la planta i alliberar-los a l'atmosfera. Aquest procés es diu fitovolatilització.

Aquesta és la tecnologia de fitoremediació més polèmica. El Hg i el Se són tòxics, i hi ha dubtes sobre si la volatilització d'aquests elements a l'atmosfera és desitjable i segura.

- *Fitoextracció*

La fitoextracció, també anomenada fitoacumulació, consisteix en l'absorció i translocació de contaminants del sòl des de les arrels a la part aèria de la planta, la qual posteriorment es recol·lecta per tal d'eliminar el contaminant del medi.

Les tècniques de fitoremediació de metalls pesants més estudiades inclouen la fitostabilització i la fitoextracció, que més endavant es descriuran amb més detall.

2.4. Tipus de plantes emprades en fitoremediació

Les plantes poden acumular metalls pesants essencials per al seu creixement i desenvolupament com ara Fe, Mn, Zn, Cu, Mg i Mo. A més a més, algunes plantes tenen la capacitat d'acumular metalls pesants sense funcions biològiques conegudes, com ara Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se i Hg [65, 68].

Podem classificar les plantes en funció de la seva capacitat per acumular metalls pesants. Així distingim les *exclusores*, que concentren els metalls pesants absorbits als vacúols de les arrels, restringint el transport cap a la tija i mantenint així una concentració baixa de metalls a les fulles. La exclusió és l'estratègia de tolerància més característica d'espècies sensibles als metalls i pot ser eficient per a tecnologies de fitostabilització.

Les plantes *acumuladores*, que concentren els metalls a la part aèria en forma no nociva per a les plantes, ja sigui mitjançant un enllaç amb cèl·lules de la paret, emmagatzematge dels ions a l'interior dels vacúols, complexació per àcids orgànics i, possiblement, per proteïnes específiques i altres propietats com adaptacions enzimàtiques i efectes en la permeabilitat de la membrana.

I, finalment les plantes *indicadores*, on l'absorció i el transport dels metalls és regulat de manera que la concentració interna reflexa els nivells externs, almenys fins arribar a la toxicitat [34].

També podem distingir però, certes plantes anomenades *hiperacumuladores* que poden tolerar, acumular i segrestar inusualment grans quantitats de metalls, sense símptomes de toxicitat visibles, en comparació amb altres plantes no acumuladores i amb la concentració de metalls a l'ambient. La definició es basa en estudis comparatius, indicant que en sòls metal·lífers la majoria de les plantes acumulen baixes concentracions d'ions metàl·lics als seus brots, mentre que algunes espècies endèmiques de llocs metal·lífers n'acumulen clarament grans quantitats. Per què una planta pugui ser identificada com un hiperacumulador ha d'acumular 0,1% d'elements com ara Al, As, Co Cr, Cu, Pb, Ni i Se en pes sec de biomassa; 1% de Zn i Mn, 0,01% de Cd i 0,001% de Hg [16, 37, 65, 69].

Es coneixen més de 450 plantes hiperacumuladores que van des de plantes anuals fins a perennes, geogràficament distribuïdes en tots els continents, tant en ambients temperats com tropicals. Aquestes plantes, usades en tecnologies de fitoextracció, són seleccionades i plantades en un lloc determinat en base al contingut de metalls presents i les condicions del lloc i, després d'haver crescut durant diverses setmanes o mesos, es cullen. La sembra i la collita es pot repetir per reduir els nivells de contaminants als límits permesos. El temps necessari per a la remediació depèn del tipus i el grau de contaminació per metalls, la durada de la temporada de creixement i l'eficiència de l'acumulació de metalls a les plantes, però normalment pot oscil·lar entre 1 i 20 anys.

Una de les principals limitacions de les plantes hiperacumuladores és l'escassa producció de biomassa, ja que tendeixen a utilitzar més energia per als mecanismes necessaris per adaptar-se a les altes concentracions de metalls dels teixits que no pas per augmentar la biomassa. Per a aquest propòsit s'han utilitzat tècniques agronòmiques com la fertilització o l'aplicació de l'enginyeria genètica per incrementar la biomassa de les plantes. L'enginyeria genètica implica la interpretació, clonació i transferència dels gens responsables de la hiperacumulació a les plantes amb major tolerància, major capacitat d'acumular o degradar diversos contaminants i produir major biomassa.

És per això que és molt important seguir investigant les plantes hiperacumuladores de metalls, la caracterització dels mecanismes usats per acumular, transportar i tolerar metalls i, eventualment, la clonació i l'ús d'aquests gens per a convertir-les en plantes amb elevada capacitat de producció de biomassa i amb elevada aptitud per acumular metalls pesants.

2.4.1. Fitostabilització mitjançant l'ús de plantes exclusores

A diferència d'altres tècniques de fitoremediació, la fitostabilització no està dissenyada per eliminar els contaminants metàl·lics d'un lloc, sinó més aviat per estabilitzar-los mitjançant l'acumulació o la precipitació a les arrels, reduint així el risc per a la salut humana i el medi ambient (Figura 7). Les plantes més adients per a aquest tipus de fitoremediació són les anomenades exclusores. La fitostabilització s'aplica en situacions on hi ha un risc importat per a la salut humana i l'exposició a les substàncies de risc es pot reduir a nivells acceptables mitjançant la contenció. La fitostabilització és més eficaç en sòls de textura fina amb alt contingut en matèria orgànica, però és

adequada per al tractament d'una àmplia varietat de llocs amb grans àrees subjectes a contaminació superficial. No obstant això, alguns llocs altament contaminats no són adequats per a la fitostabilització, perquè el creixement i la supervivència de la planta és impossible. La fitostabilització té avantatges sobre altres pràctiques de remediació de sòls ja que és menys costosa, més fàcil d'implementar i estèticament preferible.

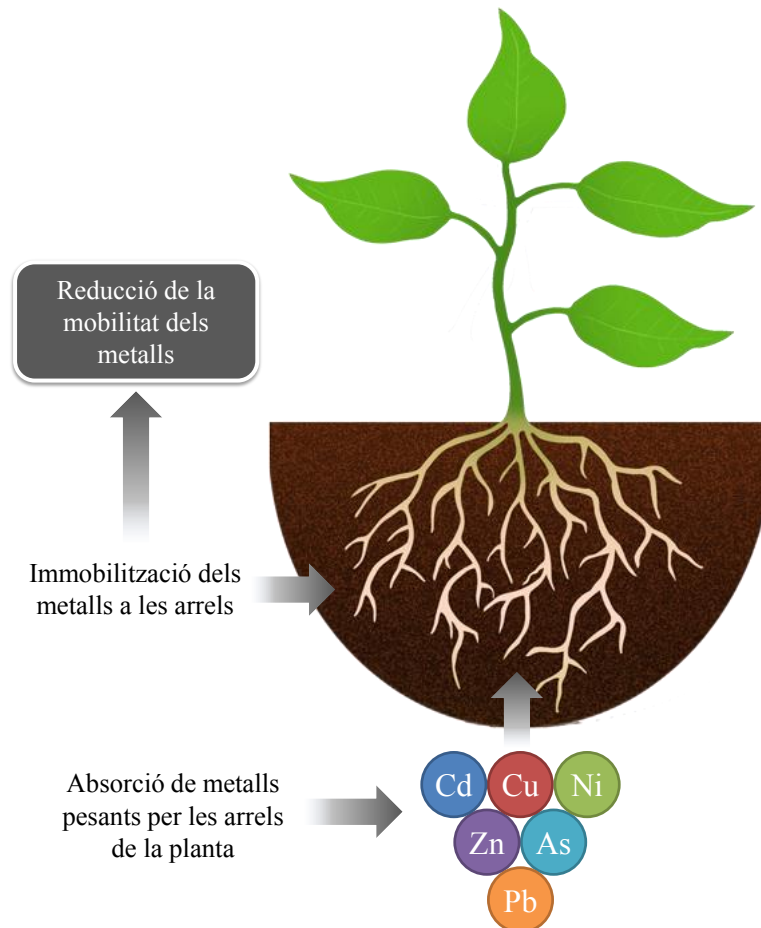


Figura 7. Representació esquemàtica dels processos implicats en la fitostabilització de metalls dels sòls (adaptat de [70]).

Aquesta tècnica disminueix l'impacte visual, ja que es cobreix la superfície del sòl amb plantes, d'aquesta manera, les arrels estableixen físicament el sòl per prevenir l'erosió, reduir la percolació de l'aigua, prevenir el contacte directe dels éssers vius amb el sòl contaminat, augmentar la biodiversitat i millorar la deposició orgànica i el cicle de nutrients, beneficiant la superfície del sòl i deixant els metalls inactius.

Les característiques de les plantes adequades per a la fitostabilització en un lloc particular, inclouen una elevada tolerància a alts nivells del contaminant d'interès, una

alta producció de biomassa de les arrels capaces d'immobilitzar aquests contaminants a través de l'absorció, la precipitació o la reducció, i una elevada retenció dels contaminants a les arrels enlloc de transferir-los a la part aèria, per evitar la manipulació especial i l'eliminació dels brots.

2.4.2. Fitoextracció mitjançant l'ús de plantes hiperacumuladores

El terme fitoextracció fa referència principalment a l'eliminació de metalls pesants o radionúclids dels sòls mitjançant les habilitats acumuladores que tenen les plantes (Figura 8). Sovint els termes fitoremediació i fitoextracció s'utilitzen incorrectament com a sinònims, però la fitoremediació és un concepte, mentre que la fitoextracció és una tecnologia específica de neteja. Aquesta tecnologia s'ha proposat per disminuir les concentracions tòxiques de metalls en sòls contaminats i per descontaminar i restaurar la fertilitat d'àrees contaminades. La fitoextracció mitjançant plantes hiperacumuladores permet evitar excavacions extensives del terreny i elevats costos o pèrdues de sòl superficial associades a les pràctiques de remediació tradicional [16].

Degut a la dimensió i l'abast dels problemes ambientals associats als sòls contaminats per metalls i l'avantatge competitiu ofert per les tecnologies de remediació basades en plantes, la fitoextracció de metalls pesants representa un dels mètodes més econòmics per a la fitoremediació de sòls contaminats.

La planta ideal per ser utilitzada en fitoextracció ha de ser tolerant a alts nivells de metall i acumular-lo a les seves parts recol·lectables, a més de tenir una taxa de creixement ràpid, produir una elevada biomassa i tenir un sistema radicular profús [68].

Hi ha dues estratègies bàsiques de fitoextracció: la fitoextracció assistida per quelants (també anomenada fitoextracció induïda) i la fitoextracció contínua a llarg termini. La fitoextracció induïda es basa en l'aplicació de quelants de metalls al sòl per augmentar significativament l'acumulació de metalls a les arrels amb el posterior transport dels metalls a les parts recol·lectables. Aquesta estratègia s'utilitza quan la biodisponibilitat del metall no és adequada per a la planta, per aquest motiu s'afegeixen agents quelants o acidificants al sòl per solubilitzar-los. A més, la posterior formació de complexos metall-quelant també pot prevenir la precipitació i la sorció de metalls,

mantenint així la disponibilitat per a les plantes [67, 68, 71]. La concentració total de metalls extrets d'un lloc és el producte de la concentració total de metall a la part recol·lectable de les plantes i la biomassa total recol·lectada.

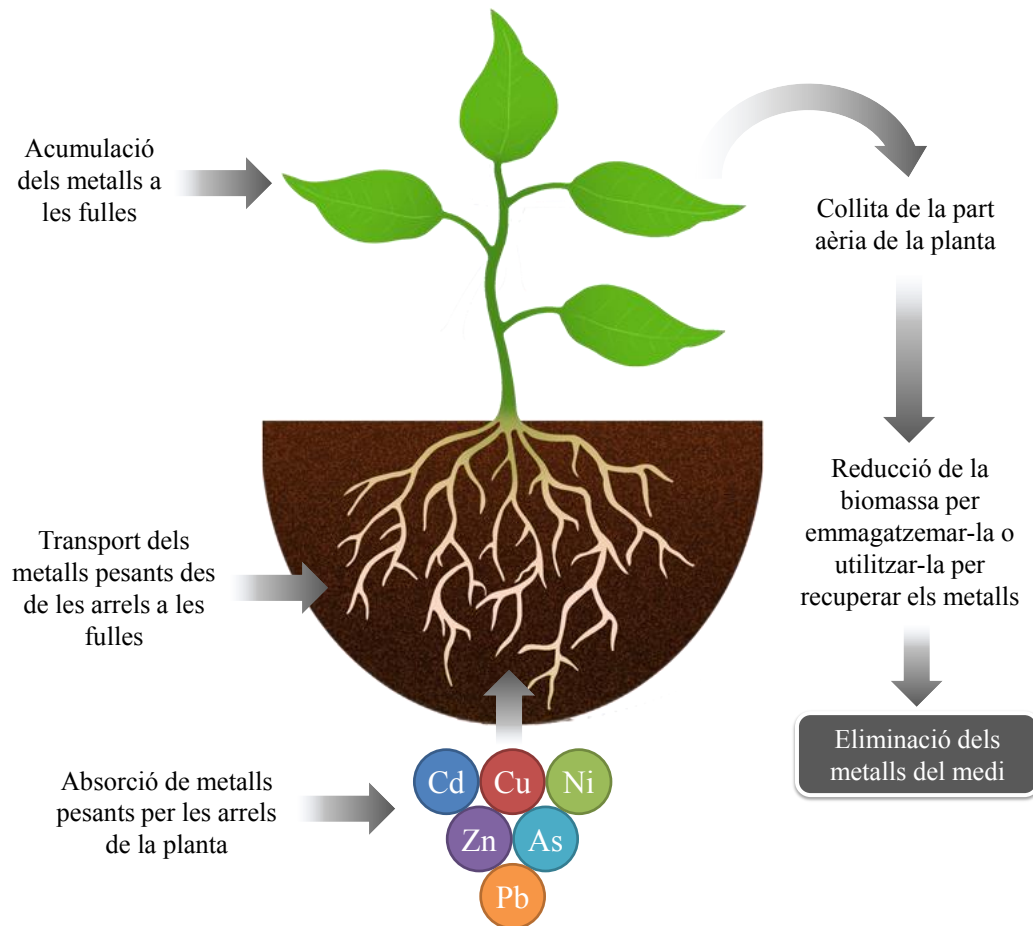


Figura 8. Representació esquemàtica dels processos implicats en la fitoextracció de metalls dels sòls (adaptat de [70]).

A diferència de la fitoextracció induïda, la fitoextracció contínua es basa en les capacitats genètiques o fisiològiques de les plantes per acumular, deslocalitzar i resistir grans quantitats de metalls pesants. Els principals inconvenients de l'ús d'hiperacumuladors metàl·lics naturals per a la fitoextracció contínua són la seva relativament baixa biomassa, les baixes taxes de creixement i la manca d'hiperacumuladors eficients per als contaminants metàl·lics més importants del medi ambient (per exemple plom, cadmi, arsènic i urani). No obstant això, la comprensió dels mecanismes biològics de l'hiperacumulació pot ajudar al desenvolupament de les plantes per a la fitoremediació de metalls [71].

Gestió de la biomassa després de la fitoextracció

La fitoextracció implica el cultiu repetit de plantes en el sòl contaminat fins que la concentració de metall es redueixi a un nivell acceptable. De cada cultiu, se'n recol·lecta la part aèria, fet que condueix a l'acumulació de grans quantitats de biomassa contaminada amb metalls que ha de ser emmagatzemada o eliminada adequadament per minimitzar el risc ambiental.

Després de la collita, el volum dels residus es pot reduir per mitjans tèrmics, microbians, físics o químics. El compostatge i la compactació són tractaments post-collita que permeten reduir-ne el volum i l'aigua acumulada. Tot i que el compostatge pot reduir significativament el volum de la biomassa collida, la biomassa contaminada amb metall encara requereix un tractament abans de la seva eliminació. En el cas de la compactació, s'ha de tenir cura per recollir i disposar els lixiviats contaminants que es generen quan es premsa la biomassa [72]. Una ruta prometedora per tractar la biomassa és a través dels processos de conversió termoquímics com la combustió, la incineració o la piròlisi. Amb alguns metalls com Ni, Zn, Cu, etc., el valor dels metalls recuperats pot constituir un incentiu addicional per a la fitoremediació [67].

2.5. Valoració i índexs de tolerància als metalls

Per tal de valorar la capacitat de les plantes per acumular metalls pesants s'han establert uns índex que reflecteixen tant l'acumulació de metalls pesants com el seu moviment dins la planta. Entre els més àmpliament utilitzats podem trobar:

- Factor de bioconcentració (BCF)

S'anomena també Coeficient d'absorció biològica (BAC) o Factor de concentració (C_f). Es defineix com la relació entre la concentració de metall a la planta ($C_{M,planta}$) respecte a la concentració total de metall al sòl ($C_{M,sòl}$) (Eq. 1). Aquest índex és especialment usat per a comparar l'eficiència de diferents plantes [16].

$$BCF = \frac{C_{M,planta}}{C_{M,sòl}} \quad (Eq. 1)$$

– Factor de bioacumulació (BAF)

També és conegut com a Factor de remediació (RF), Índex de bioacumulació (IBA) o Factor d'acumulació a les fulles (SAF). És la proporció de l'element contingut a la part aèria de la planta ($C_{M,part\ aèria}$) respecte a la concentració a la superfície del sòl ($C_{M,sòl}$) (Eq. 2). Aquest índex indica si la planta és apta per als processos de fitoextracció [73].

$$BAF = \frac{C_{M,part\ aèria}}{C_{M,sòl}} \quad (Eq. 2)$$

– Factor de translocació (TF)

També s'anomena Factor de transferència o Factor de transport i relaciona l'acumulació de metalls a la part aèria ($C_{M,part\ aèria}$) amb la concentració acumulada a les arrels ($C_{M,arrels}$) (Eq. 3). S'utilitza per a mesurar l'efectivitat de la planta en la translocació de metalls pesants des de les arrels fins a la part aèria [73]. Així quan una planta tingui un TF menor que 1 la classificarem com a exclusora, mentre que serà acumuladora si és major que 1 [74].

$$TF = \frac{C_{M,part\ aèria}}{C_{M,arrels}} \quad (Eq. 3)$$

2.6. Mecanismes cel·lulars de tolerància i desintoxicació de metalls pesants en plantes

La tolerància de les plantes als metalls pesants pot ser definida com la capacitat de sobreviure en un sòl contaminat amb metalls pesants i es manifesta en una interacció entre un genotip i el seu entorn. El terme tolerància sovint s'utilitza de manera més àmplia a la literatura per referir-se a canvis que es puguin produir a les plantes en resposta als metalls pesants.

Algunes espècies de plantes han desenvolupat variants tolerants que poden sobreviure i créixer en aquests sòls metal·lífers, presumiblement mitjançant l'adaptació de mecanismes que també poden estar implicats en l'homeòstasi general i la tolerància als ions metàl·lics essencials que es troben en totes les espècies. Les plantes tenen una

àmplia gamma de mecanismes a nivell cel·lular que podrien estar involucrats en la desintoxicació i, per tant, la tolerància a l'estrès per metalls pesants. Entre aquests mecanismes podem trobar els extracel·lulars que inclouen les funcions de les micorizes i de la paret cel·lular i els exsudats extracel·lulars per immobilitzar els metalls. La tolerància també podria implicar la exclusió degut a la membrana plasmàtica, ja sigui mitjançant la reducció de l'absorció de metalls pesants o mitjançant la simulació del bombeig del flux de sortida dels metalls que han entrat al citosol. Dins del protoplast hi tenen lloc una àmplia varietat de mecanismes com per exemple la reparació de les proteïnes danyades per l'estrès amb proteïnes de xoc tèrmic o metal·lotioneïnes, la quelació de metalls per àcids orgànics, aminoàcids o pèptids, i la seva compartimentació fora dels processos metabòlics mitjançant el transport als vacúols. Aquests mecanismes cel·lulars han estat àmpliament estudiats pel cas del Cd [71, 75-77] i hi ha evidències de que sigui extrapolable a altres metalls. A continuació es detallen els mecanismes principals de tolerància i desintoxicació de metalls pesants que es troben resumits a la Figura 9 [75].

2.6.1. Micorizes

Les micorizes són fongs del sòl que es troben en associació simbiòtica amb les arrels de la majoria de les plantes; la planta obté del fong la part que ve del sòl (nutrients minerals i aigua) mentre que el fong obté de la planta la part que ve de l'aire (energia i carbohidrats de la fotosíntesi). Les plantes micoritzades presenten una major tolerància als metalls pesants gràcies a la capacitat per immobilitzar-los a les arrels, impedit que aquests passin a la part aèria de la planta (Figura 9a). El fong és capaç d'impedir l'entrada de metalls pesants i afavorir la seva acumulació a les arrels [78].

2.6.2. Paret cel·lular i exsudat de les arrels

Encara que la paret de les cèl·lules de les arrels es troba en contacte directe amb els metalls de la solució de sòl, l'absorció de metalls a través de la paret cel·lular és limitada i, per tant, té un efecte moderat sobre l'activitat del metall a la superfície de la membrana plasmàtica. Això no obstant, a la bibliografia s'han trobat estudis on plantes tolerants als metalls pesants acumulen metalls a les parets cel·lulars, ja sigui enllaçats amb proteïnes o com a silicats [75].

Un procés relacionat amb aquesta tolerància als metalls engloba les funcions de l'exsudat de les arrels. Els exsudats són compostos orgànics alliberats per les arrels de les plantes que tenen diferents funcions, entre elles la de complexar metalls, fet que pot augmentar l'absorció d'alguns metalls a les arrels, minimitzant a la vegada l'entrada d'aquests elements a la cèl·lula (Figura 9b).

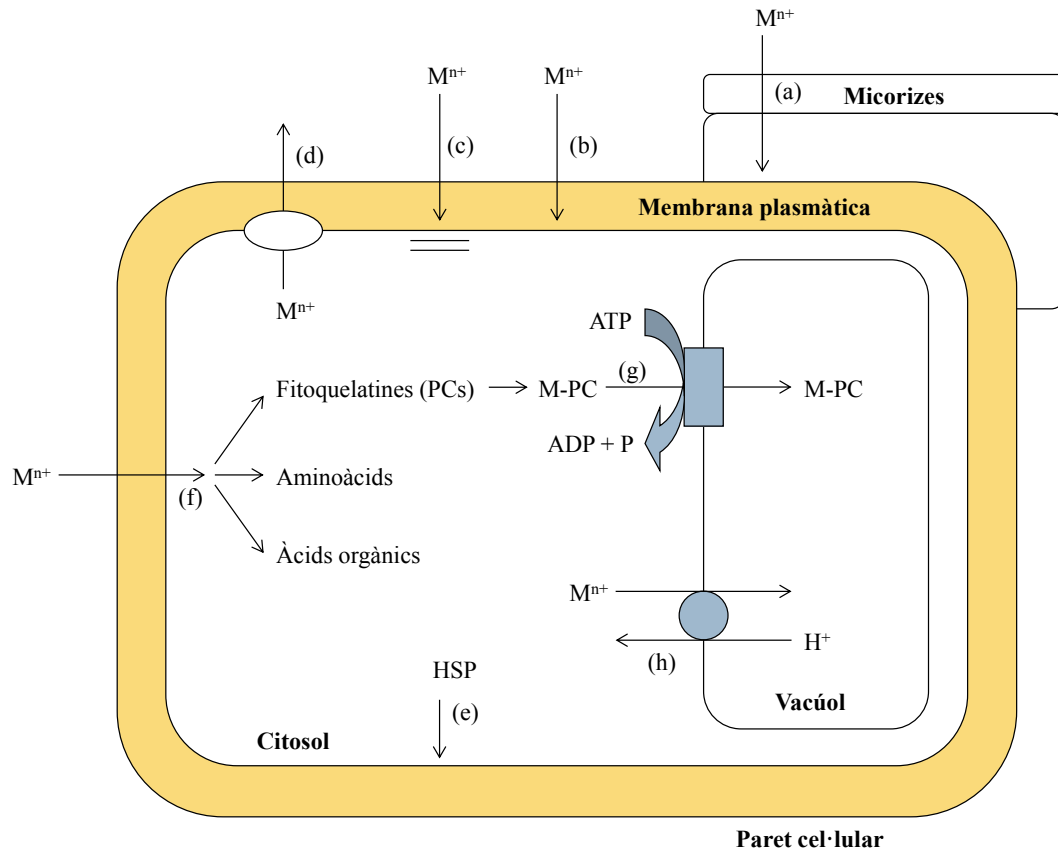


Figura 9. Resum dels mecanismes de tolerància i desintoxicació de metalls pesants en plantes. (a) Immobilització dels metalls a les arrels per micorizes. (b) Immobilització dels metalls a la paret cel·lular i a l'exsudat de les arrels. (c) Exclusió a través de la membrana plasmàtica. (d) Bomba de flux de sortida de metalls a la membrana plasmàtica. (e) Reparació i protecció de la membrana plasmàtica sota condicions d'estrès. (f) Quelació dels metalls al citosol mitjançant diferents lligands. (g) Transport del complex M-PC a l'interior dels vacúols. (h) Transport i acumulació de metalls a l'interior dels vacúols mitjançant transportadors (adaptat de [75]).

2.6.3. Membrana plasmàtica

La membrana plasmàtica és un sistema complex i d'un desenvolupament altament sofisticat que funciona com a porta d'entrada de qualsevol element al citosol, el lloc on

es realitza la química que manté la cèl·lula en vida. La principal característica d'aquesta barrera és la permeabilitat selectiva, que permet seleccionar les molècules que poden travessar la cèl·lula de dins a fora o a l'inrevés. D'aquesta forma es manté estable el medi intracel·lular, regulant el pas d'aigua, molècules i elements. El pas de metalls a través de la membrana plasmàtica es produeix mitjançant difusió facilitada o a través de proteïnes transportadores que faciliten l'energia necessària per efectuar l'operació (Figura 9c, d). No obstant això, hi ha poques evidències pel que fa a les proteïnes transportadores, sobretot pel sistema de bombeig de metalls cap a l'exterior. [75]

2.6.4. Biotransformació i mecanismes de reparació cel·lular

La biotransformació és un conjunt de reaccions de descomposició, conjugació o síntesi implicades en el correcte processament dels contaminants. Els mecanismes de reparació cel·lular són dispositius que en resposta a la deterioració soferta (com ara l'estrès oxidatiu), restableixen les característiques inicials de la planta. Després d'estar sota condicions d'estrès (altes temperatures, metalls pesants, salinitat elevada, sequera, etc.) les cèl·lules de les plantes sintetitzen proteïnes de xoc (HSP) (Figura 9e). Aquestes proteïnes tenen molts mecanismes per contrarestar la situació d'estrès [76].

2.6.5. Quelació dels metalls

Un dels aspectes més importants de l'acumulació de metalls pesants és el que es refereix al procés de complexació on el metall s'envolta de lligands per formar un complex. La planta utilitza aquest mecanisme de complexació a l'interior de la cèl·lula per reduir la concentració de metall lliure, disminuint així la toxicitat dels metalls pesants. D'aquesta manera el metall queda immers en una interacció química que el manté en equilibri electrònic, però que no el deixa fora del metabolisme (no s'ha eliminat del citoplasma de la cèl·lula) i per això segueix sent potencialment tòxic. Els metalls pesants mostren una gran afinitat per determinats grups funcionals, com ara grups sulfhidril, radicals amino, grups fosfat, carboxil i hidroxil. Per això els lligands que utilitza la planta són bàsicament àcids orgànics i aminoàcids, més específicament dos classes de pèptids rics en cisteïna: les fitoquelatines (en el cas dels vegetals i els fongs) i les metal·lotioneïnes (en el cas dels mamífers, principalment) (Figura 9f). Entre els aminoàcids i els àcids orgànics podem trobar els àcids cítric i màlic, la histidina i la

cisteïna, entre d'altres [75, 78]. En aquest estudi ens centrarem únicament en les fitoquelatines.

2.6.6. Compartimentació vacuolar

El flux de sortida d'ions de la membrana plasmàtica (explicat anteriorment) o el transport als vacúols són dues maneres de reduir els nivells de metalls tòxics del citosol i, per això són dos mecanismes importants per a la tolerància als metalls pesants.

La compartimentació vacuolar preveu limitar la circulació d'ions metàl·lics a una única àrea, els vacúols. Un exemple ben documentat és l'acumulació de Cd als vacúols en forma de complexos de Cd amb fitoquelatines mitjançant un transportador (Figura 9g), però hi ha evidències de l'acumulació d'altres metalls, involucrant diferents sistemes de transport del tonoplast (Figura 9h) [75].

2.6.7. Transport dels metalls

El principal punt d'entrada de metalls pesants a les plantes és mitjançant les arrels, com s'ha discutit anteriorment. Els mecanismes de resistència metàl·lica en espècies amb estratègies d'exclusió (principalment utilitzades en fitostabilització) es basen en l'acumulació del metall a les arrels, preferentment als vacúols, i en la restricció del transport cap a les fulles. Contràriament, les plantes hiperacumuladores (utilitzades en fitoextracció) emmagatzemen una petita part del metall als vacúols de les arrels i exporten una gran quantitat a la part aèria. Així doncs, per a una fitoextracció eficaç dels sòls, els metalls pesants han de ser transportats als teixits de la part aèria de les plantes per poder ser recol·lectats. El transport del metall de les arrels a les fulles ha estat estudiat pel cas del cadmi i del zinc en diverses plantes i s'ha proposat que es produeixi a través del xilema (sistema de transport de la saba bruta a la part més distal de la planta) [65, 79].

No obstant això, els mecanismes moleculars pel transport de llarga distància en plantes segueixen sent en gran mesura desconeguts. El model general de la transposició de metalls inclou un primer pas des del simplast de les arrels fins als vasos del xilema mitjançant el qual seran transportats, controlats activament per la transpiració, la funcionalitat dels diferents transportadors, l'acumulació de metalls a les cèl·lules de la parènquima i altres processos metabòlics, i finalment reabsorbits per les cèl·lules

foliàcies del mesòfil mitjançant proteïnes de membrana transportadores [71, 79, 80]. El transport, quan es necessari, es pot donar a la inversa, és a dir, de les fulles a les arrels a través dels vasos del floema (sistema de transport dels nutrients a la part basal de la planta). De fet, diversos treballs estudien la possible formació de glutatió i fitoquelatines a les fulles i el posterior transport a les arrels a través del floema [81]. No obstant això, encara es desconeix si les fitoquelatines es transporten des de les arrels als brots de les plantes juntament amb el metall i si les fitoquelatines afecten el transport a llarga distància [79]. Un cop a la part aèria, el metall s'acumula principalment a les tricomes de la superfície de les fulles. L'emmagatzematge del metall a les tricomes representa un mecanisme de desintoxicació, degut a què les tricomes constitueixen un teixit epidèrmic de les plantes on la toxicitat dels metalls no és significativa per a l'organisme [80].

2.7. Les fitoquelatines

Les fitoquelatines (d'aquí en endavant abreviades com a PCs) són pèptids rics en cisteïna que sintetitzen les plantes, les algues i alguns fongs i que s'enllacen als metalls pesants mitjançant el grup tiol. Les fitoquelatines estan involucrades en la desintoxicació i l'homeòstasi dels metalls pesants i per això fan la funció anàloga a la que les metal·lotioneïnes fan en els animals i alguns fongs [82].

Van ser descobertes per Grill *et al.* (1985) que en van determinar la seva estructura [83]. Posteriorment, es reafirmà l'existència de les fitoquelatines i es postulà la funció de desintoxicació de metalls pesants.

2.7.1. Estructura

Les fitoquelatines (PCs) estan constituïdes per només tres aminoàcids: àcid glutàmic (Glu), cisteïna (Cys) i glicina (Gly) amb els pèptids Glu i Cys units mitjançant un enllaç γ -carboxilàmida. Les PCs formen una família d'estructures amb repeticions del dipèptid γ -Glu-Cys seguit per una Gly terminal. La forma general d'aquests pèptids s'expressa com $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, on n pot arribar a ser 11, encara que normalment està en el rang de 2 a 5 [84-86]. La manera d'anomenar aquests lligands és PC₂, PC₃, PC₄, PC₅ i així successivament segons n sigui 2, 3, 4 o 5 (Figura 10).

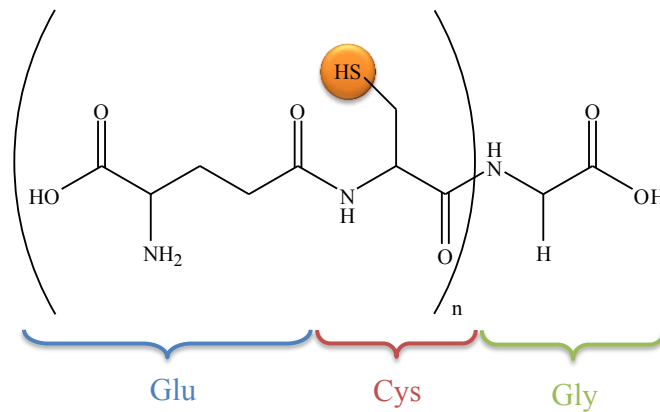


Figura 10. Estructura general d'una fitoquelatina (PC_n). Es mostren els tres aminoàcids que la formen i es ressalta el grup sulfhidril, el més reactiu.

Les fitoquelatines estan estructuralment relacionades amb el glutatió, fet que suggereix la seva participació en la síntesi de fitoquelatines. A més a més, tenen un nombre important de variants estructurals, les famílies de les quals presenten l'estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ i $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$. Aquestes quatre famílies, anomenades també iso-fitoquelatines i, juntament amb les fitoquelatines com les hem descrit abans, formen la classe III de les metal·lotioneïnes [84, 85, 87].

2.7.2. Biosíntesi

Nombrosos estudis fisiològics, bioquímics i genètics han confirmat que el glutatió (o en alguns casos els compostos relacionats) és el substrat de la biosíntesi de fitoquelatines [85, 87]. El glutatió (GSH) és un tripèptid d'estructura $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$ considerat el pèptid no proteic més abundant a les cèl·lules. A més, és una molècula clau en el balanç de l'estat oxidatiu de la cèl·lula. També participa en processos de desintoxicació de diverses substàncies lesives i és capaç de complexar metalls pesants per si mateix. La síntesi del glutatió es produeix a partir dels tres pèptids per via seqüencial mitjançant dos enzims i amb l'aportació d'energia de molècules d'ATP (Figura 11). El primer enzim de la ruta biosintètica del glutatió, la γ -glutamilcisteïn sintetasa (GCS), catalitza la formació de l'enllaç poc habitual entre el grup γ -carboxil de l'àcid glutàmic i el grup α -amino de la cisteïna (Figura 11a). La glutatió sintetasa (GS) catalitza el segon pas combinant la $\gamma\text{-Glu-Cys}$ amb una Gly per formar una molècula de $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$ (Figura 11b).

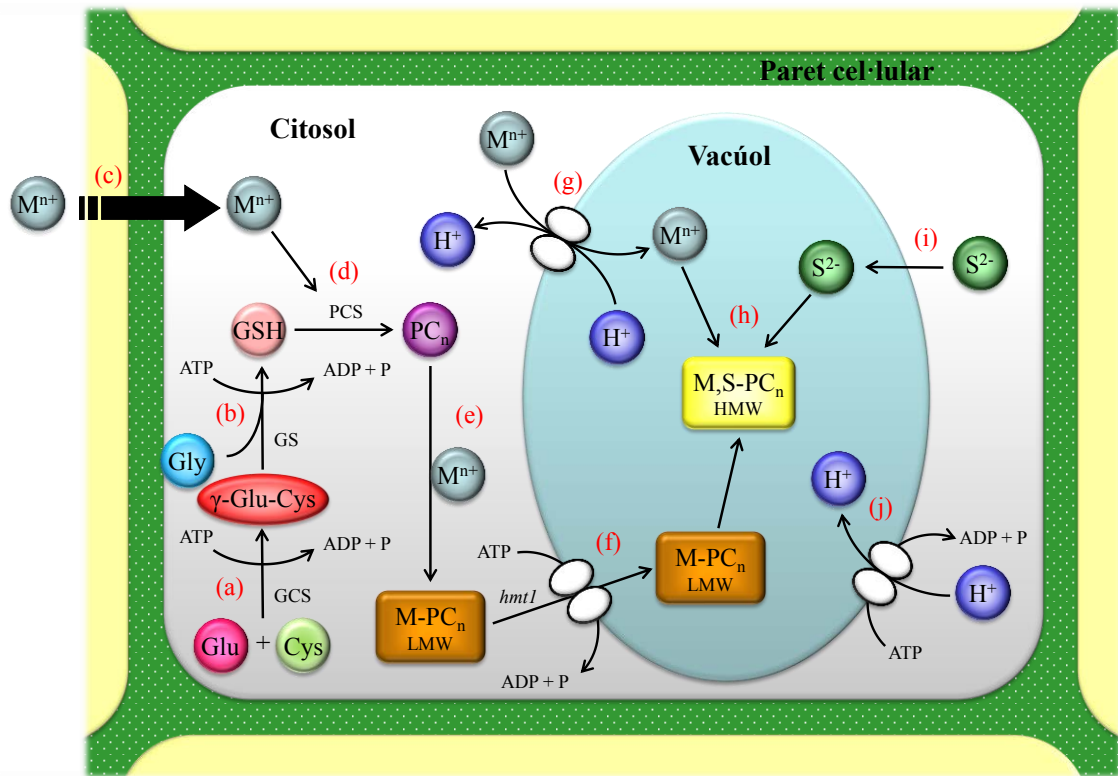


Figura 11. Síntesi de fitoquelatines, model de localització cel·lular dels complexos M-PC i resum dels mecanismes de transport associats. (a) Síntesi de la γ -Glu-Cys. (b) Síntesi del glutatió (GSH). (c) Entrada de metall a la cèl·lula. (d) Síntesi de fitoquelatines. (e) Síntesi del complex $M-PC_n$ de baix pes molecular (LMW). (f) Transport del complex $M-PC_n$ LMW amb un transportador d'ATP al tonoplast. (g) Antiport M^{n+}/H^+ . (h) Formació del complex $M-PC_n$ d'alt pes molecular (HMW). (i) Mecanisme d'arribada de sulfur. (j) ATPasa vacuolar que genera un gradient de protons. (adaptat de [76, 84-87]).

El fet de que les PCs sorgeixen per extensió de la cadena del GSH ha estat demostrat en diverses publicacions i basant-se en (a) la semblança estructural entre les PCs i el GSH, (b) l'aparició de PCs amb la concomitant desaparició de GSH amb l'addició de Cd(II) en plantes, (c) la reducció o la inhibició de la síntesi de PCs en plantes genèticament modificades mancades dels enzims GCS o GS que catalitzen la síntesi de GSH i (d) la inhibició de la síntesi de PCs per inhibidors de la síntesi del GSH [82, 87].

La γ -Glu-Cys dipeptidil transpeptidasa, comunament anomenada fitoquelatin sintasa (PCS) és l'enzim encarregat de sintetitzar fitoquelatines a partir del glutatió transferint una unitat γ -Glu-Cys d'un donador a un acceptor (Figura 11d). La reacció involucra la transpeptidació de la unitat γ -Glu-Cys del GSH a, inicialment, una segona

molècula de GSH per formar la $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{-Gly}$ (PC_2), o a una molècula de $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (PC_n) per formar un oligòmer $n+1$ [87]. Malgrat això, s'han postulat altres mecanismes, més tard descartats, de la síntesi de PCs com ara la transmissió d'una unitat $\gamma\text{-Glu-Cys}$ sintetitzada mitjançant la GCS a una molècula de GSH per formar la PC_2 o bé la polimerització d'unitats $\gamma\text{-Glu-Cys}$ per formar una molècula oligomèrica d'estructura $[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n$ i enllaçades a la Gly de manera similar a la reacció catalitzada per l'enzim GS [88].

La síntesi de fitoquelatines és activada per la presència de metalls pesants al citosol de la cèl·lula (Figura 11c). El mecanisme mitjançant el qual la PCS és activada sembla ser no específic respecte al metall activador, encara que hi ha metalls que són més efectius que d'altres [89, 90]. S'han provat diversos metalls i metal·loides com a inductors de fitoquelatines, com ara Ag^+ , As^{3+} , As^{5+} , Au^+ , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , In^{3+} , La^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Pd^{2+} , Sb^{3+} , Se^{4+} , Sn^{2+} , Te^{4+} , W^{6+} i Zn^{2+} [82, 84, 90], en general, metalls considerats tous que presenten una major afinitat pels grups sulfhidril. El millor inductor conegut de la síntesi de PCs és el Cd(II) , i és per això que serveix de base per a la majoria dels estudis de la síntesi i les funcions de les PCs.

La biosíntesi de PCs continua fins que els ions metàl·lics que l'activaven són complexats per les fitoquelatines formades, proporcionant un mecanisme que autoregula la biosíntesi de PCs on el producte de la reacció complexa el metall inductor, acabant així la reacció [84, 85, 91].

2.7.3. Mecanisme d'actuació

L'exposició de les plantes als metalls pesants, estimula la fitoquelatin sintasa (PCS) que sintetitza fitoquelatines. Així doncs, les fitoquelatines es sintetitzen al citosol, on s'uneixen amb els metalls formant complexos (Figura 11e). S'ha demostrat que existeixen majors concentracions de PCs i de metalls en l'interior dels vacúols, per tant, es dedueix que el transport i l'acumulació en el seu interior estan implicats en la tolerància i la desintoxicació. En conseqüència, sembla ser que el pas final del procés de desintoxicació, des de la mobilització del metall del sòl a les arrels fins a arribar a l'interior de les cèl·lules (tant de les arrels com del fullatge), és la compartimentació vacuolar (procés pel que el complex M-PC queda retingut als vacúols) [76].

La principal funció de les PCs és la complexació d'alguns metalls. Es poden trobar dos complexos que difereixen en el seu pes molecular: s'anomenen complexos d'alt pes molecular (HMW) o complexos de baix pes molecular (LMW). Aquesta classificació es basa en la diferent mobilitat de migració d'aquests compostos a la cromatografia de filtració de gel. La principal diferència entre aquests dos tipus de complexos és que els HMW contenen diferents proporcions de sulfurs làbils que li confereixen més estabilitat i la possibilitat d'enllaçar més ions metàl·lics [86].

Els primers complexos formats amb les PCs són els LMW que es formen al citosol de les cèl·lules de les plantes (Figura 11e). La proteïna *hmt1* és capaç de transportar eficaçment els complexos M-PC LMW a l'interior dels vacúols a través de la membrana vacuolar en un procés dependent de l'ATP (Figura 11f). Els ions de metall lliure, si hi són presents, entren als vacúols mitjançant un antiport M^{n+}/H^{+} (Figura 11g) i són afegits al complex LMW, juntament amb els sulfurs, per formar un complex HMW (Figura 11h). Aquest complex, ric en ions sulfur, serà molt més estable en el medi àcid dels vacúols i tindrà més capacitat d'enllaçar ions metàl·lics per molècula que no pas els complexos LMW. En aquest mecanisme, el complex LMW funciona com un transportador citosòlic de metalls, mentre que el complex HMW és la major forma d'emmagatzemar metall cel·lular [87]. Les fonts de sulfur (Figura 11i) s'atribueixen al metabolisme de la cisteïna. Per contrarestar l'entrada d'ions sulfur, es genera un gradient de protons a través de la membrana vacuolar (Figura 11j).

Sota les condicions àcides dels vacúols, és probable que els metalls siguin alliberats dels complexos i enllaçats als àcids orgànics presents als vacúols (citrat, oxalat, malat) i possiblement també per aminoàcids. Les PCs lliures de metall, o bé es degraden per les hidrolases vacuolars recuperant el valuós sofre reduït present en la cisteïna i/o retornen al citosol, on poden continuar la seva tasca [76, 85].

Tot i que tant la inducció de PCs com l'activació de la PCS és conferida per una varietat d'ions metàl·lics, hi ha poques evidències que suportin la funció de les PCs en la desintoxicació d'aquesta àmplia gamma d'ions metàl·lics. És evident que el mecanisme de desintoxicació de metalls és molt més complex que la simple quelació del metall per les PCs. L'ió metàl·lic ha d'activar la PCS, ser complexat per les PCs sintetitzades i després ésser transportat als vacúols i possiblement passi a formar complexos més estables amb sulfurs o àcids orgànics. Es pot observar a la bibliografia

que aquests aspectes únicament s'han estudiat pel cas del Cd(II), de manera que quan es parla dels mecanismes d'actuació de les PCs, tot i parlar de metalls en general, només s'ha investigat amb profunditat per aquest metall.

2.8. Altres biomolècules amb grups tiol

Com s'ha comentat anteriorment, al medi ambient i als organismes vius els metalls pesants s'associen amb diferents substàncies formant complexos estables. Entre tots els grups funcionals responsables de l'associació de metalls destaca el grup tiol (SH) que és un grup molt actiu a les cèl·lules. Aquest grup reacciona específica i quantitativament amb molts compostos, entre ells una gran varietat d'ions metàl·lics.

Sovint als tiols se'ls anomena mercaptans. El terme “mercaptà”, que prové del llatí *mercurium captans* (captura de mercuri), fa èmfasi en el fet que els tiols formen complexos extremadament estables amb els ions de mercuri; les constants de dissociació d'aquests complexos són de l'ordre de 10^{-40} - 10^{-44} . A pH baixos, el Hg^{2+} és l'agent complexant de grups SH més eficaç.

Degut a les propietats redox dels grups tiol (-SH) i disulfur (-SS-), les substàncies que contenen aquests grups funcionals juguen un paper important a les cèl·lules, on es pot destacar la participació en diferents sistemes de transport electrònic, en la catàlisi d'enzims i coenzims i en la desintoxicació de compostos potencialment tòxics.

Alguns tiols molt importants trobats a les cèl·lules vives són l'aminoàcid cisteïna i el seu corresponent disulfur, la cistina, l'aminoàcid homocisteïna, el glutatió, l'àcid lipoic i els tiols i disulfurs de pes elevat que es refereixen a grups SH i SS annexats a macromolècules com enzims, hormones, polipèptids i altres proteïnes. A continuació es consideraran alguns d'aquests compostos, que seran els estudiats en aquesta Tesi.

La cisteïna (Cys) és un dels vint aminoàcids que utilitzen les cèl·lules per sintetitzar proteïnes. A pesar de la seva abundància en la forma enllaçada, normalment només una petita fracció de cisteïna lliure està present a les cèl·lules o als fluxos extracel·lulars. Un excés d'aquests aminoàcids pot provocar algunes malalties metabòliques, com ara la cistinosis i la cistinúria, on el disulfur cistina s'acumula als teixits o s'excreta en quantitats anormals. Les plantes i els microorganismes utilitzen el

sofre inorgànic, el sulfur i el sulfat per obtenir el sofre de la cisteïna en reaccions de reducció. En canvi, els animals que són incapaços de reduir el sulfur o el sulfat, obtenen la cisteïna directament de l'absorció i la reducció subsegüent de la cistina formada en la hidròlisi de les proteïnes de la dieta, o com a producte de la biosíntesi de l'aminoàcid metionina.

El glutatió (GSH) amb l'estructura γ -glutamil-cisteinil-glicina (γ -Glu-Cys-Gly) és el tiol no proteic més abundant. Els animals, les plantes i els microorganismes tenen capacitat de sintetitzar-lo i promoure la seva dissociació. A pesar de la seva tendència a oxidar-se, majoritàriament es manté en la forma reduïda. La seva biosíntesi, com s'ha descrit anteriorment, té lloc en dos etapes, amb la formació inicial de γ -glutamil-cisteïna i la subsegüent unió d'una molècula de glicina. A les plantes i als animals el glutatió realitza el paper d'antioxidant i de regulador redox. A les plantes, el GSH regula l'absorció de sofre per les arrels i és utilitzat en la desintoxicació de contaminants. El GSH és el precursor de les fitoquelatines, que són els principals agents complexants de metalls pesants en plantes.

En aquesta Tesi també s'han estudiat altres fragments del glutatió com ara la γ -glutamil-cisteïna (γ -Glu-Cys) i la cisteinil-glicina (Cys-Gly). El primer és conegut per ser el precursor de la síntesi del GSH i per les seves funcions antioxidants mentre que el segon prové de la descomposició del GSH i, en els organismes vius, és important en la determinació de l'entorn redox.

Com s'ha vist anteriorment, l'estudi de la complexació d'aquestes molècules amb els metalls pesants és d'especial interès ja que és un dels mecanismes més importants que tenen les plantes per combatre la toxicitat dels metalls. L'ús d'una metodologia analítica apropiada per a la determinació de les fitoquelatines, dels compostos relacionats i dels seus complexos amb els metalls pesants és una peça clau per a entendre millor aquests mecanismes.

Estudi de biomolècules amb grups tiols i les seves interaccions amb els metalls

3.1. Metodologies analítiques: perspectiva general

Els estudis de complexació de les fitoquelatines i els compostos relacionats amb els metalls pesants es poden abordar, tal com es pot veure a la literatura, a partir de tres plantejaments diferents. En el primer es consideren les interaccions entre les fitoquelatines (i els seus fragments) i els diferents metalls pesants en mostres sintètiques sense separació prèvia; en el segon, es consideren mescleres sintètiques dels diferents tiols on s'apliquen mètodes de separació per a determinar-los, estudiant també diferents sistemes metall-tiol o metall-fitoquelatina; i el tercer plantejament és el que considera la determinació (amb separació prèvia) de les fitoquelatines induïdes per l'acció dels metalls pesants en mostres naturals.

Dins del primer plantejament cal destacar els treballs del grup de Mehra *et al.* de la *University of California* als Estats Units [92-94] on s'apliquen tècniques d'espectroscòpia UV-vis i de dicromisme circular per estudiar la complexació de les fitoquelatines (i dels compostos relacionats) amb diferents metalls. Igualment cal considerar els treballs del grup de Šestáková *et al.* del *Heyrovský Institute of Physical Chemistry* de la República Txeca [95-98] que utilitzen tècniques voltamperomètriques en els seus estudis. Però sobretot cal considerar, en aquest apartat, els estudis duts a terme pel grup d'Electroanàlisi de la Universitat de Barcelona, on s'ha realitzat aquesta

Tesi Doctoral, que han permès establir tota una sèrie de punts molt importants per a la interpretació de les interaccions de les fitoquelatines i els seus fragments amb els metalls pesants. En aquests estudis s'han utilitzat fonamentalment tècniques voltamperomètriques, encara que s'han complementat amb dicroisme circular, espectrometria de masses o valoracions calorimètriques. Aquests estudis han permès postular un ordre d'estabilitat relativa dels complexos formats en funció del metall de manera que els complexos més estables són els de Hg seguits pels de Cu, Cd, Zn i Pb [99-102]. No obstant, en els estudis de la complexació de fitoquelatines en medis naturals no només s'ha de tenir en compte l'estabilitat dels complexos que es formen sinó també la capacitat del metall per induir les fitoquelatines. D'altra banda, en el grup de recerca s'ha estudiat la competició entre les fitoquelatines i els seus fragments en el procés de complexació i s'ha determinat la capacitat complexant d'aquests compostos. Aquesta capacitat complexant augmenta en augmentar el número d'unitats γ -Glu-Cys de la molècula. No obstant, s'ha vist que les constants de complexació condicionals de les fitoquelatines de 3, 4 i 5 unitats són pràcticament iguals o una mica superiors a les de la PC₂. Això vol dir que l'enllaç depèn més de la naturalesa dels grups implicats que no pas de la molècula global [103, 104]. En aquest punt s'hauria de tenir en compte que encara que la capacitat complexant de les PCs augmenta amb la longitud de la cadena, a la planta la primera que es sintetitza és la PC₂ i les demés es formen a partir d'aquesta. Es per això que en els extractes de plantes caldria esperar una proporció més gran de PC₂.

En el segon plantejament, on es consideren mesclures sintètiques i s'utilitzen mètodes de separació per a la determinació dels tiols o dels complexos metàl·lics formats, cal ressaltar els treballs de Trnková *et al.* [105-107], Mehra *et al.* [92] i un treball realitzat al grup de recerca on s'estableix una metodologia de separació amb detecció amperomètrica per a la determinació de compostos amb grups tiol [108]. Dins d'aquest apartat s'inclouria una part de la Tesi Doctoral que es presenta al capítol 8 i que correspon a l'establiment d'una metodologia de separació de les fitoquelatines, els compostos relacionats i els seus corresponents complexos metàl·lics, utilitzant la detecció amperomètrica.

El tercer plantejament considera mostres naturals (plantes, microalgues o fitoplàncton), on s'han induït fitoquelatines per l'acció de metalls pesants. En aquest apartat cal ressaltar les investigacions fetes pel grup de Morelli i Scarano del *Istituto di*

Biofísica di Pisa a Itàlia [109-114], per Łobiński *et al.* del *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) de França [115, 116], per Meharg *et al.* de la *Queens University of Belfast* d'Irlanda [117-119] i per Hernández *et al.* de la *Universidad Autónoma de Madrid* [120-125]. En aquests estudis s'han aplicat metodologies de separació, bàsicament la cromatografia líquida en fase inversa, encara que també es considera la cromatografia d'exclusió o la cromatografia de bescanvi iònic. La detecció que s'utilitza és fonamentalment òptica o d'espectrometria de masses, i pràcticament mai s'aplica la detecció electroquímica [105, 106]. Dins dels mètodes òptics de detecció, es pot utilitzar la detecció UV-vis sense derivatització, encara que en la majoria dels casos s'utilitza una derivatització post columna pel mètode d'Ellman (amb DTNB i mesurant a 412 nm) [92, 120, 121, 124-131]. També es pot utilitzar la detecció fluorimètrica prèvia derivatització amb monobromobimane (mBrB) que segons alguns autors és més sensible que el mètode d'Ellman [129, 132-135]. Cal remarcar que la detecció UV-vis sense derivatització permet diferenciar entre la forma lliure i la complexada de les fitoquelatines, mentre que la derivatització (tant en UV-vis com fluorimètrica) trenca els complexos formats, encara que són mètodes força més sensibles.

La detecció per espectrometria de masses és la més estesa ja que proporciona una informació molt valuosa dels sistemes [115, 122, 123, 136-140]. No obstant això, cal tenir en compte que aquest sistema de detecció té com a inconvenients la complexitat de la instrumentació emprada i el seu elevat cost, així com els elevats límits de detecció que es poden aconseguir. És en aquest punt on es situa un dels objectius de la present Tesi Doctoral que és el de proposar una metodologia de detecció, com és la detecció amperomètrica, més senzilla, més barata i més sensible que les normalment utilitzades en aquest tipus d'estudis.

Per als estudis de determinació de fitoquelatines i altres tiols s'han utilitzat una gran varietat d'espècies de plantes, entre les quals caldria anomenar el gènere *Brassica* (*Brassica napus*, *Brassica chinesis*...) [131, 139], el blat de moro (*Zea mays*) [105, 106, 121, 125, 126], l'alfals (*Medicago sativa*) [120, 122-125, 141], l'arròs (*Oryza sativa*) [116, 119, 122, 135, 142] i el colitx (*Silene vulgaris*) [127-129, 136]. L'ordi (*Hordeum vulgare*), tot i que és un cereal àmpliament conreat i amb germinació ràpida, no és molt emprat per a l'anàlisi de fitoquelatines [122, 125].

Diversos estudis han analitzat les fitoquelatines induïdes en plantes sotmeses a estrès per metalls pesants (principalment Cd i Hg). No obstant això, en gran part d'aquests estudis [120, 121, 123, 124] no es fa cap mena de distinció entre les diferents PCs ni es revela la presència de complexos M-PC [105, 106, 113-117, 120, 121, 123, 124, 126-130, 132, 134, 135, 139, 141, 143, 144], paràmetre que seria de gran utilitat degut a què la millor manera d'estudiar si la quelació de les fitoquelatines amb els metalls s'està produint és mitjançant la detecció d'aquests complexos. Això no obstant, altres estudis permeten la detecció i alguns, fins i tot, la separació dels diferents complexos formats entre les PCs (o compostos relacionats) i el Hg(II) o bé el Cd(II) [113, 118, 119, 125, 131, 142, 143]. Cal tenir en compte, com s'ha posat de manifest anteriorment, que la majoria d'aquests estudis que mostren una separació de les fitoquelatines i dels complexos metàl·lics utilitzen l'espectrometria de masses, amb tots els inconvenients abans citats que això comporta.

Com una alternativa a la detecció UV i l'espectrometria de masses, àmpliament utilitzades en aquests estudis, en la present Tesi Doctoral es proposa l'ús de l'HPLC acoblada a la detecció amperomètrica amb un elèctrode de carboni vitrificat per diferenciar entre els tiols lliures i els seus complexos amb mercuri. Aquest mode de detecció té l'avantatge del caràcter electroactiu dels compostos tiòlics, uns límits de detecció baixos i la conveniència econòmica d'aquest detector en comparació amb els sistemes de MS. El mètode desenvolupat s'aplica posteriorment a plantes d'ordi cultivades en presència de metalls pesants i en condicions controlades amb l'objectiu d'avaluar la síntesi de fitoquelatines i la capacitat inductora que posseeixen els diversos metalls estudiats. També s'estudien plantes contaminades de manera natural amb Hg, procedents de la zona d'Almadén, mundialment coneguda per les mines de Hg.

Part II

METODOLOGIA APLICADA

L'ús de la instrumentació és una part atractiva i fascinant de l'anàlisi químic que interacciona amb totes les àrees de la química i amb molts altres camps de la ciència pura i aplicada. Encara que moltes vegades l'element més visible i impressionant del mètode analític és l'instrument, només és un dels components de l'anàlisi total.

Alguns dels mètodes d'anàlisi basats en fenòmens electroquímics consideren la mesura del potencial elèctric o el corrent elèctric en una cel·la que conté l'anàlit. La gran diversitat de mètodes electroanalítics permeten l'aplicació de l'electroquímica a molts camps de la ciència. Els avantatges que presenten aquestes tècniques són la seva elevada selectivitat i sensibilitat, oferint uns límits de detecció baixos. El mode clàssic de detecció electroquímica en sistemes de flux és l'amperomètric que consisteix en l'enregistrament continu del corrent resultant d'aplicar un potencial constant a l'elèctrode de treball. Aquesta metodologia és la base instrumental d'aquesta Tesi Doctoral.

En aquesta part es descriuen les tècniques instrumentals més utilitzades en la realització de la present Tesi Doctoral. Aquestes tècniques permeten tant la separació dels anàlits com la posterior quantificació dels mateixos en diferents mostres sintètiques i naturals. Principalment s'ha utilitzat la cromatografia de líquids degut a què és un mètode de separació molt versàtil i àmpliament utilitzat que, juntament amb la detecció electroquímica suposa una tècnica molt sensible i econòmicament accessible. Com a tècnica complementària s'ha utilitzat l'espectrometria de masses tant per a la confirmació de les estequiometries dels complexos analitzats, com per a la determinació dels continguts totals de metalls pesants.

L'objectiu de l'anàlisi és obtenir la informació desitjada a partir de la mostra i presentar-la de forma útil. Així, la quimiometria és una eina que fa de pont entre la mesura instrumental i la seva aplicació en química per a l'obtenció d'uns resultats fàcilment interpretables. En una part d'aquesta Tesi, s'ha considerat l'anàlisi de components principals per construir un model de comportament.

Tècniques instrumentals

4.1. Cromatografia

Segons la IUPAC la cromatografia és un mètode físic de separació on es distribueixen els components a separar entre dues fases, una de les quals és estacionària mentre que l'altra es mou en una direcció definida [145]. Aquesta definició suggereix que les separacions cromatogràfiques tenen tres característiques fonamentals: *a)* són mètodes físics de separació; *b)* hi estan involucrades dues fases diferents, una de les quals és estacionària mentre que l'altra es mou; i *c)* la separació és deguda a diferències en les constants de distribució entre les dues fases dels components de la mostra [146].

El botànic rus Michail Semenovitch Tswett (1872-1919) es considera l'inventor de l'ús de partícules sòlides, empaquetades en una columna, per separar substàncies [147]. M.S. Tswett va anomenar aquest mètode de separació cromatografia i encara que no n'explica la provinença, es conjectura que podria derivar del grec *khroma* que significa “color” i *graphein* que significa “escriure” [147, 148]. Tswett en el seu treball va utilitzar la cromatografia d'adsorció en columna per separar diversos pigments vegetals fent passar extractes de fulles verdes a través d'una columna de vidre plena de carbonat de calci en pols [146, 147, 149, 150] amb l'ajuda d'un solvent. A mesura que el solvent avançava a través de la columna per gravetat, els components de la mostra es

començaven a moure a diferent velocitat i s'anaven separant. Com que s'analitzaven pigments, la separació dins la columna es podia observar visualment i les espècies separades apareixien com a bandes de color, fet que justificava l'elecció del nom. Llavors, es recollien les diferents porcions separades i se n'evaporava el dissolvent per obtenir els compostos.

Tswett, representa l'inici d'una línia de científics il·lustres que van contribuir en gran mesura a l'avenç de la cromatografia. Caldria destacar però, que els pioners només representen el principi, i sense els èxits de molts químics i científics, coneguts o desconeguts, no estaríem on estem avui.

La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) representa la culminació moderna del desenvolupament de la cromatografia de líquids. L'evolució de la cromatografia líquida fins a l'actualitat s'ha caracteritzat per un creixement exponencial; un desenvolupament i perfeccionament de la tècnica, així com la consolidació en el mercat mundial gràcies a la seva polivalència. La contínua innovació en el camp de la tecnologia mitjançant nous instruments i columnes i l'automatització dels equips ha permès l'augment dels camps d'aplicació, l'expansió del nostre coneixement i la comprensió d'aquest mètode de separació analítica de gran abast.

Actualment la cromatografia és de les tècniques analítiques més usades arreu del món i és aplicable a una gran varietat de mostres i en diferents camps de la ciència.

4.1.1. Cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC)

El sistema cromatogràfic per a HPLC consta d'uns contenidors per a la fase mòbil, un sistema de bombeig que permet assolir i mantenir pressions elevades, un injector, una columna i un sistema de detecció.

El mètode cromatogràfic es caracteritza per la introducció d'un petit volum de mostra al sistema; aquest volum és arrossegat per la fase mòbil, impulsada per una bomba a pressió elevada. La fase mòbil actua com a dissolvent i portador de la mostra. Com a conseqüència de la diferent interacció dels anàlits amb la fase estacionària (rebliment de la columna), aquests es mouen a diferent velocitat, donant lloc a la seva separació. Així, les molècules que interaccionen amb la fase estacionària triguen més en sortir de la columna mentre que les molècules que no són retingudes per

l'empaquetament de la columna elueixen ràpidament. D'aquesta manera, mentre que la fase mòbil amb la mostra passa a través de la columna, les molècules es van agrupant segons la velocitat de migració i elueixen formant diferents bandes que són enregistrades en el cromatograma i referides com a pic cromatogràfic. Finalment, els compostos separats elueixen de la columna i produeixen una resposta al detector que es representa en funció del temps d'anàlisi obtenint el cromatograma. Cada substància eluïda correspon a un pic del cromatograma. El cromatograma obtingut proporciona informació qualitativa que permet conèixer la complexitat de la mostra en base al nombre de pics presents, així com identificar els components d'aquesta segons la posició dels pics (temps de retenció, t_R) i també dóna informació quantitativa a partir de l'àrea o l'alçada dels pics, que és proporcional a la concentració de l'anàlit [151, 152].

L'eficàcia d'un procés cromatogràfic ve determinada per l'elecció correcta de la fase estacionària i de la fase mòbil. Les característiques de la fase estacionària que influeixen en l'eficàcia són la seva naturalesa i polaritat, així com la mida de partícula. En el cas de la fase mòbil, a part de la seva composició, s'han de considerar també el pH, la viscositat i la velocitat del flux [153].

La cromatografia en fase inversa (RP-HPLC) és el mode de separació més popular de la cromatografia líquida moderna essent aplicable a un ampli ventall de compostos de diferent polaritat. A més, aprofitant els equilibris secundaris que poden tenir lloc a la fase mòbil o afegint els additius adients, els compostos iònics poden ser fàcilment separats mitjançant la supressió iònica, l'aparellament d'ions o la formació de complexos. En la cromatografia de líquids d'alta resolució en fase inversa, que és la utilitzada en la present Tesi Doctoral, la fase mòbil és més polar que la fase estacionària. Així, el temps de retenció és major per a les molècules de naturalesa apolar, mentre que les molècules de caràcter polar elueixen més ràpidament. La retenció dels compostos augmenta amb l'addició de dissolvent polar a la fase mòbil i disminueix amb la introducció de dissolvents més hidrofòbics. La cromatografia en fase inversa és tan utilitzada que sovint se l'anomena HPLC sense cap més especificació [154].

Les separacions en cromatografia de líquids requereixen un sistema de detecció que treballi *on-line*. Hi ha diversos tipus de detecció: espectrofotomètrics (UV-vis, fluorescència), d'índex de refracció, electroquímics (amperomètrics, voltamperomètrics, potenciomètrics, conductimètrics...), etc. Els emprats en aquest treball són l'UV-vis i

l'amperomètric. Ambdós detectors els podem englobar dins el grup dels detectors que responen a una característica específica de la mostra. La detecció UV, respon als compostos que absorbeixen llum ultraviolada a una longitud d'ona específica, mentre que la detecció electroquímica respon als processos redox que tenen lloc en aplicar-hi un potencial (amperometria).

Detecció ultraviolada-visible

Aquests detectors són els més universals en aplicació, encara que la sensibilitat depèn de l'absorbància de la mostra a una longitud d'ona particular i de la transparència de la fase mòbil en aquella longitud d'ona on tenim el màxim d'absorbància de la mostra.

En aquest tipus de detecció, la radiació, de longitud d'ona adequada, es fa passar a través d'una cel·la connectada al sistema cromatogràfic, registrant-ne l'absorbància en funció del temps de retenció o del volum de retenció.

El detector UV opera en el rang de 190 a 350 nm i en alguns equips es pot estendre a la zona del visible (350 a 700 nm), rebent així el nom de detector UV-vis. La concentració de l'anàlit a la mostra es determina per aplicació de la llei de Beer (Eq. 4), on A és l'absorbància, ϵ és l'absortivitat molar de l'anàlit, b és el camí òptic de la cel·la i c és la concentració de l'anàlit [155].

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Eq. 4})$$

Hi ha una gran varietat de detectors d'absorbància disponibles comercialment però podem disposar de dos grans grups, segons si mesuren a una longitud d'ona fixada o si permeten fer un escombrat de la longitud d'ona. El primer tipus de detector, opera a una longitud d'ona fixada per les línies d'emissió de la làmpada emprada, normalment de Hg, i per tant s'opera a 254 nm. A part d'aquesta longitud d'ona se solen utilitzar filtres que permeten treballar a unes quantes longituds més. El segon tipus de detectors és un espectrofotòmetre, que és molt més versàtil que el detector de longitud d'ona fixa, ja que disposa d'una xarxa de difracció que permet seleccionar lliurement la longitud d'ona de treball, en funció de l'absorbància màxima de l'anàlit i així tenir millor sensibilitat. En aquests detectors, si es disposa d'un fotodiode, es podrà enregistrar l'espectre d'absorbància de l'eluent en temps real.

En aquest treball s'ha utilitzat l'HPLC amb detecció UV per comparar els resultats obtinguts amb la detecció amperomètrica ja que l'HPLC-UV és una tècnica àmpliament utilitzada, altament reproducible i amb bons límits de detecció i quantificació.

Detecció electroquímica

Entre els detectors electroquímics, els amperomètrics on s'enregistra la intensitat a l'aplicar un potencial constant, són uns dels més utilitzats. La propietat analítica fonamental que caracteritza els detectors amperomètrics és la seva elevada sensibilitat que ve acompanyada d'una relativa senzillesa i economia. A més, les mesures tenen una bona precisió inclús a concentracions baixes d'anàlit. En aquests detectors, tots els compostos susceptibles d'oxidar-se o reduir-se (electroactius) poden, *a priori*, ser analitzats. La intensitat enregistrada és proporcional a la quantitat d'anàlit que s'oxida o redueix a la superfície de l'elèctrode i que per a unes condicions hidrodinàmiques controlades és proporcional a la concentració de la substància electroactiva en el si de la dissolució. El pas de cada substància electroactiva pel detector provoca una variació de la intensitat i representant aquestes variacions amb el temps, s'obtenen uns pics que formen el cromatograma. Si es compara la intensitat del pic de cada substància amb l'obtinguda amb els patrons, es pot determinar la concentració d'aquestes substàncies electroactives. En aquest tipus de detectors la intensitat generada depèn tant de la concentració dels anàlits com del potencial aplicat, ja que cada substància té un potencial característic d'oxidació-reducció i una determinada cinètica electròdica.

Aquest detector utilitza un potenciostat que subministra el potencial a la cel·la electroquímica que conté tres elèctrodes: l'elèctrode de treball, el de referència i l'auxiliar (Figura 12). En el mode amperomètric s'aplica, entre els elèctrodes de treball i de referència, un voltatge que s'escollirà en funció de les substàncies que es volen oxidar o reduir i, és per això, que el mètode és tan selectiu. L'elèctrode de referència proporciona un potencial fix i estable contra el qual es mesura el potencial [156]. La disposició de l'elèctrode de treball respecte al flux de la fase mòbil és molt important, fet que fa que el disseny de la cel·la sigui determinant. Les principals característiques que ha de tenir una cel·la per obtenir una resposta electròdica reproducible són: un baix volum mort, una hidrodinàmica ben definida, una elevada velocitat de transferència de

matèria, una elevada relació senyal/soroll, un disseny robust i un fàcil manteniment (generalment polir els elèctrodes).

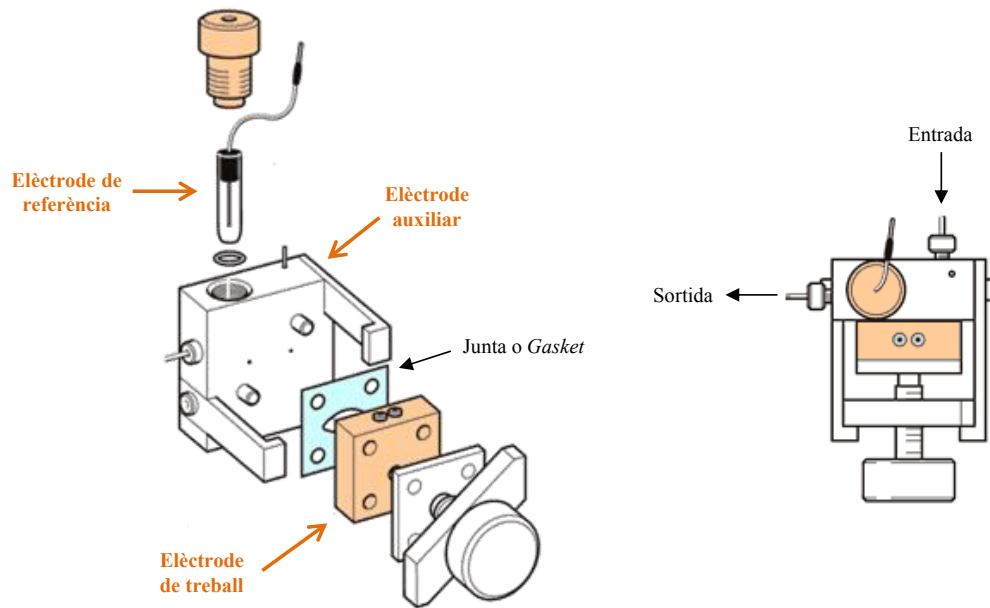


Figura 12. Esquema d'una cel·la electroquímica de capa prima [157].

Hi ha diverses configuracions per a la cel·la que s'adeqüen més o menys a aquestes necessitats (Figura 13). En la present tesi s'ha utilitzat únicament la configuració de capa prima o de configuració rectangular on el volum de la cel·la ve definit per una junta o *gasket*, i en la qual l'eluent entra per una banda, travessa paral·lelament l'elèctrode de treball (WE) i va cap al detector. Pel que respecta a l'elèctrode auxiliar, es aconsella que es situï el més a prop possible de l'elèctrode de treball per minimitzar la caiguda òhmica. La disposició de l'elèctrode de referència no és tan crucial [158].

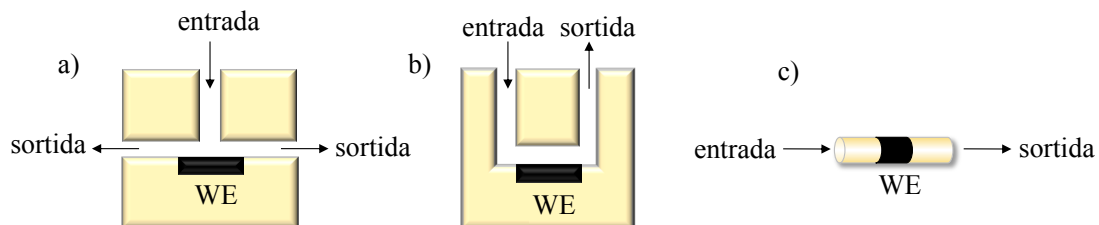


Figura 13. Esquemes de les configuracions de les cel·les més habituals (a) wall-jet (b) capa prima o de configuració rectangular i (c) tubular. WE representa l'elèctrode de treball i les fletxes la direcció del flux (adaptat de [158]).

La reacció redox és induïda a l'elèctrode de treball, mentre que l'elèctrode auxiliar subministra la càrrega de neutralització complementària. Així doncs, en el nostre cas, i degut al potencial positiu que apliquem, la reacció que té lloc a l'elèctrode de treball és la oxidació del grup tiol per formar un pont disulfur entre dos grups tiol (Figura 14). En contrapartida, a l'elèctrode auxiliar és on es produeix la reducció del solvent i a l'elèctrode de referència de Ag|AgCl una part molt petita de l'ió plata es redueix a plata metàl·lica.

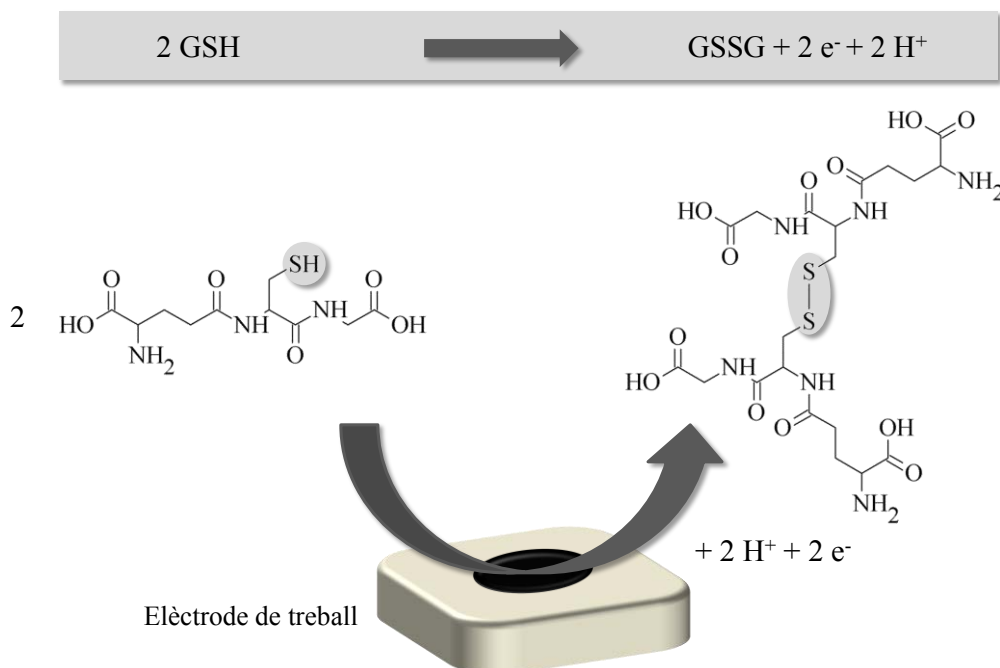


Figura 14. Reacció d'oxidació del grup tiol d'una molècula de glutatió (GSH) a l'elèctrode de treball.

En els detectors amperomètrics, l'electròlisi dels compostos electroactius no és completa, essent normalment de l'1 al 10%. Això es degut a què únicament una part de l'anàlit que flueix per la cel·la electroquímica està en contacte amb la superfície de l'elèctrode i és susceptible d'oxidar-se o reduir-se al seu pas pel detector. No obstant, podem augmentar l'electròlisi incrementant la superfície de l'elèctrode o afavorint el contacte entre aquest i l'eluent. Per aquest motiu, com s'ha comentat anteriorment, el disseny de la cel·la electroquímica juga un paper important en la detecció.

La principal limitació d'aquests detectors és la necessitat d'utilitzar una fase mòbil conductora, fet que restringeix el seu camp d'aplicació a la cromatografia en fase inversa o de bescanvi iònic. És per això que com a fases mòbils sovint s'utilitzen

solucions amortidores o amb altres additius que també ajuden a regular el pH i la força iònica.

L'elèctrode de treball representa el component més important d'una cel·la electroquímica perquè les transferències d'electrons es produeixen a la interfície entre l'elèctrode de treball i la solució. La selecció del material de l'elèctrode de treball és crítica per a l'èxit experimental. Hi ha diversos factors importants que han de ser considerats. En primer lloc, el material ha d'exhibir un comportament redox favorable amb l'anàlit, la transferència d'electrons ha de ser ràpida, reproduïble i sense embrutiment de l'elèctrode. En segon lloc, la finestra de potencial de treball de l'elèctrode en una solució d'electròlit determinat ha de ser tan àmplia com sigui possible per permetre un ampli camp d'aplicació. Altres consideracions addicionals inclouen el cost del material, la seva capacitat de ser mecanitzada o formada en geometries útils, la facilitat de renovació de la superfície després d'una mesura i la toxicitat.

Els materials dels elèctrodes de treball més comunament utilitzats són el platí, l'or, el carboni i el mercuri. Entre aquests, és probable que el platí sigui el preferit, demostrant una bona inèrcia electroquímica i una facilitat de fabricació en moltes formes. El major desavantatge de l'ús de platí, a part del seu alt cost, és que la presència de petites quantitats d'aigua o d'àcid a l'electròlit condueix a la reducció d'ions d'hidrogen per formar hidrogen gas (despreniment d'hidrogen) a potencials poc negatius. Aquesta reducció emmascara qualsevol senyal analític útil a la zona de potencials negatius.

Els elèctrodes d'or es comporten de manera similar al platí, però tenen una utilitat limitada en el rang de potencial positiu a causa de l'oxidació de la superfície. Aquest element és molt útil, però, per a la preparació d'elèctrodes modificats que contenen estructures de superfície conegudes com monocapes autoacoblades (SAM).

Els elèctrodes de carboni permeten exploracions a potencials més negatius que el platí o l'or, així com una bona finestra de potencials anòdics. La forma més comuna de l'elèctrode de carboni és el carboni vitrificat, que és relativament car i difícil de mecanitzar. Els elèctrodes de pasta de carboni (CPE) també són útils en moltes aplicacions. Aquests elèctrodes estan fets d'una pasta de carboni finament granulat que es barreja amb un substrat com a oli. La pasta s'empaqueta en una cavitat en un cos

d'elèctrode inert. Els elèctrodes de pasta de carboni tenen el desavantatge de ser propensos als danys mecànics durant l'ús.

El mercuri ha estat històricament un material d'elèctrode àmpliament utilitzat, principalment com una gota esfèrica formada a l'extrem d'un capil·lar de vidre a través del qual es permet que el metall líquid flueixi. Aquest material mostra una excel·lent finestra de potencial en la direcció catòdica, però està molt limitat en la direcció anòdica per la seva facilitat d'oxidació. L'elèctrode de gota de mercuri (DME o SMDE), en el qual es formen gotes i cauen diverses vegades durant una mesura voltamperomètrica permetent treballar amb una superfície nova cada cert temps, és el que s'utilitza en les mesures polarogràfiques. Actualment, l'ús d'aquests elèctrodes està molt limitat degut a la toxicitat del mercuri, tot i que aquest material encara és molt útil en els mètodes que impliquen la preconcentració de l'anàlit metàl·lic abans de l'exploració potencial, com es fa en la voltamperometria de redissolució anòdica (ASV). Actualment, el mercuri és més utilitzat en forma de pel·lícula creada a la superfície dels elèctrodes sòlids enlloc del metall pur. Un bon material electròdic capaç de substituir al mercuri i àmpliament utilitzat és el bismut. Els elèctrodes de bismut presenten un interval de potencials de treball comparable al de l'elèctrode d'or però amb l'avantatge que són respectuosos amb el medi ambient.

Els elèctrodes sòlids per a mesures en sistemes de flux es fabriquen habitualment mitjançant l'encapsulació del material de l'elèctrode en un bloc de material polimèric inert com el Tefló, Kel-F (policlorotrifluoroetilè) o PEEK (polièter èter cetona). Habitualment, el material que forma la superfície electroactiva té forma de disc. En alguns casos hi pot haver diverses superfícies electroactives en el mateix elèctrode de treball (Figura 15). Els diàmetres de disc més comuns disponibles comercialment són 2, 3 i 6 mm, en funció del número de superfícies electroactives que tingui l'elèctrode. Els elèctrodes d'aquesta mida generalment produeixen corrents mesurables de l'ordre dels microamperes a pocs mil·liamperes per a anàlits en concentracions properes a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

L'ús de la detecció amperomètrica en HPLC és la base d'aquest treball i s'ha utilitzat tant en la determinació de les fitoquelatines o dels compostos relacionats en mostres sintètiques i naturals com en la determinació dels seus complexos amb mercuri.

Els resultats obtinguts han demostrat que és una tècnica molt útil per a aquest tipus d'estudis amb una elevada sensibilitat i reproductibilitat.

En la present Tesi Doctoral s'han utilitzat diferents tipus d'elèctrodes. Per a la detecció de fitoquelatines, compostos relacionats i els seus complexos amb mercuri s'ha utilitzat l'elèctrode de carboni vitrificat comercial; mentre que en els estudis duts a terme durant l'estada a la *Université Libre de Bruxelles* (Bèlgica) es van utilitzar elèctrodes de plata o de pasta de carboni modificats amb plata (AgCPE) preparats al laboratori.



Figura 15. Exemples d'elèctrodes de treball per a detecció electroquímica disponibles comercialment on les superfícies electroactives són els discs de color negre [159].

Els elèctrodes de pasta de carboni (CPE) estan formats generalment per una fase conductora (grafit) i un component aïllant que normalment és un material polimèric (polímers acrílics, resines epòxid o clorur de polivinil, tefló, acetat de vinil, polièster, polietilè, etc.). També es poden afegir altres components per aconseguir determinades propietats per a la determinació d'alguns anàlits. Per exemple, els elèctrodes sòlids composts (CSE) són elèctrodes CPE que han estat modificats amb determinades proporcions d'elements com plata, or, o altres materials. La composició exacta dels CSE pot ser ajustada en funció de l'objectiu i de l'ús, i poden ser fàcilment preparats al laboratori. Això no obstant, cal ser especialment acurat amb la reproductibilitat de l'àrea i de la forma de la superfície electròdica [160, 161].

4.2. Espectrometria de masses

De totes les eines analítiques que es disposen, l'espectrometria de masses és potser la de major aplicació, en el sentit que aquesta tècnica es capaç de proporcionar informació sobre: *i)* la composició elemental de les mostres; *ii)* l'estructura de les molècules inorgàniques, orgàniques i biològiques; *iii)* la composició qualitativa i quantitativa de mesclures complexes; *iv)* l'estructura i la composició de superfícies sòlides; i *v)* les relacions isotòpiques d'àtoms a la mostra. Les aplicacions de l'espectrometria de masses són tan nombroses i engloben tants camps que no és possible resumir-les en un espai breu.

Un espectròmetre de masses es pot dividir en tres parts fonamentals: la font d'ionització o atomització, l'analitzador i el detector. L'objectiu principal del sistema d'entrada és poder introduir una petita quantitat de mostra a l'espectròmetre de masses amb la mínima pèrdua del buit. La mostra (sòlida, líquida o gasosa) pot ser introduïda directament a la font d'ionització de l'instrument o bé a través d'un cromatògraf de líquids o gasos o d'un equip d'electroforesi capil·lar acoblat. A la font d'ions, les molècules de la mostra s'ionitzen ja que els ions són més fàcils de manipular que les espècies neutres. En tots els casos s'obté un feix d'ions positius o negatius (normalment positius) que posteriorment s'accelera cap a l'interior de l'analitzador de masses on es separen en funció de la seva relació massa/càrrega (m/z). Es detecten els ions per separat al detector i els senyals s'envien al sistema d'adquisició de dades, on els resultats poden ser recollits en l'espectre de masses.

Existeixen molts mètodes d'ionització i cada un té els seus propis avantatges i inconvenients. El mètode d'ionització utilitzat depèn de la naturalesa de la mostra i del tipus d'espectròmetre de masses que s'utilitza. Després de la font d'ionització, els ions continuen cap a l'analitzador. Per a la separació dels ions amb diferent relació massa/càrrega es disposa de diversos dispositius. Un analitzador ha de ser capaç de distingir variacions molt petites de massa, o el que és el mateix, tenir una bona resolució. Els espectròmetres de masses es classifiquen en diferents categories depenent de la naturalesa de l'analitzador de masses. Així podem trobar els espectròmetres de sector magnètic, els de doble enfocament, els quadrupolars, els de temps de vol, els de trampa d'ions o els de ressonància ciclotrònica d'ions. No tots els mètodes d'ionització

són compatibles amb tots aquests analitzadors, l'elecció de l'analitzador dependrà del mètode d'ionització i viceversa.

Pel que fa als detectors, n'existeixen diversos tipus, entre els quals podem trobar la copa de Faraday, el multiplicador d'electrons secundaris, el canal multiplicador d'electrons o el de conversió fotònica o de centelleig. Encara que n'existixin de molts tipus, el canal multiplicador d'electrons és el detector escollit en la majoria d'espectrofotòmetres.

En aquesta Tesi Doctoral s'han utilitzat un espectròmetre de masses amb font d'ionització per electronebulització i analitzador de temps de vol i un espectròmetre de masses amb ionització per plasma acoblat inductivament i analitzador quadrupolar.

4.2.1. ESI-MS-TOF

La ionització per electronebulització (ESI) es realitza en condicions atmosfèriques de pressió i temperatura. La dissolució de la mostra es bombeja a través d'una agulla capil·lar (75-150 μm) d'acer inoxidable a un flux baix (1-1.000 $\mu\text{L min}^{-1}$). L'agulla es manté a un alt potencial (3-6 kV) respecte a la paret de la cambra que fa que la mostra que surt de la punta del capil·lar incrementi la seva càrrega i es dispersi assumint una forma cònica, anomenada con de Taylor. A la punta del con, el líquid canvia de forma a una línia fina, que es torna inestable i la solució es dispersa en forma d'aerosol de gotes. Aquest núvol de petites gotes carregades resultant passa a través d'un capil·lar de dessolvatació on es produeix l'evaporació del dissolvent. Degut a què les gotes es tornen cada cop més petites com a conseqüència de l'evaporació del solvent, la seva densitat de càrrega augmenta fins al punt que la gota no pot suportar aquest augment de la tensió superficial i es divideix en petites gotes carregades produint-se la desorció dels ions a l'atmosfera gasosa. El procés de dessolvatació pot ser suplementat per un flux de gas inert (N_2) o calor. Aquests ions en fase de gas carregats positivament a pressió atmosfèrica són atrets a la regió de la font d'ions de l'espectròmetre de masses per una successió de petites càrregues negatives i s'introdueixen a l'espectròmetre de masses amb les forces de succió fetes pel buit generat a la cambra de buit [151, 162, 163]. Tot aquest procés produeix poca fragmentació, fet que s'aprofita per exemple, en la determinació de pesos moleculars de biomolècules o altres compostos

Després de l'etapa d'ionització els ions de la mostra passen a l'analitzador. En l'analitzador de temps de vol (TOF) els ions es bombardegen per impulsos periòdics d'electrons, d'ions secundaris o de fotons generats per làser. Els ions produïts d'aquesta manera són accelerats en un tub analitzador lliure de camp mitjançant un camp elèctric polsant (10^3 - 10^4 V). La separació dels ions en funció de la massa es produeix durant el seu recorregut cap al detector, situat al final del tub. Degut a què tots els ions que entren al tub tenen la mateixa energia cinètica, la seva velocitat variarà inversament a la seva massa i , per tant, les partícules més lleugeres arribaran abans al detector que les pesades. Els instruments de temps de vol ofereixen alguns avantatges respecte als altres espectrofotòmetres com ara la simplicitat i la robustesa, el fàcil accés a la font d'ions i l'interval de masses virtualment il·limitat. Això no obstant, tenen una resolució i una sensibilitat limitades [151].

En el present estudi, l'ESI-MS no ha sigut la tècnica central utilitzada, sinó que s'ha utilitzat de manera complementària per determinar les estequiometries dels complexos separats per HPLC i per comprovar la validesa dels resultats.

4.2.2. ICP-MS-Q

L'espectrometria de masses de plasma acoblat inductivament (ICP-MS) és un tipus d'espectrometria de masses capaç de detectar metalls i no-metalls a concentracions de parts per trilió. Això s'aconsegueix ionitzant la mostra amb un plasma acoblat inductivament i utilitzant un espectròmetre de masses per separar i quantificar aquests ions.

Per definició, un plasma és una mescla gasosa conductora de l'electricitat que conté una concentració significativa de cations i electrons (la càrrega neta s'aproxima a zero). Al plasma d'argó utilitzat freqüentment els ions d'argó i els electrons són les principals espècies conductores, encara que els cations de la mostra també estiguin presents en menor quantitat. Una vegada s'han format els ions d'argó en un plasma, són capaços d'absorbir la suficient energia d'una font externa per mantenir la temperatura a un nivell tal que la posterior ionització sustenti el plasma indefinidament (la temperatura pot arribar a 10.000 K) [151, 162].

En la ionització de plasma acoblat inductivament s'utilitza una torxa formada per tres tubs de quars concèntrics, a través dels quals flueixen corrents d'argó

(5-20 L min⁻¹). Envoltant la part superior d'aquest tub hi ha una bobina d'inducció refrigerada per aigua, que està alimentada per un generador de radiofreqüència (0,5-2 kW a uns 27 o 41 MHz). La ionització de l'argó que flueix s'inicia mitjançant una guspira que prové d'una bobina Tesla. Els ions resultants i els seus electrons associats interaccionen amb el camp magnètic oscil·lant produït per la bobina d'inducció. Aquesta interacció fa que els ions i els electrons dins de la bobina es moguin en trajectòries circulars. La mostra s'introdueix en el flux d'argó a través del tub central de quars [151].

L'analitzador de masses quadrupolar és el més utilitzat en espectrometria de masses atòmica. Presenta l'avantatge de l'elevada velocitat d'escombratge, de manera que es pot obtenir un espectre de masses complet en menys de 100 ms. A més es un instrument més compacte, més barat i més robust que qualsevol altre espectròmetre de masses. El cor d'un instrument quadrupolar és el conjunt de quatre barres cilíndriques paral·leles que actuen com a elèctrodes. Les barres oposades es connecten elèctricament, un parell unides al pol positiu d'una font variable de corrent contínua i l'altre parell al terminal negatiu. A més s'apliquen a cada parell de barres potencials variables de corrent alterna de radiofreqüència desfasats 180°. Per obtenir un espectre de masses amb aquest dispositiu els ions s'acceleren a l'espai entre les barres mitjançant un potencial de 5 a 10 V. Al mateix temps, les tensions de corrent contínua i alterna s'incrementen simultàniament, mentre es manté constant la seva relació. En qualsevol moment, tots els ions excepte aquells que tinguin un determinat valor de m/z incideixen a les barres i es converteixen en molècules neutres. Per tant, només arribaran al detector els ions amb un valor de m/z que estigui dins de l'interval limitat.

L'ICP-MS s'ha utilitzat en aquest estudi com a tècnica complementària per obtenir resultats sobre el contingut total de metalls en les mostres de plantes. Igualment, en els estudis preliminars es va utilitzar l'espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament (ICP-OES) que utilitza la font d'inducció ICP per produir àtoms excitats i ions que emeten radiació electromagnètica a la longitud d'ona característica de cada element en particular.

Tècniques quimiomètriques

5.1. Anàlisi per components principals (PCA)

La ciència que estudia l'extracció d'informació de rellevància química de les dades produïdes en un experiment químic es denomina *Quimiometria*, per analogia amb la biometria, l'econometria, etc. Per això, la Quimiometria ha de ser una part integrant de totes les àrees de la química.

La Quimiometria es defineix com una disciplina química que utilitza les matemàtiques, l'estadística i la lògica per: *i)* dissenyar o seleccionar els procediments experimentals òptims; *ii)* proporcionar la informació rellevant analitzant les dades químiques; i *iii)* obtenir un millor coneixement del sistema químic [164].

Les tècniques instrumentals modernes de generació de dades poden proporcionar una multitud de dades per a una multitud de variables en una multitud de mostres de forma bastant fàcil. Totes aquestes dades es poden recollir en les corresponents taules massives de dades. L'anàlisi computeritzat de les dades permet estudiar aquestes taules de dades (matrius de dades). L'anàlisi multivariant es l'anàlisi de dades amb moltes

variables observades (per a grans matrius) i també l'estudi de sistemes amb múltiples tipus de variacions [165].

La base de tots els mètodes d'anàlisi multivariant es l'Anàlisi de Components Principals (PCA) [164-166]. El punt de partida en tots els mètodes d'anàlisi multivariant és la matriu de dades X . El número de files (N) de la matriu es denominen "objectes" i, molt freqüentment, es refereix a les mostres químiques, biològiques, geològiques o de qualsevol altre tipus. Les K columnes s'anomenen "variables" i comprenen les dades obtingudes per als objectes. La major part d'objectius del PCA consisteixen en l'establiment de relacions entre els objectes. Una altra finalitat pot incloure la reducció de dades, molt útil quan el seu número és elevat i es poden ajustar mitjançant un model no molt complicat.

El PCA es pot usar, juntament amb un conjunt seleccionat d'objectes i variables, per construir un model que expliqui com es comporta un sistema químic o físic. A continuació, el model obtingut es pot utilitzar per predir el comportament del sistema en altres experiments.

La matriu de dades inicial X representa la combinació de la matriu model M i el soroll E (Eq. 5). La matriu de dades X , amb N objectes i K variables, es pot representar com un conjunt de N punts en un espai K -dimensional. En unes altres paraules, el PCA és una transformació lineal que selecciona el sistema de coordenades multidimensional per al conjunt de dades, de manera que la variància més gran produïda mitjançant la projecció de les dades es troba al primer eix (component principal primer), la segona variància en el segon eix, etc. El PCA redueix les dimensions del conjunt de dades conservant les característiques de les dades que contribueixen majoritàriament a la variància [166].

$$X = M + E \quad (Eq. 5)$$

Des de la perspectiva matemàtica, el PCA s'explica de la següent manera: la projecció de X en el subespai K -dimensional, mitjançant una matriu de projecció P' , proporciona les coordenades de l'objecte en aquest pla T . Les columnes en T , t_a , s'anomenen *scores* i les files en P' , p'_a , s'anomenen *loadings*. Les desviacions entre les projeccions i les coordenades originals són els valors residuals, els quals es recullen a la

matriu d'error E . Així doncs, el PCA descompon matemàticament la matriu de dades experimentals X en el producte de dues matrius ortogonals T i P' (Eq. 6) [166].

$$X = TP' + E \quad (\text{Eq. 6})$$

Una hipòtesi bàsica de l'ús del PCA és que els vectors de *loadings* i de *scores* que corresponen als valors propis més grans contenen la informació més útil en relació amb el problema específic, i que els restants comprenen principalment el soroll. Per tant, aquests vectors s'escriuen normalment en ordre descendent de valors propis.

Potser l'ús més comú del PCA és en la conversió d'una matriu de dades a uns quants gràfics informatius. Representant entre elles les columnes t_a de la matriu de *scores* T , s'obté un gràfic dels objectes i la seva configuració en un espai- M . Els gràfics dels primers components, el t_1 - t_2 o el t_2 - t_3 , mostren els patrons més dominants en X . Això suposa tàcitament que les direccions de màxima variància representen les direccions de màxima informació. Això no és necessàriament aplicable a tots els conjunts de dades, però és una troballa ben fonamentada empíricament. Els gràfics de *scores* dels primers dos o tres vectors de *scores* poden ser útils per mostrar els agrupaments de les diferents mostres, els *outliers* (punts que es desvien del model) i altres patrons que poden seguir les dades [166].

De la mateixa manera, si es representen les files p'_a de la matriu de *loadings* P' , s'obté un gràfic de les variables i la seva configuració en un espai- M . Igualment, els gràfics dels primers components mostren els patrons més dominants en X . Si es comparen les dues gràfiques, es pot identificar fàcilment quines variables són les causants d'un *outlier* o quines variables són responsables de la separació de dos o més classes.

En la present Tesi Doctoral el PCA s'ha aplicat a l'estudi on es compara l'efecte que tenen els diferents metalls pesants en la síntesi de PCs en plantes d'ordi, per tal d'identificar un patró de síntesi de fitoquelatines en funció de la naturalesa del metall pesant i/o de la seva concentració.

Part III

EXPERIMENTAL

Instrumentació i reactius

6.1. Instrumentació

Com s'ha comentat anteriorment, per a la separació de les fitoquelatines i els seus fragments, així com dels seus complexos amb mercuri s'utilitza la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC). El sistema cromatogràfic utilitzat està constituït per un equip Agilent de la sèrie 1100 format per un desgasador de buit, una bomba quaternària, un mòdul de control manual “*Handheld Module*”, un injector manual Rheodyne 7725i amb un *loop* d'injecció de mostra de 20 μL i dues columnes amb fase estacionària d'octadecilsil·là (C18) de Supelco diferents però equivalents: la Inertsil ODS-2 i la Ascentis C18, totes dues amb mida de partícula de 5 μm , longitud de 250 mm i 4,6 mm de diàmetre intern. La Figura 16 mostra un esquema del sistema cromatogràfic emprat.

Per a la detecció s'han utilitzat dos detectors, un UV-vis i l'altre electroquímic. El detector òptic és de fila de díodes (*diode array*) de la sèrie 1100 de Agilent. El detector electroquímic està format per una cel·la de flux creuat CC-5 de Bioanalytical Systems (BAS) amb un sistema de tres elèctrodes: un elèctrode de treball de disc dual de carboni vitrificat format per dos discs de 3 mm de diàmetre cadascun, encabits en un bloc de polièter èter cetona (PEEK), treballant en paral·lel i aplicant el mateix potencial a les dues superfícies electròdiques; un elèctrode de referència de Ag|AgCl ($\text{NaCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$)

i un elèctrode auxiliar que és l'acer de la mateixa cel·la (Figura 17). La separació entre l'elèctrode auxiliar i el de treball es realitza mitjançant una junta o *gasket* de 0,005 polzades d'espessor (aproximadament 127 μm), amb un forat oval que defineix el volum de la cel·la electroquímica. La cel·la electroquímica es troba situada dins una gàbia de Faraday que minimitza el soroll provocat per les radiacions electromagnètiques externes. El sistema es connecta a un potenciostat Autolab PGSTAT 12 d'Eco Chemie que aplica un potencial constant a l'elèctrode de treball per realitzar la mesura amperomètrica, i a un ordinador per controlar tot el sistema.

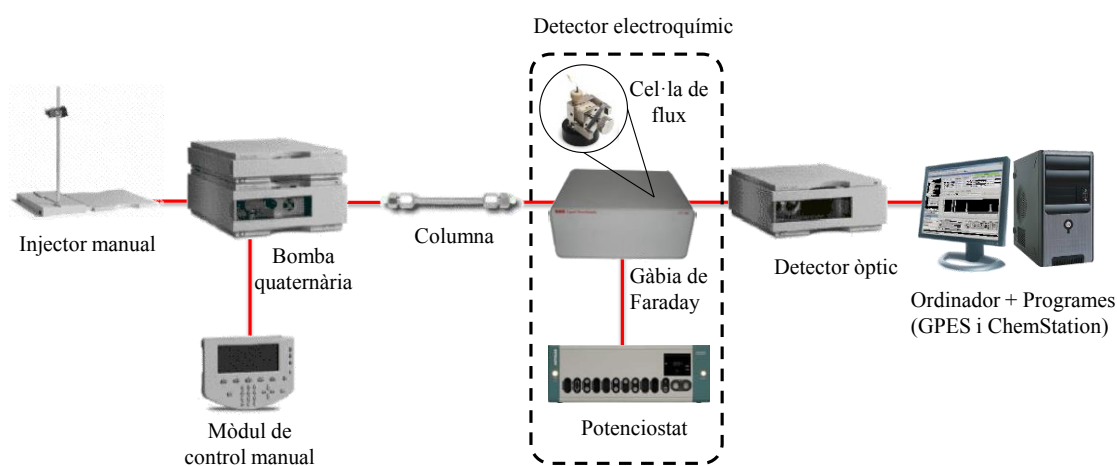


Figura 16. Esquema del sistema cromatogràfic utilitzat.

Per obtenir els cromatogrames i per analitzar les dades obtingudes s'utilitzen dos programes informàtics diferents segons el detector utilitzat. Així doncs, amb el detector UV-vis s'utilitza el HP ChemStation i per l'electroquímic el GPES 4.9.007.



Figura 17. Cel·la de flux formada per un sistema de tres elèctrodes [157].

En el primer estudi realitzat en aquesta Tesi es treballa amb els dos detectors de manera independent, és a dir, es connecta al cromatògraf o bé un detector o bé l'altre.

D'aquesta manera, per obtenir dades dels dos detectors cal injectar les mostres per duplicat. En la resta de treballs els detectors es connecten en línia (Figura 16) de manera que la fase mòbil que arrossega els anàlits passa primer pel detector electroquímic on, com s'ha comentat abans, només una petita part de la mostra s'oxida i després passa pel detector òptic. La connexió entre els detectors i les altres parts del cromatògraf es realitza mitjançant tubs de PEEK de 1/16 polzades de diàmetre extern (aproximadament 1,59 mm) i 0,18 mm de diàmetre intern i amb la llargària mínima per minimitzar l'eixamplament dels pics. Totes les connexions dels tubs es fan amb accessoris que usen diferents elements per minimitzar el volum mort.

Per a la determinació del contingut total de metalls a les mostres de plantes s'utilitza un espectròmetre d'ICP-OES del model Optima 3200 RL de Perkin-Elmer per tenir una aproximació de l'ordre de magnitud de la concentració i poder fer així les dilucions necessàries abans de mesurar-les a l'espectròmetre d'ICP-MS Elan 6000 de Perkin-Elmer. Ambdós instruments es troben als Serveis Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona.

Per a la caracterització edàfica dels sòls procedents de la zona d'Almadén es determinen el pH amb un pH-metre GLP Crison i la conductivitat elèctrica amb un conductímetre GLP 32 Crison. Per a la determinació del contingut total de metalls d'aquests sòls s'utilitza un analitzador d'absorció atòmica (ZAAS) RA-915+ de Lumex amb un accessori de piròlisi RP-91C també de Lumex. Per a l'anàlisi de les diferents fraccions de mercuri extractables amb diversos solvents s'utilitza un espectròmetre d'absorció atòmica (AAS) AMA-254 de Leco per determinar el contingut de Hg orgànic i un espectròmetre de fluorescència atòmica de vapor fred (AFS-CV) Millenium Merlin de PS Analytical per a la determinació de la resta de fraccions. Per fer les extraccions s'utilitza un bany agitador termostatitzat de la marca Selecta. Totes aquestes mesures s'han fet en col·laboració amb investigadors del *Instituto de Geología Aplicada de la Escuela de Ingeniería Minera e Industrial de Almadén (Universidad de Castilla-La Mancha)*.

Per a la caracterització dels complexos metall-fitoquelatina s'utilitza un espectròmetre d'ESI-MS de la sèrie 1100 d'Agilent, també dels Serveis Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona, treballant en mode positiu. El tractament de

les dades obtingudes i el control del sistema es realitza mitjançant el programa Agilent Masshunter Qualitative Analysis Software.

En l'estada a la *Université Libre de Bruxelles* (Brussel·les, Bèlgica), on s'estudia el glutatió i els seus complexos amb Hg(II) i Cd(II) mitjançant anàlisis d'injecció en flux amb detecció electroquímica, s'utilitza una bomba PM-92 de BAS, un injector Rheodyne 7125, una cel·la de BAS amb elèctrodes de treball de plata o de pasta de carboni modificats amb plata (AgCPE), un potenciostat model Intro de Antec Leyden i una interfase PowerChrom 280 de eDAQ. Per a la visualització dels fiagrames s'utilitza el programa informàtic PowerChrom (v2) de eDAQ. A la Figura 18 es mostra un esquema de la instrumentació utilitzada en aquest estudi.

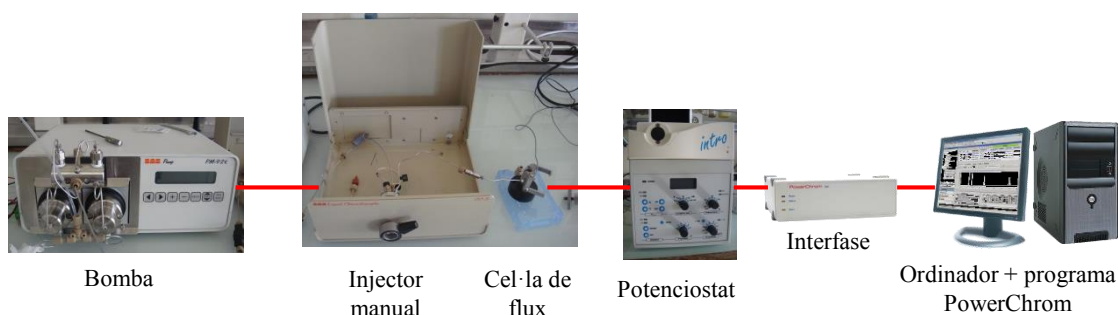


Figura 18. Esquema de la instrumentació utilitzada en l'estada a la ULB (Bèlgica).

6.2. Reactius i dissolucions

Els fragments del glutatió: Cys, Cys-Gly (80% de puresa) i γ -Glu-Cys (85% de puresa) han estat subministrats per Sigma-Aldrich, mentre que el glutatió en la seva forma reduïda (GSH) ha estat subministrat per Merck. A la Figura 19 es mostren tots els compostos tiòlics estudiats.

Les fitoquelatines $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{-Gly}$ (PC_2), $(\gamma\text{-Glu-Cys})_3\text{-Gly}$ (PC_3), $(\gamma\text{-Glu-Cys})_4\text{-Gly}$ (PC_4) i $(\gamma\text{-Glu-Cys})_5\text{-Gly}$ (PC_5) han estat sintetitzades per DiverDrugs S.L. com a sal de trifluoroacetat, amb una puresa entre 86,2% i 99,0%. Les impureses són fragments minoritaris de PC sense els grups tiol reduïts i, per tant, el seu impacte en el procés de complexació és mínim.

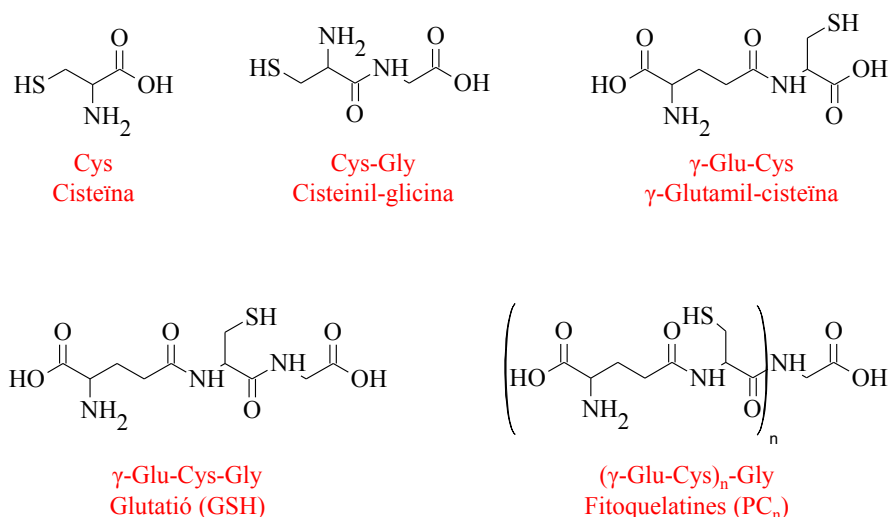


Figura 19. Compostos tiòlics estudiats.

Taula 9. Reactius de les dissolucions auxiliars utilitzades.

Nom	Fórmula	Marca comercial
Acetonitril (ACN)	CH ₃ CN	Merck
Àcid clorhídric (30%)	HCl	Merck
Àcid fòrmic 98%	HCOOH	Panreac
Àcid nítric 65% Emsure i Suprapur	HNO ₃	Merck
Àcid trifluoroacètic (TFA)	CF ₃ COOH	Sigma-Aldrich
Clorur de cadmi	CdCl ₂	Carlo Erba
Clorur de mercuri(II)	HgCl ₂	Probus
Diclorometà	CH ₂ Cl ₂	Merck
Etanol (96%)	CH ₃ CH ₂ OH	Panreac
Hidròxid de potassi (1 mol L ⁻¹)	KOH	Merck
Metanol (MeOH)	CH ₃ OH	Merck
N,N-Dimetilformamida	(CH ₃) ₂ NCHO	Merck
Nitrat de cadmi tetrahidratat	Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Panreac
Nitrat de plom(II)	Pb(NO ₃) ₂	Merck
Òxid d'arsènic(III)	As ₂ O ₃	Merck

Totes les dissolucions utilitzades en la present Tesi s'han preparat a partir dels reactius recollits a la Taula 9, utilitzant aigua ultrapura obtinguda a l'equip de purificació Milli-Q Purelab Plus de USF.

Per a la preparació de la solució nutritiva emprada en el cultiu de les plantes s'han utilitzat els reactius relacionats a la Taula 10.

Taula 10. Reactius utilitzats en la preparació de la solució nutritiva.

Nom	Fórmula	Marca comercial
Àcid bòric	H_3BO_3	Panreac
Clorur de zinc	ZnCl_2	Merck
Dihidrogenfosfat de potassi	KH_2PO_4	Panreac
Molibdat d'amoni	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6$	Panreac
Nitrat de calci	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Probus
Nitrat de ferro(III) nonahidratat	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Probus
Nitrat de magnesi hexahidratat	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Panreac
Nitrat de potassi	KNO_3	Merck
Sal dissòdica d'EDTA dihidratada	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
Sulfat de coure(II) pentahidratat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Probus
Sulfat de manganès(II) monohidratat	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck

Per a les diverses determinacions del contingut de mercuri en les mostres de sòls procedents de la zona d'Almadén s'han utilitzat els reactius de la Taula 11.

En el treball realitzat durant l'estada a la ULB s'utilitza principalment el GSH subministrat per Fluka. En la preparació d'altres solucions auxiliars s'utilitzen els reactius detallats a la Taula 12, utilitzant aigua ultrapura obtinguda a l'equip Simplicity UV de Millipore.

Per a la preparació dels elèctrodes de pasta de carboni modificats amb plata s'utilitza pols de plata (2-3,5 μm 99,9% de puresa) i pols de grafit (<150 μm 99,99% de puresa), ambdós subministrats per Sigma-Aldrich i parafina sòlida de la casa comercial Merck.

Taula 11. Reactius utilitzats en les determinacions del contingut de mercuri de les mostres de sòls procedents de la zona d'Almadén.

Nom	Fórmula	Marca comercial
Acetat d'amoni	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	Panreac
Àcid acètic glacial	CH_3COOH	Panreac
Àcid fosfòric (85%)	H_3PO_4	Panreac
Àcid nítric	HNO_3	Panreac
Àcid sulfúric (95-98%)	H_2SO_4	Panreac
Bromur de potassi	KBr	Panreac
Dicromat de potassi	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Panreac
Sal dissòdica d'EDTA dihidratada	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Panreac
Sulfat de coure(II)	CuSO_4	Panreac
Sulfat doble d'amoni i ferro hexahidratat	$(\text{SO}_4)_2\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Panreac
Tiosulfat de sodi anhidre	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Panreac
Toluè	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	Panreac

Taula 12. Reactius utilitzats en la preparació de solucions auxiliars durant l'estada a la ULB.

Nom	Fórmula	Marca comercial
Àcid fòrmic	HCOOH	Merck
Dihidrogenfosfat de sodi dihidratat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fluka
Hidrogenfosfat de sodi dihidratat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
Hidròxid de sodi	NaOH	Janssen
Metanol	CH_3OH	VWR
Nitrat de cadmi tetrahidratat	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
Nitrat de sodi	NaNO_3	Merck
Òxid de mercuri(II)	HgO	Merck

Procediments experimentals

7.1. Anàlisi amb HPLC

Per posar a punt el sistema cromatogràfic es prepara la fase mòbil tal com es descriurà més endavant i s'engeguen l'ordinador i l'instrument. Es col·loquen els solvents al cromatògraf i es purguen a un flux elevat (5 mL min^{-1}) amb la vàlvula de purga oberta per assegurar que no hi ha bombolles d'aire en cap canal. Es poleix l'elèctrode de treball com s'explicarà més endavant, es sonica a l'ultrasons i es munta la cel·la amb aquest elèctrode i el de referència. A continuació es configuren els percentatges de cada solvent de la fase mòbil i es puja el flux poc a poc fins a 1 o $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, en funció de l'anàlisi a realitzar. S'engega el potenciostat i es fixa el potencial de treball a 1,2 V. Aquest potencial ha estat optimitzat a l'inici d'aquest estudi, de la mateixa manera que s'ha optimitzat la longitud d'ona per a la detecció UV-vis. Seguidament es connecten els elèctrodes al potenciostat i s'aplica aquest potencial durant una estona amb la finalitat d'estabilitzar la línia base. S'engega el detector UV-vis i es fixa la longitud d'ona de treball de 202 nm. Es deixa estabilitzar tant la columna com els detectors mentre el flux va pujant lentament.

Un cop el flux es troba a la velocitat de treball es comprova que la pressió sigui l'adequada i que la línia base de la detecció electroquímica no mostri un soroll gran.

Això es pot comprovar enregistrant un cromatograma fent circular només la fase mòbil i comparant-lo amb el d'un altre dia. Si tot és correcte, l'equip està preparat per injectar; si no és així, si la línia base mostra molt soroll de fons, es pot treure l'elèctrode de referència i tornar-lo a introduir amb la cura que no hi quedi cap bombolla d'aire a la cavitat o bé desconnectar totes les connexions elèctriques del potenciostat i tornar-les a connectar; si tot i així la línia base encara no és l'adient, es tornarà a polir l'elèctrode de treball o es canviarà l'elèctrode de referència per un de nou. Si la pressió no és l'adequada podria voler dir que la columna o l'instrument en general no està del tot net o que hi ha alguna frita obturada. Per solucionar-ho, primer es farà circular aigua (per eliminar les sals que hi puguin haver quedat) i després metanol. Si en posar la fase mòbil la pressió continua sent molt elevada, es farà una neteja més a fons de la columna amb el protocol de neteja descrit a la Figura 20.

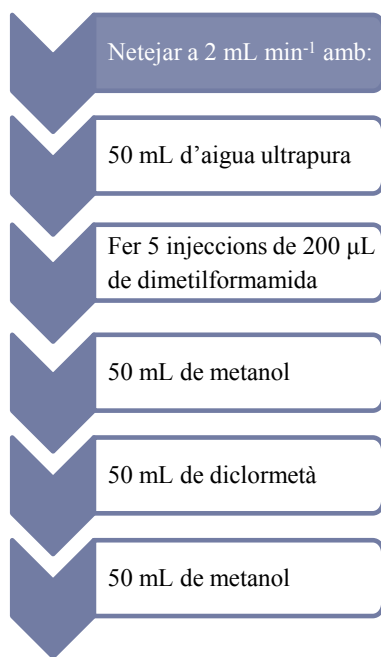


Figura 20. Protocol de neteja de la columna de C18 en HPLC en fase inversa.

És molt important realitzar un manteniment adequat de tots els components de l'equip d'HPLC per evitar futures incidències. Així quan porti una llarga temporada sense utilitzar-se (després de l'estiu per exemple) o com a mínim un o dos cops a l'any, és important desmuntar i netejar bé tant els components de la bomba com de l'injector i si convé, canviar-ne alguns. Per a la neteja, es desmunten totes les seves parts i es soniquen amb metanol durant 10 min; passat aquest temps, s'asseguen amb un paper fi i, s'acaben de netejar amb un escovilló molt petit, en cas que fos necessari. Les parts

que es canvien habitualment en el manteniment de la bomba són: la frita o els segells d'or de la vàlvula de purga (sobretot si la pressió en purgar és superior a 10 bars), els pistons si estan molt ratllats, els segells si es veuen deformats o si hi ha alguna fuga, els segells d'or de la vàlvula de sortida si estan deformats o el cartutx de la vàlvula d'entrada en cas que hi hagi fuites. Pel que fa a l'injector, les parts que es poden canviar en cas que es noti que no injecta bé o que té alguna fuga són el segell del rotor i el frontal de l'estator.

Un cop el cromatògraf està en funcionament amb la pressió correcta i la línia base estable, es pot començar a fer les injeccions.

Per injectar, s'utilitza una xeringa de vidre que abans de fer-la servir, es neteja amb MeOH i amb la solució que s'injectarà. S'omple la xeringa fins a un volum superior al triple del que injectarem, és a dir, uns 60 μL , tenint en compte que sempre s'injecta un volum fix que és el que marca el loop, en el nostre cas 20 μL .

Després de fer servir l'equip, cal deixar circular aigua una bona estona per eliminar les sals que hagin pogut quedar adsorbides a les parets dels conductes i després metanol.

Els cromatogrames obtinguts amb la detecció UV-vis s'analitzen amb el programa ChemStation per determinar l'àrea, l'alçada o els temps de retenció dels pics i s'utilitza el GPES amb els cromatogrames obtinguts amb la detecció electroquímica.

Per fer un tractament més detallat dels cromatogrames, sobretot en el cas dels electroquímics, aquests s'exporten a l'entorn Matlab (versió 7.9.0.529 (R2009b)), un programa versàtil que permet crear o modificar subrutines de programes per interpretar o corregir les senyals obtingudes. En la present Tesi Doctoral les subrutines utilitzades són:

Baseline: Per corregir la línia base dels cromatogrames.

Mimosin: Suavitza el soroll de la línia base dels cromatogrames.

Destral: Suavitza el soroll de la línia base dels cromatogrames.

Tots aquests programes han estat creats al grup de recerca pel Dr. José Manuel Díaz.

7.1.1. Fase mòbil

La fase mòbil utilitzada en la present Tesi Doctoral està formada per dues solucions: la primera conté un 0,1% d'àcid trifluoroacètic (TFA) en aigua; i la segona 0,1% de TFA en acetonitril. El TFA és un reactiu d'aparellament iònic feblement hidròfob que redueix al mínim les interaccions iòniques entre els pèptids i la fase estacionària i també serveix per mantenir un pH baix. El pH de la fase mòbil és un paràmetre important que influeix en la separació ja que afecta els temps de retenció dels anàlits a la vegada que altera la simetria dels pics i la seva resolució. En aquest cas, el pH de la solució aquosa s'ajusta amb KOH (1 mol L^{-1}) fins a 2,00. Treballant a aquest pH es poden estudiar sense problemes les fitoquelatines lliures i els fragments, així com els seus complexos amb mercuri que són molt estables inclús a pH tan àcids. Els complexos de les fitoquelatines i dels seus fragments amb altres metalls són làbils i es trenquen a aquests pH tan àcids, per tant, no es poden estudiar amb aquesta metodologia.

La presència de bombolles d'aire a la fase mòbil és un problema comú en l'ús de sistemes d'HPLC. Les bombolles poden induir problemes a la bomba i provocar pics espuris a la sortida del detector. Aquests problemes es poden evitar degasant la fase mòbil abans d'usar-la. En el nostre cas, un cop preparades les fases mòbils, es degasen utilitzant un bany d'ultrasons.

En les diferents anàlisis, s'ha utilitzat tant l'elució isocràtica (mateixa composició de la fase mòbil al llarg de l'anàlisi) com el gradient (varia la composició de la fase mòbil al llarg de la injecció). En el mode isocràtic, s'utilitzen les proporcions 95:5 o 99:1 (solució aquosa:solució orgànica) depenent dels anàlits a separar. El gradient utilitzat s'ha optimitzat en els primers estudis d'aquesta Tesi i es resumeix a la Figura 21.

En els estudis fets per ESI-MS, no es va poder utilitzar el TFA ja que aquest embruta molt l'instrument i costa molt d'eliminar-lo. Així doncs, en la realització d'aquests estudis per ESI-MS es substitueix el TFA per l'àcid fòrmic.

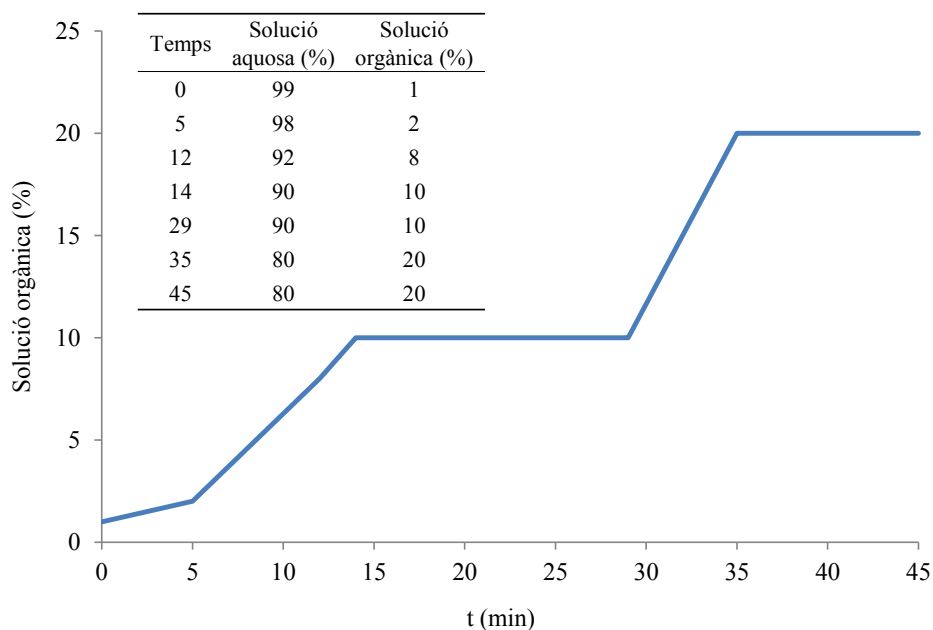


Figura 21. Detall del gradient utilitzat. Solució aquosa: aigua amb un 0,1% de TFA i solució orgànica: acetonitril amb un 0,1% de TFA.

En el treball realitzat durant l'estada a la ULB s'utilitzen diferents fases mòbils a diferents pH en elució isocràtica. Una primera fase mòbil, la més utilitzada, està formada per tampó fosfat (10^{-3} mol L⁻¹) a pH 7,4 amb 0,1 mol L⁻¹ de nitrat de sodi i 2% de metanol. Per a la seva preparació, es pesa la quantitat adequada de nitrat de sodi, es dissol amb tampó fosfat preparat mitjançant la mescla de les quantitats adients de les dues sals i finalment s'hi afegeix el volum adequat de MeOH, enrasant en un matràs aforat amb tampó fosfat.

Una altra fase mòbil utilitzada és la formada per 0,46% d'àcid fòrmic amb 0,21% de nitrat de sodi ajustada a pH 4,5 i amb un 2 o un 5% de MeOH. En aquest cas, la fase mòbil es prepara dissolent en aigua ultrapura la quantitat adient de NaNO₃ i d'àcid fòrmic, ajustant el pH a 4,5 amb NaOH, addicionant el solvent orgànic i enrasant en un matràs aforat.

Totes les fases mòbils utilitzades a la ULB es filtren abans del seu ús amb filtres de membrana de polipropilè de 0,2 µm i es desoxigenen mitjançant un bombolleig de N₂.

7.1.2. Patrons cromatogràfics

Per a la quantificació dels tiols i les fitoquelatines es fan rectes de calibratge externes amb patrons cromatogràfics dels compostos d'interès. Per a la preparació dels patrons cromatogràfics s'utilitzen solucions mare de tots els tiols estudiats de concentració 10^{-2} o 10^{-3} mol L⁻¹ preparades per pesada a partir del reactiu sòlid i conservades a la nevera a 4°C. Per a la preparació dels patrons per injectar, es pipeteja un volum concret d'aquesta solució mare, es dilueix en un eppendorf amb aigua ultrapura fins al volum desitjat i s'agita durant un minut al MixMate de la casa comercial Eppendorf.

Per a la preparació dels patrons cromatogràfics dels complexos dels tiols amb mercuri i, degut al fet que no existeixen aquests patrons comercialment, es preparen mesclant en un eppendorf una quantitat perfectament coneguda de tiol 10^{-3} mol L⁻¹ amb un excés de Hg(II) 10^{-3} mol L⁻¹, de manera que la concentració del complex format és equivalent a la concentració de tiol de la mescla. S'agita la solució obtinguda un minut al MixMate.

Per a la preparació de la solució mare que conté l'ió metàl·lic es pesa la quantitat necessària de HgCl₂ per arribar a una concentració de 10^{-2} mol L⁻¹, i es dissol en HCl 0,1 mol L⁻¹. Aquesta solució s'estandarditza amb clorur i difenilcarbazida: es valora una mostra de concentració coneguda d'ions clorur amb la dissolució preparada de Hg(II) i s'hi afegeixen unes gotes de difenilcarbazida. L'excés de Hg(II) forma un complex de color lila amb la difenilcarbazida en medi àcid (2 mL HNO₃ 0,2 mol L⁻¹) que indica el punt final de la valoració. Abans d'utilitzar aquesta solució de Hg(II) es dilueix amb aigua ultrapura fins a una concentració de 10^{-3} mol L⁻¹.

Abans d'injectar-les al cromatògraf aquestes solucions es filtren amb un filtre de disc de niló de 0,45 µm (Osmonics).

7.1.3. Elèctrodes de treball

La rugositat i altres alteracions de la microestructura de la superfície del carboni vitrificat afecten la reproductibilitat del mètode experimental, a la vegada que augmenten el soroll en l'enregistrament dels cromatogrames. Existeixen diversos mètodes per eliminar el material adsorbit a la superfície electròdica i per assegurar una

superfície completament llisa del carboni vitrificat, entre els quals es troba el polit mecànic. El procés de polit s'ha de realitzar un cop al dia, abans de l'inici de les mesures.

El kit de polit consisteix en un suport de vidre on s'hi enganxa la superfície de polit de TexMet i recipients amb alumina (Figura 22a). Els passos a seguir en el polit mecànic de la superfície electròdica són els següents:

1. S'humidifica la superfície de polit amb aigua ultrapura (Figura 22b.1).
2. S'afegeix una punta d'espàtula d'alumina i es reparteix homogèniament per tota la superfície amb l'ajuda de l'espàtula (Figura 22b.2).
3. Es posa la superfície de l'elèctrode sobre el suport de polir i es realitzen moviments en forma de vuit, sempre en el mateix sentit. Es realitza aquest procés durant uns minuts (Figura 22b.3).
4. Es neteja la superfície de l'elèctrode amb etanol i després amb aigua ultrapura per eliminar les partícules del polit (Figura 22b.4).
5. Es cobreixen les connexions de l'elèctrode amb parafilm, es submergeix l'elèctrode en un vas de precipitats amb etanol i es posa a l'ultrasons durant 5 minuts per tal d'eliminar les possibles partícules adherides a la superfície de l'elèctrode (Figura 22b.5). Es repeteix la mateixa operació submergint l'elèctrode en aigua ultrapura.

Els elèctrodes de treball utilitzats en els estudis realitzats durant l'estada a la ULB són o bé de plata policristalina o de pasta de carboni modificat amb plata (AgCPE). El potencial de treball és de 0,08 V per ambdós tipus d'elèctrodes. Els elèctrodes de plata policristalina es poleixen amb alumina abans d'utilitzar-los mitjançant el procediment de polit mecànic detallat anteriorment (Figura 22).

Per a la preparació dels elèctrodes AgCPE s'han provat diverses resines o coles i finalment l'elèctrode escollit és el de parafina. Per a la seva preparació es barregen les quantitats adequades de plata micronitzada (2-3,5 μm) i de grafit en un morter fins que queda una pols uniforme. En aquest treball s'utilitzen elèctrodes amb 35% de plata i 25% de grafit. Aquestes proporcions ja havien estat optimitzades prèviament al grup de treball. Seguidament, es posa en un altre morter una quantitat precisa de parafina sòlida

(40%) i s'escalfa en un bany d'aigua controlant la temperatura a 50°C. Quan la parafina està en estat líquid s'afegeix al morter la pols de Ag i de grafit i es continua remenant fins que la mescla es refredi. La pols resultant es guarda per fer-la servir més endavant.

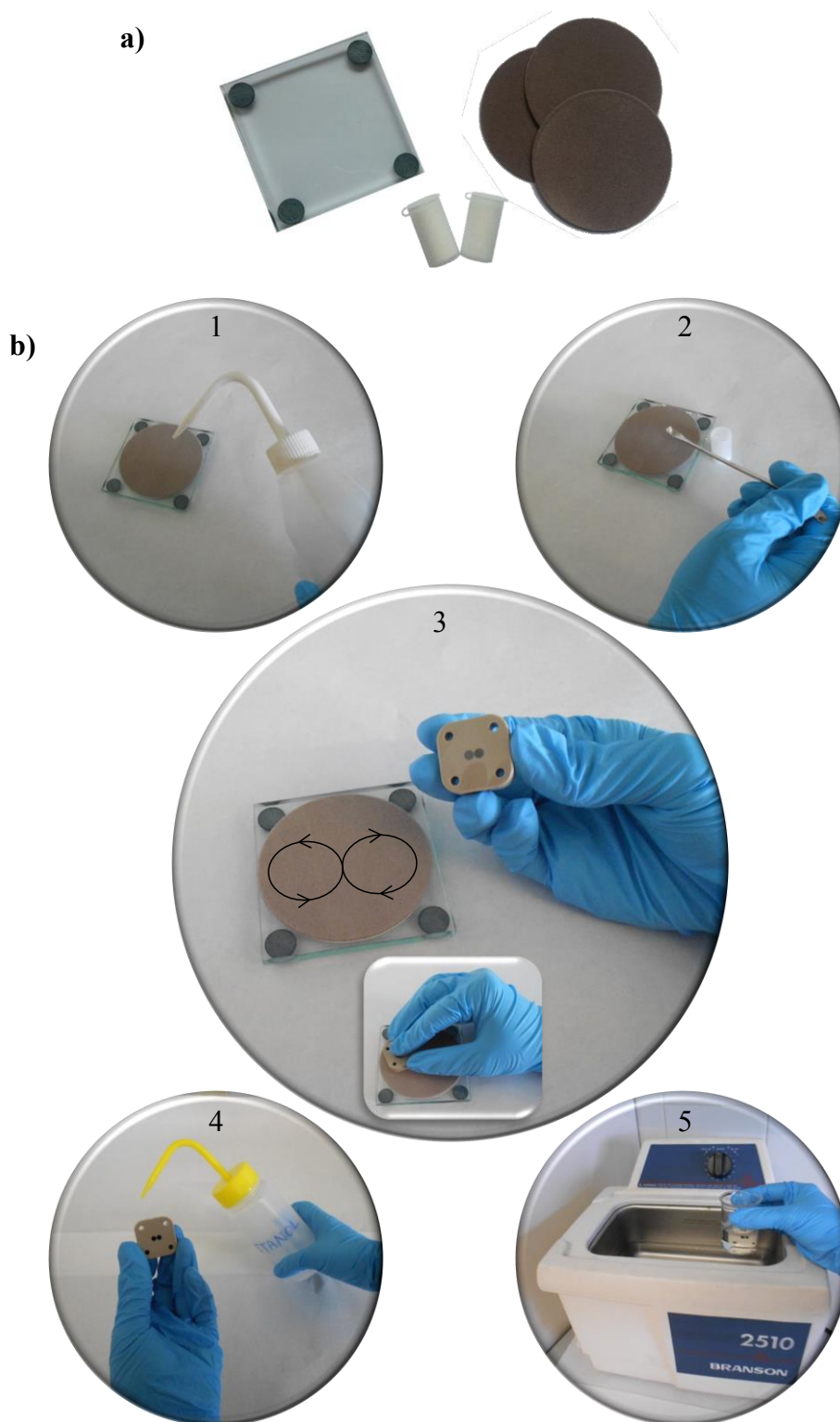


Figura 22. Etapes del polit mecànic de l'elèctrode de treball.

En la preparació d'un elèctrode nou, s'utilitza com a suport un elèctrode vell de la casa comercial BAS on s'hi han eliminat les superfícies electròdiques. S'utilitzen elèctrodes duals, on s'omplen les dues cavitats però s'aplica sempre un únic potencial. Per preparar-lo primer es buida la cavitat utilitzant un escuradents o una espàtula fina (Figura 23.1) i s'omple amb la pasta nova amb l'ajuda d'una espàtula (Figura 23.2). Es pressiona la pasta amb l'espàtula dins dels orificis omplint els espais d'aire (Figura 23.3) i, un cop ple, es poleix sobre un full de paper dibuixant cercles per eliminar la pasta que sobra i allisar-ne la superfície fins que quedi brillant (Figura 23.4). Quan es necessita una superfície nova, s'elimina una petita capa de pasta, s'omple amb una capa de pasta nova i es poleix.

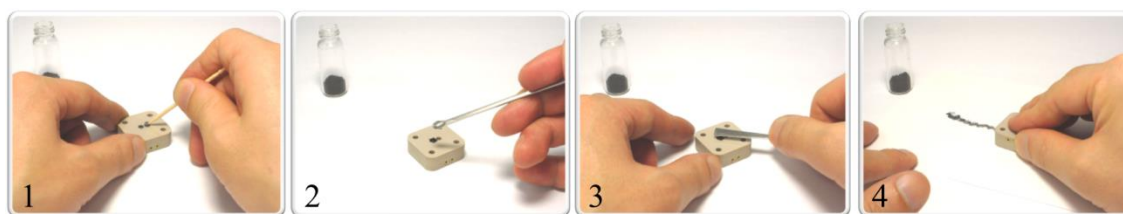


Figura 23. Etapes en la preparació d'un elèctrode de pasta de carboni (AgCPE).

7.2. Preparació de mostres de plantes

En la present Tesi Doctoral, s'han estudiat plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* cv. Graphic (ordi) cultivades hidropònicament o semi-hidropònicament i plantes de les espècies *Asparagus acutifolius* i *Retama sphaerocarpa* procedents de la zona minera d'Almadén. En els dos estudis fets amb ordi s'utilitzen llavors de segona generació certificades pel Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya.

Les plantes d'ordi es cultiven al laboratori emprant una solució nutritiva denominada solució de Hoagland [167]. Aquesta solució proveeix dels nutrients necessaris per al creixement de les plantes i és apropiada per a una gran varietat d'espècies diferents. Per a la preparació d'aquesta solució es preparen en primer lloc les solucions mare de tots els nutrients necessaris mitjançant la pesada de la massa adequada i la posterior dilució amb aigua en un matràs aforat de 100 mL. A continuació, es pipeteja el volum adient d'aquestes solucions i s'introdueix en un matràs d'1 L.

S'omple el matràs amb aigua ultrapura i, abans d'acabar d'enrasar, s'ajusta el pH amb KOH 1 mol L⁻¹ fins a un valor entre 5,5 i 6,5. Tots els nutrients necessaris per a la preparació de la solució nutritiva i les quantitats adients de cadascun d'ells es troben detallats a la Taula 13.

Taula 13. Nutrients de la solució nutritiva de Hoagland [167].

		Solució mare		Solució final	
		g 100 mL ⁻¹	mol L ⁻¹	mL L ⁻¹	mol L ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂		16,41	1	5	5·10 ⁻³
KNO ₃		17,78	1	5	5·10 ⁻³
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O		25,90	1	2	2·10 ⁻³
KH ₂ PO ₄		13,74	1	1	1·10 ⁻³
EDTA-Fe*	NaEDTA	1,66	4,48·10 ⁻²	1	4,48·10 ⁻⁵
	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	1,81			
H ₃ BO ₃		0,27	4,33·10 ⁻²	1	4,33·10 ⁻⁵
MnSO ₄ ·H ₂ O		0,16	9,23·10 ⁻³	1	9,23·10 ⁻⁵
ZnCl ₂		0,011	8,07·10 ⁻⁴	1	8,07·10 ⁻⁷
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0,0073	2,95·10 ⁻⁴	1	2,95·10 ⁻⁷
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆		0,0020	1,65·10 ⁻⁵	1	1,65·10 ⁻⁸

* El complex EDTA-Fe es prepara mesclant les quantitats indicades de sal dissòdica d'EDTA i de sal de Fe(III).

La solució nutritiva preparada d'aquesta manera conté 268 mg L⁻¹ de N, 235 mg L⁻¹ de K, 200 mg L⁻¹ de Ca, 31 mg L⁻¹ de P, 0,30 mg L⁻¹ de S i 48,6 mg L⁻¹ de Mg com a macronutrients; i 0,5 mg L⁻¹ de B, 2,50 mg L⁻¹ de Fe, 0,5 mg L⁻¹ de Mn, 0,05 mg L⁻¹ de Zn, 0,02 mg L⁻¹ de Cu i 0,01 mg L⁻¹ de Mo com a micronutrients.

Les plantes d'*Hordeum vulgare* es conreen de dues maneres diferents: mitjançant el cultiu semi-hidropònic i el cultiu hidropònic. El cultiu semi-hidropònic s'utilitza en un estudi de la determinació de les PCs induïdes en presència de Hg i/o Cd, mentre que el cultiu hidropònic s'empra per avaluar la diferent capacitat inductora de diversos metalls (Hg, Cd, Pb i As).

7.2.1. Cultiu semi-hidropònic

Aquest tipus de cultiu es fa en un test amb sorra inert com a substrat que té incorporades unes tires absorbents de poliacrilamida que estan en contacte amb la solució nutritiva que es troba dins d'un recipient, aquestes tires absorbents transporten la solució des del recipient fins al substrat (Figura 24).

Les plantes d'ordi (*Hordeum vulgare*) es cultiven durant cinc setmanes (el cultiu el va fer el grup de Fisiologia Vegetal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona) al Servei de Camps Experimentals de la Universitat de Barcelona.

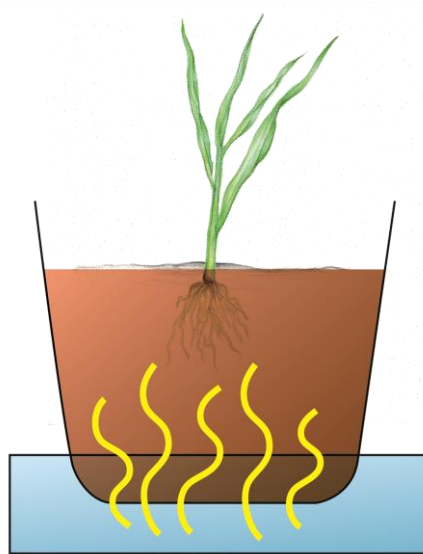


Figura 24. Esquema del cultiu semi-hidropònic.

Es cultiven 4 tests per nivell amb 10 llavors cada un. El cultiu es fa amb la solució nutritiva de Hoagland tractada amb diferents concentracions de HgCl_2 i CdCl_2 . Els nivells de Hg(II) aplicats són 0, 500 i $1.000 \mu\text{mol L}^{-1}$, on a més s'aplica una concentració de Cd(II) de 0 i $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. El disseny experimental es mostra a la Taula 14. Aquest disseny de cultiu permet fer l'estudi de l'efecte del Hg(II) en la síntesi de fitoquelatines així com l'efecte simultani d'ambdós metalls. El nivell de concentració on no hi ha cap metall serveix com a control.

Taula 14. Disseny experimental del cultiu semi-hidropònic de les plantes d'*Hordeum vulgare*.

		Hg(II) $\mu\text{mol L}^{-1}$		
		0	500	1.000
Cd(II) $\mu\text{mol L}^{-1}$	0	4 tests (10 llavors per test)	4 tests (10 llavors per test)	4 tests (10 llavors per test)
	10	4 tests (10 llavors per test)	4 tests (10 llavors per test)	4 tests (10 llavors per test)

7.2.2. Cultiu hidropònic

Aquest mètode de cultiu es fa servir en experiments de laboratori i consisteix en fer créixer les plantes sense sòl, només amb la solució nutritiva de Hoagland (Figura 25). Amb aquest mètode de cultiu les arrels només tenen la funció d'absorbir la solució nutritiva. D'aquesta manera les plantes creixen més ràpidament però, en canvi, tenen un temps de vida molt més curt [167].

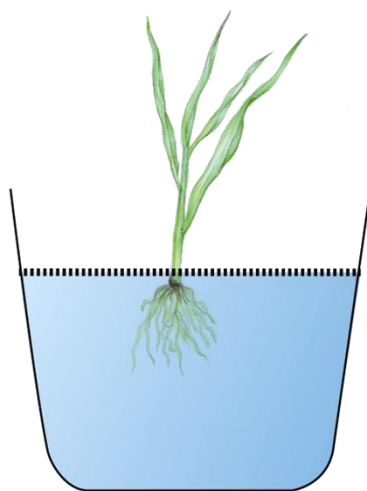


Figura 25. Esquema del cultiu hidropònic.

Les plantes d'ordi (*Hordeum vulgare*) es cultiven durant 18 dies al laboratori del grup de recerca dins un recipient de polipropilè amb una reixeta de clorur de polivinil (PVC) a sobre, subjectada amb dues pinces (Figura 26). A cada recipient s'hi posen 20 llavors i s'hi afegeixen uns 160 mL de solució nutritiva. Després de 4 dies es canvia la solució nutritiva (ja que les llavors ja han germinat) per una solució nutritiva on s'hi ha afegit un dels diferents metalls pesants considerats en aquest estudi (Hg, Cd, As o Pb) a diferents concentracions 20, 50 i 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, deixant tres recipients amb la solució

nutritiva sense metalls perquè serveixin de control. Es fan tres replicats per cada nivell de metall.

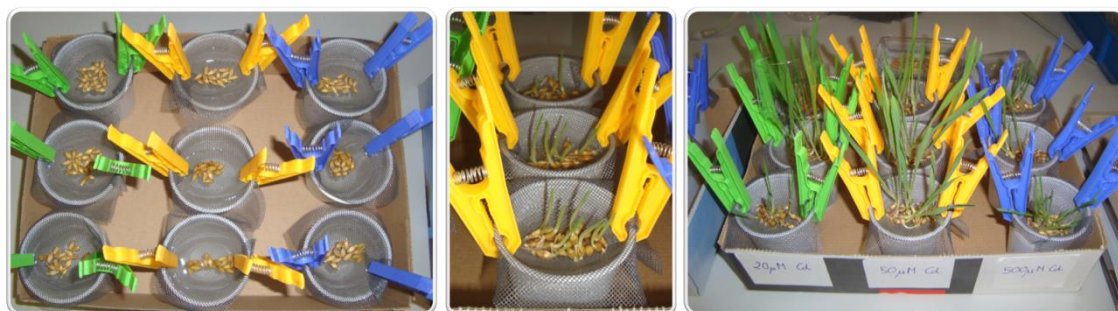


Figura 26. Cultiu hidropònic de plantes de l'espècie *Hordeum vulgare*.

Per a la preparació de les solucions de Pb(II), Cd(II) o As(III), es pesa la quantitat necessària de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ o As_2O_3 , per arribar a una concentració de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ d'ió metàl·lic, i es dissol en àcid nítric $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

7.2.3. Plantes procedents de la zona d'Almadén

Amb l'objectiu d'estudiar la formació de fitoquelatines i dels seus complexos amb mercuri en plantes procedents d'una zona contaminada de manera natural amb Hg es recullen mostres de plantes en diferents parts de la zona minera d'Almadén (Ciudad Real) (Figura 27a). Com s'ha comentat a la introducció, el recinte miner d'Almadén és considerat com una de les zones més contaminades amb Hg de tot el planeta. El poble d'Almadenejos (Figura 27b) deu el seu origen al descobriment i l'explotació de les mines de mercuri prop del municipi, incloent les mines de la *Vieja Concepción* i la *Nueva Concepción*. Almadenejos és també on s'ubica el recinte metal·lúrgic històric que conté els forns de tipus Bustamante on s'extreia el Hg del mineral de cinabri. Aquest antic precinte metal·lúrgic, conegut com a *Cerco de Almadenejos*, és considerat un dels llocs més contaminats amb mercuri de tot el districte d'Almadén (Figura 28).

Es van escollir diversos punts de mostreig amb diferents continguts de mercuri de la zona d'Almadenejos: E1) sobre les runes d'un forn al recinte d'Almadenejos, on el mineral era escalfat a temperatures superiors als 600°C ; E2) a la vora de les runes d'un forn, on el vapor de Hg era condensat a les línies de ceràmica; E3) a l'entrada de la mina *Nueva Concepción* i E4) a la paret que limita l'antic recinte metal·lúrgic a la zona més propera al municipi d'Almadenejos. Es va fixar, a més, un altre punt de mostreig

(E5) a Gargantiel, un poble situat a 9 km d'Almadenejos (Figura 27b), i que es va considerar com a blanc ja que el sòl mantenia les mateixes característiques fisico-químiques que el mostrejat a Almadenejos però tenia un contingut de Hg molt més baix. La localització dels diferents punts de mostreig va ser enregistrada amb un GPS portàtil (Figura 27c).



Figura 27. Localització de: a) Almadén; b) poblacions d'Almadén, Almadenejos i Gargantiel; c) punts de mostreig seleccionats dins el recinte miner d'Almadenejos (imatges extretes de Google Earth).

Amb l'objectiu de comparar la formació de PCs i dels seus complexos mercurics en funció del contingut de Hg del sòl, es van recollir plantes de l'espècie *Asparagus acutifolius* als punts descrits anteriorment i es va mostrejar també el sòl on creixien aquestes plantes. L'esparguera boscana o esparguera fonollera (*Asparagus acutifolius*) és un arbust perenne amb tiges llenyoses, cladodis punxants i brots basals que apareixen a la primavera drets i tendres anomenats turions (els espàrrecs) (Figura 29a). L'elecció d'aquesta espècie es va fer degut a la seva abundància en totes les zones

de mostreig. Per comparar dues espècies diferents en una mateixa zona, es van mostrejar plantes de l'espècie *Retama sphaerocarpa* procedents de la zona E3. La ginesta groga (*Retama sphaerocarpa*) és un arbust alt i recte amb les tiges verdes, molt poques fulles i amb flors petites de color groc a la primavera (Figura 29b).



Figura 28. Instantànies del recinte miner d'Almadenejos on es poden veure les runes dels forns.

De les dues espècies se'n mostra la part aèria (sense flors ni fruits) i les arrels. Cal dir que en aquest cas no es van poder recol·lectar plantes senceres degut a la mida i al fort arrelament de la planta al sòl, per això no se n'ha calculat la biomassa.

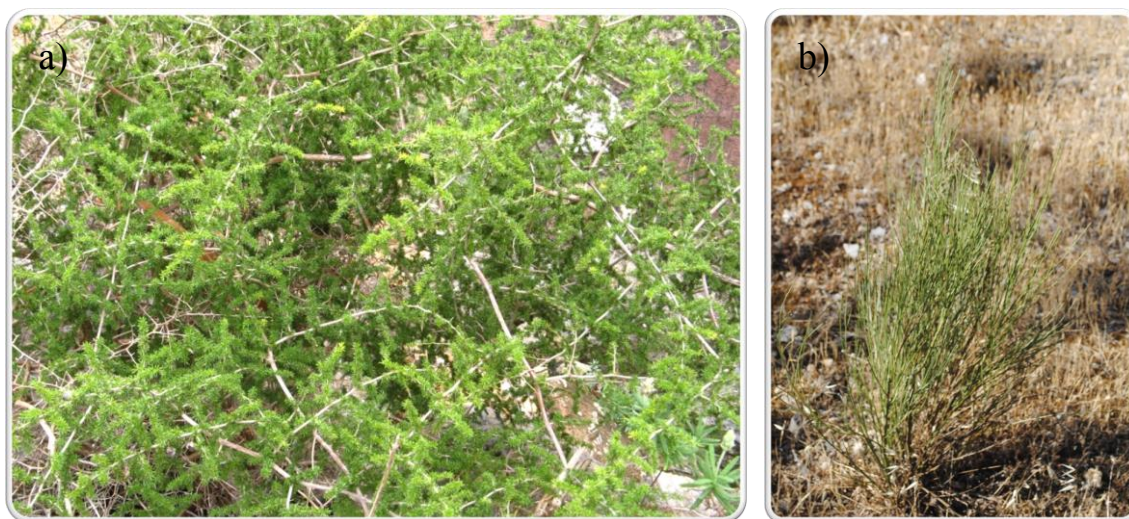


Figura 29. Plantes mostrejades a la zona d'Almadén: a) *Asparagus acutifolius*; b) *Retama sphaerocarpa*.

7.2.4. Preparació dels extractes de plantes

Immediatament després de ser collides, les plantes d'ordi, tant les cultivades semi-hidropònicament com les hidropòniques, es netegen amb una solució d'EDTA 0,1 mol L⁻¹ per eliminar el metall que hagi pogut quedar adsorbit. A continuació

s'assequen bé amb paper de filtre i es separen els brots de les arrels. Es pesen per separat els brots i les arrels per tal d'obtenir-ne la seva biomassa i es trituren amb nitrogen líquid en un morter de ceràmica (Figura 30). Per fer-ho, es col·loca el morter dins un recipient resistent a les baixes temperatures ple de nitrogen líquid, s'omple també el morter amb nitrogen líquid i s'hi afegeixen les fulles o les arrels. Es van remenant o, fins i tot, aixafant una mica amb la mà de morter fins que queda com una pasta. Cal anar afegint nitrogen líquid quan es vagi evaporant. Un cop es té en forma de pasta homogènia es deixa evaporar el nitrogen i es guarda la pols en un tub ben etiquetat dins el congelador a -80°C fins al seu ús.



Figura 30. Molturació de les arrels i dels brots amb nitrogen líquid.

En el cas de les plantes d'*Asparagus acutifolius* o de *Retama sphaerocarpa* del recinte miner d'Almadén, el procediment a seguir és el mateix. Un cop recol·lectades les mostres, es porten al laboratori i es netegen bé amb aigua ultrapura, es tallen a petits trossos separant les parts aèries (fulles i tiges) de les subterrànies (arrels) i es trituren tal com s'ha descrit anteriorment (Figura 31) per conservar-les a -80°C .

Per extreure els compostos tiòlics i els complexos amb mercuri s'han provat diverses extraccions (H_2O , HCl , HClO_4 ...), entre les quals l'extracció amb aigua és la més convenient per a l'anàlisi de les fitoquelatines i els seus complexos amb Hg. Es pesen en un eppendorf 100 mg de mostra triturada, s'hi afegeixen 500 μL d'aigua ultrapura i s'agita a 1.500 rpm durant una hora amb un agitador Eppendorf MixMate (Figura 32a). Després, les mostres es filtren a través d'un disc de niló de 0,45 μm i s'ajusta el pH a 2,00 amb TFA. Tot el procés de preparació dels extractes es troba resumit a la Figura 33. Per a les plantes del recinte miner d'Almadén inicialment es va començar el treball experimental amb 100 mg de mostra però en veure que amb la meitat era suficient i degut a la dificultat d'anar a buscar més mostres, es va reduir a la

meitat el pes de mostra (50 mg) i el volum d'extractant (250 μ L), al mateix temps que es va reduir el volum final en què es reconstitueix la mostra (100 μ L).



Figura 31. Imatges de la trituració de les plantes de l'espècie *Asparagus acutifolius* de la zona minera d'Almadén.

Per tal d'obtenir cromatogrames més nets i preconcentrar els compostos tòxics es sotmet l'extracte obtingut a un procediment d'extracció en fase sòlida (SPE) i preconcentració. El mètode optimitzat per a aquest procediment és el que es mostra a la Figura 33.



Figura 32. Instruments utilitzats en l'extracció, l'extracció en fase sòlida i l'evaporació de les mostres: a) MixMate; b) Visiprep DL Vacuum Manifold; c) Visidry Drying Attachment.

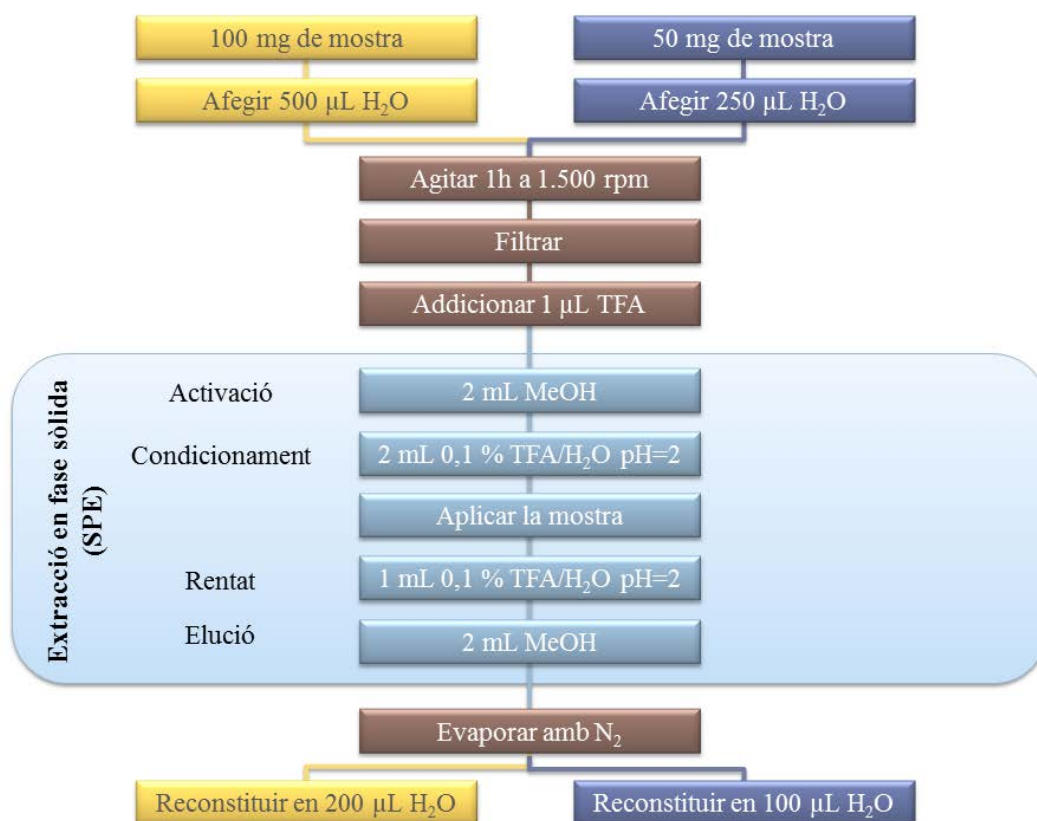


Figura 33. Procediment d'extracció, SPE i preconcentració dels compostos tiòlics i dels seus complexos amb mercuri en plantes.

L'extracció en fase sòlida (SPE) consta de cinc etapes bàsiques (Figura 34). En les dues primeres etapes s'activa i es condiciona l'adsorbent fent passar els solvents apropiats a través del cartutx. La següent etapa és l'aplicació de la mostra on els components de la matriu poden passar pel cartutx sense ser retenguts, mentre que altres poden retenir-se més o menys fortament a la superfície de l'adsorbent. El rentat permet l'eliminació de qualsevol residu que pot interferir en l'anàlisi, tot mantenint els anàlits a l'adsorbent. Finalment es fa passar un dissolvent adequat pel cartutx per eluir els compostos d'interès.

En aquesta Tesi Doctoral per a l'extracció en fase sòlida es fan servir uns cartutxos DSC-18 (Supelco) i un aparell Visiprep DL Vacuum Manifold (Supelco) (Figura 32b). Per al condicionament i el rentat dels cartutxos s'utilitza una solució de 0,1% de TFA en aigua ajustada a pH 2,00 amb KOH. Les etapes d'activació del cartutx i d'elució es fan amb metanol. Tots els solvents i els volums emprats s'optimitzen en una etapa prèvia. Per a l'evaporació en corrent de nitrogen s'utilitza un aparell Visidry Drying Attachment (Supelco) (Figura 32c).

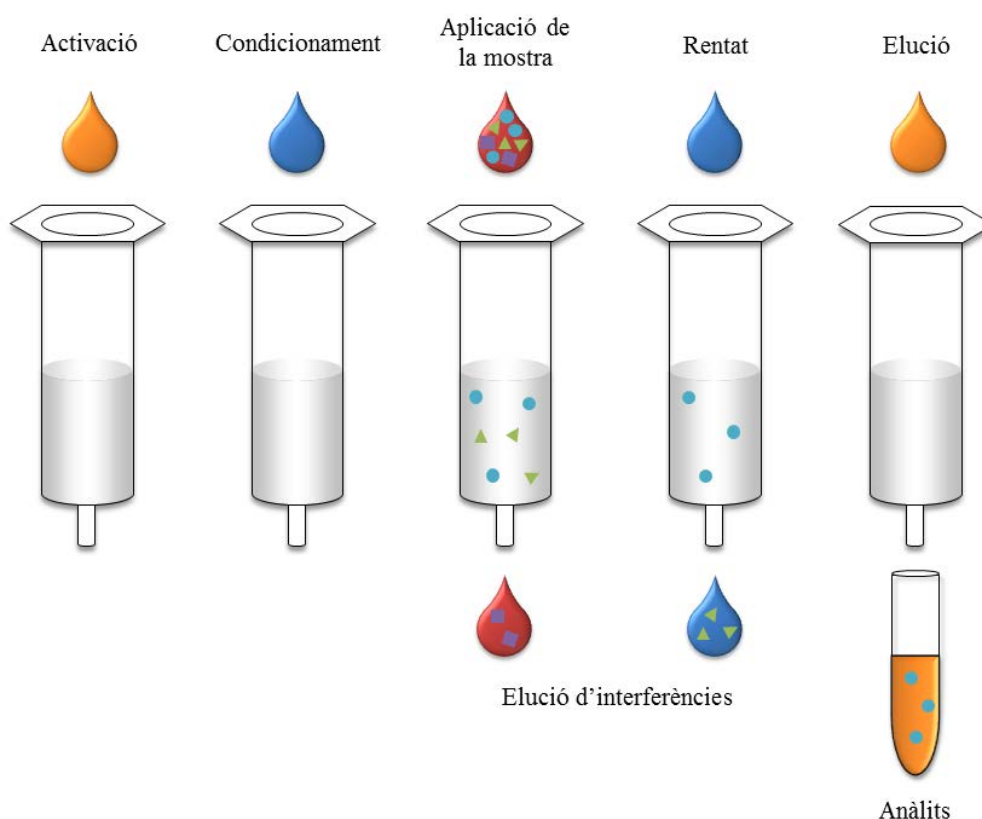


Figura 34. Etapes del procediment d'extracció en fase sòlida (SPE).

Un cop tenim l'extracte evaporat i reconstituït amb aigua, s'agita a l'agitador Eppendorf MixMate i ja es pot injectar al cromatògraf. Si cal guardar els extractes per injectar-los més tard o bé un altre dia, es guarden al congelador a -25°C .

Per identificar els pics cromatogràfics es comparen els temps de retenció amb els obtinguts en la injecció de patrons.

7.3. Anàlisis de les mostres de sòls

Es recol·lecten mostres de sòl de totes les zones del recinte d'Almadenejos descrites anteriorment i es fa la caracterització edàfica i granulomètrica, incloent les determinacions dels paràmetres més rellevants a les zones mineres com són la conductivitat elèctrica, el pH i el contingut de matèria orgànica. La conductivitat elèctrica i el pH es mesuren en una suspensió del sòl: 10 g de mostra s'homogeneïtzen amb 25 mL d'aigua ultrapura i es sotmet la solució a agitació mecànica durant 120 min en un bany agitador. Passat aquest temps es mesura el pH i la conductivitat elèctrica. El

contingut de matèria orgànica es determina seguint el procediment descrit per Walkley i Black [168] on a 1 g de sòl s'hi afegeix un excés conegut de dicromat de potassi (10 mL) i 20 mL d'àcid sulfúric concentrat per oxidar la matèria orgànica, es deixa reaccionar durant 30 min i es valora l'excés de dicromat amb sulfat de ferro utilitzant fenantrolina com a indicador. La granulometria es determina separant les partícules dels sòls en funció de la seva mida en uns tamisos disposats en forma de columna.

Per a la determinació del contingut total de Hg, les mostres de sòl es molen en un morter d'àgata i es tamisen a través d'una malla per obtenir una mida de partícula inferior a 100 µm. Es mesura directament el contingut total de Hg amb un instrument basat en l'espectrometria d'absorció atòmica Zeeman (ZAAS), on la mostra es vaporitza i els compostos de Hg descomponen a l'escalfar-los a 800°C, mentre que els compostos orgànics i les partícules de carboni es transformen catalíticament en diòxid de carboni i aigua. Per assegurar el control de qualitat s'analitzen blancs instrumentals ($<0,002 \text{ mg kg}^{-1}$), mostres duplicades (desviació estàndard relativa de 1,51%) i s'analitza un material de referència NIST SRM 2710 ($32,6 \pm 1,8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}$), obtenint una precisió de 1,23% i una veracitat de 99,32% per a la determinació del contingut total de mercuri en mostres sòlides sota les condicions d'aquestes anàlisis.

Per a la determinació de les diferents fraccions de Hg extractables amb diversos solvents s'apliquen els següents procediments d'extracció:

- a) El contingut de mercuri orgànic es determina seguint el procediment descrit per Válega [169] on el sòl es tracta inicialment amb una solució lixiviant àcida ($\text{KBr}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$), a continuació s'extreu l'halur de mercuri orgànic amb toluè i es torna a extreure amb una solució aquosa de tiosulfat de sodi. Les solucions extretes de cada sòl s'analitzen directament per AAS amb descomposició tèrmica. Aquesta metodologia senzilla es basa en la descomposició tèrmica de la mostra i la recollida del vapor de mercuri en un amalgamador d'or.
- b) El mètode d'extracció del Departament d'Estudis Geològics dels Estats Units (USGS) és el proposat per Hageman [170] que simula la lixiviació i les reaccions químiques que ocorren quan els materials geològics estan en contacte amb l'aigua. Per a aquest propòsit, 5 g de sòl es mesclen amb 100 mL d'aigua desionitzada (proporció 1:20) durant 2 hores a 50 rpm en un bany

agitador. Abans de l'anàlisi, els extractes es filtren utilitzant filtres de xeringa de nitrocel·lulosa (mida del porus de 0,45 µm). Es determina el mercuri per AFS-CV. Mitjançant aquest mètode el mercuri s'oxida amb una mescla de bromur/bromat i després es redueix amb clorur d'estany(II). Els àtoms de mercuri del gas portador s'exciten amb una font de llum UV a la longitud d'ona de 254 nm. Es mesura la radiació emesa i es quantifica l'element específic.

- c) El mètode d'extracció de la EPA (EPA 1312) conegut com a procediment sintètic de lixiviació per precipitació (SPLP) determina la mobilitat del mercuri inorgànic sota condicions àcides causades per la pluja àcida. S'extreuen 5 g de sòl amb 100 mL de la solució extractant ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{:HNO}_3$ en una proporció de 60:40 a un pH ajustat a 4,2) que es considera comparable a la pluja àcida. L'extracció es fa en un bany a 25°C durant 18 h amb agitació a 30 rpm. Passat aquest temps es filtren els extractes amb filtres de fibra de vidre de borosilicat (mida del porus de 0,7 µm) i s'analitzen per AFS-CV, com s'ha descrit anteriorment.
- d) Es fan altres extraccions mesclant 5 g de sòl amb 100 mL d'extractant. Els extractants utilitzats són 0,05 mol L⁻¹ d'EDTA a pH=4,5 i acetat d'amoni a pH=7 i pH=4,5. S'extreu durant 2 h en un bany a 25 °C, agitant a 50 rpm. Tots els extractes obtinguts es filtren amb filtres de xeringa de tefló de 0,45 µm de mida de porus i s'analitzen per AFS-CV.

Es fan tres replicats independents de cada mostra. També es fa un blanc per a cada procediment d'extracció. Totes aquestes mesures s'han fet en col·laboració amb investigadors del *Instituto de Geología Aplicada de la Escuela de Ingeniería Minera e Industrial de Almadén (Universidad de Castilla-La Mancha)*.

7.4. Anàlisis amb ICP-OES/ICP-MS

Un paràmetre important d'aquests estudis és la quantitat de metall que ha absorbit la planta, per això es fa un anàlisi del contingut total de metall tant en brots com en arrels. Per fer-ho s'ataca amb àcid la mostra en reactors de vidre i s'analitza la solució resultant per ICP-OES i/o ICP-MS.

Primer de tot, es fa una neteja dels reactors de vidre. Cada reactor està numerat amb el seu propi tap per no intercanviar-los i així evitar possibles contaminacions o diferències en el pes. S'afegeixen dins de cada reactor 4 mL HNO_3 65% Emsure i seguidament es tanca cada reactor posant un quadrat de paper de tefló (espessor 0,1 mm) entre el tub i el tap i després es tanca amb el tap; d'aquesta manera es minimitzen les fuites. Es fa l'atac àcid durant dues hores en un bany d'aigua, prèviament escalfat a 90°C . Es deixen refredar els reactors, es buiden i es netegen amb aigua ultrapura per eliminar qualsevol residu que hi pugui quedar d'àcid nítric i s'assequen a l'estufa a 60°C .

Per a l'atac de la mostra es pesa en un eppendorf la quantitat de mostra adient en funció del seu contingut de Hg: 200 mg en les plantes cultivades semi-hidropònicament, 100 mg en les plantes cultivades hidropònicament i 50 mg en les plantes d'Almadén. Es transvasa la mostra dins d'un reactor net i sec i s'hi afegeixen 2 mL de HNO_3 Suprapur. Es tapen bé els reactors amb paper de tefló i el tap corresponent i es posen dins del bany d'aigua escalfat prèviament a 90°C durant una hora (Figura 35). Un cop l'atac és complet (no s'observa la presència de partícules sòlides), es treuen els reactors, es deixen refredar i s'hi afegeixen 20 mL d'aigua ultrapura. Les mostres es transfereixen a tubs de vidre o plàstic, depenent del metall que es vol analitzar:

- Les mostres on es vol determinar el Hg es transfereixen en tubs de vidre i s'hi afegeix KMnO_4 per assegurar que tot el Hg estigui en forma oxidada. En ICP-OES o ICP-MS, l'estat d'oxidació dels elements és indiferent perquè l'aparell respon de la mateixa manera. Però en el cas del mercuri, l'addició d'un oxidant és necessària per estabilitzar la mostra perquè si una petita part del mercuri es reduís a mercuri metàl·lic, al ser volàtil, en el moment de la formació de l'aerosol al nebulitzador aquest estaria més enriquit amb mercuri i donaria una mesura errònia, ja que la concentració de mercuri a la mostra seria superior a la real. Les mostres s'analitzen per ICP-OES, per tenir una aproximació de la concentració de Hg. I en funció d'aquest resultat es dilueixen, afegint rodi com a patró intern i també KMnO_4 , i s'analitzen per ICP-MS.
- Les mostres on es vol determinar la resta de metalls (Cd, As i Pb) es transfereixen a tubs de plàstic i s'analitzen per ICP-OES per tenir una

aproximació de la concentració de metall. I en funció d'aquest resultat es dilueixen, afegint rodi com a patró intern, i s'analitzen per ICP-MS.

Totes les mostres s'analitzen per triplicat.



Figura 35. Atac àcid de les mostres en tubs de vidre per a la determinació del contingut total de metalls.

Els reactors es pesen abans i després de l'atac (quan ja se'ls ha afegit els 20 mL d'aigua ultrapura). Aquesta diferència de pes juntament amb la densitat de la solució d'atac (calculada per pesada d'un volum concret) s'utilitza per calcular el volum exacte de la dissolució.

Per assegurar el control de qualitat de les determinacions de Hg, Cd, As i Pb s'analitzen blancs de reactius ($<0,0001 \text{ mg kg}^{-1}$ Hg, $<0,00002 \text{ mg kg}^{-1}$ Cd, $<0,0001 \text{ mg kg}^{-1}$ As i $0,0005 \text{ mg kg}^{-1}$ Pb).

7.5. Anàlisi amb ESI-MS

En els experiments per comprovar les estequiometries dels complexos Hg-PC s'utilitza l'espectrometria de masses amb ionització per electronebulització en mode positiu. Aquest mode d'ionització és el més convenient per als estudis dels complexos metàl·lics ja que la fragmentació és mínima.

Es preparen mostres de l'ió metàl·lic amb diverses proporcions de lligand i es dissolen en aigua. La fase mòbil utilitzada està formada per 0,1% d'àcid fòrmic en aigua i 0,1% d'àcid fòrmic en acetonitril a una proporció (80:20). La mostra (1 μL) s'injecta directament a l'espectrofotòmetre amb les següents condicions:

- Velocitat de flux: 0,2 mL min⁻¹.
- Pressió del gas de nebulització: 40 psig (0,276 MPa).
- Temperatura de la font d'ionització: 300°C.
- Potencial del capil·lar: 4.000 V.
- Potencial del fragmentor: 215 V.
- Interval d'enregistrament de l'espectre: 60 a 3.000 m/z.

Els espectres obtinguts s'analitzen amb el programa Masshunter Qualitative Analysis de Agilent.

7.6. Determinació dels paràmetres de qualitat

Per tal d'assegurar la qualitat dels mètodes analítics, és necessari avaluar una sèrie de paràmetres de qualitat [155, 171]. Els més importants es descriuen a continuació.

7.6.1. Linealitat

És la capacitat del mètode analític d'obtenir resultats linealment proporcionals entre la concentració de l'anàlit i la resposta.

Per a la determinació de l'interval de linealitat en HPLC-ED o HPLC-UV s'injecten concentracions creixents dels patrons en un ampli rang que cobreixi l'interval de treball. Els pics obtinguts s'integren amb el programa adient i es representa l'àrea del pic en funció de la concentració del patró. S'observa el comportament de la corba i es selecciona qualitativament l'interval de linealitat. Es construeix la recta de calibratge (Eq. 7) on a és l'ordenada a l'origen i b el pendent de la recta.

$$y = a + bx \quad (\text{Eq. 7})$$

En general, el criteri d'acceptació qualitatiu que s'utilitza és el coeficient de correlació (r) que mesura la quantitat de variància explicada per la recta de regressió (Eq. 8), on els termes x_i i y_i corresponen a un determinat valor de la variable independent i dependent, respectivament; i $\bar{x}$ i $\bar{y}$ indiquen els valors mitjans d'aquestes variables.

$$r = \frac{\sum((x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}))}{\sqrt{(\sum x_i - \bar{x})^2 \cdot (\sum y_i - \bar{y})^2}} \quad (Eq. 8)$$

Els valors màxims que pot prendre són -1 i 1. Els valors extrems indiquen una relació lineal perfecta. Quan $r=0$, no existeix cap correlació, independència total dels valors de x i y . A la pràctica, el valor recomanable per a un calibratge és que el coeficient de correlació sigui major o igual que 0,999, encara que per alguns casos s'admet un valor igual o major a 0,99. La linealitat s'avalua cada dia o amb una certa periodicitat.

7.6.2. Sensibilitat

La sensibilitat d'un mètode analític correspon a la mínima quantitat d'anàlit que pot produir un resultat significatiu. Cal diferenciar entre dos tipus de sensibilitat: la sensibilitat de calibratge que correspon al pendent de la recta de calibratge i la sensibilitat analítica que correspon al quocient entre la sensibilitat de calibratge i la desviació estàndard de la mesura. Es diu que un mètode és sensible quan una petita variació de concentració determina una gran variació en la resposta. Si el pendent és elevat, el mètode té elevada sensibilitat, en canvi, si el pendent es petit, el mètode és poc sensible. Els paràmetres a definir per avaluar la sensibilitat d'un mètode són els límits de detecció i de quantificació.

El límit de detecció (LOD) correspon a la menor concentració d'anàlit que es pot detectar, però no necessàriament quantificar, en una mostra i s'expressa en unitats de concentració. Per a la determinació del límit de detecció d'un mètode instrumental cal tenir en compte que aquest valor ha de correspondre al d'un senyal significativament diferent al del blanc. Per això podem emprar dos procediments diferents: el primer consisteix en realitzar una sèrie de mesures replicades del blanc, i calcular la seva mitjana i la desviació estàndard del blanc (y_{blanc} i s_{blanc}); el valor del límit de detecció es mostra a l'Eq. 9.

$$y_{LOD} = y_{blanc} + 3 \cdot s_{blanc} \quad (Eq. 9)$$

Una alternativa a aquest mètode és fer la determinació a partir de la recta de calibratge. Així podem obtenir el valor del límit de l'ordenada a l'origen (Eq. 10), on s_a és la desviació estàndard de l'ordenada a l'origen.

$$y_{LOD} = a + 3 \cdot s_a \quad (Eq. 10)$$

Llavors, aïllant el pendent de l'equació de la recta i substituint el límit de l'ordenada a l'origen, s'obté el valor del límit de detecció x_{LOD} (Eq. 11).

$$x_{LOD} = \frac{3 \cdot s_a}{b} \quad (Eq. 11)$$

El límit de quantificació (LOQ) correspon a la menor quantitat d'anàlit que es pot determinar amb precisió i veracitat raonables en les condicions establertes i s'expressa també en unitats de concentració. El LOQ es pot avaluar seguint les mateixes metodologies descrites per al límit de detecció, però utilitzant un factor de 10 enlloc de 3 (Eq. 12).

$$x_{LOQ} = \frac{10 \cdot s_a}{b} \quad (Eq. 12)$$

En la present Tesi Doctoral, per a la determinació dels LOD i LOQ de les determinacions de tiols per HPLC-ED s'emptra el segon procediment, el que utilitza el pendent de la recta de calibratge i la desviació estàndard de l'ordenada a l'origen.

7.6.3. Veracitat

Es defineix la veracitat com el grau de concordança entre el resultat d'una mesura i el valor de referència acceptat o vertader. Matemàticament se sol expressar com la recuperació (R) (Eq. 13) on $\bar{x}$ és la mitjana de les mesures i $\hat{x}$ el valor vertader.

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \cdot 100 \quad (Eq. 13)$$

En els estudis de determinació de les fitoquelatines per HPLC-ED no es va utilitzar aquest paràmetre ja que no es disposa d'un valor considerat vertader en les mostres utilitzades i pels anàlits determinats. Això no obstant, aquest paràmetre si que es va determinar en les mesures del contingut de Hg total en sòls i en plantes, per comparació amb un material de referència certificat.

Per determinar la veracitat en les anàlisis de la determinació del contingut total de Hg en sòls per ZAAS es considera el material de referència NIST SRM 2710 i es calcula la recuperació.

7.6.4. Precisió

Es defineix la precisió com el grau de concordança entre els resultats de mesures obtingudes independentment sota les condicions establertes. La precisió s'expressa matemàticament com la desviació estàndard σ estimada analíticament per s (Eq. 14), on x_i és el valor de cada replicat, $\bar{x}$ la mitjana de tots els replicats i n el número de replicats o, més habitualment, per la desviació estàndard relativa (RSD) (Eq. 15).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Eq. 14})$$

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 15})$$

La precisió es pot establir en termes de repetibilitat i reproductibilitat.

Repetibilitat

Es defineix com la desviació estàndard relativa associada a un determinat nombre de mesures realitzades sota les mateixes condicions experimentals i en intervals curts de temps (en un mateix dia). Per a la seva avaluació en el mètode d'HPLC-ED desenvolupat, es segueix un protocol que consisteix en polir l'elèctrode, preparar fase mòbil nova, preparar tiol nou (Cys, Cys-Gly, GSH o γ -Glu-Cys) de concentració $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ i injectar-lo 10 vegades seguides en un mateix dia fent la dilució cada vegada fins a concentració $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Amb els cromatogrames obtinguts es fa la mitjana i la desviació estàndard de les àrees dels pics i es calcula la desviació estàndard relativa expressada en tant per cent.

En totes les determinacions fetes, ja siguin del contingut total de Hg en sòls per ZAAS, el contingut de Hg extractable en sòls per AAS o AFS-CV, el contingut de metalls pesants (Hg, Cd, As o Pb) en plantes per ICP-MS i també en la determinació de les PCs per HPLC-ED es fan mesures per triplicat i s'expressa el resultat com la mitjana dels tres replicats i la desviació estàndard obtinguda.

Reproductibilitat

Es defineix la reproductibilitat com la capacitat que té un mètode d'oferir els mateixos resultats en mesures diferents realitzades en les mateixes condicions al llarg

d'un període de temps. La reproductibilitat només s'ha determinat per a l'anàlisi de GSH per HPLC-ED. En aquest experiment es realitzen 5 injeccions diàries de GSH $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, durant 10 dies; cada dia es prepara GSH de concentració $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ i a cada injecció es fa la dilució fins a una concentració de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Amb els resultats obtinguts es fa la mitjana d'alçades i àrees de cada dia i amb aquests valors, es fa la mitjana i la desviació estàndard del conjunt de tots els dies.

Part IV

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Les investigacions dutes a terme sobre la determinació de fitoquelatines i compostos relacionats i dels seus complexos metàl·lics mitjançant HPLC amb detecció amperomètrica han permès la realització de sis treballs que es presenten en cinc capítols diferents. En el primer capítol es presenta el desenvolupament i la optimització de la metodologia experimental utilitzada per a la separació i detecció dels tiols i dels seus complexos amb Hg(II), basada en l'ús de l'HPLC amb detecció òptica i electroquímica. Aquest primer capítol engloba dos treballs; el primer corresponent a l'establiment i l'aplicació de la metodologia a la separació i determinació de GSH, els seus fragments i els complexos d'aquests amb mercuri, i el segon a l'ampliació d'aquest estudi a la determinació de fitoquelatines i dels seus complexos amb mercuri.

En els tres capítols següents es descriu l'aplicació d'aquesta metodologia a plantes cultivades en presència de metalls pesants. Aquests tres capítols, de fet, es podrien agrupar en un de sol però les característiques i procedències diferents de les mostres fa que sigui més convenient disposar-los en tres capítols separats on, a la introducció de cadascun d'ells es presenten les particularitats de cadascun dels estudis. En el primer treball, es consideren plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* sotmeses a estrès per Hg(II) i/o Cd(II), i s'avalua la síntesi de PCs i l'estrès provocat quan ambdós metalls són presents a la planta. En el segon treball, es fa un estudi comparatiu de la capacitat inductora de PCs de diversos metalls i la influència que aquests poden tenir en la síntesi de PCs. Per a aquest estudi s'utilitzen plantes de la mateixa espècie cultivades en presència de Hg(II), Cd(II), As(III) o Pb(II). En el tercer treball, s'analitza la síntesi de PCs en plantes procedents de la zona d'Almadén, mundialment coneguda per les mines de Hg que fan que sigui un dels llocs més contaminats amb Hg de la Terra. Aquest estudi té un elevat interès per poder aprofundir en els mecanismes naturals que les plantes de la zona han desenvolupat per fer front a la toxicitat d'aquest metall.

En l'últim capítol es presenta el treball realitzat durant l'estada a la *Université Libre de Bruxelles* (Bèlgica). Aquest estudi permet aprofundir en la preparació i la utilització d'elèctrodes de pasta de carboni modificats amb plata i la seva comparació amb l'elèctrode de plata tradicional. Aquests elèctrodes s'apliquen a la detecció electroquímica de compostos tiòlics. Tot i que aquest capítol és força diferent als treballs realitzats als capítols anteriors, el sistema de detecció electroquímica i els tiols estudiats actuen de nexa d'unió per no perdre el fil conductor que porta tota la Tesi Doctoral.

Establiment del mètode analític

Aquest capítol engloba dos treballs realitzats amb l'objectiu de desenvolupar i optimitzar una metodologia per a la determinació de diferents tiols i dels seus complexos amb Hg(II) per HPLC emprant la detecció amperomètrica i comparant-la amb la detecció UV àmpliament utilitzada a la literatura. A la primera etapa de l'estudi es consideren la Cys, la Cys-Gly, la γ -Glu-Cys, el GSH i els seus complexos amb Hg(II) i a la segona fase, a més d'aquests tiols s'estudien les fitoquelatines PC₂, PC₃, PC₄ i PC₅ i els seus complexos amb Hg(II).

En ambdós treballs s'han estudiat les estequiometries dels complexos formats mitjançant la injecció de mescles tiol-metall amb diferents proporcions de metall. A més, s'ha utilitzat l'espectrometria de masses amb ionització per electronebulització (ESI-MS) per determinar les estequiometries de les espècies formades.

8.1. Introducció

La capacitat de les plantes i les algues per sintetitzar fitoquelatines s'ha utilitzat per eliminar els metalls pesants dels sòls contaminats o dels sistemes aquàtics a través d'una metodologia anomenada fitoremediació [71, 84, 86, 172]. Les PCs són pèptids rics en grups tiol que interactuen de manera molt eficient amb els ions dels metalls pesants per minimitzar l'estrès que aquests podrien provocar als organismes vius. En presència de metalls pesants (M), les fitoquelatines formen complexos estables (M-PC) en el qual el metall s'uneix a través de grup SH de la cisteïna [82, 87, 173]. Les PCs es sintetitzen enzimàticament a partir del glutatió (GSH) com a resposta a l'augment de concentració de metalls pesants (Cd, Cu, Hg, As, Pb...) al citoplasma de la planta. Les plantes tenen l'habilitat de transportar els complexos formats als vacúols on immediatament la toxicitat del metall ja no és amenaçant. Atès que el metall immobilitzat és menys tòxic que el metall lliure, es consideren les fitoquelatines part dels mecanismes de desintoxicació de les plantes i alguns fongs.

S'han desenvolupat un gran nombre de mètodes analítics per estudiar el comportament de les PCs i dels seus fragments en presència de metalls pesants. Entre ells, els electroanalítics han jugat un paper important [95, 99, 174]. No obstant això, a causa de la coexistència de diferents espècies en medis naturals, l'ús de procediments de separació té un interès especial. Per a aquest propòsit, s'han utilitzat tècniques de separació emprant diferents modes de detecció, incloent la detecció fluorimètrica [132, 135, 175], la UV [92, 122, 126-128, 176] o l'espectrometria de masses [115, 136-140, 142, 177-179]. En general, els mètodes òptics de detecció requereixen derivatització, però en alguns casos les metodologies sense derivatització ofereixen límits de detecció prou baixos [92, 122, 176]. D'altra banda, la detecció per MS és cara i té dificultats de quantificació sota certes condicions. La detecció electroquímica (ED) s'ha estudiat com una alternativa a aquests modes de detecció ja que aprofita el caràcter electroactiu dels compostos tiòlics [105, 106, 108, 180].

Per tal d'obtenir una visió més profunda de la formació de complexos entre les PCs i els metalls pesants, en els últims anys s'han desenvolupat diverses metodologies analítiques que permeten detectar-los. No obstant això, els estudis relacionats amb la separació i la detecció simultània d'aquests compostos lliures juntament amb els seus complexos de metalls són molt escassos. Es poden destacar diversos estudis *in vitro* que

descriuen la unió del Hg(II) amb les PCs sintètiques, o els fragments Cys, Cys-Gly i GSH mitjançant voltamperometria de pols diferencial (DPV), espectrometria de masses amb ionització per electronebulització (ESI-MS) i calorimetria de valoració isotèrmica (ITC) [100, 181]. En aquests estudis, es consideren les interaccions del Hg(II) amb els diferents tiols de forma independent. Com s'ha comentat abans, en el cas de la coexistència de diferents complexos de PCs i els seus fragments, es requereixen procediments de separació. Encara que la separació dels diferents compostos no resulta excessivament complicada, la forma com es realitza la detecció presenta més controvèrsia. Mehra *et al.* [92] estudien l'afinitat del Hg(II) pel GSH, la PC₂, la PC₃ i la PC₄ en mostres sintètiques utilitzant HPLC de fase inversa i detecció UV sense derivatització prèvia. Aquest mode de detecció també es va utilitzar en l'estudi de les respostes de l'estrès de plantes de l'espècie *Zea mays* en presència de cadmi o mercuri [121]. No obstant això, no es van observar evidències apreciables de PCs a les plantes sotmeses a estrès per Hg(II) i, en el cas de Cd(II), es van obtenir pics molt mal definits presumiblement a causa dels elevats límits de detecció d'aquest mode de detecció. Tot i que la detecció de MS és cara i, com s'ha dit abans, pateix de dificultats de quantificació en certes condicions, és el mètode més estès per detectar complexos metall-tiol. Krupp *et al.* [142] apliquen la separació mitjançant HPLC amb detecció simultània per ICP-MS i ESI-MS a la detecció dels complexos de Hg amb Cys i GSH en mostres sintètiques i en extractes de plantes enriquides amb aquests compostos. També s'ha descrit l'anàlisi de les PCs induïdes per Hg(II) en mostres naturals. Chen *et al.* [131] caracteritzen els complexos de Hg-PC en plantes de l'espècie *Brassica chinensis* L. sotmeses a estrès metàl·lic per Hg utilitzant HPLC-ESI-MS/MS. Aquest treball assenyala la presència de HgGS₂, HgPC₂, HgPC₃, HgPC₄ i Hg₂PC₄ en els extractes d'arrels de *Brassica chinensis* L. En la mateixa línia, els estudis realitzats per HPLC acoblada a ESI-MS/MS i ICP-MS dels extractes de *Brassica napus* cultivat en presència de Hg(II) van indicar únicament la presència de PC₂ [139].

Com una alternativa a la detecció UV i l'espectrometria de masses, en aquest capítol es proposa l'ús de la detecció amperomètrica amb un elèctrode de carboni vitrificat per diferenciar entre els tiols lliures i els seus complexos amb mercuri. Aquest mode de detecció té l'avantatge del caràcter electroactiu dels compostos tiòlics, uns límits de detecció prou baixos i la conveniència econòmica d'aquest detector en comparació amb els equips d'espectrometria de masses.

El primer treball que es presenta en aquest capítol té com a objectiu el desenvolupament d'una metodologia electroquímica per a la separació del GSH i els seus fragments i la combinació de la detecció UV-vis (sense derivatització prèvia) per tal d'obtenir informació complementària a partir d'ambdós modes de detecció. Aquest primer treball pretén ser una prova preliminar de la detecció electroquímica en aquest tipus de sistemes per analitzar no només les PCs i els compostos tiòlics relacionats, sinó també els complexos metall-PC. Inicialment es prova la complexació amb Cd(II), Pb(II) i Hg(II), però degut a dificultats trobades en la formació i la estabilitat dels complexos formats, es continua l'estudi únicament amb el Hg(II). Es consideren els complexos de Hg(II) amb glutatió, Cys, γ -Glu-Cys i Cys-Gly, com a pas previ a l'estudi de les PCs, i s'analitzen mitjançant l'adaptació de procediments d'HPLC existents a la bibliografia [92, 105, 176, 180], emprant tant la detecció UV-vis com l'amperomètrica.

En el segon treball presentat en aquest capítol, s'aplica la metodologia d'HPLC desenvolupada al treball anterior a la mescla del GSH i els seus fragments juntament amb les diferents PCs ($n = 2-5$) i els seus complexos amb Hg(II). En aquest estudi, s'ha seguit la formació dels diferents complexos quan s'afegeix Hg(II) a la solució i, en alguns casos, s'han pogut determinar les estequiometries dels complexos formats. També s'ha utilitzat l'ESI-MS per a la confirmació d'aquestes estequiometries proposades.

8.2. Liquid chromatographic analysis of Hg(II) binding by thiol-rich peptides using both UV–vis and electrochemical detection

A. Dago, O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban

Journal of Chromatography A 1.216 (2009) 6.752-6.757



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Short communication

Liquid chromatographic analysis of Hg(II) binding by thiol-rich peptides using both UV–vis and electrochemical detection

Àngela Dago, Olga González-García, Cristina Ariño*, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona (UB), Martí i Franquès, 1–11, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2009

Received in revised form 24 July 2009

Accepted 31 July 2009

Available online 5 August 2009

Keywords:

Phytochelatin related peptides

Glutathione

Thiols

Mercury

HPLC

Electrochemical detection

ABSTRACT

An existing method for HPLC determination of thiol-containing peptides has been successfully adapted to the analysis of mixtures of glutathione (GSH) and some related peptides with their Hg(II) complexes as a first approach to the study of phytochelatin extracts. The separation was achieved in a C18 column with a mobile phase of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and 0.1% TFA/acetonitrile. Non-derivative UV–vis detection at 202 nm used in the original method has been complemented with amperometric detection at 1.2 V on glassy carbon electrode. Two different Hg(II)–GSH complexes were observed by both detection modes and confirmed by mass spectrometry.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Heavy metal pollution is a foremost environmental problem and its harmful impact on animals and plants is well defined. The plants are able to extract a large number of metal ions from the substrate, including Hg. The main procedure to remove them is to synthesize cysteine-rich peptides, such as glutathione and phytochelatin [1]. The phytochelatin (PCs) are a family of peptides with the general structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2\text{--}11$). In the presence of heavy metals (M), phytochelatin form stable complexes (M–PC) in which the metal is bound via SH-group of the cysteine unit. The PCs are enzymatically synthesized from glutathione (GSH) as response to increased concentrations of heavy metals (Cd, Cu, Hg, As and Pb) in the cytoplasm of the plant and their metal complexes are placed into the vacuoles. Since the immobilized metal is less toxic than the free metal, the phytochelatin are considered part of detoxifying mechanisms of plants and some fungi.

A number of analytical methods have been developed to study the behavior of PCs and their fragments in front of heavy metals. Among them, electroanalytical ones have been playing an important role [2–4]. However, due to the coexistence of different species in natural media, the use of separation procedures has a special interest. For this purpose, flow techniques have been used employing different detection modes including fluorimetric detec-

tion [5–7], UV detection [8–13] or mass spectrometry [14–23]. In general, optical methods of detection require derivatization, but in some cases non-derivatized methodologies offer low enough detection limits [12–14]. By the other hand, MS detection is expensive and suffers from difficulties of quantification under certain conditions. Electrochemical detection (ED) has been studied as an alternative to these detection modes which takes advantage of the electroactive character of thiol compounds [24–27]. In these studies, the separation of natural or synthetic PC and related compounds has been discussed, evidencing the goodness of this detection mode. However, in the literature, studies related with separation and simultaneous detection of these free compounds together with their metals complexes are very scarce. Only Mehra et al. [11] consider this possibility in a work basically oriented to the study of the optical properties of Hg(II)–phytochelatin complexes.

The present work aims to deepen on this research with the combination of UV–vis detection (without previous derivatization) with electrochemical amperometric detection in order to get complementary information from both modalities. The work is also intended as a preliminary test of electrochemical detection in this kind of systems which could encourage the development of more sophisticated electrochemical detection methods (e.g. using potential scans or dual electrodes) to monitor not only the oxidation of (previously separated) PCs and PC–metal complexes, but also the reduction of the complexed metal ions. With this purpose, the Hg(II) complexes with glutathione, Cys, $\gamma\text{-Glu-Cys}$ and Cys–Gly have been considered as a prior step to the study of longer chain PCs mixtures and natural PCs extracts and they

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 15 45; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: cristina.arino@ub.edu (C. Ariño).

have been analyzed by adapting existing HPLC procedures for the determination of uncomplexed thiol peptides [11,12,26,27] to both amperometric and UV–vis detection modes.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

L-Cysteine, γ -Glu-Cys (80% of purity as trifluoroacetate salt), Cys-Gly (85% of purity) and trifluoroacetic acid (TFA) were provided by Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Glutathione (GSH), hydrochloric acid 30%, nitric acid (65% of purity), potassium hydroxide (1 mol L^{-1} titrisol), acetonitrile (AcN) and methanol (MeOH), were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). HgCl_2 was purchased from Probus (Badalona, Spain). Formic acid (HfO) (98% of purity) and ethanol (EtOH) (96% of purity) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Ultrapure filtered water used was obtained from a Purelab Plus system of USF (Hamburg, Germany).

2.2. Chromatographic system

An Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 chromatographic system, with a quaternary pump, a $20 \mu\text{L}$ loop manual injector Rheodyne 7725i (Berkeley, CA, USA), a vacuum degasser and a handheld control module, was used. The analytical column was a C18 Inertsil ODS-2, particle size $5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ and it was provided by Supleco (Bellefonte, PA, USA).

Isocratic separation was achieved at ambient temperature with a mobile phase consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in ultrapure filtered water (solvent A) and 0.1% (v/v) TFA in acetonitrile (solvent B). The mobile phase solvents were sonicated during 15 min before use in an ultrasonic bath and freshly prepared weekly. Mobile phase composition was 95:5 or 99:1 of solvent A to solvent B depending on the compounds to separate. The flow rate was 1 mL min^{-1} . TFA is a weak hydrophobic ion-pairing reagent that minimizes ionic interactions between peptides and the stationary phase, and also serves to maintain a low pH.

The electrochemical detector system was a CC-5C BAS flow cell (West Lafayette, IN, USA), with a three electrode system with a 0.005 in. gasket, connected to an Autolab PGSTAT 12 Eco Chemie (Utrecht, The Netherlands). The GPES 4.9.007 software (Eco Chemie) allowed potentiostatic control and data acquisition. The working electrode was a dual glassy carbon electrode BAS, for which every day the surface was polished with $0.3 \mu\text{m}$ aluminum Metrohm (Herisau, Switzerland), rinsed thoroughly with ethanol, sonicated 5 min in an ultrasonic bath Branson 2510 (Danbury, CT, USA) into ethanol and 5 min into ultrapure filtered water. A stainless steel auxiliary electrode and an Ag/AgCl (KCl sat.) reference electrode BAS were used in electrochemical experiments. The optimized potential in the amperometric detection mode for the working electrode was 1.2 V.

The optical detector system was an Agilent 1100 Diode Array Detector. Data analyses were conducted using HP ChemStation (Palo Alto, CA, USA). The optimal wavelength was 202 nm.

2.3. MS conditions

Positive-mode ESI-MS experiments were performed using a LC/MSD-TOF Agilent 1100 instrument. Samples ($10 \mu\text{L}$) with different $\text{Hg(II)}:\text{GSH}$ ratios were injected into the HPLC system (flow rate: 1 mL min^{-1} , mobile phase: 0.1% HfO in acetonitrile:water 97:3 and the same column than before). MS conditions were: flow rate $250 \mu\text{L min}^{-1}$, nebulizer gas pressure 45 psig, dried with nitrogen at 11 L min^{-1} , temperature 300°C , capillary voltage 4000 V and frag-

mentor voltage 215 V. Spectra were collected in the m/z range of 50–2500.

Instrument control and spectra treatment were performed with the Analyst QS Software.

2.4. Measurement solutions

Stock solutions of thiols ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) were prepared directly on solvent A media and stored at 5°C . Working solutions were prepared daily by diluting the stock solution with solvent A. All solutions were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ Nylon filter discs by Osmonics (Minnetonka, MN, USA) prior to HPLC analysis.

3. Results and discussion

There are different mobile phases that can be used for the separation and analysis of thiol compounds [17–19,21,24]. In the present study, we have selected an aqueous-acetonitrile solution with 0.1% of TFA because it has demonstrated to be not only a good solvent for the separation of thiol compounds or phytochelatin, but also, a medium compatible with both detection modes here considered [11,12,25–27].

Selection of the optimal electrode potential for amperometric measurements in ED was based on the hydrodynamic voltammogram obtained from chromatograms measured at different

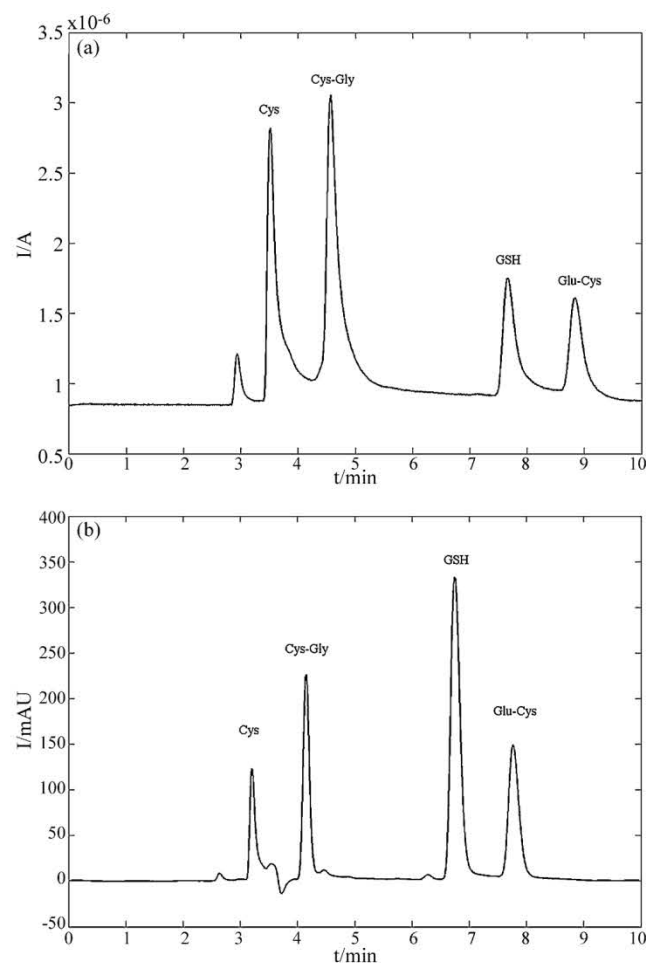


Fig. 1. Chromatograms of Cys, Cys-Gly, GSH and γ -Glu-Cys $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ using a mobile phase of 0.1% TFA/ H_2O :0.1% TFA/acetonitrile (99:1) at a flow rate of 1 mL min^{-1} and electrochemical detection mode (a) at 1.2 V working potential and UV–vis detection mode and (b) at 202 nm wavelength.

potential values. The curve was built for GSH as representative thiol compound varying the electrode potential from 0.7 to 1.6 V (results not shown) and a value of 1.2 V was chosen from this voltammogram.

Optimal wavelength for UV–vis detection was selected by screening from 190 to 400 nm different solutions of the thiol compounds studied with a diode array detector. From the obtained three-dimensional spectra (results not shown) an optimal wavelength of 202 nm was selected.

Fig. 1 shows, as an example, the chromatograms obtained by monitoring the signal obtained by both detection modes after injection of 20 μ L of a solution containing 10^{-3} mol L $^{-1}$ of each thiol (run

time 10 min). A good separation and detection was obtained with both detection modes. However, ED peaks exhibit noticeable tails that hinder a fast recovery of the baseline. This fact is surely due to the distortion of the electrical double layer on the electrode surface as a result of the changes produced by the electrochemical reaction of the analyte. This point, although does not hinder measurements, could be a limitation in some uses.

3.1. Hg(II)–GSH System

Once the separation and detection of the considered thiol compounds have been established, complexation studies with mercury

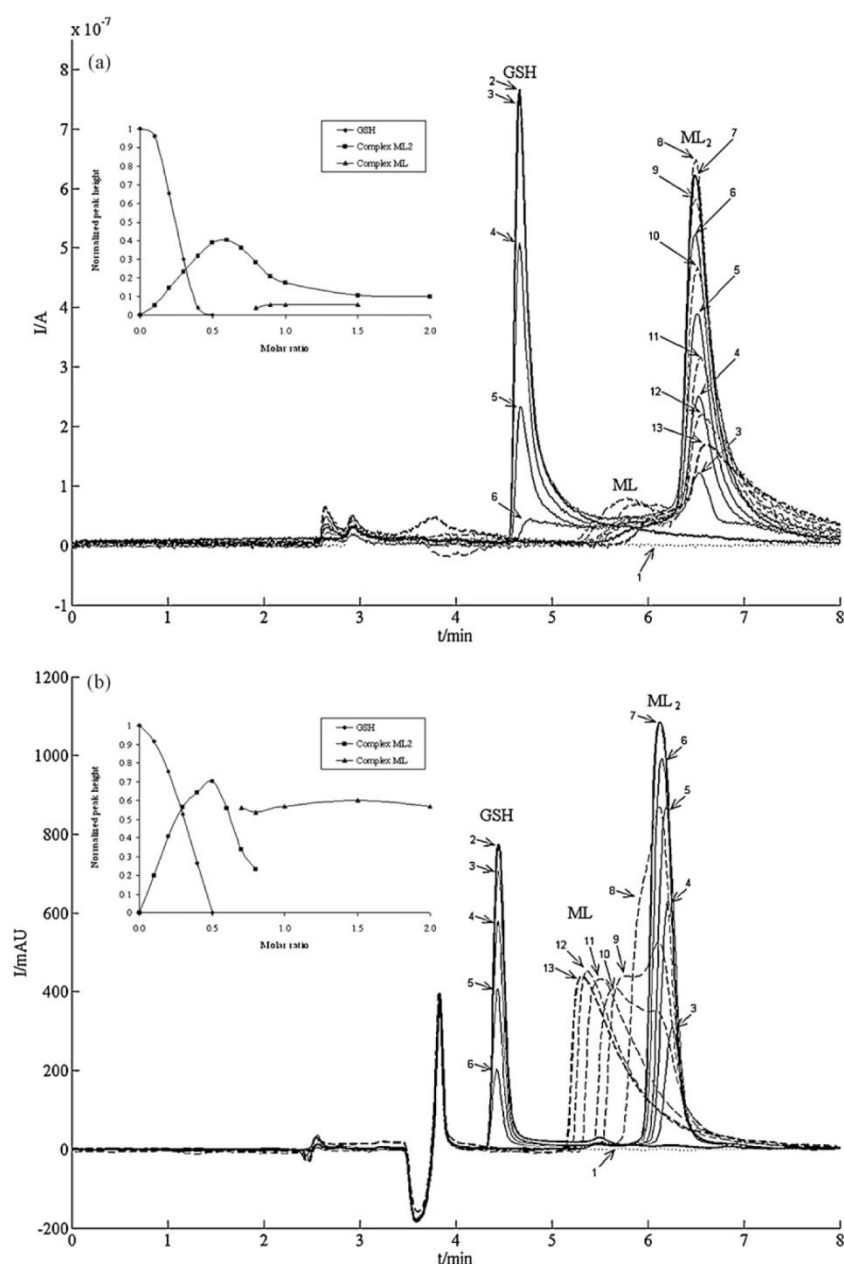


Fig. 2. Chromatograms of Hg(II):GSH (5×10^{-4} mol L $^{-1}$) at different molar ratio using a mobile phase of 0.1% TFA/H₂O:0.1% TFA/acetonitrile (95:5) and electrochemical detection (a) at 1.2 V working potential or UV–vis detection (b) at 202 nm. Dotted line 1 means the mobile phase, 2 GSH, and 3–13 increasingly molar ratio of Hg(II):GSH from 0.1 to 2.0. Continuous lines mean that the GSH peak disappears and the first complex peak increases. Dashed lines are when the first complex peak disappears and another complex peak appears. Thicker lines correspond to molar ratios of 0 and 0.5 of Hg(II):GSH. Insets in figures are a representation of the peak height vs. the molar ratio (Hg(II):GSH) of the three peaks that appear in the chromatograms, where ♦ lines are a representation for GSH peak, ● lines for ML₂ complex and ▲ lines for ML complex.

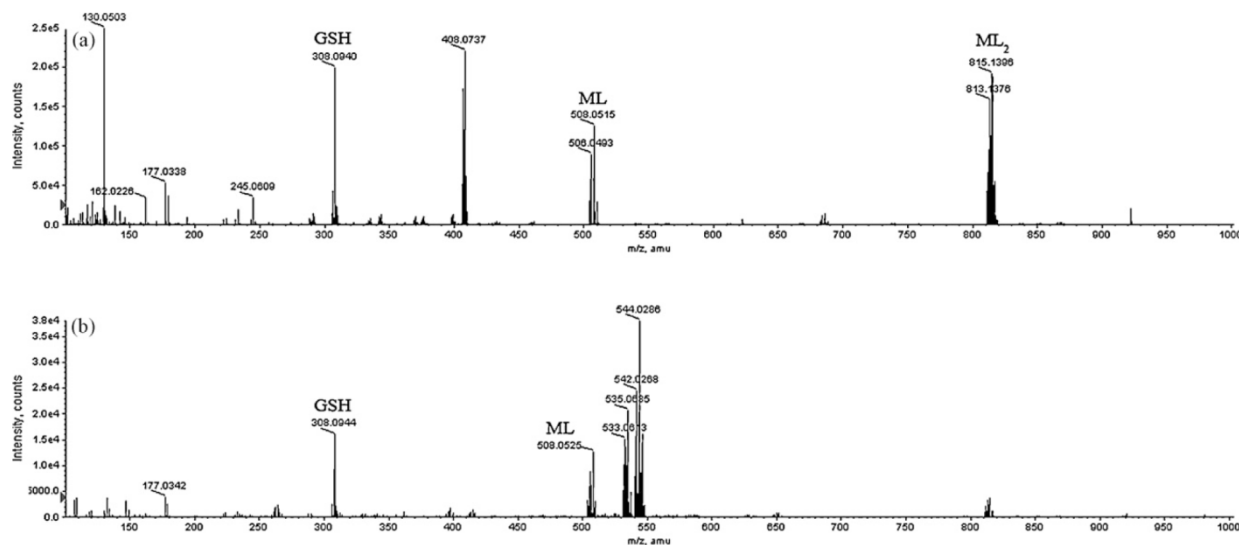


Fig. 3. LC-MS-ESI-TOF spectra of Hg(II):GSH (5×10^{-4} mol L⁻¹) at molar ratios of 0.5 (a) and 2.0 (b) using a mobile phase of 0.1% formic acid/H₂O:0.1% formic acid/acetonitrile (97:3).

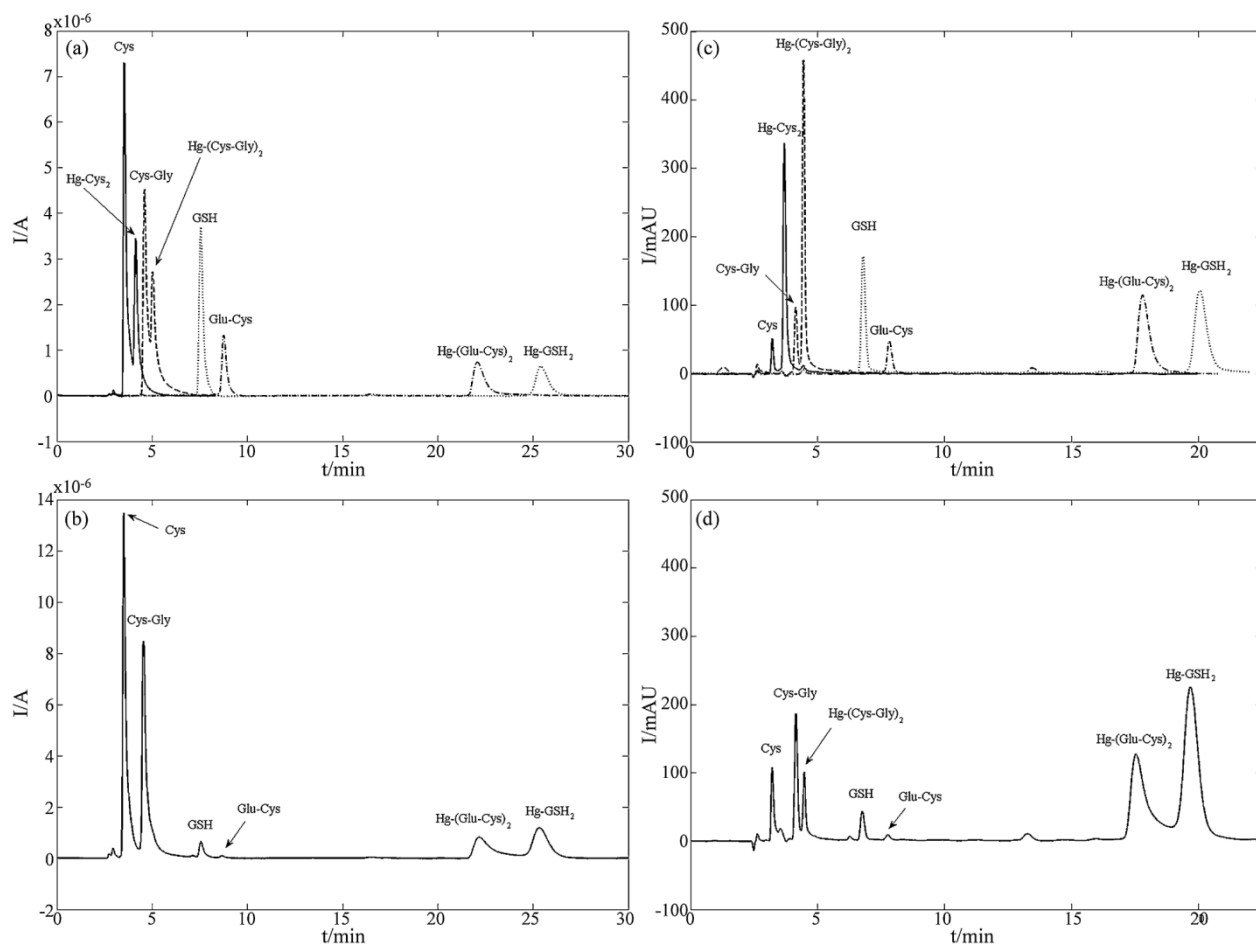


Fig. 4. Chromatograms of mixtures of Hg(II):thiol (5×10^{-4} mol L⁻¹) at a molar ratio 0.2 using a mobile phase of 0.1% TFA/H₂O:0.1% TFA/acetonitrile (99:1). Insets (a) and (b) use electrochemical detection employing 1.2 V as the working potential and (c) and (d) UV-vis detection at 202 nm. In figures (a) and (c) lines signify (---) Hg(II):Cys, (---) Hg(II):Cys-Gly, (...) Hg(II):GSH, (---) Hg(II):γ-Glu-Cys. Figures (b) and (d) are chromatograms of a mixture of the four thiols used in this study and Hg(II) at a molar ratio of 0.2 referring to the total amount of thiol.

can be done because of the high affinity of this metal ion by thiol groups. First of all, the GSH system has been considered.

In this study, mixtures of Hg(II):GSH at molar ratios up to 2 were injected and detected by both detection modes, and chromatograms shown in Fig. 2 were obtained. These chromatograms allow us to differentiate between the free and the complexed GSH forms, and to follow the complexation process of GSH with mercury. As Fig. 2 shows, when Hg concentration increases, the free GSH peak decreases and another peak at higher retention times appears, which can be associated to a Hg–GSH complex. This peak increases until a 0.5 Hg:GSH molar ratio; at this point the peak of free GSH disappears and an increase of Hg provokes a decrease on the complex peak and the appearance of a new peak which could be associated to a new complex. This general behavior can be deduced from both detection modes. However, the information from the UV–vis mode seems to be more complete. That may be because the ED is based on the oxidation of the ligand, and the influence of the complexation on the detection is not well-known. To analyze the complexation process, a plot of the peak height of the different signals versus the molar ratio has been built (insert figures in Fig. 2). These figures show that at 0.5 Hg(II):GSH molar ratio the free GSH peak disappears and the peak of the first complex reaches a maximum, indicating ML₂ stoichiometry for this complex. At higher ratios the height of this signal decreases and the 1:1 complex seems to be formed.

To confirm these stoichiometries some MS measurements were done, indicating that the first complex was ML₂ and the second one was ML (Fig. 3).

This study indicates that it is possible to separate and detect free and complexed thiol compounds.

3.2. Hg(II)–thiols mixtures

Since usually a blend of thiol compounds is present in natural media, the behavior of a mixture of these compounds with mercury was studied. Fig. 4 shows the chromatograms corresponding to a mixture of Cys, Cys-Gly, γ -Glu-Cys and GSH with Hg(II) at a ratio of Hg:total thiol groups of 1:5, obtained by both detection modes. The chromatograms can be compared with those obtained in the individual complexation study of each thiol with Hg(II) (Fig. 4a and b). A very good resolution can be noticed not only for the free peptides, but also for the different complexes, although the ED tails cause a certain overlapping of the signals of Cys and Cys-Gly complexes with those of free thiols. A qualitative analysis of retention times (which, as expected, are coincident for both detection modes) evidences that they increase with increasing size of the free peptide. At this point, it is interesting to notice that the retention times of ML₂ complexes are quite higher than those of the corresponding free peptides, which could also be related to their bigger size. As for the comparison of both detection methods, a higher sensitivity is noticed in the amperometric mode for the biggest ML₂ complexes as compared to the corresponding UV–vis signals. This suggests that the presence of Hg(II) in the molecule could enhance the oxidation of the thiol groups, which could be valuable in the analysis of longer chain phytochelatin, for which quite low and broad signals are expected. Finally, in Fig. 4 it can also be seen that the sequence of complex formation depends on the affinity of each thiol with mercury, so that GSH and γ -Glu-Cys are almost entirely complexed, Cys-Gly is partially complexed and Cys is practically not complexed.

4. Conclusions

The results described so far show that the existing methodology for the determination of free, uncomplexed, thiol-containing pep-

tides can be adapted to the separation of the different complexes formed between these substances and Hg(II)-ions and, eventually, for the estimation of their stoichiometries.

As for detection, the comparison between the non-derivative UV–vis modality of the original method (optimized to a wavelength of 202 nm) and the newly proposed amperometric detection on glassy carbon electrode at 1.2 V shows a better performance of the first, since the former suffers from tails (which seem mostly due to electroodic double layer effects) and from a decreased linearity range (probably due to electrode adsorption/saturation). However, the results provided by both detection modes are consistent with each other and appear to be complementary. This is especially important if we consider that they are based on quite different processes (light absorption and thiol groups oxidation, respectively). Moreover, electrochemical detection is open to many significant improvements such as the application of potential scans (voltammetric detection) or the combination of oxidative (for peptides) and reducing (for bound metals) potentials, which could be the subject of future works.

In the particular case of GSH, two Hg(II) complexes, with ML and ML₂ stoichiometries, were detected by using the adapted method, and they were confirmed by mass spectrometry.

Just to conclude, the results here described could open a promising field of research on metal–phytochelatin binding in plant extracts based on the combination of chromatographic separation of free peptides and metal complexes and selective and complementary UV–vis and electrochemical detection methods.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (project CTQ2006-14385-C02-01/BQU). This research is a part of the activities of SIBA-TEQ group, which is recognized as consolidated group by the Generalitat de Catalonia (project 2005SGR00186). Àngela Dago acknowledges the University of Barcelona for a Ph.D. grant.

References

- [1] C.S. Cobbett, *Plant Physiol.* 123 (2000) 825.
- [2] E. Chekmeneva, R. Prohens, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2860.
- [3] A. Alberich, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Talanta* 71 (2007) 344.
- [4] I. Šestáková, H. Vodičková, P. Mader, *Electroanalysis* 10 (1998) 764.
- [5] R. Minocha, P. Thangavel, O.P. Dhankher, S. Long, *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 72.
- [6] S. Döring, S. Korhammer, M. Oetken, B. Markert, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 316.
- [7] A.M. Svardal, M.A. Mansoor, P.M. Ueland, *Anal. Biochem.* 184 (1990) 338.
- [8] A. Tukendorf, W.E. Rauser, *Plant Sci.* 70 (1990) 155.
- [9] H. Harmens, P.R. Den Hartog, W.M. Ten Bookum, J.A.C. Verkleij, *Plant Physiol.* 103 (1993) 1305.
- [10] J.A. de Knecht, M. van Dillen, P.L.M. Koevoets, H. Schat, J.A.C. Verkleij, W.H.O. Ernst, *Plant Physiol.* 104 (1994) 255.
- [11] R.K. Mehra, J. Miclat, V.R. Kodati, R. Abdullah, T.C. Hunter, P. Mulchandani, *Biochem. J.* 314 (1996) 73.
- [12] A.A. Hunaiti, I.K. Abukhalaf, N. Silvestrov, M. Bayorh, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 26 (2003) 3463.
- [13] R. Rellán-Álvarez, L.E. Hernández, J. Abadía, A. Álvarez-Fernández, *Anal. Biochem.* 356 (2006) 254.
- [14] I. Leopold, D. Günther, D. Neumann, *Analisis* 26 (1998) M28.
- [15] V. Vacchina, H. Chassaigne, M. Oven, M.H. Zenk, R. Lobinski, *Analyst* 124 (1999) 1425.
- [16] T.-Y. Yen, J.A. Villa, J.G. DeWitt, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 930.
- [17] M.H.A. El-Zohri, R. Cabala, H. Frank, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1871.
- [18] S. Iglesia-Turiño, A. Febrero, O. Jauregui, C. Caldelas, J.L. Araus, J. Bort, *Plant Physiol.* 142 (2006) 742.
- [19] B.B.M. Sadi, A.P. Vonderheide, J.-M. Gong, J.I. Schroeder, J.R. Shann, J.A. Caruso, *J. Chromatogr. B* 861 (2008) 123.
- [20] P. Kubáň, P. Houserová, P. Kubáň, P.C. Hauser, V. Kubáň, *Electrophoresis* 28 (2007) 58.
- [21] E.M. Krupp, B.F. Milne, A. Mestrot, A.A. Meharg, J. Feldmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1753.

- [22] N. Buford, M.D. Eelman, K. Groom, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 1992.
- [23] F.M. Rubino, C. Verduci, R. Giampiccolo, S. Pulvirenti, G. Brambilla, A. Colombi, J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom. 15 (2004) 288.
- [24] O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, J. Chromatogr. A 1062 (2005) 95.
- [25] J. Petrlova, R. Mikelova, K. Stejskal, A. Kleckerova, O. Zitka, J. Petrek, L. Havel, J. Zehnalek, V. Adam, L. Trnkova, R. Kizek, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1166.
- [26] D. Potesil, J. Petrlova, V. Adam, J. Vacek, B. Klejdus, J. Zehnalek, L. Trnkova, L. Havel, R. Kizek, J. Chromatogr. A 1084 (2005) 134.
- [27] L. Manna, L. Valvo, P. Betto, J. Chromatogr. A 846 (1999) 59.

8.3. Characterization of Hg(II) binding with different length phytochelatins using liquid chromatography and amperometric detection

A. Dago, O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban

Analytica Chimica Acta 695 (2011) 51-57



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Characterization of Hg(II) binding with different length phytochelatins using liquid chromatography and amperometric detection

Àngela Dago, Olga González-García, Cristina Ariño*, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona (UB), Martí i Franquès, 1-11, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2011
Received in revised form 18 March 2011
Accepted 21 March 2011
Available online 8 April 2011

Keywords:

Phytochelatins
Electrochemical detection
Liquid chromatography
Mercury complexes

ABSTRACT

A simple and rapid methodology is optimised to analyse mixtures of different phytochelatins (PC_n , $n = 2-5$) with Hg(II) by HPLC with amperometric detection as a first step towards the analysis of extracts of plants stressed with Hg(II). The separation was achieved in a C_{18} column with a mobile phase of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and 0.1% TFA in acetonitrile using gradient elution. Electrochemical detection with glassy carbon electrode and UV-vis detection were used in series. This methodology can clearly distinguish between the free peptides and their complexes and permits to study the evolution of the different complexes formed and predicts the possible interactions between the long chain phytochelatin complexes. ESI-MS is used as a complementary technique to find out the stoichiometries of such long chain phytochelatin complexes.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mercury is a global pollutant that together with its compounds constitutes one of the most toxic substances found in all environment compartments. It is well known that the incorporation of heavy metals into the cells of plants or animals can induce some mechanisms leading to modulate the possible harmful effects. One of these mechanisms is the synthesis of several compounds such as metallothioneins (MT), in the case of mammals and some fungi, or phytochelatins (PC), in the case of plants and algae [1–4]. These substances are thiol-rich peptides which interact very efficiently with heavy metal ions minimizing the stress that these could provoke in living organisms. The capability of plants and algae to synthesize this kind of molecules has been used to remove heavy metals from contaminated soils or aquatic systems through a methodology named phytoremediation. The role that PCs play in detoxification mechanism has received great attention in the last decades [1,2,5–7]. These molecules have the general structure of γ -(Glu-Cys) $_n$ -Gly where n has been reported as high as 11, but generally is in the range from 2 to 5 [1–4]. They are synthesized enzymatically from glutathione (GSH) by the constitutive enzyme PC synthase.

In the particular case of Hg(II), the high affinity that inorganic forms of this metal ion possess for biomolecules containing sulphhydryl groups (–SH) in comparison with other groups like

phosphate, carboxyl, amide or amine is well described [8–10]. Due to Hg(II) toxicity, the knowledge of complexation processes with PCs is of great interest. In order to gain deeper insight on the complexation between PCs and heavy metals, different approaches have been developed in the last years. Among them, direct spectrophotometric techniques [11,12] or chromatographic separations combined with spectrophotometric or mass-spectrometric detection techniques have been the most widely used [13–16]. The use of voltammetric techniques or amperometric detection modes has received special attention in the last few years [17–21]. However, little information is still available about the complexation of Hg with PCs or its fragments. Several *in vitro* studies describing the binding of Hg(II) with synthetic PC_n , $n = 2, 3, 4$, or the fragments Cys, Cys-Gly and glutathione (GSH) using differential pulse voltammetry (DPV), electrospray mass-spectrometry (ESI-MS) and isothermal titration calorimetry (ITC) can be stand out [22,23]. In these studies, the interactions of Hg(II) with different thiols are considered independently. In the case of coexistence of different PCs and their fragments, separation procedures are required. Although the separation of the different compounds is not excessively complicated, the way how the detection is done presents more controversy. Thus, Mehra et al. [24] studied the affinity of Hg(II) for GSH, PC_2 , PC_3 and PC_4 in synthetic samples using reverse-phase HPLC and UV detection without previous derivatization in conditions in which high sensitivity is not necessary. This detection mode was also used in the study of the stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury [25]. However, no appreciable evidences of PCs were observed in the plants subjected to Hg(II) stress and very poorly defined peaks were obtained in the case of

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 15 45; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: cristina.arino@ub.edu (C. Ariño).

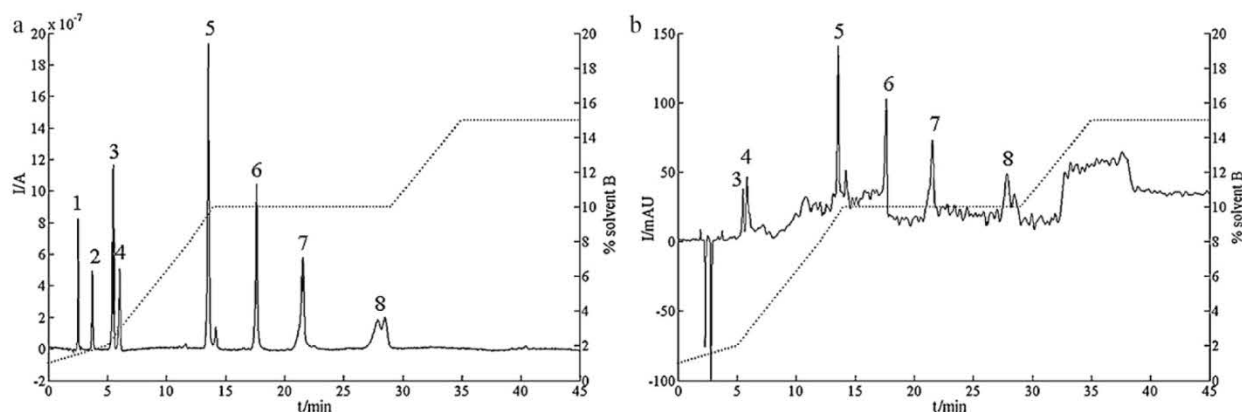


Fig. 1. Chromatograms of Cys (1) and Cys-Gly (2) at $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, GSH (3), γ -Glu-Cys (4), PC₂ (5), PC₃ (6), PC₄ (7) and PC₅ (8) at $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ using a mobile phase of 0.1% TFA/H₂O:0.1% TFA/acetonitrile with gradient profile elution (showed in dotted lines) and a flow rate of 1.2 mL min^{-1} using electrochemical detection (a) at 1.2 V working potential and UV-vis detection (b) at 202 nm wavelength.

Cd(II) presumably due to the high detection limits of this detection mode. Although MS detection is expensive and suffers from difficulties of quantification in certain conditions, it is the most extended method to detect heavy metal-thiol complexes. Krupp et al. [26] applied HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS to the detection of mercury complexes with Cys and GSH in synthetic samples and in plant extracts spiked with these compounds. Analysis of PCs induced by Hg(II) in natural samples have also been described. Chen and co-workers [27] characterized the Hg-PC complexes in Hg-stressed *Brassica chinensis* L. using reverse-phase HPLC-ESI-MS/MS. This work points out the presence of HgGS₂, HgPC₂, HgPC₃, HgPC₄ and Hg₂PC₄ in root extracts of *Brassica chinensis* L. On the same line, the studies by HPLC coupled with ESI-MS/MS and ICP/MS of the extracts of *Brassica napus* grown in the presence of Hg(II) indicate that only PC₂ is found in the plant extracts [28]. As an alternative to UV and MS detection modes, our research group proposed the use of amperometric detection with a glassy carbon electrode [29] as a more appropriate alternative to differentiate between free-thiol compounds and their complexes with mercury. This detection mode takes the advantage of the electroactive character of thiol compounds, the low detection limits that electroanalytical techniques can provide and the economical convenience of this detector in comparison with MS systems. The preliminary application to small thiol peptides [29] yielded satisfactory results and encouraged the application to longer chain peptides such as PCs.

Considering again the Hg-PCs complexes formed in plants stressed with mercury reported elsewhere [25,27,28,30], it is possible to notice that although the studied plants are not the same, the higher PCs are not always observed. This fact, however, is not necessarily a consequence of the non induced formation of these

compounds but could be a problem of the formation of some aggregated compounds during the detection step. Nevertheless, it must be taken into account that when synthesis of PCs in plants is activated, PC₂ is firstly formed and the higher PCs (probably PC₃, PC₄ and PC₅) are created later. A tentative study made in our group with an extract of *Hordeum vulgare* roots (results not shown) seems to indicate that a mixture of Hg(II) complexes with PC_n, with n from 2 to 5, could be present, and that signals related to the higher PCs suffer of some uncertainty.

In the present work, a RP-HPLC methodology has been applied to the separation of a mixture of different PCs (from $n=2$ to $n=5$), GSH and their fragments. In this study, the formation of different complexes and their separation from the apo-form (not complexed form) has been followed when mercury is added to the solution and in some cases different stoichiometries can be distinguished. ESI-MS has been used to confirm the predicted species. The use of amperometric detection with a glassy carbon electrode allows us to study the evolution of the different complexes formed by each PC depending on the Hg concentration added.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

L-Cysteine, γ -Glu-Cys (80% of purity as trifluoroacetate salt), Cys-Gly (85% of purity) and trifluoroacetic acid (TFA) were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The phytochelatin (γ -Glu-Cys) _{n} -Gly ($n=2-5$), as trifluoroacetate salts, were provided by DiverDrugs S.L. (Barcelona, Spain) with a purity ranging from 86.2% to 99.0%. Glutathione, hydrochloric acid 30%, acetonitrile and methanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). HgCl₂

Table 1
Figures of merit for thiol determination by HPLC-ED (amperometric mode at 1.2 V).

Compound	Retention time (min)	Calibration functions ^a	Detection limit ^b		Quantification limit ^c	
			$\mu\text{mol L}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{mol L}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Cys	2.47	$A = 0.031c + 8 \times 10^{-9}$, $r^2 = 0.997$	3.21	0.39	10.71	1.30
Cys-Gly	3.47	$A = 0.020c - 6 \times 10^{-8}$, $r^2 = 0.998$	2.90	0.52	9.67	1.72
GSH	4.57	$A = 0.116c + 9 \times 10^{-9}$, $r^2 = 0.997$	2.71	0.83	9.02	2.77
γ -Glu-Cys	5.39	$A = 0.147c - 2 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0.995$	4.20	1.05	14.00	3.50
PC ₂	12.38	$A = 0.193c - 1 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0.999$	1.89	1.02	6.32	3.41
PC ₃	16.63	$A = 0.108c + 7 \times 10^{-8}$, $r^2 = 0.996$	4.10	3.16	13.66	10.54
PC ₄	19.71	$A = 0.202c - 8 \times 10^{-8}$, $r^2 = 0.996$	3.44	3.46	11.47	11.52
PC ₅	24.64	$A = 0.230c - 9 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0.995$	4.90	6.06	16.33	20.19

^a A is the peak area (Ampere per second) and c the injected concentration (mol L^{-1}).

^b Calculated with the 3σ criterion.

^c Calculated with the 10σ criterion.

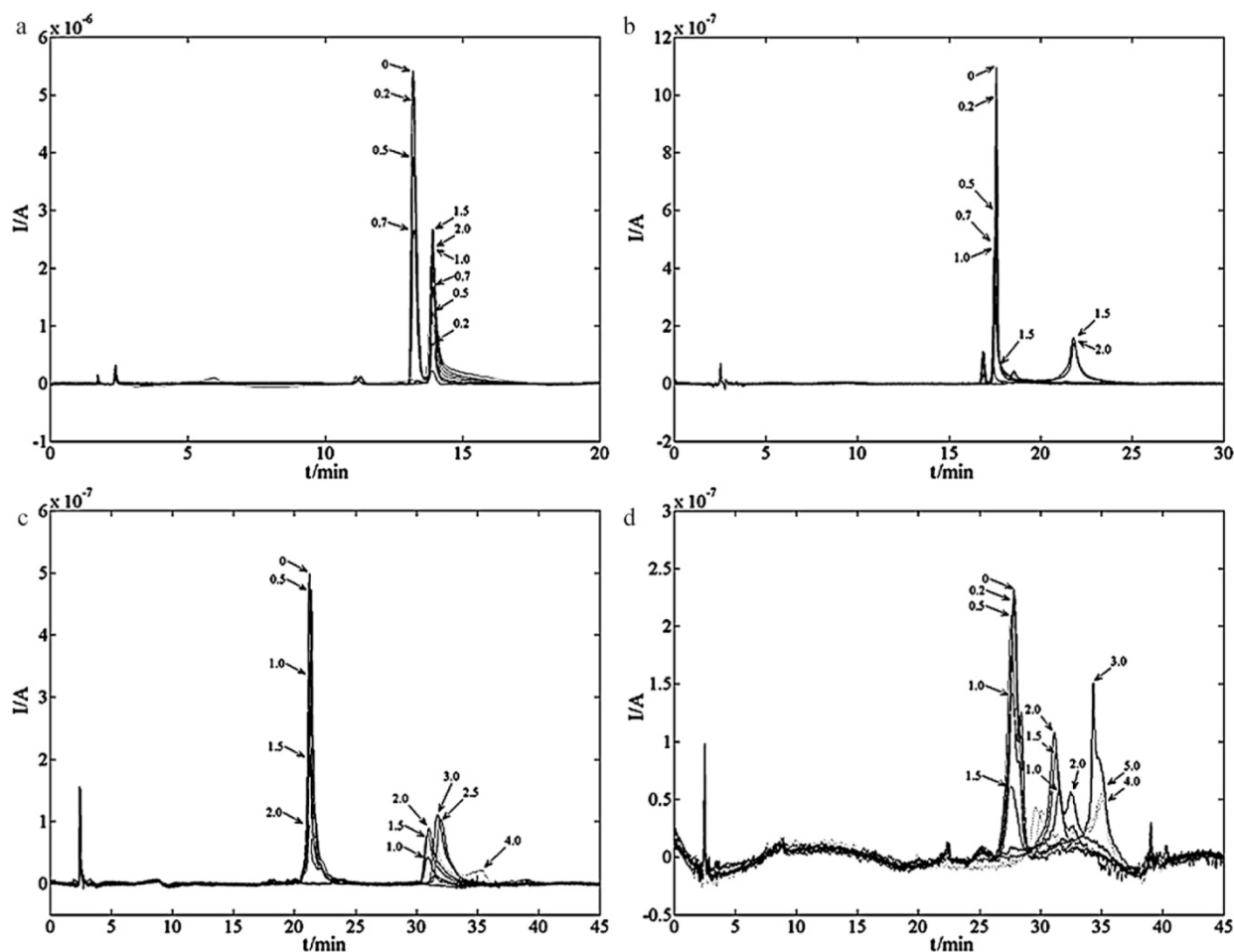


Fig. 2. HPLC-ED chromatograms of PC₂ at $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a), PC₃ at $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (b), PC₄ at $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (c) and PC₅ at $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (d) with Hg(II) at different molar ratios Hg(II):PC which are indicated in each chromatogram.

was purchased from Probus (Badalona, Spain). Formic acid (98% of purity) and ethanol (96% of purity) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

For the preparation of the solutions and cleaning the column ultrapure filtered water obtained from Purelab Plus of USF (Hamburg, Germany) was used.

Stock standard solutions of the thiols ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) were prepared with ultrapure water and stored at 5°C . Working solutions were prepared daily by diluting the stock solution with ultrapure water.

2.2. Instrumentation

An Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 chromatographic system, with a quaternary pump, a $20 \mu\text{L}$ loop manual injector Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, USA), a vacuum degasser and a handheld control module were used. An analytical column, Ascentis C₁₈, particle size $5 \mu\text{m}$, $25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$ was provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Electrochemical and optical detectors were connected in series by using 1/16 in. i.d. PEEK tubing in order to compare the signals obtained by both detectors in each injection. The eluent that flows through the column goes to the electrochemical detector, which oxidizes a small part of the separated compounds and then passes through the UV-vis detector that optically detects the compounds.

The electrochemical detector (ED) was a CC-5C flow cell BAS (West Lafayette, IN, USA), with a three electrode system and a 0.005 in gasket, connected to an Autolab PGSTAT 12 Eco Chemie (Utrecht, Nederland). The GPES 4.9.007 software Eco Chemie (Utrecht, Nederland) allowed potentiostatic control and data acquisition. Electrochemical chromatograms were smoothed and baseline-corrected, when necessary, using proprietary programs developed by Matlab 7.3.0.267 software Mathworks Inc. (Natick, MA, USA).

In the electrochemical system, the working electrode was a dual glassy carbon electrode BAS (West Lafayette, IN, USA). A stainless steel auxiliary electrode and an Ag/AgCl (KCl sat.) reference electrode were also used.

The optical detector system was an Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 Diode Array Detector. Data analyses were conducted using HP ChemStation by Agilent.

Positive-mode ESI-MS experiments were performed using a MS-ESI-TOF Agilent 1100 instrument. Instrument control and spectra treatment were performed with the Agilent Masshunter Qualitative Analysis Software.

2.3. Procedures

The working electrode was daily polished using a suspension of alumina particles of $0.3 \mu\text{m}$ from Metrohm (Herisau, Switzerland), rinsed thoroughly with ethanol, sonicated 5 min into ethanol and 5 min into ultrapure filtered water. The optimized potential for the

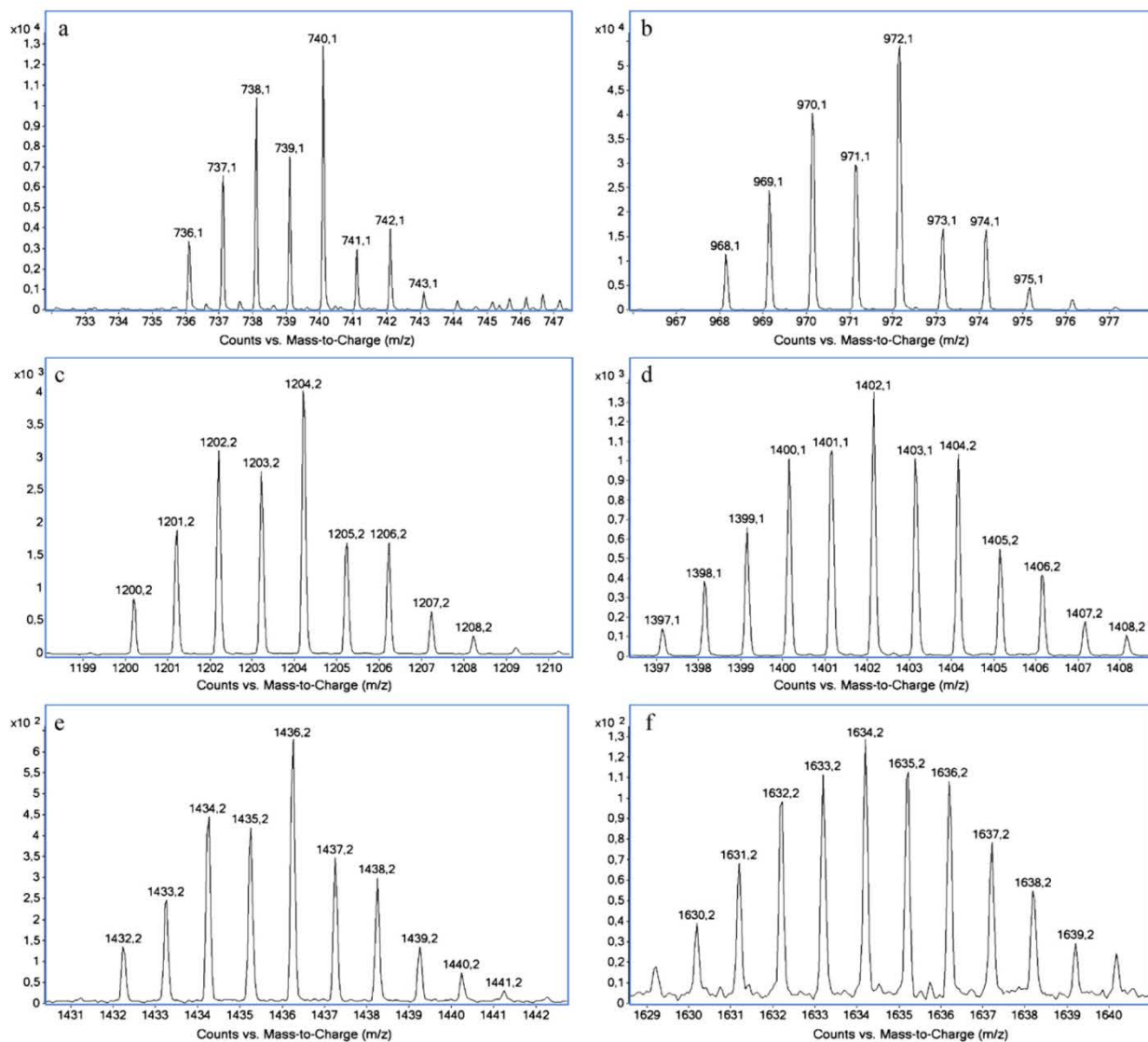


Fig. 3. ESI-MS spectra showing the isotopic peak distributions of HgPC₂ (a), HgPC₃ (b), HgPC₄ (c), Hg₂PC₄ (d), HgPC₅ (e) and Hg₂PC₅ (f) with direct injection of mixtures of each PC (5×10^{-5} mol L⁻¹) with Hg(II).

working electrode was 1.2 V (selected from measurements at different potential values). The optimal wavelength for the optical detector was 202 nm.

The mobile phase consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in ultrapure filtered water at pH 2.00 (solvent A) and 0.1% TFA in acetonitrile (solvent B). The two solvents were degassed with an ultrasonic bath every day. Gradient separation was achieved at ambient temperature with a gradient profile starting up at 99:1 (solvent A:solvent B), then decreasing linearly up to 98:2 for the first 5 min, decreasing up to 92:8 for 7 min, decreasing to 90:10 for the next 2 min, kept constant for 15 min and finally decreasing up to 80:20 from 29 to 35 min. The flow rate was 1.2 mL min⁻¹.

For the ESI-MS experiments, samples (1 μ L) were injected directly into the MS system (flow rate: 0.2 mL min⁻¹, mobile phase: 0.1% formic acid in acetonitrile:water 80:20). ESI conditions were: nebulizer gas pressure 40 psig (0.276 MPa), dried with nitrogen at 10 L min⁻¹, temperature 300 °C, capillary voltage 4 kV and fragmentor voltage 215 V. Spectra were collected in the m/z range of 60–3000.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary experiments

The above-described HPLC conditions applied to a mixture of all the studied thiols (Cys, Cys-Gly, GSH, γ -Glu-Cys, PC₂, PC₃, PC₄ and PC₅) in the absence of mercury give a simple and clean chromatogram with well-separated peaks by both detection modes (Fig. 1). The different peaks have been accurately assigned to each thiol by the injection of individual standards. The retention times are in concordance with the length of the phytochelatins chains as it is reported in the literature [24,31]. The fact that the detectors are connected in series does not diminish the sensitivity of these because, as noted above, the analyte fraction oxidized by the electrochemical detector is very small and the results are complementary. The comparison of ED with UV-vis detection shows that ED presents better sensitivity and gives a cleaner baseline, although in both cases the peaks of phytochelatins are less intense compared to those of the smaller fragments. Taking into account that in natural samples the concentration level of thiol compounds

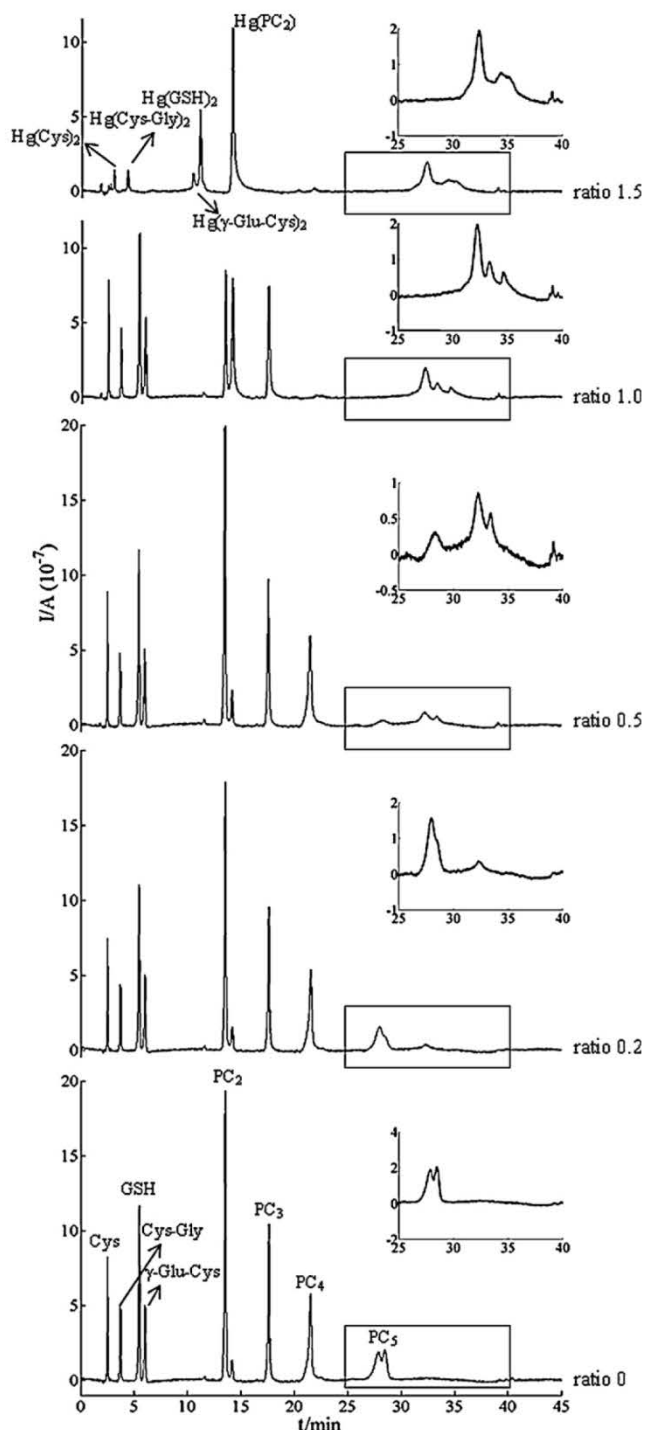


Fig. 4. HPLC-ED chromatograms of the eight studied thiols with Hg(II) at different molar ratios which are indicated in each chromatogram. Insets in figures are an expansion of the zone inside the box in the chromatogram.

is very low, as a tentative study and as literature show [18], ED seems to be more convenient for this kind of studies. At this low concentration level, the peaks obtained by the UV-vis detector are confused with the background noise of the chromatogram (Fig. 1), whereas the signal to noise ratio of amperometric detection is still very good. This leads us to select the electrochemical detector for this study. Table 1 summarizes the figures of merit

using this methodology and presents the retention time of each thiol compound. The table shows that detection limits are reasonably low and quite similar for the different PCs. It must be remarked that, as the molecules become larger, the retention time increases and peaks broaden, which produce poorer detection limits. However, this fact is in part counterbalanced by the increase of the oxidation current due to the increase of oxidizable thiol groups, which constitutes a clear advantage of electrochemical detection.

3.2. Individual study of Hg-PCs

Phytochelatin are involved in the cellular detoxification mechanisms due to their ability to form stable metal-PC complexes [2]. To better understand the behavior of mercury complexes by HPLC-ED a preliminary study of the individual mercury complexes formed with each PC has been made. Mixtures of each PC with Hg(II) at different molar ratios (metal/ligand) were injected and electrochemically detected in order to differentiate the peaks of the free and the complexed forms and to follow the complexation process of each PC with mercury.

The results for PC₂ (Fig. 2(a)) show two well-separated peaks. The first one is due to the free PC₂ and the second one corresponds to a Hg(II)-PC₂ complex. It can be seen that when the Hg(II) concentration increases the peak of the free PC₂ decreases and the other peak increases until a molar ratio of 1, which leads us to believe that this is a complex of 1:1 stoichiometry, the same Hg-PC₂ complex that was previously reported by using other techniques [23,24,27].

In the case of PC₃, the study (Fig. 2(b)) shows the peak of the apo-form of PC₃ and a peak of a complex. The height of the PC₃ signal decreases with Hg(II) additions indicating that a complexation process takes place. However the peak of the complex that appears is only evident at high ratios. The evolution of peaks could indicate the initial formation of a 1:1 complex (as it is reported in the literature [23]) and, in the presence of Hg(II) excess, the further appearance of a M₂L complex.

Titration of PC₄ and PC₅ with Hg(II) (Fig. 2(c) and (d)) show a similar behavior as in the case of PC₃; a decrease of the peak of the apo-forms is observed when additions of Hg(II) are made. For these systems the peak of the apo-forms disappears at ratios close to 2. In both cases some ill-defined peaks appear at larger retention times that seem to correspond to Hg(II) complexes. It is important to remark that peaks related with PC₄ and PC₅ complexes appear at the same range of retention times.

Previous studies of the complexing behavior of different length PCs [32] made by voltammetry indicate that the electrochemical response of PC₂ complexes is clearly different than those of PC₃, PC₄ and PC₅ complexes. For these PCs, although the complexing capacity is clearly different, the electrochemical characteristics of their complexes are very similar. By the other hand, the voltammetric analysis of the Hg-PCs complexes [23] shows that the complexes formed have a clearly inert character that difficult the observation of their own voltammetric signals. All these facts could justify the uncertain behavior observed for the long PCs when Hg(II) is present.

To establish the stoichiometries of the formed complexes with the different PCs, MS experiments have been done. Fig. 3 shows the isotopic peak distribution of the complexes formed in mixtures of Hg(II) with PC₂, PC₃, PC₄ and PC₅. The pattern for the Hg(II)-PC₂ system (Fig. 3(a)) confirms the stoichiometry proposed above. For the Hg(II)-PC₃ system (Fig. 3(b)), only the ML complex is detected. For Hg(II)-PC₄ (Fig. 3(c) and (d)) and Hg(II)-PC₅ systems (Fig. 3(e) and (f)), the presence of ML and M₂L complexes is shown. For these two systems the stoichiometries of the formed complexes could not be assigned from the HPLC with amperometric detection experiment possibly due to the equilibrium between the formed species.

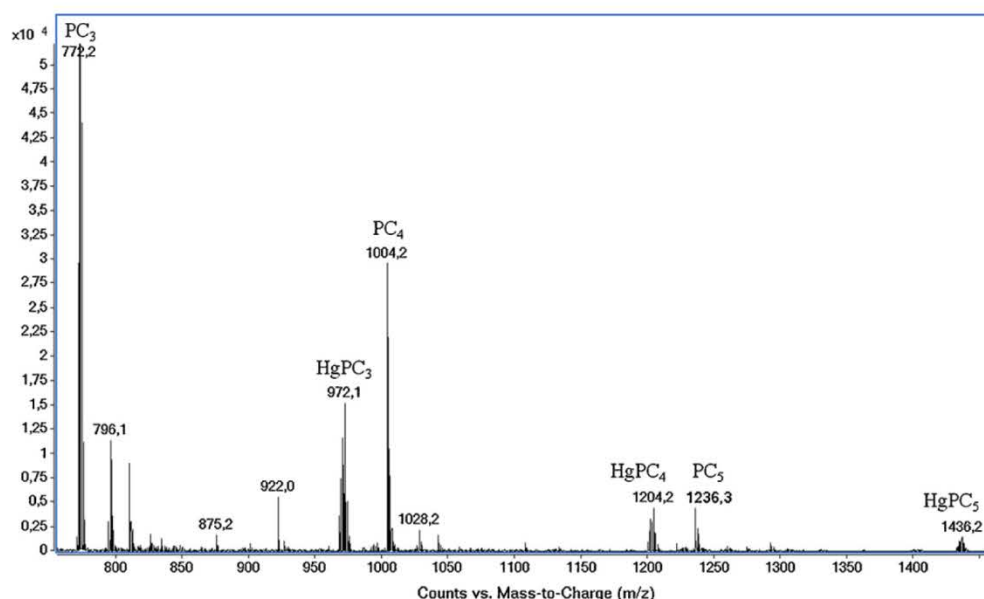


Fig. 5. ESI-MS spectrum of a mixture of PC₃, PC₄ and PC₅ ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) with mercury at a molar ratio of 0.5 (considering the total amount of PCs) using a mobile phase of 0.1% formic acid/H₂O:0.1% formic acid/acetonitrile (80:20).

3.3. Mercury complexation of a mixture of different PCs and its fragments

To simulate the behavior of a natural sample stressed with mercury, mixtures of all the studied thiols with different proportions of Hg(II) were considered. To make a real estimation of the behavior in plants, concentrations of thiols up to $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ were considered, which approximates the concentration that can be found in plants according to previous studies.

As it can be seen in Fig. 4, when mercury is added to a mixture of the different PCs and their fragments some changes are observed. These changes show the progressive complexation of the thiol compounds following the previously observed increase on complexing capacity as PC chain length increases [32]. Until ratio 0.5, the chromatogram seems to indicate that only complexes with PC₅ are formed, because the rest of the signals do not suffer important modification. At ratio equal to 1 the signals corresponding to free PC₄ and PC₅ totally disappear, and the signal corresponding to free PC₂ decreases substantially giving a new peak corresponding to its complex with mercury. The broad peaks that appear at around 30–35 min increase in height and number. These signals are related to Hg(II) complexes with PC₄ and PC₅. However, the characteristics of these signals do not allow assigning clear correspondences with the different complexes formed. At this ratio the free PC₃ peak seems to suffer a small decrease. At ratio 1.5 all the peaks of the free PCs and fragments completely disappear giving the signals corresponding to their complexes. The signals for the PC₃, PC₄ and PC₅ complexes cannot be identified because of the overlapping peaks at higher retention times. This could be explained considering that in the presence of larger PCs all complexes appear together and give a broad signal.

To know what happens with the broad signal, a MS study of a mixture of Hg(II) with PC₃, PC₄ and PC₅ was done (Fig. 5). The results of this study indicate that the complexes formed have ML stoichiometries in the three cases and that, although the masses of the three complexes are different; they appear together in the chromatogram. This fact, together with the complexes of small size of the peaks (in comparison with the sizes of the small thiols, GSH and PC₂) suggests that the detection of the larger Hg(II)-PC complexes could be difficult. All these facts point out that in the analysis

of natural extracts one has to be careful with large PC complexes. From these studies a sequence of complexation could be proposed. Thus, PC₅ is the first thiol compound to be complexed, after that PC₄ and PC₂, later PC₃, and finally GSH and the small fragments.

4. Conclusions

The combination of reverse phase liquid chromatography and amperometric detection with a glassy carbon electrode is a promising tool for the analysis of mixtures of phytochelatin and their Hg(II) complexes at the low concentration levels that are expected in natural extracts from plants suffering from mercury contamination. The optimal separation was achieved in a C₁₈ column with a mobile phase of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and 0.1% TFA in acetonitrile using gradient elution. This methodology can distinguish the free peptides and their complexes, and also can resolve the complexes of the shorter PC and their fragments. However, for PC₃ and longer chain PCs, the Hg(II) complexes produce many broad and overlapping peaks which hinder an accurate analysis. In these cases, ESI-MS can be used as a complementary technique to find out the stoichiometry of such long chain PC complexes.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (project CTQ2009-09471). Àngela Dago acknowledges the University of Barcelona for a PhD grant.

References

- [1] C.S. Cobbett, *Plant Physiol.* 123 (2000) 825–832.
- [2] C. Cobbett, P. Goldsbrough, *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 (2002) 159–182.
- [3] W.E. Rauser, *Plant Physiol.* 109 (1995) 1141–1149.
- [4] J. Johanning, H. Strasdeit, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 2464–2466.
- [5] E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 439–443.
- [6] D.E. Salt, R.D. Smith, I. Raskin, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 643–668.
- [7] I. Raskin, B.D. Ensley, *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, Wiley, New York, 2000.

- [8] R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, K. Heumann, *Handbook of Elemental Speciation II*, Wiley, Chichester, 2005.
- [9] J.P.K. Rooney, *Toxicology* 234 (2007) 145–156.
- [10] U. Skyllberg, P.R. Bloom, J. Qian, C.-M. Lin, W.F. Bleam, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 4174–4180.
- [11] H. Satofuka, T. Fukui, M. Takagi, H. Atomi, T. Imanaka, J. Inorg. Biochem. 86 (2001) 595–602.
- [12] G. De la Rosa, J.R. Peralta-Videa, M. Montes, J.G. Parsons, I. Cano-Aguilera, J.L. Gardea-Torresdey, *Chemosphere* 55 (2004) 1159–1168.
- [13] R. Minocha, P. Thangavel, O.P. Dhankher, S. Long, *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 72–83.
- [14] P. Agraftiou, S. Sotiropoulos, A. Pappa-Louisi, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 949–954.
- [15] M.H.A. El-Zohri, R. Cabala, H. Frank, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1871–1876.
- [16] A. Bräutigam, D. Schaumlöffel, G.-J. Krauss, D. Wesenberg, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 1737–1747.
- [17] B. Yosypchuk, I. Šestáková, L. Novotný, *Talanta* 59 (2003) 1253–1258.
- [18] V. Diopan, V. Shetivska, O. Zitka, M. Galiova, V. Adam, J. Kaiser, A. Horna, K. Novotny, M. Liska, L. Havel, J. Zehnalek, R. Kizek, *Electroanalysis* 22 (2010) 1248–1259.
- [19] V. Supalkova, D. Huska, V. Diopan, P. Hanustiak, O. Zitka, K. Stejskal, J. Baloun, J. Pikula, L. Havel, J. Zehnalek, V. Adam, L. Trnkova, M. Beklova, R. Kizek, *Sensors* 7 (2007) 932–959.
- [20] R. Gusmão, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Analyst* 135 (2010) 86–95.
- [21] E. Chekmeneva, R. Prohens, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environm. Sci. Technol.* 42 (2008) 2860–2866.
- [22] E. Chekmeneva, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.* 644 (2010) 20–24.
- [23] E. Chekmeneva, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environm. Sci. Technol.* 43 (2009) 7010–7015.
- [24] R.K. Mehra, J. Miclat, V.R. Kodati, R. Abdullah, T.C. Hunter, P. Mulchandani, *Biochem. J.* 314 (1996) 73–82.
- [25] R. Rellán-Álvarez, C. Ortega-Villasante, A. Álvarez-Hernández, F.F. Del Campo, L.E. Hernández, *Plant Soil* 279 (2006) 41–50.
- [26] E.M. Krupp, B.F. Milne, A. Mestrot, A.A. Meharg, J. Feldmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1753–1764.
- [27] L. Chen, L. Yang, Q. Wang, *Metallomics* 1 (2009) 101–106.
- [28] S. Iglesia-Turiño, A. Febrero, O. Jauregui, C. Caldelas, J.L. Araus, J. Bort, *Plant Physiol.* 142 (2006) 742–749.
- [29] A. Dago, O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6752–6757.
- [30] T. Maitani, H. Kubota, K. Sato, T. Yamada, *Plant Physiol.* 110 (1996) 1145–1150.
- [31] A.A. Hunaiti, I.K. Abukhalaf, N. Silvestrov, M. Bayorh, J. Liq. Chrom. Relat. Technol. 26 (2003) 3463–3473.
- [32] R. Gusmão, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Anal. Biochem.* 406 (2010) 61–69.

8.4. Discussió de resultats

Tal com s'ha anticipat a la introducció d'aquest capítol, el treball 8.2 és un estudi preliminar per posar a prova la detecció electroquímica en l'estudi de diferents tiols (Cys, Cys-Gly, γ -Glu-Cys i GSH) com a pas previ per a l'estudi de les fitoquelatines i dels seus complexos amb Hg(II) del treball 8.3. Amb aquest propòsit s'ha adaptat una metodologia descrita a la bibliografia per a l'anàlisi de tiols lliures [92, 105, 176, 180] a l'estudi de la complexació d'aquests tiols amb Hg(II) i, a més, aquest estudi ha permès l'estimació de les estequiometries dels complexos formats. La separació s'ha dut a terme mitjançant HPLC en fase inversa, emprant una columna C18 i amb elució en gradient d'una fase mòbil formada per dues solucions (0,1% d'àcid trifluoroacètic (TFA) en aigua i 0,1% de TFA en acetonitril (ACN)).

La composició de la fase mòbil és molt important per a l'anàlisi cromatogràfica perquè influeix significativament en la retenció, l'alçada i la forma del senyal analític. Un requisit important per a la determinació electroquímica efectiva de les substàncies estudiades és la presència d'electròlits a la fase mòbil, a més, l'ús d'un solvent no aquós a la fase mòbil és també necessària per assegurar una separació ràpida dels compostos estudiats [105]. S'ha vist que un component inorgànic (electròlit) adequat per a la fase mòbil per a la determinació de compostos orgànics és l'àcid trifluoroacètic (TFA). El TFA és un reactiu d'aparellament iònic feblement hidròfob que també serveix per mantenir un pH baix, minimitzant d'aquesta manera les interaccions iòniques entre el pèptid i la fase estacionària a la vegada que actua com a electròlit suport per a la detecció amperomètrica [180]. Com a solvent orgànic de les fases mòbils en cromatografia de líquids s'utilitza sovint l'ACN, encara que també es poden usar altres dissolvents orgànics, per exemple, metanol. D'aquesta manera, amb el mètode proposat s'obté una resolució adequada, uns pics ben definits i uns temps d'anàlisi relativament curts.

Per a la detecció, s'empra tant el mètode HPLC-UV sense derivatització descrit a la bibliografia però optimitzant la longitud d'ona, com la detecció amperomètrica (HPLC-ED) utilitzant un elèctrode de treball de carboni vitrificat i optimitzant el potencial de treball. L'optimització d'aquests paràmetres dels detectors es fa utilitzant el glutatió com a patró i es suposa que la resta dels tiols es comportaran d'una manera similar ja que contenen els mateixos grups funcionals.

Un dels paràmetres més importants quan s'utilitza el mètode amperomètric, és el potencial que s'aplica a l'elèctrode de treball. Per a l'optimització d'aquest paràmetre, es fan una sèrie d'injeccions de glutatió $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ variant el potencial que s'aplica a l'elèctrode de treball de 0,7 V a 1,6 V (Figura 36). En aquesta figura es pot apreciar que la línia base és força bona però que el pic del glutatió presenta una cua apreciable que pot ser deguda a canvis a la doble capa electròdica.

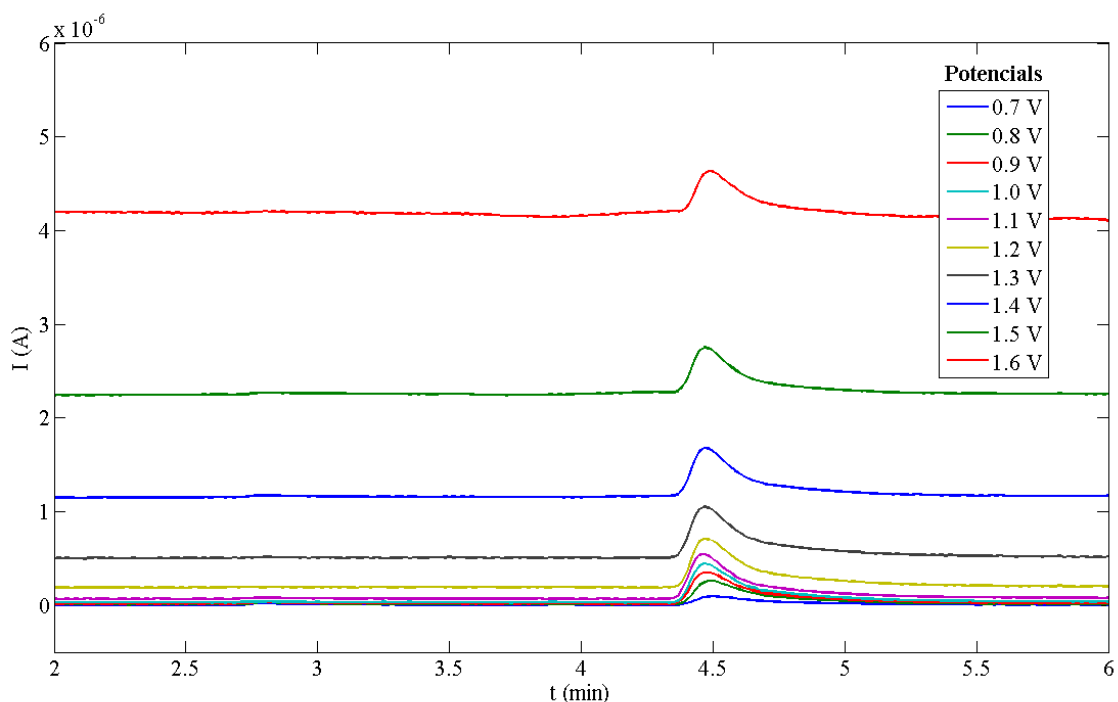


Figura 36. Cromatogrames d'una solució de glutatió $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ aplicant diferents potencials a l'elèctrode de treball i utilitzant com a fase mòbil 0,1% de TFA/ H_2O , 0,1% de TFA/ACN (95:5).

Amb l'ajuda del programa GPES, es calculen les àrees i les alçades de pic per a cada injecció i es representa l'alçada de pic en funció del potencial aplicat (Figura 37). El resultat mostra que la intensitat de senyal augmenta fins a potencials superiors a 1,2 on pràcticament es manté constant. Per tant, s'escull com a òptim el potencial de 1,2 V que dóna un senyal força bo i no és tan oxidant com potencials superiors.

El potencial òptim que s'aplica a l'elèctrode de treball està relacionat amb el potencial d'oxidació-reducció de la substància analitzada, o millor dit del grup funcional que pateix el procés redox, en aquest cas és el grup tiol del glutatió. Aquest potencial es pot veure afectat en major o menor extensió per l'estructura de la molècula que conté el

grup tiol i per això s'ha de comprovar que per a les altres substàncies analitzades en aquest treball es conserva aquest màxim o que la substància s'oxida significativament a aquest potencial. En aquest estudi, es posa de manifest que per tots els tiols estudiats el senyal que apareix a aquest potencial és força intens, encara que quan es consideren els complexos amb mercuri el senyal és bastant més baix (per a una mateixa concentració de lligand) degut a les característiques del procés electròdic que impliquen la ruptura prèvia del complex abans de l'oxidació del grup sulfur del lligand.

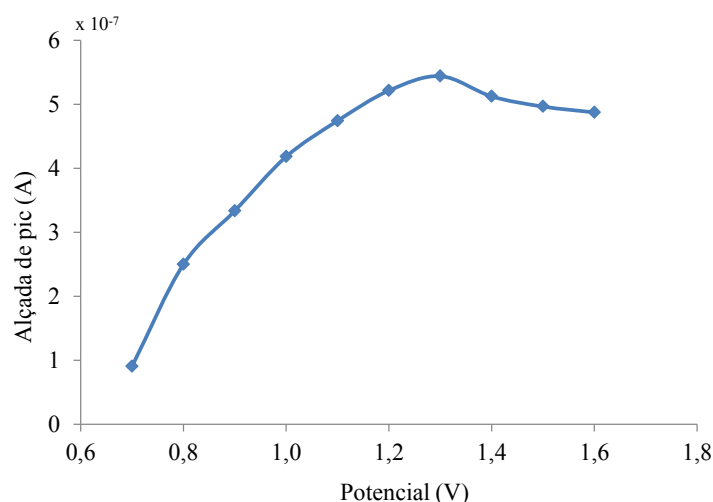


Figura 37. Representació de l'alçada de pic del glutatió en funció del potencial de l'elèctrode de treball corresponent als cromatogrames de la Figura 36.

Quan s'aplica la detecció UV-vis, cal optimitzar la longitud d'ona. Per trobar aquest paràmetre es fa un escombratge de longituds d'ona per a cada tiol estudiat. Com que el detector és un detector de díodes (*diode array detector*) s'enregistra l'espectre entre 190 i 400 nm durant tot el temps d'anàlisi (Figura 38a). A la Figura 38b es poden veure els cromatogrames de les longituds d'ona al voltant del màxim extrets de l'espectre. L'evolució dels pics permet seleccionar la longitud d'ona que dona una absorbància màxima del senyal que apareix a un temps de retenció de 4,5 min. En aquests cromatogrames es pot apreciar que entre 3,5 i 4 min apareix una vall i un pic que sempre apareixeran al detector UV-vis i que són deguts al front de la fase mòbil però que no interfereixen en la mesura.

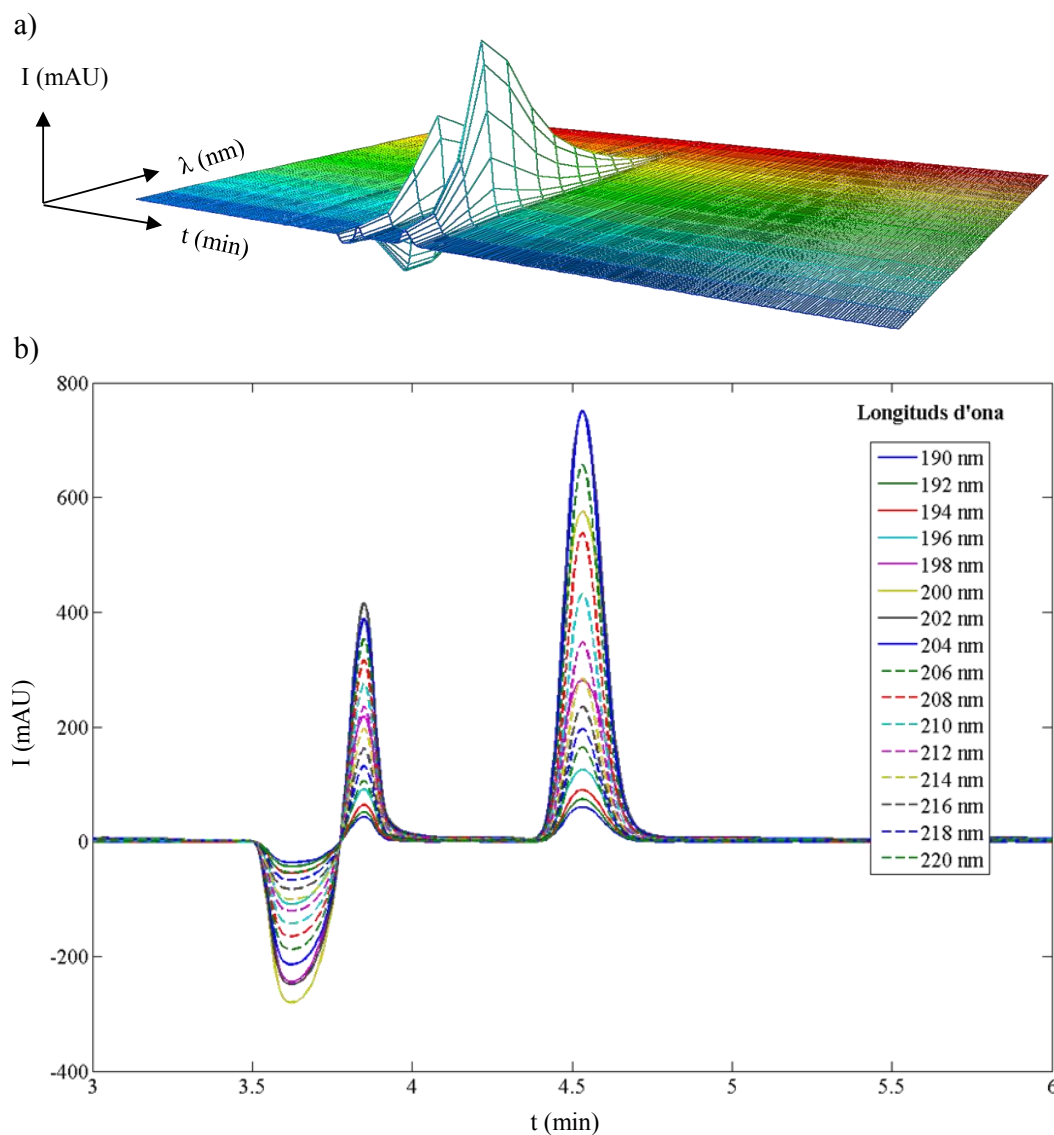


Figura 38. Optimització de la longitud d'ona: a) espectre del glutatió ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) amb fase mòbil formada per 0,1% de TFA/ H_2O , 0,1% de TFA/ACN (95:5), b) cromatogrames superposats extrets de l'espectre.

Utilitzant el programa ChemStation, es calcula l'àrea i l'alçada del pic del glutatió a les diferents longituds d'ona i es representa l'alçada en funció de la longitud d'ona (Figura 39). La figura mostra com el senyal del glutatió augmenta en augmentar la longitud d'ona fins que arriba a un màxim d'intensitat i comença a disminuir. Per tant, la longitud d'ona òptima serà quan l'alçada sigui màxima, és a dir, entre 202 i 204 nm. Es fa el mateix amb els espectres dels altres tiols i es pot veure que mantenen el màxim al voltant de 202 nm i, per això, s'escull aquesta longitud d'ona de 202 nm per a la realització de tots els experiments que utilitzen aquest detector.

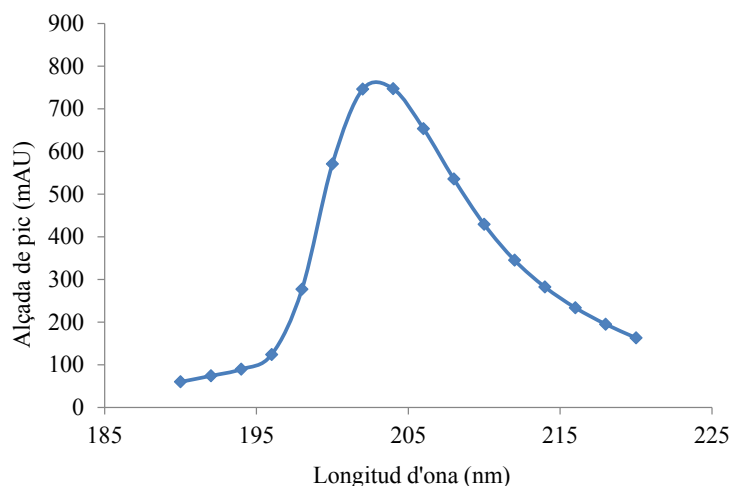


Figura 39. Representació de l'alçada de pic del glutatió en funció de la longitud d'ona corresponent als cromatogrames de la Figura 38b.

La comparació dels cromatogrames obtinguts amb la detecció UV sense derivatització i els obtinguts amb la detecció amperomètrica proposada en aquest treball (Figura 1 del treball 8.2) mostra una bona separació dels compostos d'estudi amb els dos modes de detecció, encara que els pics obtinguts amb la detecció amperomètrica presenten cues importants que impedeixen la recuperació ràpida de la línia base. Aquest fet podria ser degut a la distorsió de la doble capa elèctrica de la superfície de l'elèctrode com a resultat dels canvis produïts per la reacció electroquímica i el flux continu de la fase mòbil.

Per tal d'assegurar la qualitat dels mètodes desenvolupats es determina l'interval de linealitat i els límits de detecció i quantificació per als dos mètodes descrits. Es mostra com a exemple la recta de calibratge del GSH. Per al mètode electroquímic, es va injectar glutatió en un rang de concentracions de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ fins a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ i els resultats de la integració de l'àrea dels pics es mostra a la Figura 40a. Els límits de detecció i quantificació obtinguts a partir d'aquesta recta pel mètode descrit anteriorment són $2,84 \cdot 10^{-5}$ i $9,47 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivament. Per tal de calcular els límits de detecció i quantificació més acuradament es mostra, com a exemple, una altra recta amb un interval de concentració més petit (10^{-6} a $7 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (Figura 40b), els límits de detecció i quantificació obtinguts mitjançant aquesta nova recta són $1,99 \cdot 10^{-7}$ i $6,66 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivament.

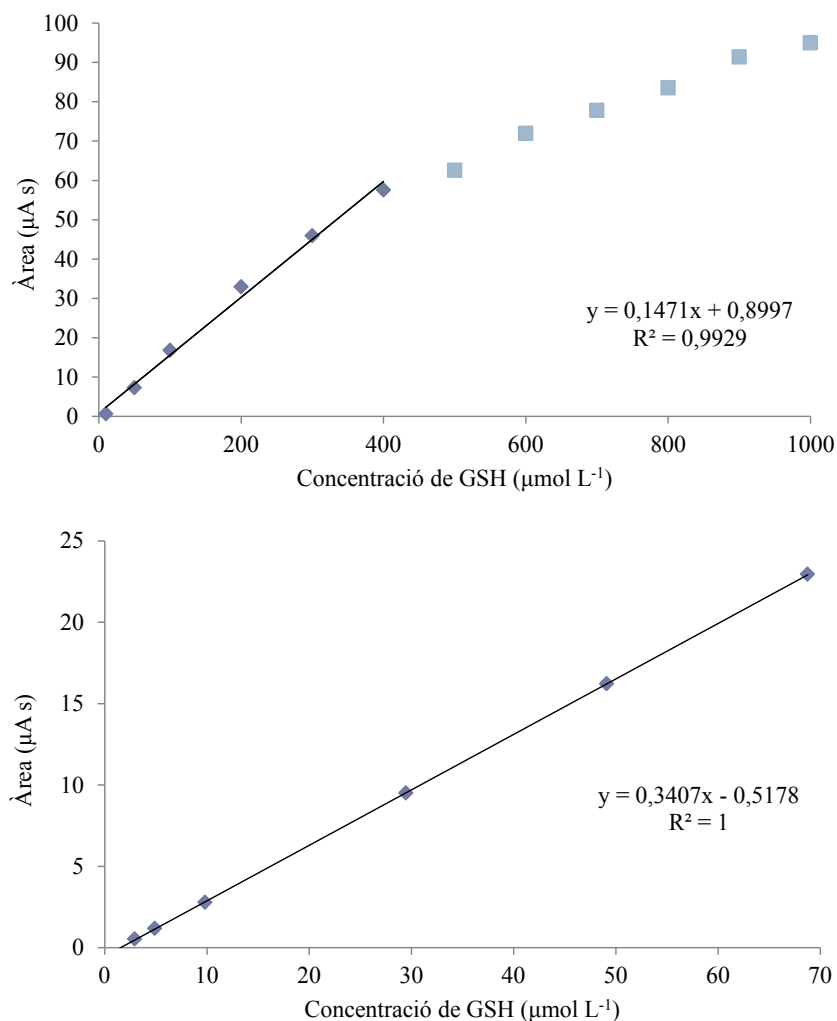


Figura 40. Rectes de calibratge del GSH emprant el mètode electroquímic.

Pel que fa a la detecció UV, s'avalua la linealitat en el mateix interval (10^{-5} a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) i en integrar els pics i representar-los en funció de la concentració de glutatió s'obté la gràfica de la Figura 41. Els límits de detecció i quantificació associats a aquestes mesures són $4,48 \cdot 10^{-5}$ i $1,49 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivament.

Es pot veure que l'interval de linealitat és més curt amb detecció amperomètrica probablement degut a problemes de saturació de la superfície de l'elèctrode encara que els límits de detecció i quantificació són bastant més baixos per a la detecció electroquímica. Això no obstant, els resultats presentats pels dos sistemes de detecció són consistents entre ells i semblen ser complementaris. Això és especialment important si tenim en compte que es basen en processos molt diferents (l'absorció de la llum i l'oxidació dels grups tiol).

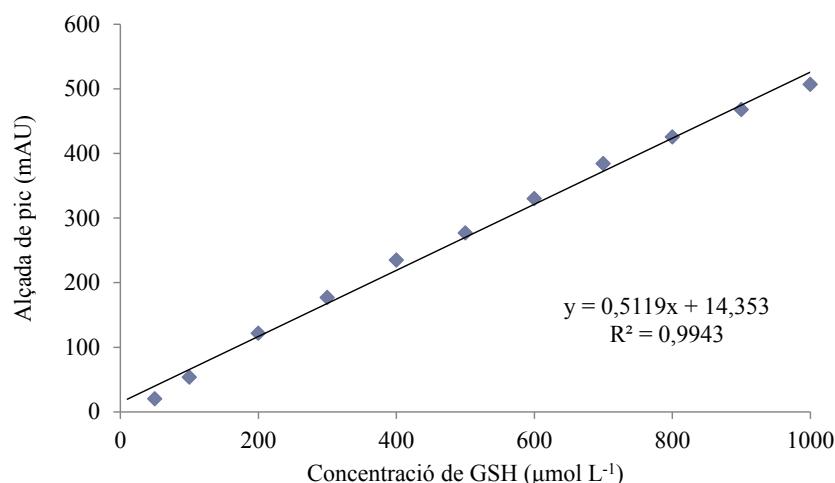


Figura 41. Recta de calibratge del GSH emprant el mètode HPLC-UV.

Pel mètode electroquímic es determina a més la repetibilitat i la reproductibilitat, tal com s'ha descrit anteriorment. Per a la repetibilitat s'obtenen valors de RSD entre 3,0 i 4,8% per tots els tiols analitzats. La reproductibilitat s'avalua només pel GSH i els resultats obtinguts mostren una RSD de 14,52%. Cal tenir en compte, pel que fa a la reproductibilitat que és molt difícil reproduir les condicions exactes d'un experiment perquè depenen de molts paràmetres, com ara el polit i el sonicament de l'elèctrode de treball però sobretot el soroll elèctric.

Un cop establertes les característiques de la separació i la detecció dels compostos tiòlics considerats, es procedeix a l'estudi del comportament d'aquests tiols en presència de metalls pesants. Inicialment, i tot i que no es mostra en el treball publicat, es consideren els complexos formats amb Cd i Pb però en ambdós casos els resultats no són satisfactoris (Figura 42 i Figura 43) degut a què en les condicions de la separació no s'observa cap senyal dels complexos. Cal dir que aquests complexos no són estables a pH àcid com el de la fase mòbil proposada. És per això que per fer aquest estudi el pH de la fase mòbil es modifica per poder mantenir els complexos, l'estabilitat dels quals és molt inferior a la dels complexos de Hg. La fase mòbil utilitzada és la descrita anteriorment però ajustant el pH a 5,5 en l'estudi del Pb i a 8,00 en l'estudi del Cd. En injectar mesclures de GSH amb diferents proporcions de Pb o de Cd, es pot veure que un augment de la proporció de metall no modifica el senyal del GSH dels cromatogrames obtinguts. Això podria ser degut a dos factors, per una banda, la relativa llibertat dels complexos M-GSH per aquests dos metalls que fa que no es separin a la columna

cromatogràfica, és a dir, el complex es forma i es dissocia ràpidament i tenim un equilibri dinàmic entre les dues formes que fa impossible la seva separació mitjançant aquesta metodologia; i/o per altra banda, a una possible competició del TFA del medi en la complexació del metall, tal com semblen indicar els cromatogrames obtinguts per UV-vis (Figura 42a i Figura 43a), on apareixen uns senyals que van augmentant tant amb la concentració de plom com amb la de cadmi, és a dir, degut a què els metalls també poden formar complexos amb el TFA, existeix una competició entre el GSH i el TFA per complexar el metall. Aquest senyal no es pot veure amb el detector electroquímic, ja que aquests complexos amb el TFA no deuen ser electroactius al potencial de mesura.

Com que ni amb el Cd ni amb el Pb, es poden veure els complexos pels motius exposats, es decideix centrar l'estudi en el mercuri, ja que les constants de formació dels complexos mercuri-tiol són considerablement més elevades. Així doncs, s'estudia en primer lloc el sistema GSH-Hg(II) utilitzant tant la detecció electroquímica com l'UV. Els cromatogrames de la Figura 2 del treball 8.2, permeten diferenciar entre la forma lliure del GSH i les formes complexades i, a més, permet seguir el procés de complexació del GSH amb el Hg(II). A mesura que augmenta la proporció de metall, el pic del GSH lliure disminueix i es forma un altre pic a temps de retenció més gran que s'associa a un complex Hg-GSH. A una relació molar de 0,5 (Hg(II):GSH) aquest senyal és màxim a la vegada que desapareix el pic del GSH lliure. A partir d'aquest punt, un augment de la concentració de Hg(II) provoca una disminució del pic del complex format i l'aparició d'un nou senyal a temps de retenció menor que no varia d'alçada amb la concentració de mercuri. Aquest segon pic format podria ser degut a la formació d'un nou complex. Aquest comportament general es pot observar en els dos modes de detecció encara que la informació obtinguda per la detecció UV sembla més completa. En representar l'alçada dels diferents pics enfront de la relació molar Hg(II):GSH es pot veure que és a una relació molar de 0,5 quan el pic del GSH lliure desapareix i el pic del primer complex arriba a un màxim, indicant que aquest complex té estequiometria ML_2 . A relacions molars més altes, l'alçada d'aquest pic disminueix i es forma un altre pic que correspondria a un complex d'estequiometria 1:1.

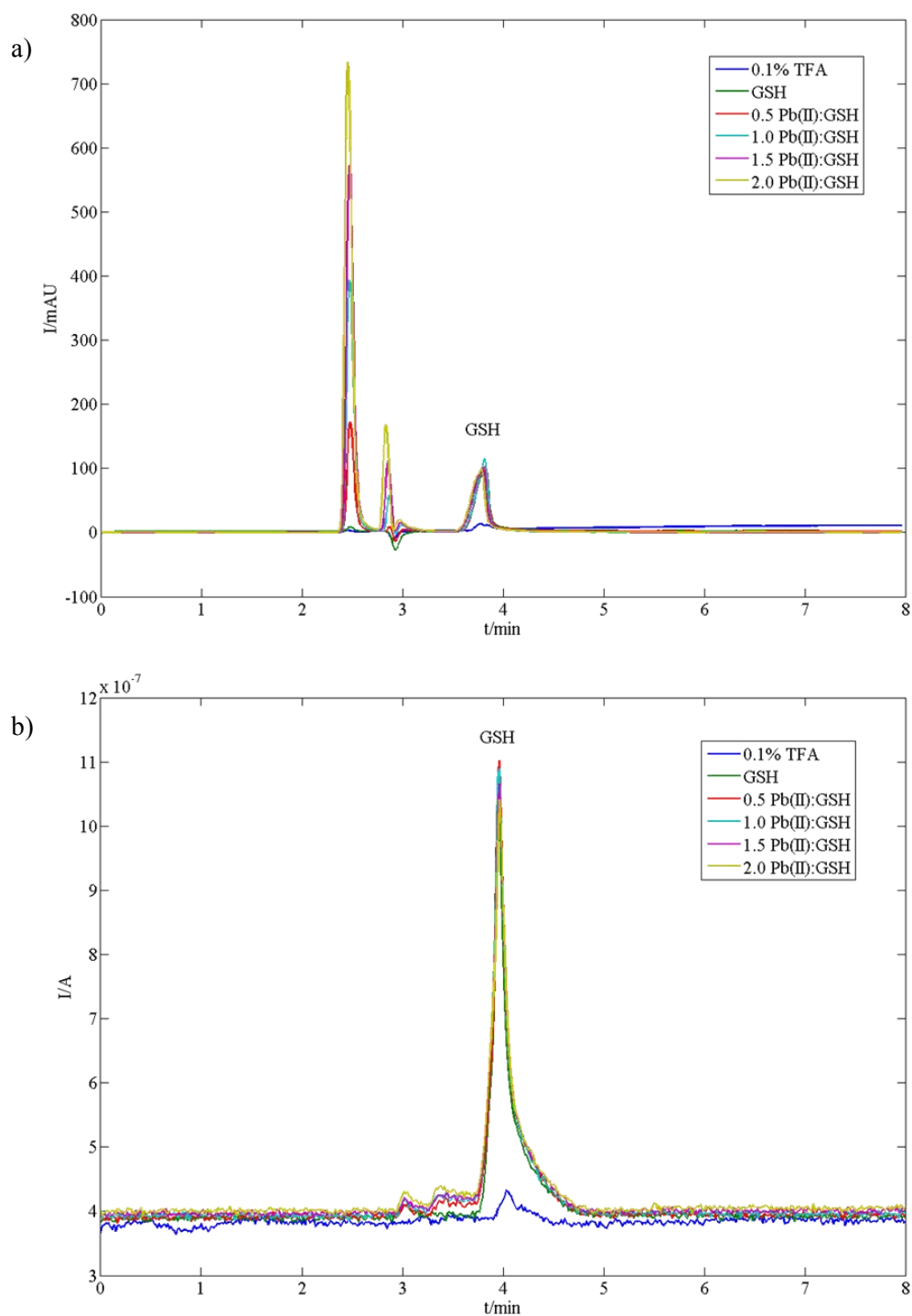


Figura 42. Cromatogrames per HPLC-UV (a) i HPLC-ED (b) de mesclades Pb(II):GSH.

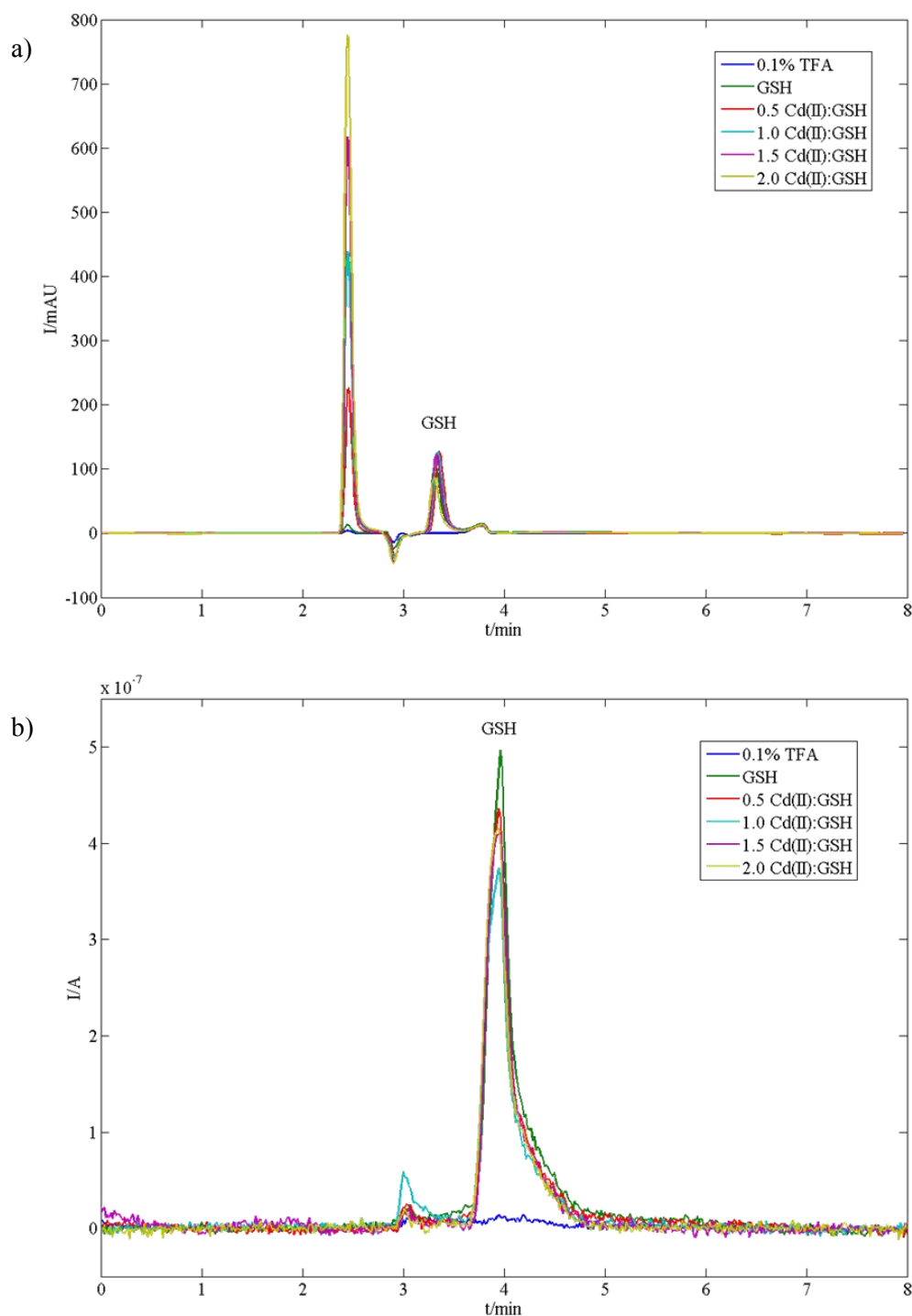


Figura 43. Cromatogrames per HPLC-UV (a) i HPLC-ED (b) de mescles Cd(II):GSH.

Per verificar la presència d'aquestes espècies es realitza un estudi complementari per espectrometria de masses. Degut a què als Serveis Científics i Tecnològics de la UB no és permesa la utilització d'àcid trifluoroacètic en els equips de MS, cal canviar la composició de la fase mòbil i utilitzar àcid fòrmic per fer aquests experiments. La fase

mòbil utilitzada està formada per dues dissolucions: la primera constituïda per H_2O amb un 0,1% d'àcid fòrmic i la segona formada per acetonitril amb un 0,1% d'àcid fòrmic. Els resultats obtinguts (Figura 3 del treball 8.2) confirmen que a concentracions baixes de Hg(II) , es forma un complex amb el glutatió d'estequiometria ML_2 , i quan la proporció de mercuri augmenta, es forma un complex ML . Aquest estudi posa de manifest que és possible separar les diferents formes (lliure i complexades) de mescles de GSH i Hg(II) .

Una vegada vist que és possible diferenciar entre la forma lliure i la complexada del GSH, s'amplia l'estudi a altres tiols (γ -Glu-Cys, Cys i Cys-Gly), per finalment considerar la mescla de tots ells. Així doncs, es fa el mateix estudi per a la resta dels tiols estudiats obtenint resultats molt similars per tots ells, amb la formació inicial d'un complex ML_2 i la posterior evolució cap a un complex d'estequiometria ML .

Atès que en general al medi natural s'hi pot trobar una mescla de molts tiols, s'estudia el comportament d'una barreja d'aquests compostos amb mercuri mitjançant els dos modes de detecció (Figura 4 del treball 8.2). Els cromatogrames mostren una bona resolució encara que les cues dels pics de la detecció electroquímica poden causar la superposició dels pics. Els temps de retenció d'aquests tiols està en concordança amb la longitud de la cadena del pèptid. Igualment en estudiar una mescla de tots els tiols, es pot intuir que la seqüència de complexació depèn de l'afinitat de cada tiol pel mercuri, de manera que, a una relació molar de 0,2 respecte al total de tiols, el GSH i la γ -Glu-Cys estan gairebé complexats totalment, la Cys-Gly està parcialment complexada i la Cys pràcticament no es complexa (absència del pic del complex).

Una vegada vist que es poden separar els tiols lliures dels complexats i que la detecció amperomètrica dona resultats satisfactoris, s'amplia l'estudi a les fitoquelatines i es consideren nivells de concentració de l'ordre dels que es podrien trobar al medi natural. Així, en el treball 8.3 s'aplica la metodologia desenvolupada a la separació de les fitoquelatines PC_2 , PC_3 , PC_4 i PC_5 i dels seus complexos amb Hg(II) a més dels tiols estudiats al treball 8.2. Per a aquest propòsit i degut als temps de retenció tan grans de les fitoquelatines, és necessari establir una elució en gradient que permeti separar aquests 8 tiols i els seus complexos amb Hg(II) amb el menor temps possible. A més, en aquest treball, aprofitant, com s'ha comentat anteriorment, que només una petita part dels anàlits s'oxiden a la superfície de l'elèctrode, es connecten els dos detectors en

sèrie per tal que amb una única injecció s'obtingui informació dels dos modes de detecció.

Els cromatogrames obtinguts amb la separació optimitzada dels 8 tiols estudiats mostren pics ben diferenciats pels dos sistemes de detecció que poden ser identificats mitjançant els corresponents patrons de cada tiol (Figura 1 treball 8.3). Els temps de retenció estan en concordança amb la longitud de la cadena del pèptid, de manera que les PCs més llargues queden més retingudes a la columna i tarden més en sortir. Si es comparen els dos modes de detecció, es pot veure que la detecció electroquímica presenta una millor sensibilitat i mostra una línia base més bona, encara que, com era d'esperar degut als llargs temps de retenció, els pics de les PCs són menys intensos que els dels fragments petits. Degut a les baixes concentracions d'aquests tiols al medi natural, la detecció electroquímica sembla ser més convenient per aquest tipus d'estudis ja que a aquests nivells tant baixos, els pics obtinguts amb la detecció UV es confonen amb el soroll de fons. A la Taula 1 del treball 8.3 es presenten les corbes de calibratge i els límits de detecció i quantificació obtinguts mitjançant el mètode electroquímic. Els límits de detecció són bastant semblants entre tots ells i prou baixos (entre 1,89 i 4,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Cal remarcar que tot i que en les molècules més grans els pics són cada vegada més amples, en la detecció electroquímica aquest fet queda contrarestat per l'augment de grups tiol de les molècules en augmentar la cadena, que produeix un corrent d'oxidació més elevat i que, per tant, constitueix un clar avantatge d'aquest mode de detecció.

En aquest treball també es fan estudis individuals de la complexació de cada PC amb Hg(II) mitjançant la injecció de mesclures de cada PC amb diferents proporcions de metall. A la Figura 2 del treball 8.3 es mostren els cromatogrames obtinguts, evidenciant que per a la PC₂ només es forma un complex que va augmentant d'intensitat fins a una relació molar de 1, suggerint l'estequiometria ML del complex, tal com s'ha publicat a la literatura [92, 100, 131]. Pel cas de la PC₃, s'observa la formació inicial d'un complex d'estequiometria 1:1, i en presència d'un excés de Hg(II), l'aparició d'un complex M₂L es fa evident, d'acord amb la bibliografia [100]. Per a la PC₄ i la PC₅ s'observa un comportament similar a l'observat per la PC₃, encara que la desaparició total del pic de les PCs lliures es produeix a una relació molar de 2 (Hg:PC). En els dos casos apareixen pics poc definits a temps de retenció elevats que corresponen als complexos i que, tant per a la PC₄ com per a la PC₅, aquests pics coincideixen en temps

de retenció. Aquest comportament ja s'havia observat en estudis previs del grup de recerca, posant de manifest el caràcter inert d'aquests complexos de Hg(II) amb la PC₃, la PC₄ i la PC₅ que pot dificultar la seva detecció electroquímica i que la capacitat complexant està més relacionada amb la naturalesa del grup enllaçant que no pas amb la llargària de la molècula [100].

Per establir les estequiometries dels complexos formats amb les diferents PCs, s'injecten aquestes mescles a l'ESI-MS, donant lloc als espectres de la Figura 3 del treball 8.3. Aquests espectres mostren la distribució isotòpica característica del Hg, a la vegada que la relació m/z ens permet identificar-ne l'estequiometria. Per a la PC₂, s'observa el complex ML que s'havia proposat anteriorment. Per a la PC₃ només s'observa el complex ML i per a la PC₄ i la PC₅ es mostra la presència dels complexos ML i M₂L, encara que aquests últims no es poden separar per HPLC possiblement degut a l'equilibri que existeix entre aquestes dues espècies.

Tal com s'ha fet en el treball 8.2 i per simular el comportament d'una mostra natural contaminada amb Hg(II), es van estudiar mescles de tots els tiols formats amb diferents proporcions de Hg (Figura 4 del treball 8.3). En addicionar més mercuri a les mescles, s'observa la progressiva complexació dels tiols seguint la creixent capacitat complexant que tenen les PCs en augmentar la cadena. Així doncs, la primera en complexar-se és la PC₅, seguida de la PC₄, la PC₂, la PC₃, el GSH i finalment els tiols petits. Al mateix temps es formen els pics dels complexos, encara que els pics dels complexos de la PC₃, la PC₄ i la PC₅ sembla que surten superposats al mateix temps de retenció, fent impossible la seva identificació. Per veure què passa amb aquest senyal ampli que apareix a temps de retenció elevat, es van injectar a l'espectròmetre de masses mescles d'aquestes tres PCs amb Hg(II) (Figura 5 del treball 8.3). Els resultats obtinguts mostren la presència dels complexos d'estequiometria ML de cadascuna de les tres PCs i, encara que les relacions m/z són diferents, l'HPLC no permet diferenciar-los. Aquest fet juntament amb la poca intensitat dels pics d'aquests complexos dificulten la detecció electroquímica dels complexos Hg(II):PC de cadena llarga.

No obstant això, aquests estudis posen de manifest que la combinació de l'HPLC amb la detecció electroquímica (HPLC-ED) amb un elèctrode de carboni vitrificat és una tècnica prometedora per a l'anàlisi de les PCs i els seus complexos amb Hg(II) als nivells que s'esperen trobar als extractes de plantes contaminades amb Hg(II). Aquesta

metodologia permet distingir els pèptids lliures i els seus complexos, i també permet separar els pics del glutatió, els seus fragments i els complexos de tots ells. Tanmateix, per la PC_3 i PCs de cadena més llarga, els complexos de mercuri produeixen pics amples i superposats que impedeixen una anàlisi precisa.

Anàlisi de plantes sotmeses a estrès per Hg(II) i/o Cd(II)

Aquest capítol engloba el treball corresponent a l'aplicació de la metodologia desenvolupada anteriorment a plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* cultivades semi-hidropònicament i sotmeses a estrès metàl·lic per Hg(II) i a estrès simultani per Hg(II) i Cd(II). La primera etapa del treball considera plantes cultivades en presència únicament de Hg(II) a diferents nivells de concentració, mentre que en la segona fase es comparen els resultats obtinguts amb els de les plantes sotmeses a estrès simultani per Hg(II) i Cd(II) amb l'objectiu d'estudiar l'afinitat que aquesta planta té per absorbir i metabolitzar aquests metalls quan ambdós hi són presents.

Per tal d'estudiar l'estrès metàl·lic produït en aquestes plantes, s'avalua la inhibició del creixement expressada com a biomassa, el contingut total de metall assimilat i, finalment, s'analitzen les PCs induïdes i els seus complexos amb Hg(II) mitjançant la metodologia d'HPLC amb detecció amperomètrica desenvolupada en els treballs anteriors. En aquest estudi es consideren tant les arrels com els brots i s'estudien per separat.

9.1. Introducció

La fitoremediació de metalls s'està desenvolupant com una solució rendible de remediació de sòls contaminats [67, 71]. Les plantes responen a la toxicitat dels metalls pesants mitjançant una gran varietat de mecanismes diferents, entre ells la fitoextracció és un dels més estudiats. Aquest mecanisme inclou la quelació, la compartimentació, la biotransformació i els mecanismes de reparació cel·lular [71]. Algunes plantes, conegudes com a hiperacumuladores, són capaces d'acumular, absorbir i transportar grans quantitats de metalls dels sòls a les parts aèries de les plantes a través de les arrels [67]. A part del glutatió, es coneixen dues classes principals de pèptids quelants de metalls pesants existents en els organismes: les metal·lotioneïnes i les fitoquelatines [86]. Aquest treball es centra en les fitoquelatines (PCs), que són pèptids, rics en cisteïna capaços d'enllaçar ions metàl·lics a través del grup tiol.

Entre els metalls pesants tòxics, el mercuri és un dels contaminants ambientals més perillosos. L'interès humà i ecològic per a aquest contaminant es basa en la multiplicitat de fonts (antropogèniques i naturals), la seva toxicitat, la seva mobilitat al medi ambient i la seva tendència a biomagnificar-se en els ecosistemes terrestres i aquàtics [51]. Aquests fets justifiquen l'interès de l'extracció del Hg dels sòls contaminats mitjançant l'ús de plantes hiperacumuladores. En els últims anys s'han utilitzat diverses plantes per a l'anàlisi de l'estrès per mercuri. Entre elles les més estudiades són el blat de moro (*Zea mays*) [121, 125], l'alfals (*Medicago sativa*) [120, 123-125, 141] i l'arròs (*Oryza sativa*) [119, 142]. L'ordi (*Hordeum vulgare*), tot i que és un cereal important, àmpliament conreat i amb germinació ràpida i senzilla, no és molt emprat habitualment per a l'anàlisi de fitoquelatines [125].

La millor manera d'estudiar si la quelació del mercuri amb les PCs s'està produint és a través de la separació dels complexos d'aquests pèptids amb mercuri. Algunes publicacions [120, 121, 124] indiquen la presència de glutatió i fitoquelatines en diverses plantes estressades amb mercuri (*Zea mays* i *Medicago sativa*), però no es fa cap distinció entre les diferents PCs ni es revela la presència de complexos metall-tiol. Válega *et al.* [143] suggereixen que el mercuri pot formar complexos amb les PCs en plantes d'aiguamolls en exposicions ambientals prolongades però no poden diferenciar entre aquests complexos. Krupp *et al.* [142] identifiquen els diferents complexos de la cisteïna i el glutatió amb el mercuri i el metilmercuri en els extractes de plantes

fortificades amb Hg. En un altre estudi de Krupp *et al.* [119] identifiquen únicament els complexos Hg-PC₂ en els extractes d'arrels de *Oryza sativa* i *Marrubium vulgare* exposades a mercuri. Chen *et al.* [131] identifiquen diversos complexos de Hg amb PCs en arrels de *Brassica chinensis* estressada amb Hg elucidant els rols importants de les PCs en la tolerància al Hg. Carrasco-Gil *et al.* [125] tracten amb Hg plantes d'ordi, blat de moro i alfals i els resultats obtinguts mostren la presència de diversos complexos Hg-PC en l'anàlisi de les fraccions solubles de les arrels. No obstant això, en cap d'aquests estudis s'utilitza la detecció amperomètrica.

Per altra banda, el cadmi és un dels metalls tòxics més estesos i que, a més, és l'inductor més potent de PCs conegut fins al moment [82, 84, 86, 87]. S'han realitzat diversos estudis comparant el dany cel·lular induït a les plantes segons el metall aplicat, però, fins al moment, ningú ha aplicat dos metalls simultàniament a la mateixa planta. Ortega-Villasante *et al.* [120], Rellán-Álvarez *et al.* [121] i Sobrino-Plata *et al.* [124] van estudiar el contingut de PCs en extractes de plantes estressades amb Cd o Hg, però sempre subministrant únicament un metall a la planta. No obstant això, es va evidenciar que el Cd és un inductor més gran de la síntesi de PCs que no pas el Hg com es dedueix de les proporcions més altes de tiol que es troben en el nivell més alt de cadmi. D'altra banda, en aquests estudis, a vegades no detecten les PCs i sovint no es poden distingir entre les PCs de diferent longitud de cadena.

En el present treball, es considera l'ordi (*Hordeum vulgare*) com la planta d'estudi degut a la seva ràpida germinació i al seu ús globalment estès. Per investigar l'estrès oxidatiu d'aquesta espècie vegetal en presència de metalls pesants, es subministra Hg(II) i/o Cd(II) a les plantes. L'elecció dels metalls contaminants s'ha fet tenint en compte l'elevada toxicitat del mercuri i l'estabilitat dels seus complexos; i la seva combinació amb el cadmi degut al seu elevat poder inductor de fitoquelatines. En aquest estudi es tracten diverses llavors en un sistema semi-hidropònic amb diferents concentracions de HgCl₂ i CdCl₂, i s'avalua l'estrès produït per aquests metalls. Per tant els objectius d'aquest treball són: i) l'estudi de la fitotoxicitat de Hg induïda expressada com la inhibició del creixement i el contingut total de Hg a les arrels i als brots d'ordi estressat amb diferents nivells de Hg(II), ii) l'anàlisi de les PCs induïdes i els seus complexos amb Hg als extractes de les plantes estressades per Hg(II), i iii) la comparació d'aquests paràmetres amb les plantes estressades amb Hg(II) i Cd(II) simultàniament.

9.2. Analysis of phytochelatins and Hg-phytochelatin complexes in *Hordeum vulgare* plants stressed with Hg and Cd: HPLC study with amperometric detection

A. Dago, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban

International Journal of Environmental Analytical Chemistry (2013)

DOI: 10.1080/03067319.2013.864649

Analysis of phytochelatins and Hg-phytochelatin complexes in *Hordeum vulgare* plants stressed with Hg and Cd: HPLC study with amperometric detection

À. Dago, C. Ariño*, J.M. Díaz-Cruz and M. Esteban

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona,
E – 08028 Barcelona, Spain

(Received 26 July 2013; final version accepted 7 October 2013)

Several parameters related to metal stress have been studied in *Hordeum vulgare* plants treated with Cd and Hg at different doses to provide new insights concerning toxicity and resistance mechanisms produced by these metals. To the best of our knowledge, for the first time the simultaneous stress by Hg and Cd has been investigated. Growth inhibition has been evaluated showing clear symptoms of phytotoxicity in metal stressed plants. Hg and Cd content evidenced the ability of this plant species to uptake and accumulate toxic metals in its tissues. Moreover, when both metals were present, regardless of their concentration, a lower uptake of Hg was observed leading us to conclude that *Hordeum vulgare* plants have less affinity for Hg when there is cadmium competing in the media. To explore a way of following toxic metal stress response in plants, HPLC with amperometric detection has been used to study different thiols: glutathione (GSH), its fragments and several phytochelatins (PC₂₋₅). The accumulation mechanism of these metals could be explained by the formation of PCs and their Hg complexes, which play an important role in metal detoxification. As expected, Cd was shown to be a greater PC inducer than Hg. PC₂ might be used as a marker of metal stress in plants because it increases according to the concentration of metals supplied to the plant.

Keywords: cadmium; electrochemical detection; *Hordeum vulgare*; liquid chromatography; mercury; phytochelatins

1. Introduction

Phytoremediation is defined as the use of green plants to remove, transfer, stabilise and/or degrade pollutants from the environment [1,2]. Phytoremediation of metals is being developed as a potential cost-effective remediation solution for contaminated soils. Plants respond to metal toxicity in a variety of different ways, among them phytoextraction and phytostabilisation are the most studied. This mechanism includes chelation, compartmentalisation, biotransformation, and cellular repair mechanisms [1]. Certain plants, known as hyperaccumulators, are capable of accumulating, uptaking and translocating high amounts of metals in soils by plant roots into above-ground components of the plants [2]. Apart from glutathione, two major classes of metal chelating peptides are known to exist in organisms: metallothioneins and phytochelatins [3]. In this work, we focus on the use of phytochelatins (PCs) which are small, cysteine-rich peptides capable of binding metal ions via thiolate coordination. PCs consist of only three amino acids: glutamic acid (Glu), cysteine (Cys) and glycine (Gly) with the Glu and Cys residues linked

*Corresponding author. Email: cristina.arino@ub.edu

through a γ -carboxylamide bond. PCs form a family of structures with increasing repetitions of the γ -Glu-Cys dipeptide followed by a terminal Gly: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, where n is generally in the range of 2 to 5 [4–7]. Phytochelatins are synthesised enzymatically by the PC synthase taking the glutathione (GSH) as the substrate. This reaction involves the transpeptidation of the γ -Glu-Cys unit and is activated by the presence of metals such as Cd, Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg, Ni, Sn, Sb, Te, W and Au [4–6]. Phytochelatins bind to metals through the sulfhydryl group of the cysteine unit forming metal–phytochelatin complexes (M-PC) which are then accumulated in the vacuole. This process has been widely studied using Cd as the PCs inductor [3,5–7]. Once inside the vacuoles, complexes are transformed into more stable compounds and, with the aim of decreasing the toxicity of such metals and metalloids, they are chemically reduced and/or incorporated into organic compounds [1,2].

Among the toxic metals, mercury is one of the most hazardous environmental pollutants. Hg exists in a large number of physical and chemical forms and its toxicity depends on its form [8]. Mercury is transported in the environment by air and water, as well as by biological organisms through the food-chain. The human health and ecological concern for the contaminant is based on its multitude of sources (anthropogenic and natural), its toxicity, its mobility in the environment, and its tendency to biomagnify in terrestrial and aquatic ecosystems [9]. These facts justify the interest of the extraction of Hg from contaminated soils by using hyperaccumulator plants. Several plants have been widely used in the last few years for the analysis of mercury stress. Maize (*Zea mays*) [10,11], alfalfa (*Medicago sativa*) [11–15] and rice (*Oryza sativa*) [16,17] are the most studied. Barley (*Hordeum vulgare*), despite it is a major cereal grain largely cultivated, with easy and fast germination, it is not used for phytochelatin studies [11]. Moreover, barley can be grown in relatively dry soils, where the other mentioned plants couldn't survive. This property can be useful, perhaps, for remediation in dry lands. Among all the methodologies used for the separation and detection of biothiols in mercury stressed plants, HPLC with mass spectrometry detection is the most extended [11,13,14,17–19], followed by HPLC with post-column derivatisation and fluorescence detection [20] or absorbance detection [10,12,15]. Although electrochemical detection has the advantage of its low detection limits for the PCs analysis [21] and its convenient price, much lower than MS detection, it is rarely used for the analysis of PCs in plants under metal stress. Nevertheless, in our research group several in vitro experiments have been done in order to study the interactions between Hg and PCs with electrochemical techniques in either static experiments [22,23] or chromatographic separations [21,24].

The best way to study if mercury chelation by PCs is occurring in environmental exposures is through the separation of mercury–peptide complexes. Some publications [10,12,15] indicated the presence of glutathione and phytochelatins in several mercury stressed plants (*Zea mays* and *Medicago sativa*) but did not distinguish between PCs or reveal the presence of metal–thiol complexes. Válega *et al.* [20] suggested that mercury could be complexed by PCs in a salt marsh plant in environmental prolonged exposures but they could not differentiate between these complexes. Krupp *et al.* [16] identified different cysteine and glutathione complexes with mercury and methylmercury in spiked plant extracts. Hg:PC₂ complexes were identified by Krupp *et al.* [17] in root extracts of mercury exposed *Oryza sativa* and *Marrubium vulgare* but no mercury complexes were found in shoot extracts. However, Chen *et al.* [19] could identify several Hg complexes with PCs in roots of *Brassica chinensis* stressed with Hg elucidating the important roles of PCs in Hg tolerance. Barley, maize and alfalfa plants were treated with Hg by Carrasco-Gil *et al.* [11] and the results obtained showed that several Hg–PC complexes were found in the analysis of root soluble fractions. However, in none of these works amperometric detection is used.

Cadmium is one of the most widespread toxic metals which is known to be the most potent inducer of PCs [3–6]. Several studies compared the cellular damage induced in plants depending on the metal applied but, to the best of our knowledge, nobody applied two metals simultaneously in the same plant. Ortega-Villasante *et al.* [12], Rellán-Álvarez *et al.* [10] and Sobrino-Plata *et al.* [15] studied the PCs content in plant extracts stressed with Cd or Hg, but always supplying only one metal to the plant. Nevertheless, they evidenced that Cd was more inducer of the PCs synthesis than Hg as inferred from the higher thiol proportions found in high-level cadmium contamination. Moreover, in these studies, sometimes PCs were not detected and they could not distinguish between different length PCs.

In the present work, barley was considered as a test plant because it is one of the most popular cereals and it is widely cultivated at global scale. To investigate the stress of this plant species in the presence of metals, Hg and Cd were supplied to the plants, the first one was selected because of its high toxicity and the second one due to its PCs inducer power. Several seeds were treated in a semi-hydroponic system with different concentrations of HgCl_2 and CdCl_2 , and the stress produced by these metals was evaluated. So the objectives of this work are: (1) the study of Hg-induced phytotoxicity expressed as growth inhibition and total content of Hg in roots and shoots of barley stressed with different levels of Hg; (2) the analysis of the induced PCs and their Hg(II) complexes in Hg stressed plant extracts; and (3) the comparison of these parameters with plants stressed with Hg and Cd simultaneously.

2. Experimental

2.1 Chemicals and reagents

L-Cysteine, γ -Glu-Cys (80% of purity as trifluoroacetate salt), Cys-Gly (85% of purity) and trifluoroacetic acid (TFA) were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Phytochelatins (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly ($n = 2-5$), as trifluoroacetate salts, were provided by DiverDrugs S.L. (Barcelona, Spain) with a purity ranging from 86.2% to 99.0%. Glutathione, acetonitrile and methanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). HgCl_2 was purchased from Probus (Badalona, Spain). Ethanol (96% of purity) and $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

For the preparation of the plant extracts, cleaning the column and the preparation of all solutions, ultrapure filtered water obtained from Purelab Plus of USF (Hamburg, Germany) was used.

For the determination of the total content of Hg and Cd, HNO_3 intra-analysed 69.0–70.0% from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) and H_2O_2 suprapur 30% from Merck were used.

2.2 Plant material

Barley (*Hordeum vulgare*) plants were cultivated by the Vegetal Physiology group of the Faculty of Biology of the University of Barcelona. Plants were grown under semihydroponic conditions described by Iglesia-Turiño *et al.* [18] using half-strength Hoagland nutrient solution, with sand as substrate. The sand was not in direct contact with the nutrient solution, but some cords allowed the movement of the solution up into the sand, so the advantages of both soil culture and hydroponic culture were present. Plants were grown under glasshouse conditions at the University of Barcelona. The metal concentrations applied were 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of HgCl_2 and 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of CdCl_2 . So, six treatments were done: the first one with no metal applied, two treatments with Hg(II) (500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$), another treatment with only 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cd(II) and two treatments with both Hg(II) and Cd(II) at a fixed concentration

of cadmium ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) and different Hg concentration (500 and $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$). Four pots per treatment with ten replicates (seeds) per pot were considered. Seeds germinated in sand. Seedlings were grown for five weeks. Immediately after harvest, plants were rinsed with water in order to eliminate adsorbed Hg. Fresh weight was obtained from shoots and roots separately. Samples were frozen at once with liquid nitrogen to disrupt the cells and stored at -80°C . Later on, samples were ground separately in liquid nitrogen.

2.3 HPLC instrumentation

An Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 chromatographic system, with a quaternary pump, a $20 \mu\text{L}$ loop manual injector Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, USA), a vacuum degasser and a handheld control module were used. An analytical column, Ascentis C18, particle size $5 \mu\text{m}$, $25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$ was provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA). The mobile phase consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in ultrapure filtered water $\text{pH} = 2.00$ (solvent A) and 0.1% TFA in acetonitrile (solvent B). Gradient separation was achieved at ambient temperature, as described in Dago *et al.* [21], with a gradient profile starting up at 99:1 (solvent A:solvent B), then decreasing linearly up to 98:2 for the first 5 min, decreasing up to 92:8 for 7 min, decreasing to 90:10 for the next 2 min, kept constant for 15 min and finally decreasing up to 80:20 from 29 to 35 min. The flow rate was 1.2 mL min^{-1} .

The electrochemical detector (ED) was a CC-5C flow cell BAS (West Lafayette, IN, USA), with a three electrode system, connected to an Autolab PGSTAT 12 Eco Chemie (Utrecht, The Netherlands). The GPES 4.9.007 software Eco Chemie (Utrecht, The Netherlands) allowed potentiostatic control and data acquisition.

The working electrode was a dual glassy carbon electrode BAS (West Lafayette, IN, USA), whose surface was daily polished using a suspension of alumina particles of $0.3 \mu\text{m}$ from Metrohm (Herisau, Switzerland), rinsed thoroughly with ethanol, sonicated 5 min into ethanol and 5 min into ultrapure filtered water. The optimised potential for the working electrode was 1.2 V . The redox reaction that takes place on the working electrode by the application of a positive potential is the oxidation of thiol groups giving disulphides. A stainless steel auxiliary electrode and a Ag/AgCl ($\text{NaCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) reference electrode were also used. The separation between the working and the auxiliary electrodes was performed by a gasket whose thickness was 0.005 inches that creates the cell volume. The optimisation of the methodology and the calibration functions, as well as the limits of detection and quantification, are presented in Dago *et al.* [21].

2.4 Sample preparation for HPLC

Several solutions were tested to extract phytochelatins from plant tissues: H_2O , HCl and HClO_4 . Among them water extraction was selected as the most convenient for the analysis of phytochelatins and their complexes. For this purpose, 100 mg of sample fresh weight were mixed with $500 \mu\text{L}$ of ultrapure filtered water at 1500 rpm during 4 hours in an Eppendorf MixMate (Hamburg, Germany). For the clean-up and preconcentration of the samples, Supelco (Bellefonte, PA, USA) solid phase extraction DSC-18 cartridges were used in a Visiprep SPE Vacuum Manifold by Supelco. For the evaporation under stream of nitrogen a Visidry drying attachment was used. Prior to the clean-up procedure, samples were filtrated through $0.45 \mu\text{m}$ Nylon filter discs by Osmonics (Minnetonka, MN, USA) and pH adjusted to 2.00 with TFA. To condition the SPE tube packing, it was rinsed with 2 mL of methanol and 2 mL of 0.1% TFA in water. The sample was then accurately transferred to the tube followed by a step of washing the packing with 1 mL of 0.1% TFA in water. In this step, weakly retained materials were removed

and possibly Cys and Cys-Gly were also washed off. Finally, we eluted the compounds of interest with 2 mL of methanol leaving behind any impurities not removed in the wash step. After that, the eluent was evaporated and then reconstituted in 200 μL of ultrapure filtered water. This clean-up and preconcentration procedure allows the elimination of many irrelevant signals that appeared at low retention times giving us a cleared chromatogram. Although signals of Cys and Cys-Gly decrease with this methodology, those of GSH, γ -Glu-Cys and PCs are significantly increased by it. The recoveries were assayed by the injection of standards of the eight studied thiols with and without the clean-up and preconcentration treatment. The obtained recovery factors were in the range 1.2 to 2.2 for all thiols, except for Cys and Cys-Gly that were 0.15 and 0.46, respectively. For this reason, although the peaks of these two thiols can be present in the chromatograms, they were not quantified.

2.5 Analysis of Hg and Cd content

Approximately 200 mg of sample fresh weight were digested in 60 mL Teflon PFA reactors with 3 mL of HNO_3 and 3 mL of H_2O_2 . Digestion was conducted overnight at 90°C . Digested cooled extracts were diluted with 20 mL of ultrapure filtered water. The samples were then transferred to plastic tubes with the addition of KMnO_4 to guarantee the total oxidation of the metals, and diluted, if necessary, with HNO_3 1%. All samples were analysed by ICP-OES PerkinElmer Optima 3200 RL (Waltham, MA, USA) for a first approximation of the Hg and Cd concentrations. Then, samples with low content of metals (all except roots stressed with 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg(II)) were analysed by ICP-MS PerkinElmer Elan-6000 prior dilution in some cases, and with the addition of 2% of rhodium as an internal standard. External calibration curves were used by both techniques to determine the metals concentrations. All samples were analysed by triplicate and a blank analysis was then subtracted to the final concentration.

3. Results and discussion

3.1 Growth inhibition and Hg content in Hg-stressed plants

Clear symptoms of phytotoxicity were observed in plants exposed to Hg(II) , as the fresh weight of shoots and roots decreased significantly (Table 1) as is reported in the literature [10,19,25]. The increase of Hg(II) concentration in the medium, 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, resulted in a progressive decrease of root fresh weight by 54% and 78% respectively, as compared with the control. In shoots the decrease is extremely pronounced, 70% and 86% as compared with the control (Table 1). This indicates that the growth reduction observed appear to be coincident with an increase in the supplied metal. However, 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II) treatment was not enough to completely inhibit plant growth.

Table 1. Fresh weight (g plant^{-1}) and Hg concentration ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ fresh weight) in shoots and roots from barley plants treated with Hg(II) at different concentrations: 0, 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

	Fresh weight (g plant^{-1})		Concentration of Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)	
	Shoots	Roots	Shoots	Roots
Control	6.3 ± 0.5	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.4	0.15 ± 0.02
500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II)	1.9 ± 0.4	0.57 ± 0.09	3.1 ± 0.2	3764 ± 355
1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II)	0.88 ± 0.07	0.27 ± 0.08	130 ± 8	6950 ± 356

Regarding the content of Hg in barley tissues, it rised concurrently with the increasing Hg concentration applied (Table 1). In control plants, very low levels of Hg were found, which were higher in shoots than in roots probably due to environmental pollution. Hg concentration in roots with $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg(II) increased to almost $4000 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ fresh weight, which meant more than 25,000-fold higher than the control, but in shoots the Hg concentration was practically the same as in the control level maybe because Hg had not reached the leaves, remaining only in roots (Table 1). According to Sobrino-Plata *et al.* [15] Hg is not as mobile as Cd and is accumulated to a much higher extent in roots than in shoots. Moreover in the most concentrated Hg level the increment was higher both in shoots and roots, about 72 and 46,340-fold higher respectively in comparison with the control level. Except for the control plants, the concentration of Hg accumulated in roots was higher than the one accumulated in shoots; Hg content in roots of $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II) was about 53-fold higher than in shoots in agreement with the literature published [10,18,19,25]. Metal retention in roots could be a strategy for protecting the more sensitive aerial parts from the deleterious effects induced by metal stress and it has been reported that in most plant species, metal ions are preferably retained in root tissues and only small portions are translocated to leaves [20]. The maximum accumulation of Hg was $6950.52 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight in roots treated with $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II).

In summary, plants stressed with Hg showed a clear growth inhibition with an increase of Hg concentration in the medium which resulted in a progressive decrease of root and shoot fresh weight. However, $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II) treatment was not enough to completely inhibit plant growth. Moreover, *Hordeum vulgare* plants show a high ability to uptake and accumulate Hg in both shoots and roots. Nevertheless, the accumulation of Hg is higher in roots than in shoots.

3.2 Analysis of phytochelatins and Hg-PC complexes in Hg-stressed plants

Cleaned-up and preconcentrated extracts of each sample were injected in the chromatograph and results of shoots and roots were analysed separately. Eight different thiols were studied: glutathione (GSH), which is the precursor of phytochelatins, three fragments of GSH (Cys, Cys-Gly and γ -Glu-Cys) and four phytochelatins (PC₂, PC₃, PC₄ and PC₅). As mentioned in the previous section, Cys and Cys-Gly were weakly retained in the SPE cartridge and were mainly washed off in the cleaning step. For this reason, Cys and Cys-Gly were not considered for the quantification although both were detected. Cadmium complexes cannot be separated and detected with this methodology because these complexes are broken with these experimental conditions giving chromatograms with only the free ligand signal. Previous studies [26] demonstrate that in acidic pH the complexation of Cd with PCs doesn't take place. Conversely, mercury complexes are inert in these experimental conditions giving well-defined peaks in the chromatograms [21,24]. As an example, chromatograms of the extracts of shoots and roots at different levels of Hg are shown (Figure 1), compared with one of a standard solution of phytochelatins and their fragments. For the identification of the peaks, retention times of the extracts were compared with those obtained from the injection of standards in the case of PCs and their fragments. For mercury complexes, because standards are not commercially available, retention times were compared with those obtained for solutions prepared by mixing Hg and the appropriated ligand, as was described in Dago *et al.* [21].

In shoots (Figure 1a), the chromatogram of the control extract showed, apart from some unknown compounds, the peaks of Cys, GSH, γ -Glu-Cys and a small peak related with Hg:GSH complex. According to Rauser [5], a low concentration of small thiols could be detected in plants grown in normal conditions (without metal stress), as well as lower concentrations of PC₂ or PC₃. The presence of Hg:GSH could be attributable to the effect of the small levels of Hg found in control shoots. At the retention time corresponding to PC₅, a small peak appeared. Its

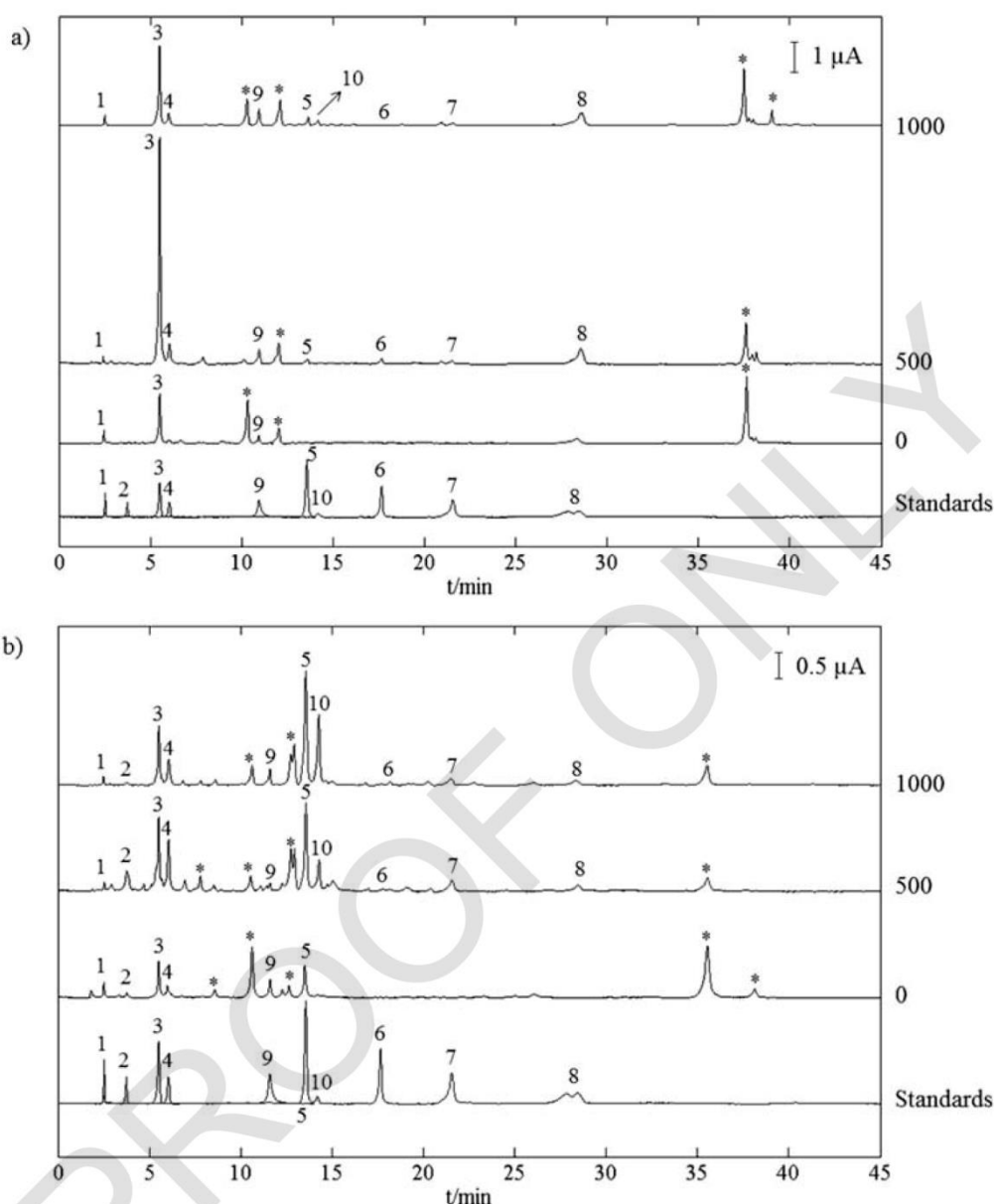


Figure 1. Chromatograms of shoots (a) and roots (b) of *Hordeum vulgare* plants treated with 0, 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg(II) compared with a chromatogram of standards of Cys (1), Cys-Gly (2), ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) and GSH (3), $\gamma\text{-Glu-Cys}$ (4), PC_2 (5), PC_3 (6), PC_4 (7) and PC_5 (8) at a concentration of $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. It also appears GSH:Hg(II) complex (9) and $\text{PC}_2\text{:Hg(II)}$ complex (10) at a concentration of $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Unknown peaks are marked as *.

presence cannot be easily justified, first because PCs are formed in the presence of metals and second that, if PC_5 has been synthesised, PC_2 should also have been formed as the precursor of longer chain PCs. In this extract we did not have neither metals nor other smaller PCs so it must be another compound present in shoots that elute at a retention time very similar to that of PC_5 . In the $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg(II) level, PC_2 , PC_3 , PC_4 and PC_5 were formed but at very low

concentrations. The addition of more Hg to the plant did not increase the concentration of thiols significantly, although a small peak of Hg:PC₂ complex appeared.

Regarding the roots (Figure 1b), in the control extract Cys, Cys-Gly, γ -Glu-Cys and PC₂ could be seen in higher concentrations than in shoots, while GSH has lower concentration. These compounds are easily found in plants with no metal stress, as noted above. The peak of the Hg:GSH complex could be due to the low Hg concentration that roots have taken up. When increasing concentrations of mercury were added, all the studied compounds (GSH, γ -Glu-Cys, Hg:GSH complex, PC₂, Hg:PC₂ complex, PC₃, PC₄ and PC₅) increased their concentrations, as shown by the increase of the respective signals.

In order to quantify these substances, external calibration curves with all the studied thiols were done. Analytical parameters and limits of detection and quantification were similar to those presented in Dago *et al.* [21]. As for quantifying the most abundant mercury complexes (with no available standards), external calibration curves were done by mixing a fixed concentration of the thiol with an excess of Hg(II); in these proportions, and knowing the stoichiometries of the complexes formed [21], all the thiol was complexed by mercury and we could assume that the complex concentration was the same as the thiol concentration in the mixture. The quantification has been done with triplicates of the extracts and the average and standard deviation are summarised in Table 2. Even though roots had more mercury than shoots, GSH concentration in shoots was higher than in roots. This could be explained as plants challenged with toxic metals might synthesise GSH in shoots, and then export it to roots, where it could be converted into PCs [15]. Other thiols were more concentrated in roots than in shoots. In roots, GSH was observed in the Hg contaminated levels, although no significant differences were observed between them. The increase of the Hg(II) applied to the plant did not produce an increase on the GSH concentration, as it could be expected, maybe because other longer chain thiols were formed using GSH as the substrate. Despite this, thiols concentrations increased, in general, with a rise in the concentration of Hg. Regarding the Hg:GSH complex, an appreciable increase could be seen in shoots when adding Hg, although in roots the level was practically constant. The decrease of Hg:GSH in shoots from 500 to 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ could be attributable to a decrease in free GSH concentration by forming longer thiols. No considerable increase was observed in PC₄ and PC₅ between 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg(II) level both in roots and

Table 2. Thiol and Hg:thiol concentration (nmol g^{-1} fresh weight) in shoots and roots from barley plants stressed with Hg(II) at different concentrations: 0, 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Values are the mean of three independent replicates $\pm$ standard deviation.

	Applied Hg concentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II))					
	Shoots			Roots		
	0	500	1000	0	500	1000
GSH	124 $\pm$ 46	509 $\pm$ 23	192 $\pm$ 34	n.q.	90 $\pm$ 31	65 $\pm$ 5
γ -Glu-Cys	n.d.	29 $\pm$ 2	n.q.	n.q.	42 $\pm$ 10	25 $\pm$ 4
PC ₂	n.q.	20 $\pm$ 1	24 $\pm$ 4	73 $\pm$ 23	121 $\pm$ 53	231 $\pm$ 55
PC ₃		24.3 $\pm$ 0.1	n.q.		n.q.	n.q.
PC ₄		30 $\pm$ 2	27 $\pm$ 1		40 $\pm$ 16	36 $\pm$ 2
PC ₅		34 $\pm$ 1	38.7 $\pm$ 0.4		41 $\pm$ 8	35 $\pm$ 1
GSH complex	23 $\pm$ 5	57.7 $\pm$ 0.8	46 $\pm$ 3	31 $\pm$ 7	20 $\pm$ 9	26 $\pm$ 5
PC ₂ complex			n.d.		n.q.	140 $\pm$ 39

Note: n.d., non-detectable; n.q., non-quantifiable.

shoots. Otherwise PC₂ in roots rised with an increasing concentration of Hg(II) applied, and it might be used as a marker of metal stress to plants because it increases quite fast with the applied concentration of mercury.

In conclusion, the most abundant thiol in shoots are GSH and its Hg complex, while in roots PC₂ and its complex have higher values leading us to suggest PC₂ as a marker for heavy metal stress in roots of barley as it increases in concordance with the Hg concentration applied.

3.3 Plants stressed with cadmium and mercury

To evaluate metal stress of cadmium and mercury applied simultaneously in the same plant, seeds were grown by adding 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of CdCl₂ in each treatment to prove the high capacity of Cd to induce PC synthesis even at such a small concentration. So, three other levels were analysed. The first one contained only 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cd(II), the second one 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cd(II) and 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg(II) and the last one 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cd(II) and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg(II).

Biomass and both Hg and Cd concentrations for each level were determined, and the results obtained are presented in Table 3. Despite the amount of Hg(II) was the same as plants considered above, the biomass of these plants stressed with Cd(II) and Hg(II) increased comparing to plants stressed only with Hg(II), probably owing to the capacity of Cd to induce more PCs which could help the plant to diminish the toxicity of Hg. To confirm this hypothesis, HPLC-ED analysis were conducted as described previously and results showed that in roots stressed with Cd and Hg, PC₂ and its Hg complex were the most abundant, with concentrations that, in 0 and 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg(II) levels, double the values found in roots stressed only with Hg(II) (Figure 2) thus confirming the PCs-inductor function of Cd. In roots treated with 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg, PC₂ concentration when the plant was also stressed with Cd was similar than those with no Cd stress.

Moreover, in plants stressed with both metals, the content of Hg determined by ICP-MS was lower than in plants treated only with Hg(II), although the concentrations of Hg applied to these plants were the same (Table 3). This lower absorption of metals could be due to a competition between them. This fact, together with the higher capacity of Cd(II) to induce PCs, could cause the increase of the biomass when both metals are present. Nevertheless, the concentration of Cd in the plant diminished when Hg supplied concentration increases, due to the low concentration of Cd in the media compared with those of mercury.

Table 3. Fresh weight (g plant^{-1}) and Hg and Cd concentration ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ fresh weight) in shoots and roots from barley plants treated with 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cd(II) and Hg(II) at different concentrations: 0, 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Metal applied ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Fresh weight (g plant^{-1})		Concentration of Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)		Concentration of Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)	
Cd(II)	Hg(II)	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
0	0	6.3 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.4	0.15 $\pm$ 0.02	n.d.	0.028 $\pm$ 0.003
10	0	5.5 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.31 $\pm$ 0.02	3.2 $\pm$ 0.1	27 $\pm$ 3
10	500	2.5 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.1	1548 $\pm$ 265	0.4 $\pm$ 0.6	3 $\pm$ 1
10	1000	1.3 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	15 $\pm$ 4	2427 $\pm$ 765	n.d.	2.3 $\pm$ 0.8

Note: n.d., non detectable.

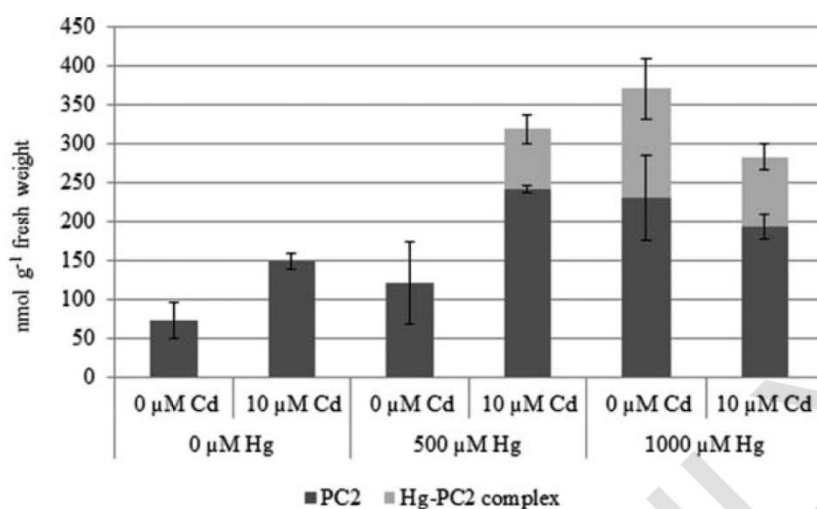


Figure 2. PC_2 and $Hg-PC_2$ concentration (nmol g^{-1} fresh weight) in roots from barley plants stressed with Cd and Hg simultaneously at different concentrations: 0, 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of $Hg(II)$ and 0 and 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of $Cd(II)$. Values are the mean of three independent replicates and standard deviations are shown.

These results demonstrate the ability of Cd to induce the synthesis of more PCs than Hg, because in the 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg level, although the assimilated mercury is lower when Cd is present in the growing media, a clear increase on the PC_2 concentration can be observed. A similar behaviour can be noticeable in the 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ level, but in this case the content of PC_2 and its complex are not significantly different despite the lower assimilation of mercury when Cd is present. This mechanism helps plants to tolerate metal toxicity, as indicated by an increase of their biomass. On the other hand, when both metals are present, regardless of their concentration, a lower uptake of Hg is observed leading us to conclude that *Hordeum vulgare* plants have less affinity for Hg when there is cadmium competing in the solution. However, further studies should gain a deeper insight into the mechanisms of plants responding to simultaneous metal toxicity in order to evaluate phytoremediation of soils contaminated by both metals.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Vegetal Physiology group of the Faculty of Biology of the University of Barcelona for growing the *Hordeum vulgare* plants. This research was financially supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (project CTQ2009-09471 and CTQ2012-32863). Àngela Dago acknowledges the University of Barcelona for a PhD grant.

References

- [1] D.E. Salt, R.D. Smith and I. Raskin, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 643 (1998).
- [2] P.K. Padmavathiamma and L.Y. Li, *Water Air Soil Pollut.* **184**, 105 (2007).
- [3] C. Cobbett and P. Goldsbrough, *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 159 (2002).
- [4] E. Grill, E.-L. Winnacker and M.H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 439 (1987).
- [5] W.E. Rauser, *Plant Physiol.* **109**, 1141 (1995).
- [6] C.S. Cobbett, *Plant Physiol.* **123**, 825 (2000).
- [7] J.L. Hall, *J. Exp. Bot.* **53**, 1 (2002).
- [8] M. Leermakers, W. Baeyens, P. Quevauviller and M. Horvat, *Trends Anal. Chem.* **24**, 383 (2005).

- [9] T.L. Leonard, G.E. Taylor, M.S. Gustin and G.C.J. Fernández, *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 2063 (1998).
- [10] R. Rellán-Álvarez, C. Ortega-Villasante, A. Álvarez-Hernández, F.F. Del Campo and L.E. Hernández, *Plant Soil*. **279**, 41 (2006).
- [11] S. Carrasco-Gil, A. Álvarez-Fernández, J. Sobrino-Plata, R. Millán, R.O. Carpena-Ruiz, D.L. Leduc, J.C. Andrews, J. Abadía and L.E. Hernández, *Plant Cell Environ.* **34**, 778 (2011).
- [12] C. Ortega-Villasante, R. Rellán-Álvarez, F.F. Del Campo, R.O. Carpena-Ruiz and L.E. Hernández, *J. Exp. Bot.* **56**, 2239 (2005).
- [13] C. Ortega-Villasante, L.E. Hernández, R. Rellán-Álvarez, F.F. Del Campo and R.O. Carpena-Ruiz, *New Phytol.* **176**, 96 (2007).
- [14] Z.S. Zhou, S.J. Wang and Z.M. Yang, *Chemosphere* **70**, 1500 (2008).
- [15] J. Sobrino-Plata, C. Ortega-Villasante, M.L. Flores-Cáceres, C. Escobar, F.F. Del Campo and L.E. Hernández, *Chemosphere* **77**, 946 (2009).
- [16] E.M. Krupp, B.F. Milne, A. Mestrot, A.A. Meharg and J. Feldmann, *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1753 (2008).
- [17] E.M. Krupp, A. Mestrot, J. Wielgus, A.A. Meharg and J. Feldmann, *Chem. Commun.* 4257 (2009).
- [18] S. Iglesia-Turiño, A. Febrero, O. Jauregui, C. Caldelas, J.L. Araus and J. Bort, *Plant Physiol.* **142**, 742 (2006).
- [19] L. Chen, L. Yang and Q. Wang, *Metallomics* **1**, 101 (2009).
- [20] M. Válega, A.I.G. Lima, E.M.A.P. Figueira, E. Pereira, M.A. Pardo and A.C. Duarte, *Chemosphere* **74**, 530 (2009).
- [21] A. Dago, O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Anal. Chim. Acta* **695**, 51 (2011).
- [22] E. Chekmeneva, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* **43**, 7010 (2009).
- [23] E. Chekmeneva, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.* **644**, 20 (2010).
- [24] A. Dago, O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *J. Chromatogr. A* **1216**, 6752 (2009).
- [25] U.-H. Cho and J.-O. Park, *Plant Sci.* **156**, 1 (2000).
- [26] J.M. Díaz-Cruz, J. Sanchís, E. Chekmeneva, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst* **135**, 1653 (2010).

9.3. Discussió de resultats

Per avaluar l'estrès que els metalls produeixen en el creixement de les plantes, es calcula la biomassa de tots els nivells, tant dels brots com de les arrels. En aquest estudi s'observen clars símptomes de fitotoxicitat a les plantes sotmeses a Hg(II) i/o Cd(II), ja que el pes dels brots i de les arrels disminueix significativament quan les plantes creixen en presència d'aquests metalls (Taula 1 i 3 del treball 9.2 i Figura 44). L'augment de la concentració de Hg(II) del medi produeix una disminució progressiva del pes tant dels brots com de les arrels. No obstant això, el tractament amb $1.000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II) no és suficient per inhibir completament el creixement de la planta.

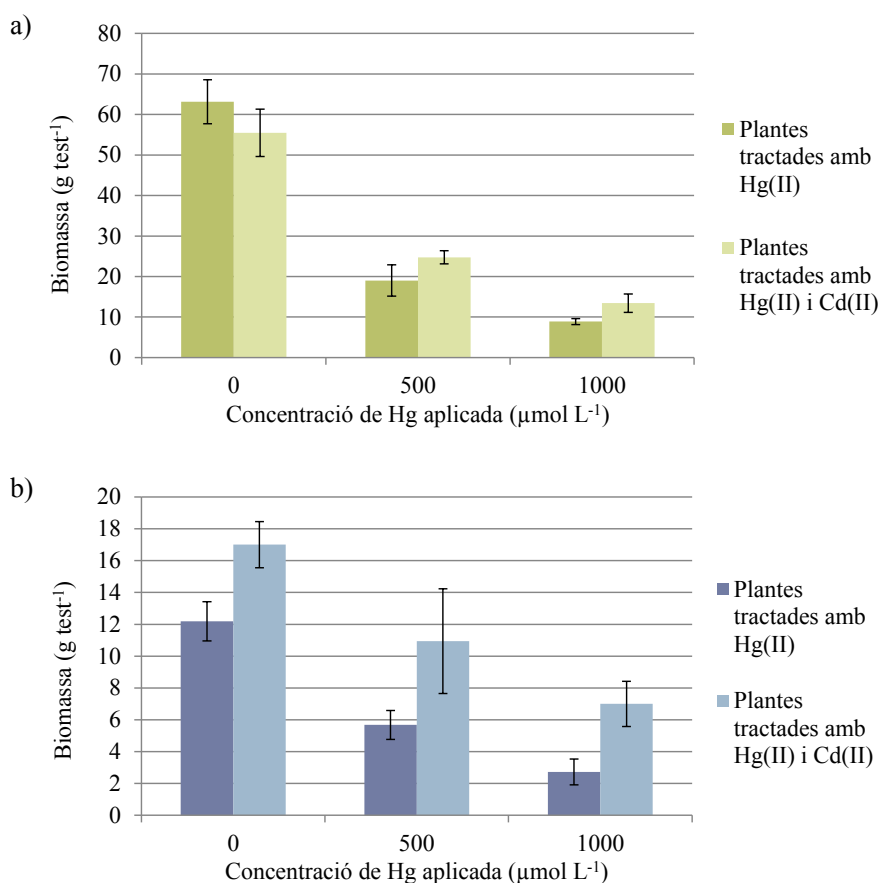


Figura 44. Biomassa (g test^{-1}) dels brots (a) i de les arrels (b) de les plantes d'ordi cultivades semi-hidropònicament i tractades amb Hg(II) a diferents concentracions (0, 500 i $1.000 \mu\text{mol L}^{-1}$) i amb Cd(II) (0 i $10 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Si es compara la biomassa de les plantes tractades amb Hg(II) i les tractades amb Hg(II) i Cd(II) (Figura 44), s'observa que la biomassa dels brots i de les arrels de les plantes sotmeses a estrès metàl·lic per Hg(II) i Cd(II) simultàniament normalment és

més elevada que les plantes tractades únicament amb Hg(II). Aquests resultats són contraris al que en principi caldria esperar, tenint en compte que s'afegeix la mateixa concentració de Hg(II) a la solució nutritiva, a més d'afegir-hi Cd(II).

Aquesta diferència de biomassa entre les plantes de l'estudi amb Hg(II) i les de l'estudi amb Hg(II) i Cd(II) simultàniament, pot ser deguda per una banda a la diferent toxicitat del Hg i del Cd (el Cd és menys tòxic que el Hg) i, per altra banda a què el Cd és un inductor més eficaç de la síntesi de fitoquelatines, fet que ajuda a la planta a combatre la toxicitat dels metalls pesants d'una manera més eficaç. Sembla per tant, que l'efecte tòxic del Hg, almenys respecte al creixement de les plantes, queda inhibit per la presència de Cd(II) en el medi de creixement, possiblement degut a què aquest té una capacitat de síntesi de PCs més gran.

El contingut de Hg assimilat per les plantes sotmeses a Hg(II) augmenta simultàniament amb l'augment de la concentració de Hg(II) aplicada (Taula 1 del treball 9.2, Figura 45). A les plantes que no contenen Hg ($0 \mu\text{mol L}^{-1}$) s'hi troben uns nivells de Hg molt baixos possiblement degut a una contaminació ambiental. En general, s'observa que les arrels sempre tenen més contingut de metall que no pas els brots, tenint en compte que l'absorció de metalls es produeix a través de les arrels, això pot ser una estratègia de les plantes per protegir la part aèria, ja que aquesta part és més sensible als efectes perjudicials induïts per l'estrès metàl·lic. A més, es coneix que en la majoria d'espècies de plantes els ions metàl·lics prefereixen quedar-se retinguts als teixits de les arrels i només una petita part és traspasada als brots [143], excepte en algunes espècies hiperacumuladores que les acumulen de manera extrema a la part aèria [67].

A les plantes sotmeses simultàniament a Hg(II) i Cd(II), el contingut de Hg també augmenta a l'incrementar la concentració de Hg(II) aplicada (Taula 3 del treball 9.2, Figura 45). Pel que fa al contingut de Cd assimilat per les plantes (Taula 3 del treball 9.2), tot i que la concentració de Cd(II) aplicada és la mateixa en tots els nivells, el Cd assimilat per la planta no és constant sinó que disminueix amb l'augment de la concentració aplicada de Hg(II), possiblement degut a la diferència de l'ordre de concentració del Cd respecte al Hg (hi ha molt més Hg que no pas Cd).

Si es compara el contingut de Hg de les plantes tractades només amb Hg amb les plantes tractades simultàniament amb Hg i Cd s'observa que aquestes últimes acumulen menys Hg tot i haver-ne aplicat la mateixa concentració (Figura 45). Per tant, podem dir que la planta té menys afinitat pel Hg(II) quan hi ha presència de Cd(II).

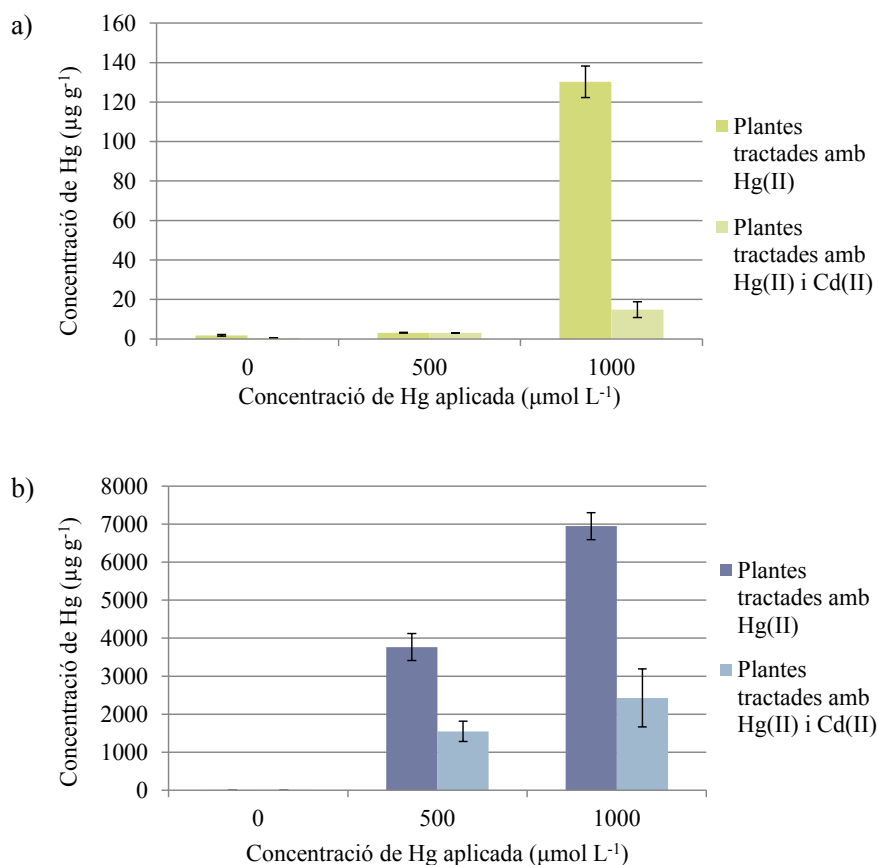


Figura 45. Contingut de Hg (µg g⁻¹) dels brots (a) i de les arrels (b) de les plantes d'ordi cultivades semi-hidropònicament i tractades amb Hg(II) a diferents concentracions (0, 500 i 1.000 µmol L⁻¹) i amb Cd(II) (0 i 10 µmol L⁻¹).

Pel que fa a la determinació del contingut de PCs, l'optimització de l'extracció de les fitoquelatines és un paràmetre important per assegurar una bona quantificació. Per aquest motiu, es proven diferents reactius per fer l'extracció: HCl 1 mol L⁻¹, HClO₄ al 30% i aigua ultrapura. L'extracció que mostra més bons resultats és l'extracció amb aigua, ja que dona uns cromatogrames més nets i definits, a la vegada que és el mètode més senzill i que pot pertorbar menys la mostra. D'aquesta manera es poden extreure tant les PCs com els seus complexos amb Hg.

Amb la finalitat de quantificar el contingut total de cada una de les PCs sintetitzades i dels pèptids petits, s'ha intentat trencar els complexos formats amb Hg.

Tal com descriuen Iglesia-Turiño *et al.* [139], els complexos, en principi, es poden trencar amb un agent complexant fort. Per això es tracten els extractes amb àcid dimercaptosuccínic (DMSA) i àcid 2,3-dimercapto-1-propanosulfònic (DMPS) que són agents complexants amb dos grups sulfhidril que poden complexar els metalls. No obstant, amb cap d'aquests reactius s'aconsegueix desplaçar el metall del complex ja que el pic del complex Hg:PC es manté. Cal dir que en una lectura acurada del treball citat [139] es detecten inconsistències amb els resultats que presenten, les quals semblen indicar que no es van poder trencar els complexos tal com diuen els autors. També s'ha provat, tal com s'apunta a la bibliografia [131], la utilització d'un reductor com el borohidru de sodi (NaBH_4) amb NaOH o bé amb HCl, però els resultats tampoc són satisfactoris. Així doncs es decideix deixar de banda la possibilitat de trencar els complexos per obtenir les PCs lliures i es continua amb l'extracció senzilla amb aigua ultrapura per quantificar tant la forma lliure com la complexada.

Una vegada establert el tipus d'extracció, es procedeix a optimitzar l'etapa d'extracció en fase sòlida (SPE). Els cartutxos d'extracció en fase sòlida utilitzats són els DSC-18. Abans d'analitzar els extractes de plantes s'aplica el procés d'extracció en fase sòlida a solucions patró de fitoquelatines i dels seus fragments optimitzant les etapes de neteja i elució (volum i solvent emprats). Després es preconcentra l'extracte obtingut, s'evapora en un corrent de nitrogen i es reconstitueix en aigua ultrapura.

A la Figura 46 es mostra uns cromatogrames de patrons de diferents fitoquelatines i fragments amb SPE i preconcentració o sense. S'observa que quan es duu a terme l'extracció en fase sòlida i la preconcentració, els dos primers pics cromatogràfics que corresponen a la Cys i a la Cys-Gly disminueixen d'intensitat, però en canvi la intensitat dels altres pics augmenta. S'han calculat els factors de recuperació mitjançant el càlcul de les àrees dels pics d'aquests cromatogrames, obtenint factors de recuperació entre 1,2 i 2,2 per tots els tiols excepte la Cys i la Cys-Gly que mostren factors de recuperació de 0,15 i 0,46, respectivament. Aquests dos fragments, la Cys i la Cys-Gly, no són d'especial interès en els estudis que es fan en aquest treball, de manera que la seva elució durant l'etapa de neteja no és rellevant i, per tant, no es consideraran en aquest estudi.

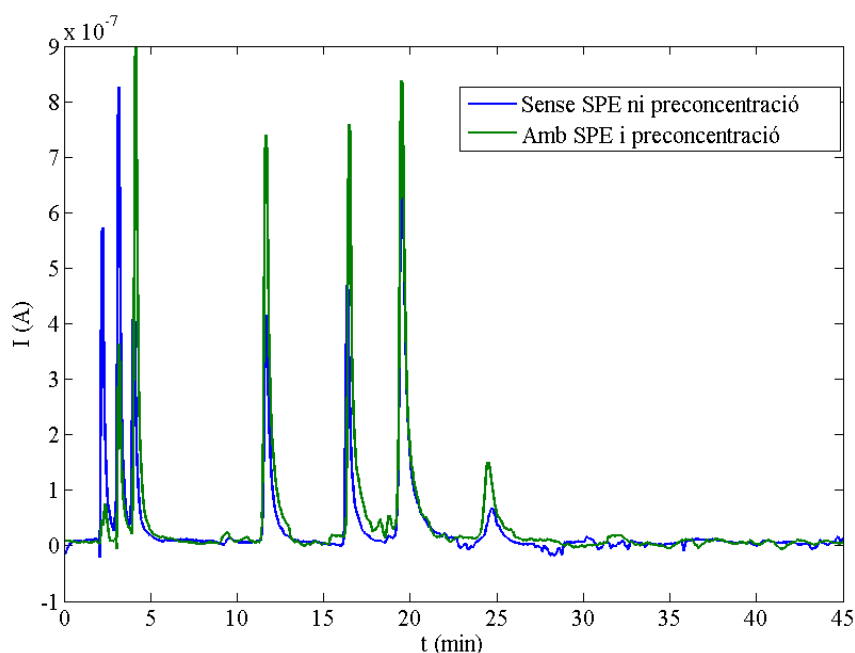


Figura 46. Cromatogrames superposats de les diferents fitoquelatines i fragments ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cadascuna de les substàncies) sense tractament (—) i amb SPE i preconcentració (—).

La importància de l'etapa de SPE es pot veure a la Figura 47 on es mostren uns cromatogrames d'arrels de les plantes sotmeses a estrès metàl·lic amb Hg ($1.000 \mu\text{mol L}^{-1}$). A temps de retenció baixos, apart dels pics de la Cys i la Cys-Gly s'observen tota una sèrie de pics no identificats que en l'etapa d'extracció en fase sòlida s'eliminen parcialment, donant uns cromatogrames més nets i més ben definits.

Un cop optimitzada l'etapa d'extracció, es procedeix a la injecció dels diferents extractes obtinguts, els cromatogrames dels quals es mostren a la Figura 1 del treball 9.2 per les plantes sotmeses només a Hg(II) i a la Figura 48 per les plantes sotmeses a Hg(II) i Cd(II). Als cromatogrames corresponents als extractes de brots que no han estat sotmesos a cap metall (nivell 0 de la Figura 1 del treball 9.2), es poden veure els pics de GSH i γ -Glu-Cys. La presència de pics dels tiols en plantes no sotmeses a estrès metàl·lic no és un fet estrany; d'acord amb Rauser [87], es poden observar petites concentracions de tiols a les plantes cultivades en condicions normals (sense estrès metàl·lic), així com concentracions més baixes de PC₂ o PC₃.

En els cromatogrames dels brots, a mesura que augmenta la concentració aplicada de Hg(II), la intensitat del pic del GSH augmenta i s'observa la formació del complex Hg-PC₂ tant en l'estudi de les plantes sotmeses a Hg(II) com amb les sotmeses a Hg(II)

i Cd(II). En l'estudi de plantes sotmeses únicament a Hg(II) també s'observa l'aparició dels pics de PC₂, PC₃, PC₄ i PC₅.

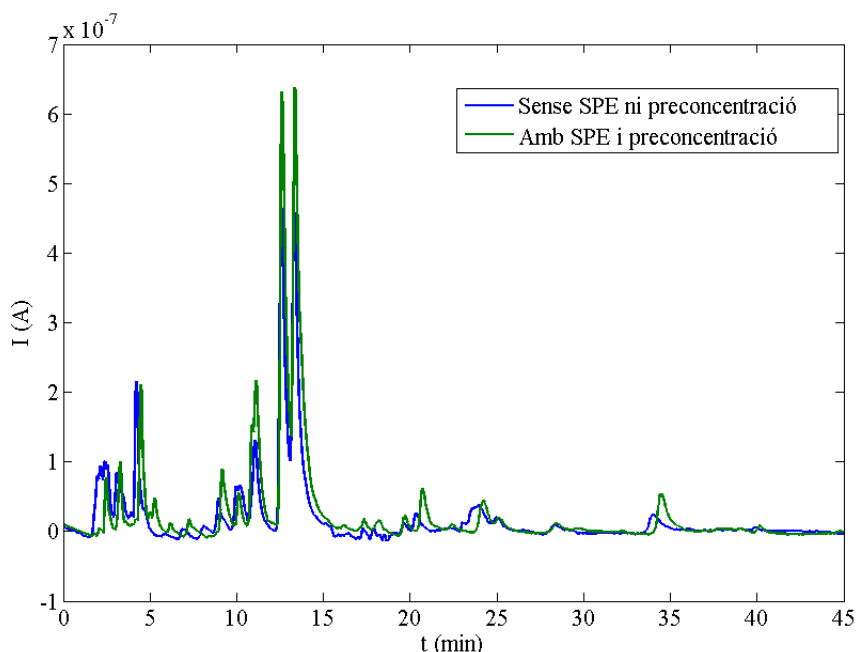


Figura 47. Cromatogrames superposats de dos extractes d'arrels d'ordi cultivat semi-hidropònicament amb $1.000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), sense SPE ni preconcentració (—), i amb SPE i preconcentració (—).

En canvi, a les arrels s'observa la presència majoritària de PC₂ i Hg-PC₂ en els extractes de plantes dels dos estudis. Als cromatogrames de les plantes estressades només amb Hg(II) s'observa la presència de PC₃, PC₄ i PC₅ mentre que a les plantes sotmeses a Hg(II) i Cd(II) només es forma la PC₄.

Els resultats de les quantificacions dels tiols de les plantes sotmeses únicament a Hg(II) es mostren a la Taula 2 del treball 9.2. Als brots de les plantes tractades amb $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd(II) i 0, 500 o $1.000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II) només s'ha pogut quantificar el glutatió (GSH) amb valors de 53 ± 17 , 89 ± 1 i $119 \pm 37 \text{ nmol g}^{-1}$, respectivament. En canvi, a les arrels de les plantes sotmeses a Hg(II) i Cd(II), sorprenentment només s'observa la presència de PC₂ i del seu complex amb Hg (Taula 15).

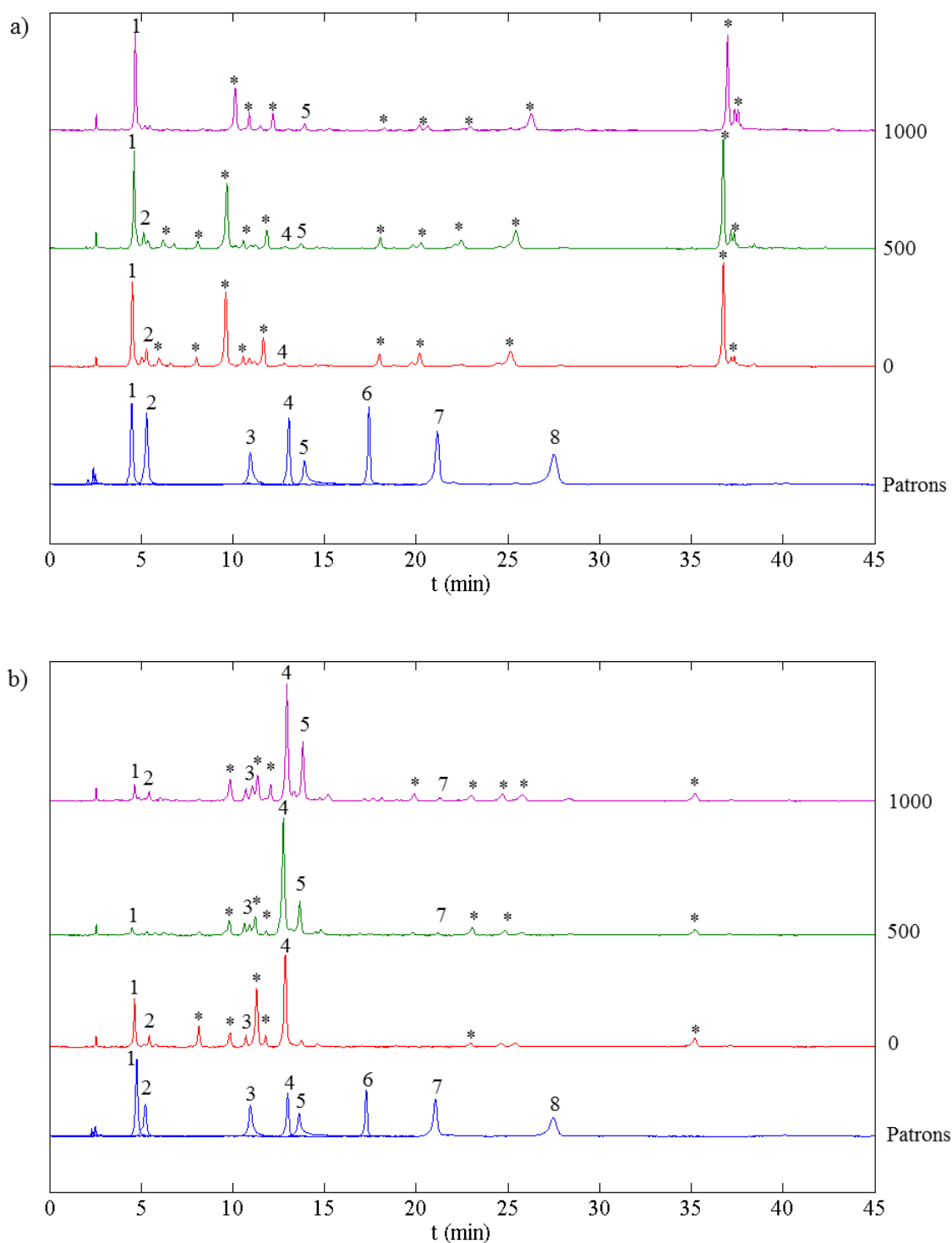


Figura 48. Cromatogrames superposats dels brots (a) i de les arrels (b) de plantes d'*Hordeum vulgare* cultivades semi-hidropònicament i sotmeses a estrès metàl·lic per Cd(II) ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) i per diferents concentracions de Hg(II) (0, 500 i $1.000 \mu\text{mol L}^{-1}$). Es mostra també un cromatograma de patrons dels tiols ($10^{-5} \text{mol L}^{-1}$); 1: GSH, 2: γ -Glu-Cys, 3: Hg-GSH, 4: PC_2 , 5: Hg- PC_2 , 6: PC_3 , 7: PC_4 , 8: PC_5 .

*Taula 15. Quantificació (nmol g⁻¹) de la PC₂ i del complex Hg-PC₂ de les arrels de les plantes d'*Hordeum vulgare* cultivades semi-hidropònicament i sotmeses a estrès per Cd(II) i Hg(II). Els valors corresponen a la mitjana obtinguda dels 4 replicats i la desviació estàndard associada (n.d. no detectable).*

	Concentració de metalls aplicada (μmol L ⁻¹)		
	10 Cd(II)	10 Cd(II) 500 Hg(II)	10 Cd(II) 1.000 Hg(II)
PC ₂	149 ± 11	242 ± 4	193 ± 16
Hg-PC ₂	n.d.	77 ± 19	90 ± 17

Pel que fa a les plantes sotmeses únicament a Hg(II) (Taula 2 del treball 9.2), si es compara el contingut de GSH dels brots amb el de les arrels, tot i que com s'ha vist anteriorment les arrels de les plantes assimilen més mercuri que els brots, la concentració de GSH als brots és superior a la trobada a les arrels, en els dos estudis. Això pot ser degut a què les plantes estressades amb metalls tòxics poden sintetitzar GSH als brots i després exportar-lo a les arrels, on podria ser utilitzat com a substrat de la síntesi de PCs [124]. Els altres tiols es troben més concentrats a les arrels que als brots.

La resta de tiols analitzats als brots de les plantes sotmeses a Hg(II) no semblen mostrar un increment significatiu amb l'increment de metall aplicat. Pel que fa a les arrels sotmeses únicament a Hg(II), en augmentar la concentració de metall augmenta la concentració dels tiols sintetitzats, excepte la PC₃ que no és quantificable. A les plantes sotmeses a Hg(II) i Cd(II) (Taula 15 i Figura 3 del treball 9.2) s'observa que en augmentar la concentració aplicada de Hg(II) augmenta la concentració de PC₂, excepte en les arrels tractades amb 1.000 μmol L⁻¹ de Hg on la concentració de PC₂ disminueix, possiblement degut a la formació del complex Hg-PC₂.

Si comparem els dos estudis realitzats, i sabent que el contingut de mercuri de les plantes sotmeses a estrès metàl·lic per Hg(II) i Cd(II) és inferior al de les plantes sotmeses a estrès únicament per Hg(II) com s'ha vist anteriorment, la síntesi de fitoquelatines també és diferent. Les plantes sotmeses a estrès només amb Hg(II) sintetitzen, en general, més fitoquelatines que les sotmeses a Hg(II) i Cd(II), ja que el contingut de metall assimilat per aquestes ha estat inferior. D'altra banda, les plantes

sotmeses a estrès metàl·lic només per $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd (sense Hg) han sintetitzat una concentració més elevada de PC_2 , que les sotmeses només a $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg, tot i que aquestes també han sintetitzat petites quantitats de fitoquelatines de cadena més llarga. Aquests resultats posen en evidència que el Cd, tot i estar en una concentració menor que el Hg, és més inductor de fitoquelatines que no pas el Hg. A més es demostra l'elevada capacitat del Cd per sintetitzar més PCs que no pas el Hg, ja que es pot observar un clar augment de la concentració de PC_2 en comparació amb les plantes estressades només amb Hg(II) (Figura 3 del treball 9.2). Aquesta capacitat d'incrementar la síntesi de PCs pot ajudar a les plantes a tolerar la toxicitat dels metalls, tal com s'indica per un augment de la biomassa de les plantes sotmeses a Hg(II) i Cd(II). No obstant això, caldria fer altres estudis per aprofundir en el coneixement dels mecanismes de resposta que tenen les plantes envers la toxicitat simultània de metalls.

Inducció de PCs en plantes sotmeses a diferents metalls pesants

Aquest capítol engloba un treball corresponent a l'aplicació de la metodologia desenvolupada anteriorment a l'estudi de les fitoquelatines induïdes en plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* cultivades hidropònicament en presència de Hg(II), Cd(II), As(III) o Pb(II). Igual que en el treball anterior, s'avalua la disminució del creixement de les plantes sotmeses als diferents metalls, la concentració total de metall tant en brots com en arrels i el contingut de fitoquelatines.

Per tal d'identificar un patró de síntesi de fitoquelatines en funció de la naturalesa del metall pesant contaminant i/o de la seva concentració s'aplica una tècnica de processament de dades més avançada als resultats obtinguts de la quantificació de les diferents PCs induïdes per cada ió metàl·lic. D'aquesta manera, s'aplica una anàlisi de components principals (PCA) a les dades obtingudes, essent aquest el primer cop que s'apliquen tractaments quimiomètrics en estudis de fitoremediació.

10.1. Introducció

Existeixen diversos metalls que han demostrat ser inductors de fitoquelatines en plantes com a resposta a l'estrès metàl·lic produït. El cadmi és conegut per ser l'inductor més potent de PCs i és també el metall més àmpliament estudiat. S'han publicat un gran nombre de treballs sobre l'anàlisi de les PCs en plantes sotmeses a estrès per Cd(II) [130, 182, 183]. Això no obstant, la majoria dels estudis publicats utilitzen metodologies que consumeixen molt temps o que suposen un important cost econòmic.

Un altre metall que ha estat àmpliament estudiat és el mercuri, que és conegut per ser un dels contaminants més perillosos pel medi ambient a causa de la seva bioacumulació i biomagnificació en diversos ecosistemes. En conseqüència, la descontaminació de llocs contaminats amb mercuri és un objectiu universal. S'han trobat diverses publicacions que determinen el contingut de PCs a les plantes sotmeses a estrès per Hg [131, 139]. En el treball del capítol 9.2 de la present Tesi Doctoral, es consideren plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* cultivades en presència de Hg(II) i Cd(II) aplicats simultàniament i es quantifiquen les PCs. Els resultats obtinguts mostren que en el cas de les arrels de les plantes sotmeses a Cd(II), la PC₂ és l'única fitoquelatina que se sintetitza mentre que en les plantes sotmeses a Hg(II) també s'observa la presència de PC₄ i PC₅ i d'alguns complexos amb Hg. Aquest fet posaria de manifest la diferent inducció de PCs produïda pels diferents metalls i portaria a la realització d'aquest estudi per comparar la síntesi de fitoquelatines en funció del metall aplicat.

També es va decidir incloure l'arsènic en aquest estudi ja que és un altre contaminant que es troba àmpliament distribuït al medi ambient. Encara que es considera un metal·loide enlloc d'un metall, les dues espècies inorgàniques de l'arsènic, As(V) i As(III), són altament tòxiques per a les plantes. Tot i que l'arsenat [As (V)] és l'espècie predominant en sòls aeròbics, es creu que un cop dins del citoplasma, l'As(V) es redueix fàcilment a As(III), fent-lo l'espècie predominant d'As tant en arrels com en brots [184, 185]. En estudis de PCs induïdes per As [186, 187], no només es posa de manifest la inducció de PCs per l'arsènic sinó que també es demostra que la PC₂ és la PC predominant en presència d'arsenit.

En aquest estudi també es considera el plom que és un metall utilitzat freqüentment en els estudis d'inducció de PCs [74, 144]. Això no obstant, diversos problemes relacionats amb el cultiu de les plantes sotmeses a Pb(II) no van permetre d'avaluar correctament la inducció de PCs per aquest metall i per això aquest metall no s'inclou en el treball publicat, tot i que els resultats obtinguts si que es presenten en aquesta Tesi.

Diversos estudis han comparat el dany cel·lular induït a les plantes d'acord amb el metall estressant utilitzat. Encara que molt pocs han comparat el contingut de PCs als extractes de plantes en funció del metall estressant. D'aquesta manera, les PCs induïdes per Cd i Hg es van determinar per Ortega-Villasante *et al.* [120], Rellán-Álvarez *et al.* [121] i Sobrino-Plata *et al.* [124] en els extractes de *Zea mays* i *Medicago sativa*, demostrant que el Cd(II) és un inductor més potent de la síntesi de PCs que no pas el Hg(II), segons s'infereix de les proporcions més altes de tiols que es van trobar en els nivells altament contaminats amb Cd(II). Cal dir que aquests autors no sempre detecten les PCs, o si les detecten, no són capaços de distingir entre les PCs de diferent longitud i tampoc s'especifica quina és la PC més induïda per cada metall. En un altre estudi comparant les PCs induïdes per Cd(II) i Pb(II) en *Phaeodactylum tricornutum* [109], es va observar que quan s'exposen les cèl·lules al Pb(II), la PC més abundant és la PC₂, però en els cultius amb Cd(II), la més abundant és la PC₄.

Altres estudis s'han dut a terme utilitzant diferents metalls, per exemple, Grill *et al.* [188] van analitzar la inducció de PCs per Cd(II), Bi(III), As(V), Cu(II), Pb(II), Zn(II) i Ag(I) a les cèl·lules de *Schizosaccharomyces pombe* i van mostrar que el Cd és l'inductor més potent de PCs. En un altre estudi multi-metall realitzat per Maitani *et al.* [90], es van analitzar diversos metal·loides a més d'alguns metalls. Es van assajar com a inductors de PCs Ag(I), As(III), As(V), Cd(II), Cu(II), Ga(III), Hg(II), In(III), Ni(II), Pb(II), Pd (II), Se(IV) i Zn (II) en arrels de *Rubia tinctorum*. En aquest estudi s'utilitza una metodologia d'HPLC amb derivatització post-columna que consumeix molt temps. D'altra banda, els autors no descriuen les PCs predominants o el patró de PCs per a cada metall.

En el present estudi, l'ordi (*Hordeum vulgare*) és selecciona com a planta d'estudi, ja que és fàcil i ràpid de germinar i es troba fàcilment disponible, degut a què és un cereal àmpliament cultivat. El cultiu hidropònic (un mètode de cultiu de plantes

que utilitza únicament solució nutritiva) es considera un mètode viable de cultiu de plantes per a estudis de fitoremediació abans d'avaluar el comportament de les plantes a l'hivernacle i/o al camp. Les plantes es cultiven hidropònicament en presència de Hg(II), Cd(II), As(III) o Pb(II) i es duu a terme una anàlisi de les PCs induïdes utilitzant la metodologia d'HPLC amb detecció amperomètrica optimitzada anteriorment com una tècnica sensible, ràpida i barata. Tot i que el Pb(II), com s'ha dit anteriorment, no apareix al treball publicat, en aquest estudi també es va analitzar la inducció de PCs amb aquest metall. Els resultats obtinguts de les diferents PCs induïdes per cada ió metàl·lic s'utilitzen per aplicar una tècnica més avançada de processament de dades per tal d'identificar un patró en funció de la naturalesa del metall contaminant i/o de la seva concentració. Amb aquesta finalitat, s'aplica una anàlisi de components principals (PCA) a les dades obtingudes de la quantificació de les PCs, essent aquest el primer cop que s'aplica la quimiometria en estudis de fitoremediació. Per tant, els objectius d'aquest estudi són: *i)* induir la síntesi de PCs en plantes d'*Hordeum vulgare* sotmeses a diferents concentracions de diversos metalls i metal·loides tòxics, *ii)* avaluar la fitotoxicitat que aquests elements provoquen a les plantes, expressada com la inhibició del creixement i el contingut total d'aquests metalls a les arrels i als brots, *iii)* quantificar les PCs formades mitjançant l'aplicació de la metodologia d'HPLC amb detecció amperomètrica desenvolupada als treballs previs (capítol 8), i *iv)* aplicar eines quimiomètriques a les dades obtingudes, per tal d'avaluar la possible correlació entre la concentració de tiols a les plantes i el metall pesant subministrat i/o el seu nivell de concentració.

**10.2. Chemometrics applied to the analysis of induced phytochelatin
in *Hordeum vulgare* plants stressed with various toxic non-essential
metals and metalloids**

A. Dago, I. González, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban

Talanta 118 (2014) 201-209



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Chemometrics applied to the analysis of induced phytochelatin in *Hordeum vulgare* plants stressed with various toxic non-essential metals and metalloids

Àngela Dago, Inmaculada González, Cristina Ariño*, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona (UB), Martí i Franquès, 1-11, E-08028 Barcelona, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2013
Received in revised form
26 September 2013
Accepted 30 September 2013
Available online 22 October 2013

Keywords:

Amperometric detection
Phytochelatin
Hordeum vulgare
Heavy metal stress
Principal component analysis

ABSTRACT

Hordeum vulgare plants were stressed with Hg, Cd and As and their phytotoxicity was evaluated in terms of growth inhibition and total metal uptake by the plant. The synthesised phytochelatin ((γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly, $n=2-5$; PCs) were determined by HPLC with amperometric detection at a glassy carbon electrode. The results indicate that *H. vulgare* is a good phytostabilisation plant due to its capacity to accumulate heavy metals in roots. Cd and Hg are the most uptake toxic elements, being Cd the most potent inducer of PCs. The data obtained on the different PCs and related peptides induced by each heavy metal were used to perform a Principal Component Analysis (PCA) of the results as a function of the contaminating toxic element or its concentration level. The nature of the stressor element could be predicted from the pattern of PCs and related peptides identified by PCA. PCs were the most strongly induced peptides under Cd and Hg stress, whereas As only tended to synthesise small thiols such as glutathione and γ -glutamylcysteine, both precursors of PCs synthesis. This finding indicates that PCs are induced at different rates depending on the metal stressor used.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Plants respond to heavy metal stress by inducing SH-containing peptides such as phytochelatin (PCs) [1,2]. Phytochelatin are small, cysteine-rich peptides capable of binding heavy metal ions via thiolate coordination. PCs consist of L-glutamic acid, L-cysteine and a carboxy-terminal glycine. The general structure of these peptides is (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly, where n has been reported as being as high as 11, but is generally in the range of 2–5 [3]. Phytochelatin (PCs), which possess a high antioxidant capacity, are thought to be the most important mechanism of detoxification in plants subject to metal stress, and are involved in the accumulation, chelation, sequestration and metabolism of metal ions [4,5]. The PC pathway consists of two parts: metal-activated synthesis of peptides and transport of metal-PC complexes into the vacuole. Glutathione (γ -Glu-Cys-Gly; GSH) is known to be the precursor of phytochelatin, and phytochelatin synthase the enzyme responsible. When plants are exposed to heavy metals in the environment, PCs can reduce the free metal concentration in the cytosol by binding and transporting the metal to specific compartments,

mainly the vacuole, prior to biotransformation into organic compounds or chemical reduction of the element [5].

Several metals have been proved to be inducers of PCs in plants. Cadmium is known to be the most potent PC inducer and is also the most extensively studied metal. A large number of papers have been published on the analysis of PCs in Cd-stressed plants. For example, Bräutigam et al. [6] studied Cd-induced peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*, observing several PCs and related peptides by MS detection prior oxidation of the thiols, while Najmanova et al. [7] used RP-HPLC-ED to analyse the abundance of PC species in tissues of *Linum usitatissimum* grown in the presence of Cd(II). They determined PCs content and proved the translocation of Cd-PC complexes from roots to shoots. Mohamed et al. [8] used HPLC with post-column derivatisation to determine PCs in Cd-treated *Brassica juncea*, and demonstrated that GSH and PC biosynthesis increased in both roots and shoots. Many more articles have been published describing the response to Cd stress in plants; however, time-consuming or expensive methodologies were used. Another metal which has been extensively studied is mercury, which is known to be one of the most hazardous pollutants in the environment due to its bioaccumulation and biomagnification in diverse ecosystems. Consequently, decontamination of Hg-polluted sites is a universal goal. Several publications were found which report the content of PCs in Hg-stressed plants.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 15 45; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: cristina.arino@ub.edu (C. Ariño).

Chen et al. [9] analysed the generation of PCs in *Brassica chinensis* exposed to different Hg species, and also determined Hg–PC complexes. Iglesia-Turiño et al. [10] analysed PCs in *Brassica napus*, but only found PC₂. In previous studies by our research group [11], *Hordeum vulgare* plants were stressed with Hg or Hg and Cd simultaneously, and PCs from $n=2$ to 5 were detected and quantified. PCs in *Asparagus acutifolius* and *Retama sphaerocarpa* grown in the Almadén mining district, one of the most Hg-contaminated sites in the world, were determined in order to evaluate plant response to Hg pollution (unpublished results).

Arsenic is another contaminant which is widely distributed in the environment. Although it is considered a metalloid rather than a metal, both inorganic species, As(V) and As(III), are highly toxic to plants. For this reason, some authors include arsenic in the term “heavy metal”, although strictly speaking it is not a metal [12,13]. As(V) is a phosphate analogue, and it can therefore compete with phosphate in the cytoplasm, replacing it in ATP to form the unstable complex ADP–As, which leads to the disruption of energy flows in cells. Meanwhile, As(III) is highly toxic to plants because it reacts with sulphhydryl groups in enzymes and tissue proteins, leading to inhibition of cellular function and death. Although arsenate [As(V)] is the predominant species in aerobic soils, it is thought that once inside the cytoplasm, As(V) is readily reduced to As(III) by GSH, making it the predominant As species in roots and shoots [14,15]. As(III) is then complexed with PCs and subsequently stored in the vacuoles. In a study of PCs induced by As stress, Sneller et al. [16] analysed the short- and long-term toxicity of arsenate in *Silene vulgaris* plants. They reported that PCs accumulation is linearly related to toxicity and can therefore be used as a biomarker for As toxicity; they also proved that PC₂ is the predominant PC in the presence of arsenite, in agreement with Schmöger et al. [17].

Several studies have compared the cellular damage induced in plants according to the metal stressor used. Nevertheless, very few have compared PC content in plant extracts as a function of the metal stressor. Thus, PCs induced by Cd and Hg have been determined by Rellán-Álvarez et al. [18], Ortega-Villasante et al. [19] and Sobrino-Plata et al. [20] in *Zea mays* extracts and in *Medicago sativa*, respectively, demonstrating that Cd is a more potent inducer of PC synthesis than Hg, as inferred from the higher proportions of thiols found at high levels of Cd contamination. However, these authors did not always detect PCs, or if detected they were unable to distinguish between different length PCs and could not determine which PC was the most induced by each metal. In another study comparing PCs induced by Cd and Pb in *Phaeodactylum tricornutum* [21], it was observed that when cells were exposed to Pb, the most abundant PC was PC₂, but PC₄ was the most abundant when Cd was added to the cultures. Nevertheless, the higher capacity of Cd to activate PC synthesis remained unproven.

Other studies have been conducted using different toxic elements; for example, Grill et al. [1] analysed the induction of PCs by Cd(II), Bi(III), As(V), Cu(II), Pb(II), Zn(II) and Ag(I) in *Schizosaccharomyces pombe* cells and showed that Cd is the most potent inducer of PCs. In another multi-metal study conducted by Maitani et al. [22], several metalloids were analysed in addition to metals. Ag(I), As(III), As(V), Cd(II), Cu(II), Ga(III), Hg(II), In(III), Ni(II), Pb(II), Pd(II), Se(IV) and Zn(II) were tested as PC inducers in *Rubia tinctorum* roots. However, this study used a time-consuming HPLC methodology with post-column derivatisation. Moreover, the authors did not describe the PC pattern for each metal or whether there were predominant PCs for each metal or not.

In the present study, barley (*H. vulgare*) was selected as the study plant because it is easy and fast to germinate and is readily available since it is a major cereal grain which is widely cultivated. Hydroponic culture (a method of growing plants using only

nutrient solution) is considered a viable research method for phytoremediation studies prior to evaluating the behaviour of plants in greenhouse and/or field soils. Plants were stressed hydroponically with Hg(II), Cd(II) or As(III), and an analysis of the induced PCs was performed using an optimised HPLC methodology with amperometric detection as a sensitive, cheap and fast technique. The results obtained on the different PCs induced by each toxic element were used to apply a more advanced data processing technique in order to identify a pattern in the behaviour observed depending on the contaminating metal and/or its concentration. To this end, chemometrics was applied for the first time in phytoremediation studies. Principal Component Analysis (PCA) was applied to the PC quantification data obtained, with good results. Thus, the aims of this study were (i) to induce PCs in *Hordeum vulgare* plants stressed by different concentrations of several toxic metals and metalloids, (ii) to evaluate heavy metal phytotoxicity in plants, expressed as growth inhibition and total content of these toxic elements in roots and shoots, (iii) to quantify the PCs formed by applying HPLC with amperometric detection using an external calibration curve, and (iv) to apply chemometric tools to the data obtained, in order to evaluate the possible correlation between thiol concentrations in plants and the heavy metal supplied to the plants and/or its concentration level. The results obtained may contribute to improving current knowledge on heavy metal stress response in plants.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

L-cysteine, γ -Glu-Cys (80% purity as trifluoroacetate salt) and Cys-Gly (85% purity) were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Phytochelators (γ -Glu-Cys)_n-Gly ($n=2-5$), as trifluoroacetate salts, were provided by DiverDrugs S.L. (Barcelona, Spain) with a purity ranging from 86.2% to 99.0%. Glutathione (GSH) and As₂O₆ were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). HgCl₂ was purchased from Probus (Badalona, Spain). Cd(NO₃)₂·4H₂O was obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Ca(NO₃)₂, Fe(NO₃)₃·9H₂O and CuSO₄·5H₂O from Probus, KNO₃, MnSO₄·H₂O and ZnCl₂ from Merck and Mg(NO₃)₂·6H₂O, KH₂PO₄, H₃BO₃ and Mo₇O₂₄(NH₄)₆ from Panreac, were used to prepare the Hoagland solution (nutrient solution).

For plant extract preparation, cleaning the column and preparation of all solutions, ultrapure filtered water obtained from USF Purelab Plus (Hamburg, Germany) was used.

2.2. HPLC instrumentation

An Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 chromatographic system was used, equipped with a quaternary pump, a Rheodyne 7725i 20 μ L loop manual injector (Rohnert Park, CA, USA), a vacuum degasser and a handheld control module. An Ascentis C18 5 μ m particle size analytical column measuring 25 cm $\times$ 4.6 mm was provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA). The mobile phase consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in ultrapure filtered water, pH=2.00, and 0.1% TFA in acetonitrile. Gradient separation was achieved at ambient temperature with a gradient profile as described in Dago et al. [23]. The flow rate was 1.2 mL min^{−1}.

The electrochemical detector (ED) was a CC-5C flow cell BAS (West Lafayette, IN, USA), with a three electrode system and a 0.005 in. gasket, connected to an Autolab PGSTAT 12 (Eco Chemie, Utrecht, the Netherlands). GPES software version 4.9.007 (Eco Chemie) was used for potentiostatic control and data acquisition.

The working electrode was a glassy carbon electrode BAS, the surface of which was polished daily using a suspension of 0.3 μ m

alumina particles from Metrohm (Herisau, Switzerland), rinsed thoroughly with ethanol and sonicated for 5 min in ethanol and 5 min in ultrapure filtered water. The optimised potential for the working electrode was 1.2 V. A stainless steel auxiliary electrode and an Ag/AgCl ($\text{NaCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) reference electrode were also used.

2.3. Plant material

Barley (*H. vulgare* cv. Graphic) seedlings were cultivated hydroponically using Hoagland solution adjusted to pH 5.5–6.5. The nutrient solution contained 268 mg L^{-1} of N, 235 mg L^{-1} of K, 200 mg L^{-1} of Ca, 31 mg L^{-1} of P, 0.30 mg L^{-1} of S and 48.6 mg L^{-1} of Mg as macronutrients; 0.5 mg L^{-1} of B, 2.50 mg L^{-1} of Fe, 0.5 mg L^{-1} of Mn, 0.05 mg L^{-1} of Zn, 0.02 mg L^{-1} of Cu and 0.01 mg L^{-1} of Mo as micronutrients. Seeds were placed on top of a mesh situated over a plastic container filled with nutrient solution so that the seeds were slightly in contact with the nutrient solution. Four days after germination, the nutrient solutions were changed for Hoagland solutions to which four different concentrations of Hg(II), Cd(II) or As(III) had been added: 0 (control), 20, 50, and $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. Three pots per treatment with 20 seeds per pot were considered. Barley shoots and roots were collected after 14 days of treatment and fresh weight was obtained from shoots and roots separately. Plants were cleaned with 0.1 mol L^{-1} EDTA solution, frozen at once with liquid nitrogen to disrupt cell walls and stored at -80°C . Subsequently, samples were ground separately in liquid nitrogen.

2.4. Sample preparation for HPLC

Water extraction was selected as the most convenient method for analysis of PCs and their complexes. For this purpose, 100 mg of sample fresh weight was mixed with $500 \mu\text{L}$ of ultrapure filtered water at 1500 rpm for 1 h in an Eppendorf MixMate (Hamburg, Germany). For preconcentration and clean-up of the samples, DSC-18 solid phase extraction cartridges were used in a Visiprep SPE Vacuum Manifold, both supplied by Supelco. For evaporation under a stream of nitrogen, a Visidry drying attachment was used. Prior to the clean-up procedure, samples were filtrated through $0.45 \mu\text{m}$ nylon filter discs by Osmonics (Minnetonka, MN, USA) and pH was adjusted to 2.00 with TFA. SPE cartridges were then conditioned and equilibrated before adding the sample. Finally, the compounds of interest were eluted with methanol leaving behind any impurities not removed in the washing step. After that, the eluent was evaporated and then reconstituted in ultrapure filtered water. Many of the irrelevant signals that appear at low retention times were eliminated through this clean-up procedure, and clear chromatograms were obtained.

2.5. Data treatment

Chromatograms were baseline-corrected and converted into data matrices by means of home-made programs implemented in MATLAB[®] (version 7.9.0.529 (R2009b), MathWorks, Natick, MA).

Principal component analysis (PCA) of the data was performed to obtain qualitative results for pattern recognition. PCA is a linear feature extraction method that consists of projecting the m -dimensional data set (in our case, m being the number of PCs or related peptides) in a dimension smaller than m . The uncorrelated and orthogonal coordinates of this reduced space are the eigenvectors (principal components) of the covariance or correlation matrix of the data set. These new variables are more descriptive because they are chosen to describe the maximum amount of variance in the data matrix. The eigenvalue of a principal component is directly related to the percentage of

“information” contained in the corresponding component, so that only the most relevant components are preserved. In spite of the limitations due to its linearity, PCA is a very useful classification technique which is widely used in the field of analytical chemistry. PLS_Toolbox 3.5 software was used for the PCA [24], and a detailed description of this method is given elsewhere [25].

The distribution of the samples on the principal components, known as the scores plots, is a powerful strategy for classifying samples according to the data measured. These graphs reveal patterns and other features that may be correlated to sample characteristics. An analysis of the distribution of variables (the loadings plot) provided information about their correlations and possible relationships with phytochelatin concentrations. Additionally, a simultaneous study of scores and loadings (biplots) was used to explore the relationships between samples and variables.

2.6. Analysis of total metal content

Approximately 100 mg of fresh sample was digested in glass reactors with 2 mL of HNO_3 . Digestion was conducted at 90°C for 1 h, after which the digested extracts were cooled and diluted with ultrapure water. The samples were then transferred to plastic or glass tubes, depending on the metal analysed (glass tubes in the case of Hg and plastic ones with the other metals), and diluted with 1% HNO_3 . All samples were analysed using an ICP-OES Perkin-Elmer Optima 3200 RL (Waltham, MA, USA) for a first approximation of metal concentrations. Then, following prior dilution where necessary, samples were analysed using an ICP-MS Perkin-Elmer Elan-6000, and 2% rhodium was added as an internal standard. Triplicate analyses of each sample were measured and a blank was then subtracted from the final concentration.

3. Results and discussion

3.1. Effect of Hg, Cd and As on growth inhibition

Plants exposed to different levels of Hg, Cd or As suffered clear symptoms of phytotoxicity after 18 days of treatment, as reflected in the general visible trend towards decreased plant size with increasing heavy metal concentration (Fig. 1). This reduction was particularly evident at the highest concentration. Shoot and root fresh weight (milligrams per seedling) was determined for all levels (Fig. 2). An analysis of growth inhibition revealed a strong correlation between the heavy metal supplied to the plant and

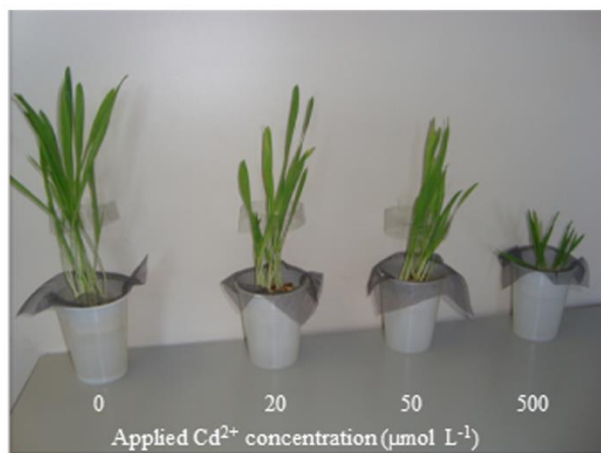


Fig. 1. Seedlings of *Hordeum vulgare* grown hydroponically in the absence and presence of 20, 50 and $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ of Cd(II) for 14 days.

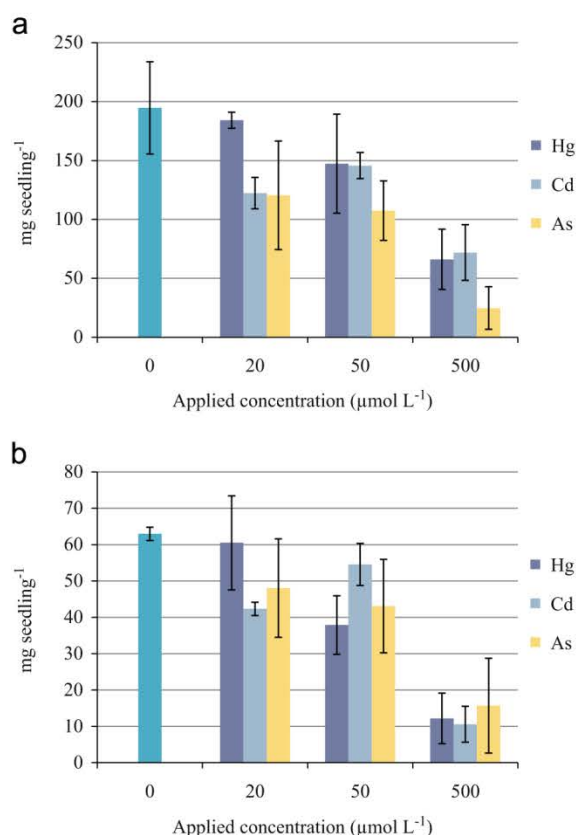


Fig. 2. Effect of Hg, Cd and As on growth of *Hordeum vulgare* seedlings treated with these elements at the indicated concentrations (0, 20, 50 and 500 µmol L⁻¹) for 14 days. Plant fresh weight biomass (milligrams per seedling) of both shoots (a) and roots (b) is represented. The bar in the zero point represents the no-contamination level.

plant biomass. All the toxic elements assayed caused a marked reduction in the fresh weight of shoots and roots, indicating the plants' capacity to uptake heavy metals into their tissues. Regarding the results shown in Fig. 2, plant growth at the first concentration level (20 µmol L⁻¹) was inhibited in a very irregular manner. The relative growth inhibition observed in roots treated with Hg, Cd and As was 4%, 33% and 24%, respectively. In shoots of plants stressed with 20 µmol L⁻¹ of the different heavy metals, a similar decrease in biomass was observed. At 50 µmol L⁻¹ of each toxic element, two different groups were observed in roots: Hg and As caused a relative growth inhibition of between 30% and 40%, whereas Cd caused an inhibition of 13%. All heavy metals provoked a reduction in shoot biomass of plants treated with 50 µmol L⁻¹, which decreased by 25% for Hg and Cd, and 45% for As. Furthermore, at the highest concentration, all heavy metals caused a very marked inhibition of growth of between 75% and 85% in roots and between 65% and 90% in shoots, thus evidencing heavy metal toxicity.

3.2. Heavy metal accumulation in shoots and roots

To investigate the heavy metal uptake efficiency of barley, which was grown under Hg, Cd or As stress, the total heavy metal content in roots and shoots was compared (Table 1). The metal levels in shoots and roots of seedlings grown in 20, 50 and 500 µmol L⁻¹ solutions clearly increased in a dose-dependent manner. Furthermore, the concentration of heavy metals in roots was higher than in shoots.

Heavy metal uptake in shoots and roots was highest for cadmium, with values of 120 ± 21 and 2970 ± 570 µg Cd g⁻¹ of fresh weight in shoots and roots, respectively, for a 500 µmol L⁻¹ Cd-solution. Moreover, although the biomass of plants stressed with 20 and 50 µmol L⁻¹ of Cd was almost equal, the concentration of metal increased at the higher dose and the largest increase was observed at the most contaminated level. In shoots, the Cd uptake concentration was similar to that of As, and much higher than those of Hg. Conversely, roots accumulated similar concentrations of Cd and Hg, whereas uptake of As was lower.

Although the concentration of heavy metals in roots is always higher than that in shoots, some of them are much more mobile than others and can be transferred more easily to the aerial part of plants. Comparing the shoots and roots of plants stressed with three different toxic elements, Hg and Cd would appear to be less mobile because only small quantities of metal were translocated from roots to shoots and, of these, Hg was the least mobile. Conversely, As would seem to be much more mobile in view of the amount absorbed by roots and the concentration of As in shoots. The metal translocation efficiency of any given plant species is indicated by the translocation factor (TF), which is a ratio of the metal concentration in shoots to roots [26]. In the present study, the observed TF values were always smaller than 1, indicating that *H. vulgare* can be classified in the "shoot metal excluder" group which, due to a tendency to store heavy metals in root tissues, is suitable for phytostabilisation of metal-contaminated soils. This accumulation of toxic elements in roots may be a strategy for protecting the aerial parts of plants from the toxicity of these heavy metals [10,18].

3.3. Induced phytochelatins content

As an example, chromatograms of roots stressed with 50 µmol L⁻¹ of Hg, Cd or As are shown in Fig. 3, together with the control level and the standards. The chromatographic peaks were identified by comparing the retention times with those obtained by injection of standards. Quantification was performed by external calibration curves of all the studied thiols and the figures of merit are summarised in Table 2. Tables 3 and 4 present the results obtained from shoots and roots, respectively. As it can be seen, an increase in the heavy metal concentration induced an increase in thiol synthesis. This phenomenon was evidenced by an increase in small thiol or PC concentrations, depending on the stressor element. It can be seen that Cd was by far the most potent PC inducer assayed, with different PCs synthesised and with higher concentrations in both shoots and roots. At the control level, with no heavy metal supplied, GSH and γ-Glu-Cys were detected in both shoots and roots, although PC₂ was also quantifiable in roots. However, this was not unusual, since Rauser [3] detected the presence of GSH, PC₂ and PC₃ in plants grown under normal conditions without heavy metal stress.

Generally, thiol concentrations were higher in roots than in shoots, with a maximum value of 573 ± 14 nmol PC₂ g⁻¹ fresh weight in roots stressed with 20 µmol L⁻¹ of Cd. For all the heavy metals studied, the concentration of thiols in both shoots and roots increased according to the concentration supplied to the plants. The length of the PC chain depended on the level of metal concentration as well as the metal supplied.

In Hg-stressed roots, increasing concentrations of Hg induced the synthesis of PC₂, although a marked decrease in PC₂ content was observed at the most contaminated level when GSH concentrations increased. In media with very high levels of Hg contamination, PC synthesis was inhibited and only its substrate, GSH, was observed. PC content in Hg-stressed shoots was very low, and only PC₃ was observed at the 20 µmol L⁻¹ level and PC₅ at 500 µmol L⁻¹.

Table 1

Heavy metal concentrations (microgram metal per gram fresh weight) in shoots and roots of *Hordeum vulgare* seedlings grown in the absence and presence of Hg, Cd and As (20, 50 and 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for 14 days). Data are mean $\pm$ standard deviation of three replicates.

	Shoots				Roots			
	0	20	50	500	0	20	50	500
Hg	< 0.21	< 0.21	0.36 $\pm$ 0.04	30 $\pm$ 2	< 0.21	17.0 $\pm$ 0.5	36 $\pm$ 3	1740 $\pm$ 110
Cd	0.09 $\pm$ 0.01	8.8 $\pm$ 0.2	14.3 $\pm$ 0.5	120 $\pm$ 21	0.8 $\pm$ 0.2	82 $\pm$ 5	126 $\pm$ 4	2970 $\pm$ 570
As	0.4 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.2	105 $\pm$ 2	22.4 $\pm$ 0.4	37 $\pm$ 6	62 $\pm$ 5	207 $\pm$ 2

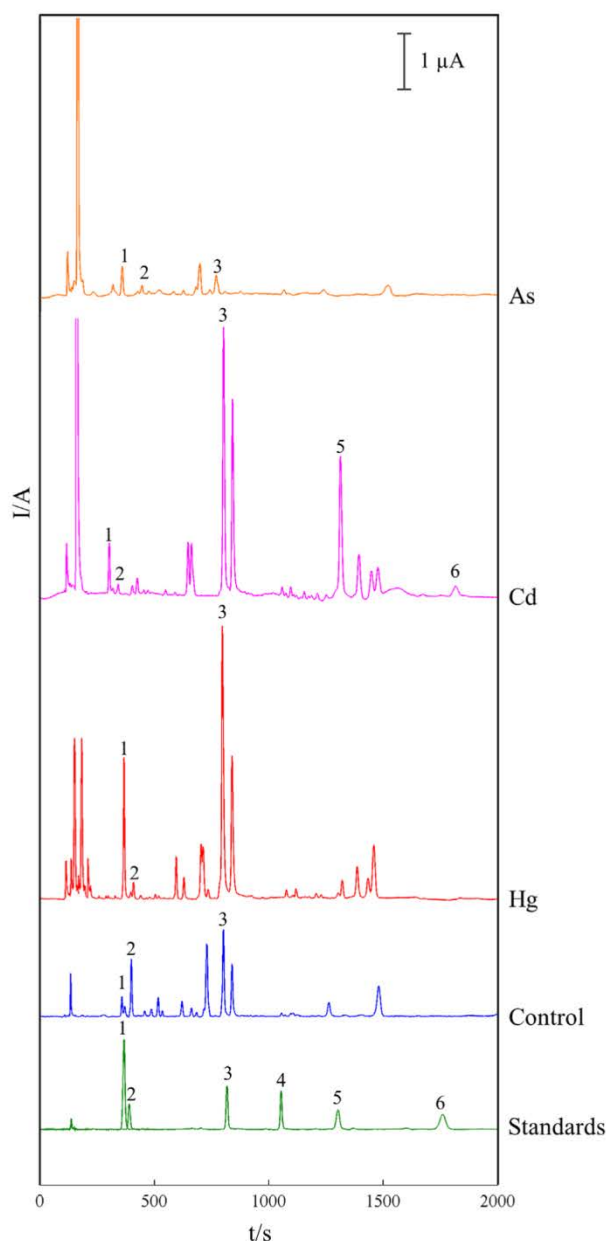


Fig. 3. Chromatograms of barley roots stressed with 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg, Cd and As. It also shows a chromatogram of no-contamination level (control) and a chromatogram of standards (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Peaks correspond to: 1. GSH, 2. γ -Glu-Cys, 3. PC₂, 4. PC₃, 5. PC₄ and 6. PC₅.

Cadmium is more likely to induce the synthesis of longer-chain PCs in both shoots and roots. In addition to GSH and γ -Glu-Cys, PC₃, PC₄ and PC₅ could also be observed in shoots at all levels,

Table 2

Figures of merit for thiol determination by HPLC with amperometric detection at a glassy carbon electrode.

Compound	Calibration function ^a	Detection limit ^b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Quantification limit ^c ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
GSH	$A = 0.315c - 8 \times 10^{-8}$, $r^2 = 0.999$	0.87	2.92
γ -Glu-Cys	$A = 0.158c - 1 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0.999$	1.26	4.20
PC ₂	$A = 0.213c - 4 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0.993$	3.20	10.66
PC ₃	$A = 0.237c - 6 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0.994$	2.88	9.60
PC ₄	$A = 0.209c - 6 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0.987$	4.62	15.42
PC ₅	$A = 0.334c - 6 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0.998$	1.66	5.55

^a A is the peak area (ampere per second) and c the injected concentration (moles per litre).

^b Calculated as three times the standard deviation of the y-intercept and divided by the slope.

^c Calculated as ten times the standard deviation of the y-intercept and divided by the slope.

Table 3

Thiol concentration (nanomoles per gram fresh weight) in shoots of *Hordeum vulgare* stressed with different heavy metals. (n.d. non detectable and n.q. non quantifiable).

	Thiol concentration (nmol g ⁻¹ fresh weight)					
	GSH	γ -Glu-Cys	PC ₂	PC ₃	PC ₄	PC ₅
No metal	21 $\pm$ 4	22 $\pm$ 3	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg	16 $\pm$ 3	14 $\pm$ 6	n.q.	30 $\pm$ 5	n.d.	n.d.
50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg	8 $\pm$ 2	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg	6 $\pm$ 1	n.q.	n.q.	n.d.	n.q.	15 $\pm$ 1
20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cd	n.q.	16 $\pm$ 2	n.d.	71 $\pm$ 12	n.d.	n.d.
50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cd	11.3 $\pm$ 0.7	24 $\pm$ 4	n.d.	125 $\pm$ 6	31 $\pm$ 8	21 $\pm$ 3
500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cd	18 $\pm$ 4	22 $\pm$ 3	n.q.	171 $\pm$ 3	67 $\pm$ 3	50 $\pm$ 1
20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ As	8 $\pm$ 2	40 $\pm$ 2	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ As	21 $\pm$ 2	35 $\pm$ 6	n.q.	67 $\pm$ 10	n.q.	n.d.
500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ As	183 $\pm$ 26	89 $\pm$ 16	n.q.	44 $\pm$ 5	n.q.	n.d.

increasing their proportion as metal content increased. In roots, PC₂ was the most abundant thiol although PC₄ and, at some levels, PC₃ and PC₅, could also be observed. Moreover, the amount of PCs synthesised in Cd experiments was higher by far than in the other ones, indicating that from among the metals studied, Cd is the most potent inducer of PCs. At high Cd levels, a decrease in PC synthesis was observed, similar to that noted with Hg.

In As-stressed plants, longer-chain PCs were practically not synthesised, and the concentration of GSH and γ -Glu-Cys increased as metal levels rose. With As, the only PC synthesised in shoots was PC₃, whereas only PC₂ was detected in roots.

To better compare the formation of thiols with the different heavy metals, the total γ -Glu-Cys units are represented in front of the supplied element concentration in both shoots and roots (Fig. 4). In shoots (Fig. 4a), an increase in heavy metal concentration produced an increase in the formation of γ -Glu-Cys units in almost all cases. Cd was confirmed as being the most potent

Table 4
Thiol concentration (nanomoles per gram fresh weight) in roots of *Hordeum vulgare* stressed with different heavy metals. (n.d. non detectable and n.q. non quantifiable).

	Thiol concentration (nmol g ⁻¹ fresh weight)					
	GSH	γ-Glu-Cys	PC ₂	PC ₃	PC ₄	PC ₅
No metal	14 ± 5	78 ± 22	112 ± 18	n.d.	n.q.	n.d.
20 μmol L ⁻¹ Hg	56 ± 10	n.q.	227 ± 6	n.d.	n.q.	n.d.
50 μmol L ⁻¹ Hg	80 ± 8	15 ± 2	256 ± 42	n.d.	n.q.	n.d.
500 μmol L ⁻¹ Hg	251 ± 27	18 ± 1	194 ± 38	n.d.	n.d.	n.d.
20 μmol L ⁻¹ Cd	48 ± 4	61 ± 5	573 ± 14	n.d.	222 ± 15	n.q.
50 μmol L ⁻¹ Cd	31 ± 3	11 ± 2	388 ± 32	n.d.	294 ± 6	20 ± 4
500 μmol L ⁻¹ Cd	65 ± 11	32 ± 8	177 ± 52	76 ± 14	79 ± 14	n.q.
20 μmol L ⁻¹ As	22 ± 3	n.d.	36 ± 10	n.d.	n.d.	n.d.
50 μmol L ⁻¹ As	33 ± 10	34 ± 14	68 ± 5	n.q.	n.q.	n.d.
500 μmol L ⁻¹ As	81 ± 22	133 ± 33	n.q.	n.d.	n.q.	n.d.

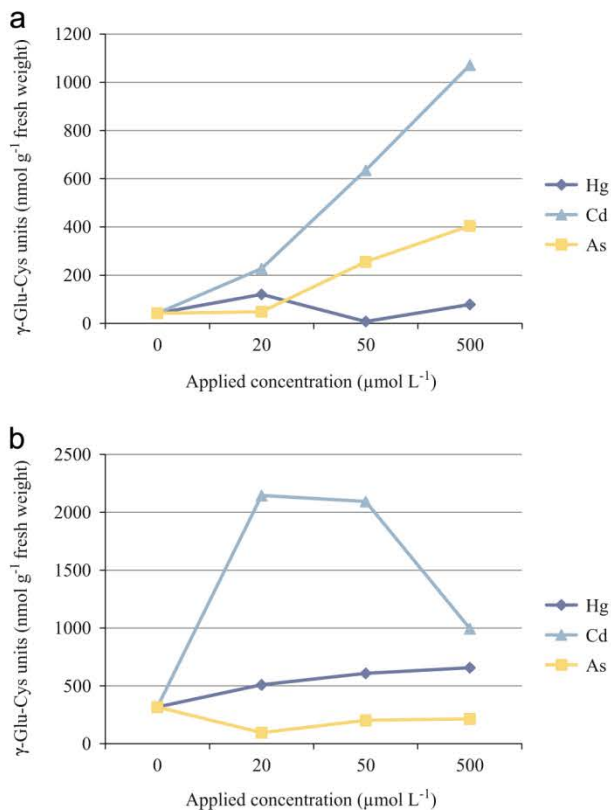


Fig. 4. Total γ-Glu-Cys units (nanomoles per gram fresh weight) synthesised in shoots (a) and roots (b) of *Hordeum vulgare* stressed with different concentrations (0, 20, 50 and 500 μmol L⁻¹) of Hg, Cd and As.

inducer of thiol from among the toxic elements studied. An increase in the units was also observed with As, whereas Hg did not show a visible increase. The presence of thiols in roots (Fig. 4b) was higher than in shoots. Moreover, Cd was also the element that induced most thiols, but its behaviour did not correlate with an increase in heavy metal concentrations. At the 50 μmol L⁻¹ level, the amount of γ-Glu-Cys units appeared to stabilise and began to decrease, probably due to the toxicity of this metal, which as mentioned earlier affects the synthesis of PCs. Hg showed a linear behaviour with an increase in metal concentration, although

with a small slope of the curve. On the other hand, As did not induce a clear increase in thiol units with increased heavy metal concentrations.

3.4. Principal Component Analysis

The biosynthesis of PCs proceeds by stepwise addition of dipeptidyl units to GSH or to the previously formed PC. Our finding that different heavy metal ions induce different chain length PCs suggests that the nature of the ion involved in induction and complexation reactions could affect the capacity of the previously formed PC to act as a γ-Glu-Cys acceptor, as reported by Morelli and Scarano [21]. However, in some cases the amount of synthesised PC does not depend on the stressor element; rather, it is the combination of all the thiols synthesised which yields the pattern that permits identification of the pollutant. Therefore, a Principal Component Analysis (PCA) was performed with the data obtained from PC quantification.

Two different groups of PCA studies were carried out in order to obtain the correlation between the synthesised PCs and (i) the concentration of heavy metal and (ii) the nature of the stressor element. In all PCA studies, the multivariate data (variables) are the concentrations of the different thiols (GSH, γ-Glu-Cys, PC₂, PC₃, PC₄ and PC₅).

The first block of PCA studies was applied to the different heavy metals supplied, and they were performed for shoots and roots separately. Thus, in the first study, six different PCA were performed with different data matrices, the dimensions of which were 4 (objects) × 6 (variables). Note that in this nomenclature, the objects were the four different levels of concentration (0, 20, 50 and 500 μmol L⁻¹), while the variables were the six thiols under study. Six different PCA were performed using the same data arranged in different matrices obtained from the three different metals applied to both shoots and roots.

In the second block of PCA studies, the dimensions of the corresponding data matrices were also 4 (objects) × 6 (variables). In this case, the objects were the three different heavy metals supplied to the plants (Hg, Cd and As) plus the control level (no metal), while the variables were the six thiols studied. This type of data arrangement was applied to six different PCA applications using data on the three different concentrations of metals (20, 50 and 500 μmol L⁻¹) in both roots and shoots.

Before performing all the PCA analyses, data were autoscaled to provide similar weights for all thiols in the PCA model.

The results obtained for the first group of PCA studies indicated a good correlation between the amount of thiols and the concentration of heavy metal supplied to the plant. Nevertheless, the scores plot makes it possible to group the analysed samples according to the different toxic element content in the media only on the basis of thiol content. Moreover, the loadings plot indicates the correlation between the thiol concentrations. As an example, PCA scores and loadings plots of barley shoots stressed with different concentrations of Hg are shown in Fig. 5. The evolution of the magnitude of eigenvalues as a function of the number of components suggests that, in this example, three principal components are significant. The percentages of variance retained by principal components 1, 2 and 3 were 64.64%, 21.18% and 12.71%, respectively; more than 98% of significant information is thus captured by the model. The map of scores (Fig. 5a) shows that the independent replicate samples were always in close positions. This finding is consistent with a satisfactory repeatability of the entire method, from cultivation to analytical measurements. Four characteristic patterns were observed, which are represented by the different levels of metal. As regards the loading plot in this example (Fig. 5b), the distribution of variables on principal components 1 and 2 shows that γ-Glu-Cys and GSH are clustered

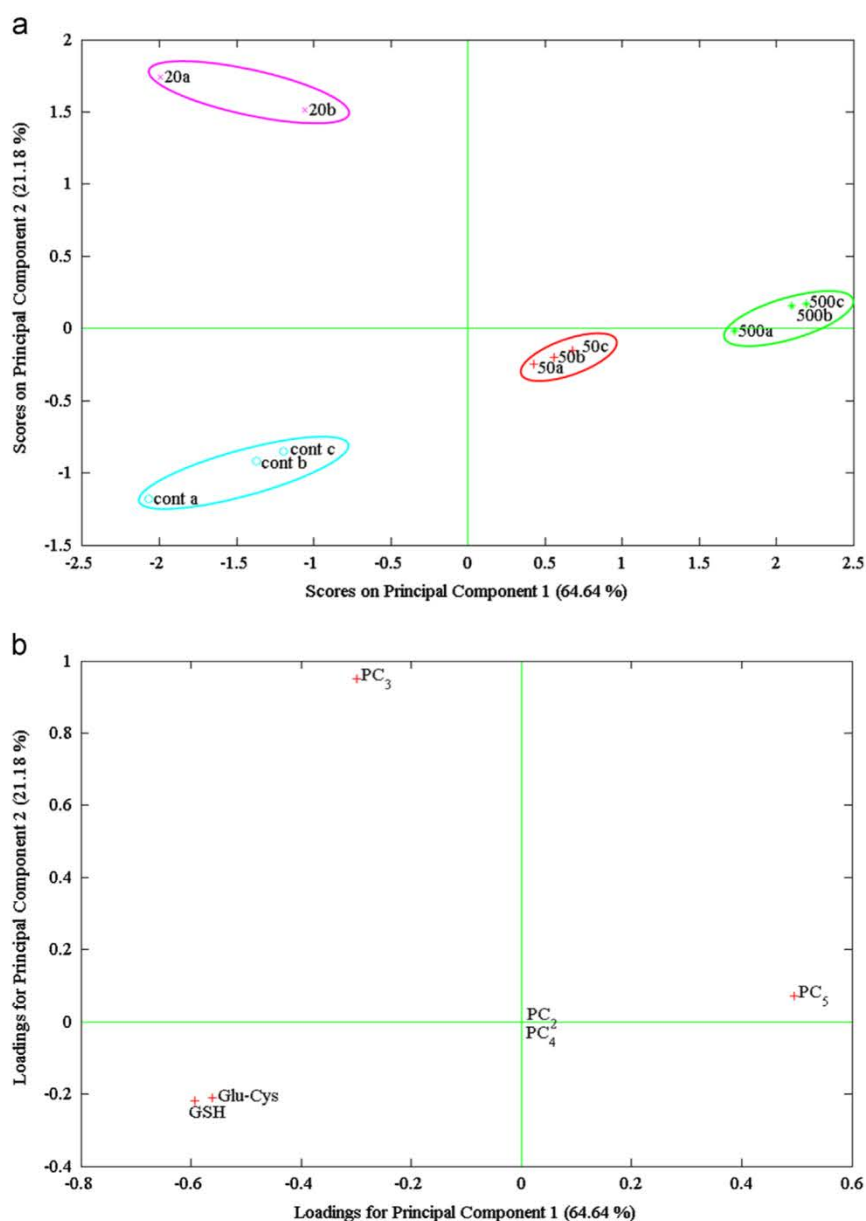


Fig. 5. PCA characterisation of barley shoots stressed with different levels of Hg using thiols concentration as analytical data. (a) Plot of scores of principal component 1 and 2 where *cont* is the control level and 20, 50 and 500 the Hg concentration in micromoles per litre and a, b and c the three independent replicates of each level. (b) Plot of loadings of principal components 1 and 2 where Glu-Cys, GSH, PC_2 , PC_3 , PC_4 and PC_5 are the studied thiols.

to the left. This finding confirms that these two peptides were reasonably correlated and their behaviour was similar. However, in this example, longer-chain PCs did not correlate with each other, although this did occur in other cases. PC_2 and PC_4 appear at the centre, which means that none of the components explains its variance because they are not quantifiable in any of the samples.

A greater wealth of information can be extracted from the simultaneous analysis of scores and loadings (Fig. 5). Principal component 1 confirms that $\gamma\text{-Glu-Cys}$ and GSH were the most representative thiols for control and 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ levels. Moreover, PC_3 was also representative of the 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ level. According to this principal component, PC_5 was more abundant at the 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ level. Principal component 2 indicates that PC_3 was more abundant at the 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ level than in control, whereas in contrast, $\gamma\text{-Glu-Cys}$ and GSH were the predominant

thiols at control level. The 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ level showed a good correlation with PC_5 for principal component 2. The highest concentration (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) showed a good correlation with PC_5 as regards principal components 1 and 2, but $\gamma\text{-Glu-Cys}$ and GSH were not representative of this level, as inferred by their opposite positions in the loadings plot.

These results indicate that smaller thiols are almost always important at low metal concentration levels, whereas longer-chain PCs are more characteristic at high metal concentrations.

The second group of PCA analyses was conducted in order to discriminate the four cases of heavy metal pollutants considered in this study (no contamination, Hg, Cd and As). The results obtained for shoots and roots with all levels considered permitted discrimination of four different clusters in the principal component scores plot. As an example, Fig. 6 shows the scores and loadings

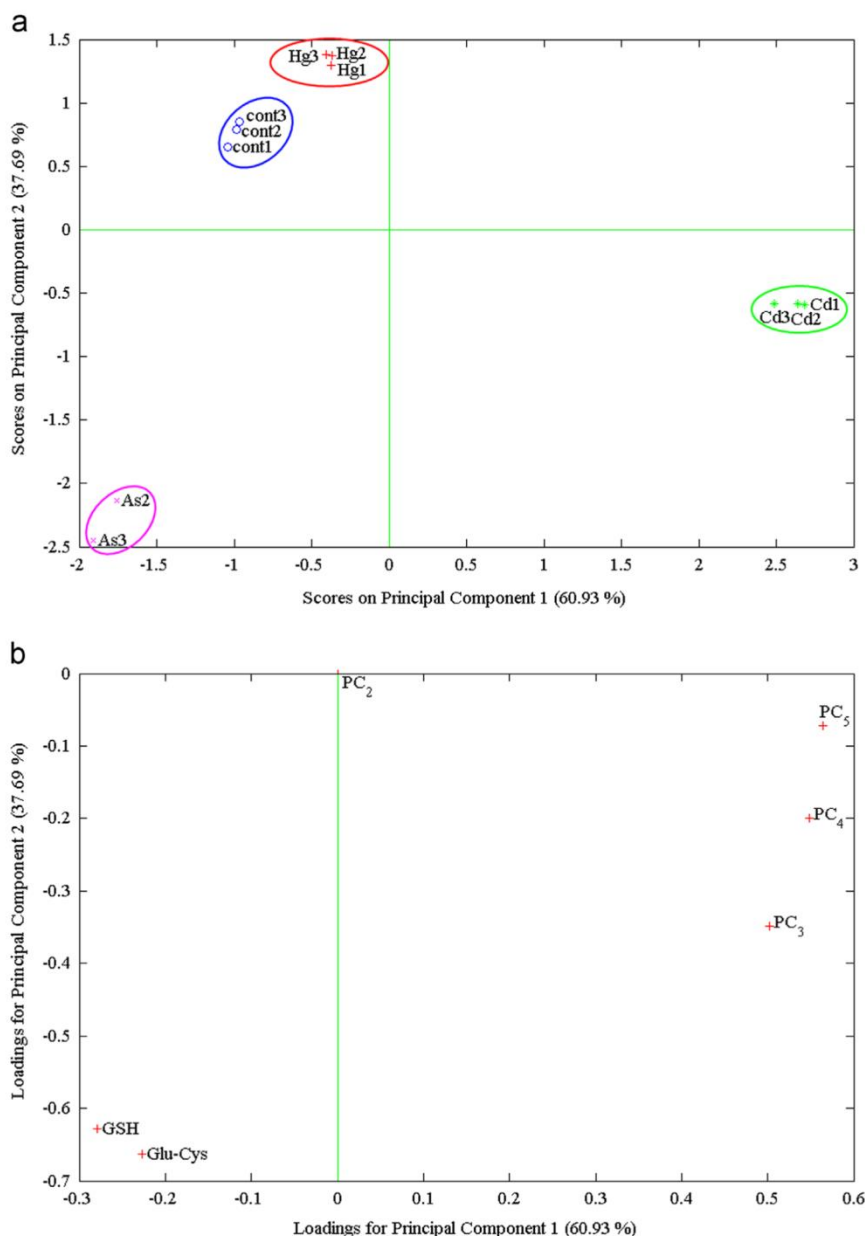


Fig. 6. PCA characterisation of barley shoots stressed with $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ of the different metals studied using thiols concentration as analytical data. (a) Plot of scores of principal component 1 and 2 where cont is the control level (with no-contamination), Hg, Cd and As are the stressing elements and 1, 2 and 3 are the three independent replicates of each heavy metal. (b) Plot of loadings of principal components 1 and 2 where Glu-Cys, GSH, PC₂, PC₃, PC₄ and PC₅ are the studied thiols.

plots for shoots, with $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ of different toxic elements, as a function of the first two principal components. In this case, three principal components explained more than 99% of the variance. Thus 60.93% was captured by principal component 1, 37.69% by principal component 2 and 1.05% by principal component 3. The scores plot (Fig. 6a) shows that samples stressed with the same heavy metal were always close together, which seems to indicate that a pattern of contamination according to the stressor element could be identified depending on the amount and type of thiols synthesised. In the loadings plot (Fig. 6b), the six thiols are represented on the plane between principal components 1 and 2. From this plot, it can be seen that GSH and γ -Glu-Cys are on the left side of the plot, suggesting that they were reasonably correlated and their behaviour was similar. The same is the case for PC₃, PC₄ and PC₅, which appear on the right side. It can also be

stated that these two groups of thiols were inversely correlated with each other because they appear in opposite positions of the plot. However, PC₂ does not show any correlation with the other PCs. As regards principal component 1, it was possible to distinguish between samples containing more GSH and γ -Glu-Cys and samples with PCs. Samples with small thiols should be placed on the left side of the plot, whereas samples where long-chain thiols are more representative should be placed on the right side. Nevertheless, principal component 2 did not distinguish between GSH and γ -Glu-Cys but did differentiate between PCs.

When extracting information from scores and loadings plots together (Fig. 6), for principal component 1, non-contaminated samples or those stressed by As and Hg were more correlated with GSH and γ -Glu-Cys, whereas those stressed by Cd were more related to PC₃, PC₄ and PC₅. Taking into account principal component 2, As

samples correlated most strongly with GSH, γ -Glu-Cys and PC₃, which appear at the bottom of the plot, whereas those stressed by Hg were more related to PC₅, which appears at the top.

Thus, the predominant thiols in plants stressed with high concentrations of As were GSH and γ -Glu-Cys, indicating that As is not a very good inducer of PCs and tends to synthesise small thiols, although some PCs, such as PC₃, may be formed and explained in the PCA model by analysis of scores and loadings of principal component 2. PCs are completely related to Cd contamination and PC₅ was the most abundant thiol in Hg-contaminated samples. On the other hand, the characteristic thiols appearing at control level were GSH and γ -Glu-Cys, but these occupied a higher position in the scores plot because of their low content compared with those of As contamination.

To conclude, *H. vulgare* seems to be a good phytostabilisation plant due to its capacity to accumulate heavy metals in its roots. Cd and Hg were the most uptake metals. The synthesis of PCs was evaluated in Hg, Cd and As stressed plants, and the results indicate that Cd is the most potent inducer of PCs. Using the pattern of PCs and peptides observed by PCA, it is possible to predict the nature of the metal stressor. As was more likely to synthesise small thiols, such as GSH and γ -Glu-Cys, whereas Cd and Hg tended to synthesise PCs.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects CTQ2009-09471 and CTQ2012-32863). Àngela Dago acknowledges the University of Barcelona for a Ph.D. grant.

References

- [1] E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk, FEBS Lett. 197 (1986) 115–119.
- [2] E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 439–443.
- [3] W.E. Rauser, Plant Physiol. 109 (1995) 1141–1149.
- [4] C. Cobbett, P. Goldsbrough, Annu. Rev. Plant Biol. 53 (2002) 159–182.
- [5] D.E. Salt, R.D. Smith, I. Raskin, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49 (1998) 643–668.
- [6] A. Bräutigam, D. Schaumlöffel, G.J. Krauss, D. Wesenberg, Anal. Bioanal. Chem. 395 (2009) 1737–1747.
- [7] J. Najmanova, E. Neumannova, T. Leonhardt, O. Zitka, R. Kizek, T. Macek, M. Mackova, P. Kotrba, Ind. Crops Prod. 35 (2012) 536–542.
- [8] A.A. Mohamed, A. Castagna, A. Ranieri, L. Sanità di Toppi, Plant Physiol. Biochem. 57 (2012) 15–22.
- [9] L. Chen, L. Yang, Q. Wang, Metallomics 1 (2009) 101–106.
- [10] S. Iglesia-Turiño, A. Febrero, O. Jauregui, C. Caldelas, J.L. Arais, J. Bort, Plant Physiol. 142 (2006) 742–749.
- [11] A. Dago, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Intern. J. Environ. Anal. Chem., accepted for publication.
- [12] J.H. Duffus, Pure Appl. Chem. 74 (2002) 793–807.
- [13] K.-J. Appenroth, in: I. Sherameti, A. Varma (Eds.), Soil Biology, vol. 19, Springer, Berlin, 2010, pp. 19–29.
- [14] M. Quaghebeur, Z. Rengel, Plant Physiol. 132 (2003) 1600–1609.
- [15] N. Scott, K.M. Hatlelid, N.E. MacKenzie, D.E. Carter, Chem. Res. Toxicol. 6 (1993) 102–106.
- [16] F.E.C. Sneller, L.M. Van Heerwaarden, F.J.L. Kraaijeveld-Smit, W.M. Ten Bookum, P.L.M. Koevoets, H. Schat, J.A.C. Verkleij, New Phytol. 144 (1999) 223–232.
- [17] M.E.V. Schmöger, M. Oven, E. Grill, Plant Physiol. 122 (2000) 793–801.
- [18] R. Rellán-Álvarez, C. Ortega-Villasante, A. Álvarez-Hernández, F.F. Del Campo, L.E. Hernández, Plant Soil 279 (2006) 41–50.
- [19] C. Ortega-Villasante, R. Rellán-Álvarez, F.F. Del Campo, R.O. Carpena-Ruiz, L.E. Hernández, J. Exp. Bot. 56 (2005) 2239–2251.
- [20] J. Sobrino-Plata, C. Ortega-Villasante, M.L. Flores-Cáceres, C. Escobar, F.F. Del Campo, L.E. Hernández, Chemosphere 77 (2009) 946–954.
- [21] E. Morelli, G. Scarano, Mar. Environ. Res. 52 (2001) 383–395.
- [22] T. Maitani, H. Kubota, K. Sato, T. Yamada, Plant Physiol. 110 (1996) 1145–1150.
- [23] A. Dago, O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Anal. Chim. Acta 695 (2011) 51–57.
- [24] B.M. Wise, N.B. Gallagher, R. Bro, J.M. Shaver, W. Windig, R.S. Koch, PLS_Toolbox 3.5 for use with Matlab, Eigenvector Research Inc., Manson, 2004.
- [25] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [26] S.S. Andra, R. Datta, D. Sarkar, K.C. Makris, C.P. Mullens, S.V. Sahi, S.B.H. Bach, Plant Soil 326 (2010) 171–185.

10.3. Discussió de resultats

En aquest treball s'han cultivat plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* amb la presència de Hg(II), Cd(II), As(III) o Pb(II). Com s'ha comentat a la part experimental, per a la preparació de la solució nutritiva de Hoagland s'utilitza una solució amb gran varietat de nutrients, on després s'hi addiciona la concentració desitjada de metall pesant i, finalment, s'ajusta el pH. En aquest darrer procés, en la preparació de la solució nutritiva tractada amb Pb(II) s'observa la formació d'un precipitat en el si de la solució. En aquest cas, la concentració de plom afegida a la solució nutritiva no es correspon amb la concentració disponible per a la planta ja que part d'aquest plom es troba formant part d'un precipitat i, per tant, no es poden correlacionar els fets observats amb la concentració de plom afegida. Per aquest motiu, tot i que es va continuar amb l'anàlisi d'aquestes plantes, els resultats no es troben publicats. Això no obstant, a continuació es comenten breument els resultats obtinguts.

Les plantes sotmeses a estrès per Pb(II) no semblen patir la toxicitat del plom ja que la biomassa és gairebé constant en tots els nivells de concentració (Taula 16). Això podria ser degut, com s'ha comentat amb anterioritat, a la formació d'un precipitat blanc insoluble a la solució nutritiva, que podria haver restringit l'absorció del Pb per les arrels de les plantes. A causa de la presència de fòsfor a la solució nutritiva a una concentració de 31 mg L^{-1} , aquest precipitat podria ser fosfat de plom, que precipita al pH de la solució nutritiva. En un estudi més exhaustiu de la predicció de l'especiació i la precipitació del Pb en diferents solucions nutritives de Hoagland (variant el pH i el contingut de P i de Cl) [189] s'observa, examinant les constants d'equilibri, que la formació de la sal $(\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl})$ és la més favorable al pH de la solució nutritiva. En aquestes condicions, un 90% del Pb present a la solució nutritiva es troba precipitat. Com és lògic, en incrementar la concentració de P a la solució nutritiva, també augmenta la formació del precipitat. A la literatura, diversos estudis han utilitzat la reacció de precipitació del plom en presència de fosfats per simular la immobilització del Pb en sòls [74]. En el citat treball, s'avalua la reducció de la forma soluble del Pb amb la presència o l'absència de fòsfor en el medi de cultiu mitjançant la comparació de l'acumulació de Pb als brots i a les arrels. Els resultats obtinguts mostren una disminució de l'absorció de Pb del 80-85% a les arrels i del 95-98% als brots quan el fòsfor hi és present.

*Taula 16. Biomassa (mg llavor⁻¹) i contingut de Pb (µg g⁻¹) dels brots i de les arrels de les plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* cultivades hidropònicament i sotmeses a diferents concentracions de Pb(II) (0, 20, 50 i 500 µmol L⁻¹). Es mostra la mitjana ± la desviació estàndard de tres replicats (n.d. no detectable).*

	Biomassa (mg llavor ⁻¹)		Contingut de Pb (µg g ⁻¹)	
	Brots	Arrels	Brots	Arrels
0 µmol L ⁻¹	195 ± 39	63 ± 2	n.d.	n.d.
20 µmol L ⁻¹	139 ± 89	53 ± 26	0,61 ± 0,03	41 ± 1
50 µmol L ⁻¹	203 ± 95	55 ± 25	0,73 ± 0,08	106 ± 5
500 µmol L ⁻¹	187 ± 37	52 ± 16	2,9 ± 0,2	217 ± 16

Quan el Pb precipita a la solució nutritiva en forma de sals insolubles de fosfat, si es relaciona el creixement de la planta amb la concentració de Pb afegida inicialment a la solució nutritiva el resultat obtingut mostra que el Pb sembla ser menys tòxic del que realment és. En aquest cas, l'ús de solucions amb altes concentracions de P i/o valors alts de pH posen en dubte la interpretació dels experiments de fitotoxicitat del Pb.

Per tant, quan s'estudien els efectes tòxics que produeix el Pb(II) en les plantes és important utilitzar solucions nutritives més o menys àcides, diluïdes i amb baix contingut de P per minimitzar els errors d'interpretació resultants de pèrdues importants per precipitació del Pb afegit. No obstant, a causa que sempre hi ha algun risc de precipitació, és altament desitjable relacionar els efectes del Pb en les plantes amb la concentració del metall tòxic mesurada a la solució nutritiva adequadament filtrada enlloc de la concentració de l'element afegida a la solució nutritiva durant el tractament.

En la realització d'aquest estudi amb Pb(II) no es van tenir en compte aquests aspectes per minimitzar la precipitació de sals d'aquest metall. És per aquest motiu que l'estudi de la inducció de PCs per mitjà del Pb(II) no es té en compte en la publicació però els resultats obtinguts sí que es mostren en aquesta Tesi Doctoral.

A la Taula 16 també es mostra el contingut de Pb d'aquestes plantes, tant dels brots com de les arrels. Mentre que el contingut de Pb als brots gairebé es manté constant i és un valor molt petit, les arrels sí que mostren un augment del contingut de Pb assimilat per la planta respecte al Pb(II) afegit a la solució nutritiva. Ara bé, com

s'ha comentat anteriorment, aquests valors només són orientatius degut a què la disponibilitat del Pb per les arrels de les plantes és mínima comparat amb la quantitat afegida a la solució nutritiva.

Pel que fa al contingut de fitoquelatines sintetitzades (Figura 49), tant als brots com a les arrels s'observa la presència de GSH i γ -Glu-Cys, la concentració dels quals augmenta en augmentar la concentració de metall aplicada. A més, l'única PC que s'observa és la PC₂ a les arrels del nivell de màxima concentració de metall. És per això que sembla que per aquest metall la síntesi de PCs no sembla produir-se segurament degut a la poca absorció de metall.

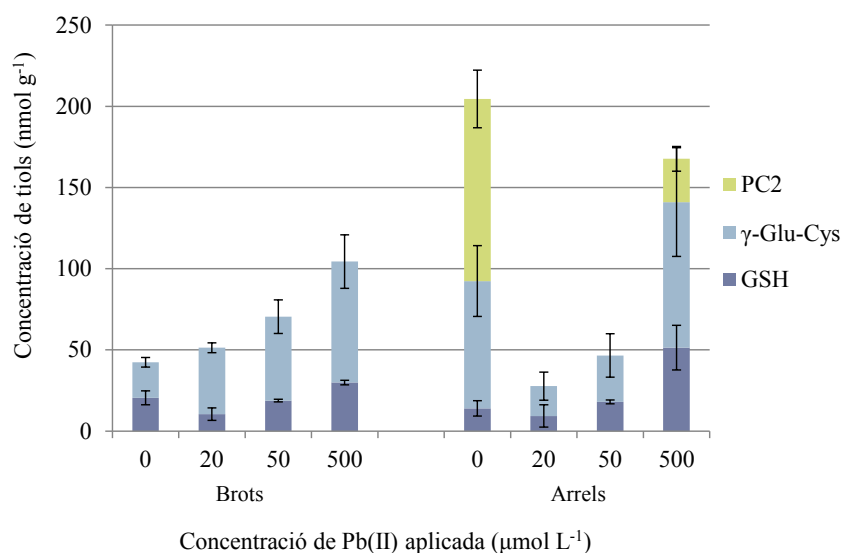


Figura 49. Contingut de tiols (nmol g⁻¹) als brots i a les arrels de les plantes d'ordi cultivades hidropònicament i sotmeses a diferents concentracions de Pb(II) (0, 20, 50 i 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Així doncs, pel que fa a les plantes sotmeses a estrès metàl·lic per plom, no es pot concloure res, ja que el problema de la formació de la sal insoluble a la solució nutritiva, provoca una menor absorció de plom per part de la planta, i per tant una menor inhibició del creixement i un menor efecte inductor de fitoquelatines.

En canvi, les plantes exposades a diferents nivells de Hg(II), Cd(II) o As(III) pateixen clars símptomes de fitotoxicitat després de 18 dies de tractament, com es reflecteix a la tendència general observada de disminució de la mida de la planta amb un augment de la concentració de metall (Figura 1 del treball 10.2). La reducció de la biomassa de les plantes exposades a diferents nivells de Hg(II), Cd(II) o As(III) és

particularment evident a la concentració de metall pesant més alta. Aquest efecte és similar per a tots els elements tòxics considerats.

Tots els metalls pesants assajats provoquen una marcada reducció del pes tant dels brots com de les arrels (Figura 2 del treball 10.2), fet que posa de manifest la capacitat de les plantes per a l'acumulació de metalls pesants als seus teixits. En general, s'observa que la biomassa tant de les arrels com dels brots disminueix a mesura que augmenta la concentració aplicada de metall pesant, encara que les plantes sotmeses a estrès metàl·lic a una concentració de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ tenen una biomassa molt semblant o en alguns casos superior a les tractades amb $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

El creixement de les plantes en el primer nivell de concentració ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) s'inhibeix d'una manera molt irregular. La inhibició relativa del creixement a les arrels tractades amb Hg(II), Cd(II) o As(III) és del 4%, 33% i 24%, respectivament. En els brots de les plantes estressades amb $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ dels diferents metalls, s'observa una disminució similar de la biomassa. A les arrels del nivell de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada metall, s'observen comportaments diferents: el Hg i l'As causen una inhibició del creixement relativa d'entre el 30 i el 40%, mentre que el Cd causa una inhibició del 13%. Als brots tractats amb $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, tots els metalls pesants considerats provoquen una reducció de la biomassa del 25% pel cas del Hg i del Cd i del 45% per l'As. D'altra banda, al nivell de concentració de metall més alta, tots els metalls pesants assajats causen una inhibició molt marcada del creixement entre 75% i 85% a les arrels i entre 65% i 90% als brots, evidenciant així la toxicitat d'aquests metalls pesants.

Per investigar l'eficiència de l'absorció de metalls en plantes d'ordi conreades sota l'estrès de Hg(II), Cd(II) o As(III), es compara el contingut total de metall a les arrels i als brots (Taula 1 del treball 10.2). Els nivells de metalls pesants als brots i a les arrels de les plantes cultivades en presència de 20, 50 i $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ dels diferents elements clarament augmenta d'una manera dependent de la dosi aplicada a la solució nutritiva. D'altra banda, la concentració de metalls pesants a les arrels és superior que als brots.

A la Figura 50 es presenten gràficament els resultats obtinguts. S'observa que el metall que més s'acumula és el Cd tant en brots com en arrels, seguit del Hg en el cas de les arrels, i de l'As en el cas dels brots. L'elevada concentració de Cd podria ser deguda

a una major mobilitat i biodisponibilitat o també a les semblances amb l'ió Ca^{2+} que fa que la planta el confongui i consideri necessari l'ió Cd^{2+} absorbint-lo amb més facilitat.

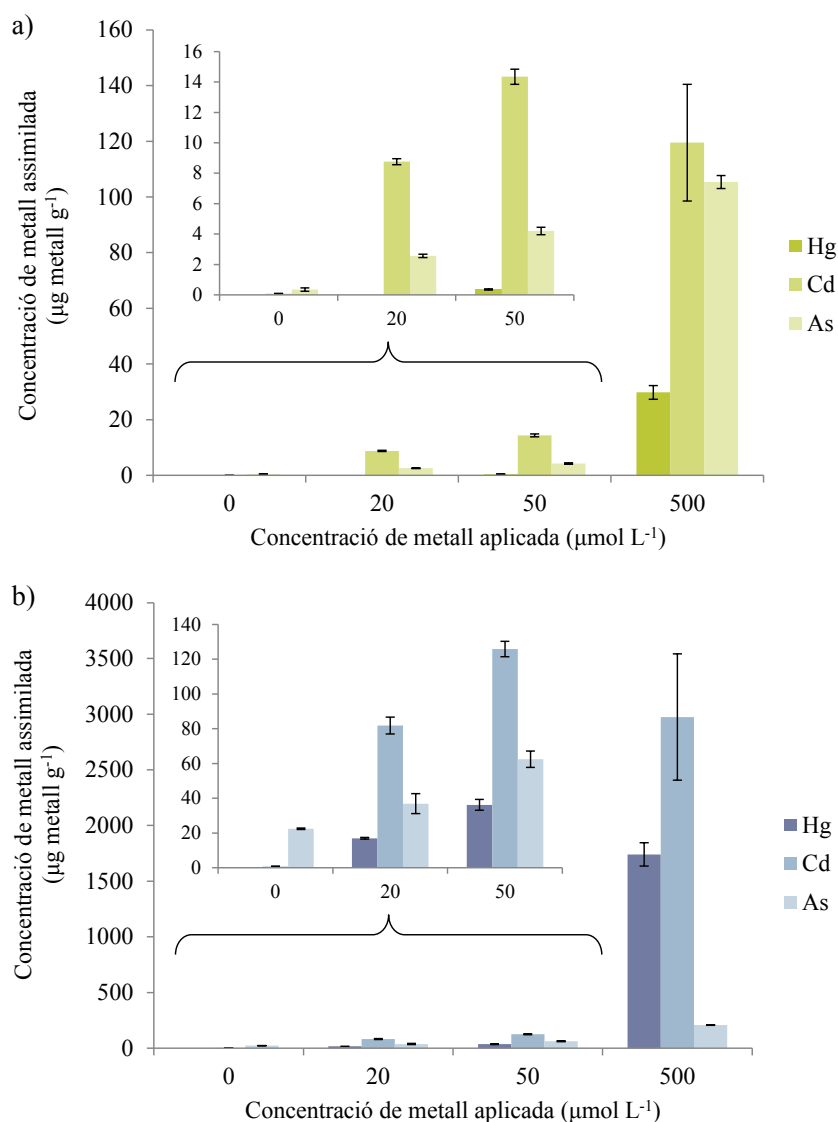


Figura 50. Concentració de metall assimilada ($\mu\text{g metall g}^{-1}$) pels brots (a) i les arrels (b) de les plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* cultivades hidropònicament en presència de Hg(II) , Cd(II) o As(III) .

D'altra banda, encara que la biomassa de les plantes tractades amb 20 i les tractades amb 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd(II) és gairebé igual, la concentració de metalls pesants al nivell de 50 augmenta. En els brots, la concentració de Cd absorbida és similar a la de l'As, i molt més alta que la de Hg. Per contra, les arrels acumulen concentracions similars de Cd i Hg, mentre que la captació d'As és inferior.

Tot i que la concentració de metalls a les arrels és sempre major que als brots, alguns metalls són molt més mòbils que els altres i es poden transferir més fàcilment a la part aèria de les plantes. Si es comparen els brots i les arrels de les plantes cultivades amb els tres metalls pesants, el Hg i el Cd semblen ser menys mòbils ja que només petites quantitats de metall són transportades des de les arrels als brots i, entre aquests, el Hg és el menys mòbil. Per contra, l'As sembla molt més mòbil si és té en compte la quantitat absorbida per les arrels i la concentració d'As als brots. L'eficiència de la translocació del metall en qualsevol espècie de planta s'indica mitjançant el factor de translocació (TF), que és la relació entre la concentració de metalls als brots i a les arrels [74]. En el present estudi, els valors de TF calculats són sempre menors que 1, fet que indica que l'*Hordeum vulgare* pot ser classificada al grup de les plantes exclusores que, a causa de la tendència a emmagatzemar metalls pesants als teixits de les arrels, és adequada per a la fitostabilització de metalls en sòls contaminats. Aquesta acumulació de metalls a les arrels pot ser una estratègia per a la protecció de les parts aèries de les plantes de la toxicitat d'aquests metalls [121, 139].

Per a la determinació del contingut de fitoquelatines, s'injecten els extractes, tant de fulles com d'arrels, al cromatògraf. Com a exemple, a la Figura 3 del treball 10.2 es poden veure els cromatogrames d'extractes d'arrels de les plantes sotmeses a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), Cd(II) o As(III), juntament amb el nivell de control i els patrons dels tiols analitzats.

A les Taules 3 i 4 del treball 10.2 i a la Figura 51 es presenten els resultats obtinguts de la quantificació de les fitoquelatines i dels seus fragments, tant dels brots com de les arrels. Com es pot veure, un augment en la concentració de metall pesant indueix un augment en la síntesi de tiols. Aquest fenomen s'evidencia per un augment de la concentració dels tiols petits o bé un augment de la síntesi de PCs, depenent de la naturalesa de l'element estressant. Es pot observar que el Cd és, sens dubte, l'inductor de PCs més potent, amb diferents PCs sintetitzades i amb majors concentracions tant en brots com en arrels. En el nivell de control, amb cap metall subministrat, es detecta GSH i γ -Glu-Cys en brots i arrels, i també PC₂ a les arrels. No obstant, com es comenta al treball anterior, això no és un fet inusual, ja que a la bibliografia hi ha treballs on es detecta la presència de GSH, PC₂ i PC₃ en plantes cultivades en condicions normals i sense estrès per metalls pesants [87].

En general, la concentració dels tiols és major a les arrels que als brots, amb un valor màxim de 573 ± 14 nmol PC₂ g⁻¹ a les arrels de les plantes estressades amb 20 µmol L⁻¹ de Cd(II). Per tots els elements tòxics estudiats, la concentració de tiols tant en brots com en arrels s'incrementa d'acord amb la concentració de metall pesant subministrat a les plantes. La longitud de la cadena de les PCs sintetitzades depèn del nivell de concentració de metall pesant, així com de la naturalesa de l'element subministrat.

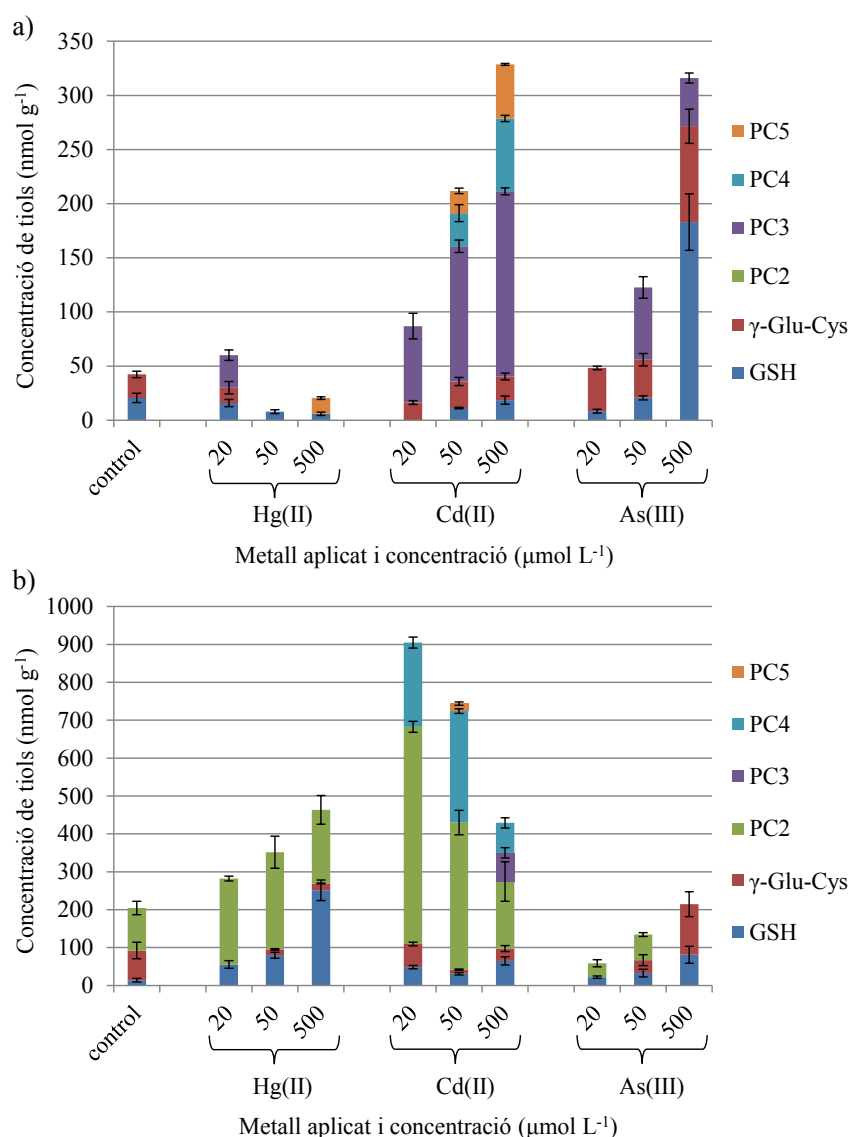


Figura 51. Resultats obtinguts de la quantificació dels tiols (nmol g⁻¹) als brots (a) i a les arrels (b) de plantes de l'espècie *Hordeum vulgare* cultivades hidropònicament i sotmeses a diferents concentracions de Hg(II), Cd(II) o As(III) (0, 20, 50 i 500 µmol L⁻¹).

S'observa que tots els metalls sintetitzen tiols petits (GSH i γ -Glu-Cys). El Cd(II) és el metall més inductor de fitoquelatines, tant en brots com en arrels. D'altra banda, tant el Hg(II) com l'As(III) sintetitzen únicament fitoquelatines de cadena curta com la PC₂ en el cas del Hg o la PC₂ i la PC₃ en el cas de l'As. En totes les arrels sotmeses a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metall s'observa un comportament similar: un augment de la concentració de GSH i de γ -Glu-Cys seguit d'una disminució de la concentració de fitoquelatines. Aquest comportament podria ser degut a la inhibició de la síntesi de PCs a causa de l'elevat contingut de metall aplicat.

Una manera d'avaluar la tendència de les plantes a generar PCs i compostos relacionats quan estan sotmeses a estrès metàl·lic és, enlloc de considerar els compostos individuals generats, avaluar la quantitat total d'unitats γ -Glu-Cys que es generen. Així a la Figura 4 del treball 10.2 es representa el contingut total d'unitats γ -Glu-Cys enfront de la concentració de metall subministrada a les plantes, tant en brots com en arrels. En general s'observa que el Cd és el metall més inductor de grups tiol i el menys inductor és el Hg en el cas dels brots i l'As en les arrels.

En brots (Figura 4a del treball 10.2), un augment de la concentració de metall produeix un augment d'unitats γ -Glu-Cys en gairebé tots els casos. Es confirma el Cd(II) com l'inductor més potent de compostos tiòlics entre els metalls pesants estudiats. També s'observa un augment de les unitats γ -Glu-Cys pel cas de les plantes sotmeses a As(III), mentre que les de Hg(II) no mostren un augment important. La presència de tiols a les arrels (Figura 4b del treball 10.2) és major que als brots. D'altra banda, el Cd també és el metall més inductor de grups tiol, però el seu comportament no està massa correlacionat amb un augment de la concentració de metall. Al nivell de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd(II), la quantitat d'unitats de γ -Glu-Cys sembla que s'estabilitza i, fins i tot, comença a disminuir, possiblement degut a una inhibició del procés de síntesi de grups tiols provocada per l'elevada concentració de metall aplicada. D'altra banda, a les plantes sotmeses a Hg(II) el contingut de tiols mostra un comportament lineal amb l'augment de la concentració de metall, encara que amb un pendent petit de la corba. L'As(III) no sembla induir un clar augment de les unitats tiol en funció de la concentració aplicada.

La biosíntesi de PCs es produeix mitjançant l'addició d'unitats γ -Glu-Cys a la molècula de GSH o a una PC prèviament formada. La conclusió que els diferents ions

metàl·lics indueixen PCs de diferent longitud de cadena suggereix que la naturalesa de l'ió metàl·lic implicat en les reaccions d'inducció i complexació podria afectar la capacitat de la PC prèviament formada per actuar com un acceptor d'unitats γ -Glu-Cys, segons publiquen Morelli i Scarano [109]. No obstant això, en alguns casos, no hi ha una PC característica d'aquell element en qüestió, sinó que és una combinació de tots els tiols sintetitzats que produeix el patró que permet la identificació del metall contaminant.

Amb l'objectiu de correlacionar l'efecte dels metalls pesants considerats amb la síntesi de fitoquelatines, s'aplica l'anàlisi de components principals (PCA) a les dades obtingudes del contingut de PCs. Es duen a terme dos grups diferents d'estudis de PCA per tal d'obtenir la correlació entre les PCs sintetitzades i la concentració, o bé la naturalesa de l'element estressant. En tots els estudis de PCA, les dades multivariants (variables) són les concentracions dels diferents tiols (GSH, γ -Glu-Cys, PC₂, PC₃, PC₄ i PC₅).

El primer bloc d'estudis de PCA s'aplica als diferents metalls pesants subministrats, i es duu a terme pels brots i per les arrels per separat. Per tant, en el primer bloc es realitzen 6 PCA diferents amb les seves matrius corresponents, les dimensions de les quals són 4 objectes $\times$ 6 variables. Els 4 objectes són els diferents nivells de concentració de metall aplicat (0, 20, 50 i 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$), mentre que les variables corresponen als sis tiols estudiats (GSH, γ -Glu-Cys, PC₂, PC₃, PC₄ i PC₅).

El segon bloc s'aplica als diferents nivells de metall pesant subministrats i es duen a terme pels brots i per les arrels per separat. Així doncs, en el segon estudi es realitzen 6 PCA diferents amb les seves corresponents matrius. Les dimensions de les matrius són també de 4 objectes $\times$ 6 variables, encara que en aquest cas, els objectes són els 3 metalls utilitzats (Hg, Cd i As) i el nivell de no-contaminació (quan no hi hem afegit metall), mentre que les variables són els 6 tiols estudiats.

Els resultats obtinguts per al primer grup d'anàlisi de PCA indiquen una bona correlació entre la quantitat de tiols i la concentració del metall pesant subministrat a la planta. Els gràfics de *scores* permeten agrupar les mostres segons la concentració del metall a la solució nutritiva, només tenint en compte el contingut de tiols. En canvi, el gràfic de *loadings* explica la correlació entre la concentració dels diferents tiols.

Tots els PCA realitzats es mostren a l'annex, encara que en aquesta memòria s'explicarà un PCA de cada tipus. Com a exemple del primer tipus de PCA, s'explica els gràfics de *loadings* i *scores* dels brots sotmesos a estrès metàl·lic per Hg(II) (Figura 5 del treball 10.2). Els components principals significatius en aquest PCA són l'1, el 2 i el 3 i els percentatges de variància explicats per aquests components són 64,64%, 21,18% i 12,71%, respectivament, explicant en total més d'un 99% de la variància.

En el gràfic de *scores* (Figura 5a del treball 10.2) es veuen els grups ben diferenciats segons el nivell de concentració aplicada de Hg, això informa de la bona reproductibilitat del sistema. També es pot veure que les mostres replicades sempre estan en posicions properes. Aquesta troballa és consistent amb una repetibilitat satisfactòria de tot el mètode, des del cultiu fins a les mesures analítiques.

Per altra banda, en el gràfic de *loadings* (Figura 5b del treball 10.2) la distribució de les variables mostra que la γ -Glu-Cys i el GSH estan agrupats a l'esquerra. Aquest fet confirma que aquests dos pèptids estan raonablement correlacionats i el seu comportament és similar. No obstant això, en aquest exemple, les PCs de cadena més llarga no es correlacionen entre si, encara que sí que ho fan en altres casos. La PC₂ i la PC₄ apareixen al centre, fet que significa que cap dels components principals explica la seva variància degut a què no són quantificables en cap de les mostres.

A l'estudiar els dos gràfics alhora (Figura 5 del treball 10.2) s'observa que els brots de control estan correlacionats directament amb el GSH i la γ -Glu-Cys ja que es troben a la part inferior esquerra del gràfic. Els brots de les plantes tractades amb 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II) estan directament correlacionats amb la PC₃ ja que es troben a la part superior esquerra del gràfic i també amb el GSH i la γ -Glu-Cys mitjançant el component principal 1. Els brots de les plantes tractades amb 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg, tot i que es poden diferenciar de la resta, només estan relacionats amb la PC₅ mitjançant el component principal 2. Finalment els brots tractats amb 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg estan directament correlacionats amb la PC₅ ja que estan a la part dreta i al centre de la gràfica. Per tant, es pot dir, que els brots que han estat sotmesos a una concentració elevada de Hg(II) són més inductors de fitoquelatines de cadena llarga i, en canvi, els tiols petits com ara el GSH i la γ -Glu-Cys són característics dels nivells amb baixa concentració de metall.

El segon grup d'anàlisi de PCA es va dur a terme per tal de discriminar entre els quatre casos de contaminació per metalls considerats (sense aplicar metall, Hg, Cd o As). Els resultats obtinguts pels brots i les arrels han permès la discriminació de 4 grups diferents en els gràfics de *scores* de tots els nivells considerats.

Com a exemple del segon tipus de PCA, s'explica els gràfics de *loadings* i *scores* dels brots de les plantes sotmeses a estrès metàl·lic per $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ dels diferents elements tòxics (Figura 6 del treball 10.2). Els components principals significatius també són l'1, el 2 i el 3 i els percentatges de variància explicats per aquests components són 60,93%, 37,69% i 1,05%, respectivament.

En el gràfic de *scores* (Figura 6a del treball 10.2) s'observa que les mostres estressades amb el mateix metall estan sempre properes, fet que sembla indicar que es podria identificar un patró de contaminació d'acord amb l'element estressant en funció de la quantitat i el tipus de tiols sintetitzats.

Per altra banda, en el gràfic de *loadings* (Figura 6b del treball 10.2) els sis tiols es troben representats en el pla definit pels components 1 i 2. En aquest gràfic s'observa que el GSH i la γ -Glu-Cys es troben a la part esquerra del gràfic, fet que suggereix que es correlacionen entre si i el seu comportament és similar. El mateix ocorre amb la PC₃, la PC₄ i la PC₅, que es troben a la part dreta del gràfic. També es pot afirmar que aquests dos grups de tiols estan inversament correlacionats entre ells, ja que apareixen en posicions oposades del gràfic. A més a més, la PC₂ no mostra cap correlació amb les altres PCs. El component principal 1 (eix x) permet diferenciar les mostres que contenen més GSH i γ -Glu-Cys de les que contenen més PCs. Les mostres amb més tiols petits es col·loquen a la part esquerra del gràfic, mentre que a la part dreta s'hi troben les mostres on són més representatives les PCs. Per altra banda, el component principal 2 (eix y) no permet establir diferències entre el GSH i la γ -Glu-Cys però sí que pot diferenciar les diferents PCs.

A l'estudiar els dos gràfics alhora (Figura 6 del treball 10.2) s'observa que, segons el component principal 1, els brots de les plantes de control i les tractades amb As(III) i Hg(II) són els que estan més correlacionats amb el GSH i la γ -Glu-Cys, mentre que els brots de les plantes tractades amb Cd(II) estan més correlacionats amb la PC₃, la PC₄ i la PC₅. Tenint en compte el component principal 2, les mostres de les plantes tractades

amb As estan més correlacionades amb el GSH, la γ -Glu-Cys i la PC₃ ja que apareixen a la part inferior de la gràfica mentre que les estressades amb Hg(II), que apareixen a la part superior, són les més correlacionades amb la PC₅.

Per tant, els tiols predominants a les plantes estressades amb altes concentracions d'As(III) són el GSH i la γ -Glu-Cys. Aquest fet indica que l'As(III) que no és bon inductor de PCs i tendeix a sintetitzar tiols petits, encara que es poden detectar algunes PCs, com ara la PC₃, aquestes però, s'expliquen en el model de PCA mitjançant l'anàlisi dels *scores* i *loadings* del component principal 2. Les PCs estan totalment relacionades amb la contaminació per Cd(II) i la PC₅ és el tiol més abundant a les mostres contaminades amb Hg(II). D'altra banda, els tiols característics que apareixen al nivell de control són el GSH i γ -Glu-Cys, però aquests ocupen una posició superior al gràfic de *scores* a causa del seu baix contingut en comparació amb els contaminats amb As(III).

Per concloure, l'*Hordeum vulgare* sembla una bona planta per a la fitostabilització per la seva capacitat d'acumular metalls pesants a les arrels. El Cd(II) i el Hg(III) són els metalls més absorbits per les plantes. En avaluar la síntesi de PCs en plantes contaminades amb Hg(II), Cd(II) o As(III) els resultats indiquen que el Cd(II) és l'inductor més potent de PCs. Utilitzant el patró de PCs i pèptids obtinguts pel PCA, és possible predir la naturalesa del metall estressant. El Cd(II) i Hg(II) tendeixen a sintetitzar fitoquelatines mentre que l'As(III) és més propens a sintetitzar tiols petits, com ara GSH i γ -Glu-Cys.

Anàlisi de plantes de la zona d'Almadén

Aquest capítol engloba un treball corresponent a l'aplicació de la metodologia desenvolupada anteriorment a l'estudi de les fitoquelatines induïdes en plantes de la zona d'Almadén (Ciudad Real), mundialment coneguda per les seves mines de mercuri i considerada una de les zones més contaminades per mercuri del món. En aquest treball s'estudien plantes de les espècies *Asparagus acutifolius* i *Retama sphaerocarpa* crescudes de forma natural en aquesta zona.

Es consideren diverses zones amb diferent contingut de Hg i s'analitza el contingut de Hg de les parts aèries i subterrànies per separat, així com el contingut de fitoquelatines i dels seus complexos amb Hg. També es considera el contingut de Hg del sòl, tant el contingut total com les fraccions extractables amb diversos solvents i es correlaciona amb el contingut de Hg i de PCs sintetitzades a les plantes per obtenir més informació sobre els mecanismes que tenen les plantes crescudes en aquesta zona per fer front a la toxicitat del mercuri.

11.1. Introducció

El districte miner d'Almadén (Ciudad Real, Espanya) és conegut per tenir els majors dipòsits de mercuri del món descoberts fins a l'actualitat [190, 191]. A causa d'això, es pot considerar com un dels llocs més contaminats amb Hg de la Terra [23]. El districte miner d'Almadén cobreix una àrea d'uns 300 km² i compta amb moltes mines de mercuri que ara estan inactives, però que en els seus gairebé 2.000 anys d'activitat han produït al voltant d'un terç del mercuri consumit per la humanitat [190]. El poble d'Almadenejos té el seu origen en el descobriment i l'explotació de les mines de Hg properes al poble, incloent les mines de *La Vieja Concepción* i *La Nueva Concepción* [190]. Almadenejos va albergar també un recinte metal·lúrgic històric que contenia els forns on s'extreia el mercuri de les menes de cinabri. Aquest antic recinte metal·lúrgic, conegut com a *Cerco de Almadenejos*, pot ser considerat com un dels llocs més contaminats amb mercuri de tot el districte miner d'Almadén, com es veu en els estudis de sòls, aigua i sediments [24, 25, 192].

El desenvolupament i el creixement de les activitats mineres, la metal·lúrgia i la indústria han augmentat la concentració de metalls pesants al medi ambient, exposant així els animals i les plantes a altes concentracions d'aquests contaminants. Això ha fet que l'exposició humana a aquests metalls sigui més probable a través de la ingesta, la inhalació o el contacte amb la pell. Atès que les plantes són la principal font d'aliments per al consum humà, la presència de metalls pesants en elles és de gran interès. Les plantes poden absorbir els metalls dels sòls, l'aigua i l'aire, tot i que la principal font d'absorció de metalls és el sòl. La captació de metalls no depèn només del contingut total de metalls als sòls, sinó també de la seva bioaccessibilitat per a les arrels i de la transferència a través de la interfase sòl-arrel. La quantitat total de metalls en un sòl és afectada pels recursos naturals inherents de la zona en particular, a més de l'agricultura i de les activitats industrials [193].

La toxicitat i la mobilitat dels compostos de mercuri al medi ambient estan estretament relacionades amb la seva forma química. Les espècies de mercuri més comunes que es troben prop dels jaciments miners de mercuri són el cinabri i altres sulfurs de mercuri, l'òxid de mercuri, el mercuri metàl·lic i els compostos orgànics de mercuri. Malgrat això, també poden estar disponibles en aquest tipus de sòl altres formes inorgàniques. D'altra banda, les concentracions totals de metalls als sòls no són

un bon indicador de la biodisponibilitat i tampoc són una bona eina per a l'avaluació del risc, a causa dels variats i complexos patrons de distribució dels metalls entre les diverses espècies químiques o fases del sòl.

De tots els estudis del districte miner d'Almadén, no n'existeix cap que avaluï l'estrès causat pels metalls pesants a les plantes degut a les altes concentracions de Hg trobades als sòls, sediments, aigua o aire. No obstant això, diversos investigadors han estudiat la distribució del mercuri en aquesta zona. Higuera *et al.* [25] i Martínez-Coronado *et al.* [192] posen èmfasi en les altes quantitats de mercuri que es troben als sòls i postulen les possibles fonts de Hg. Ferrara *et al.* [194] i Higuera *et al.* [195] analitzen el Hg atmosfèric i determinen les principals fonts d'emissió i els fluxos de Hg del poble d'Almadén. El medi aquàtic s'ha analitzat per Berzas Nevado *et al.* [196], Gray *et al.* [24] i Rodríguez Martín-Doimeadios *et al.* [197], que determinen el contingut de Hg en aigües, sediments i bivalves. En l'estudi de Higuera *et al.* [23] es fa una anàlisi del contingut de Hg en els sediments, el sòl i l'aigua i es compara amb altres districtes miners per arribar a la conclusió que el districte miner d'Almadén és el lloc més contaminat amb mercuri del món. Les plantes del districte miner d'Almadén també han estat estudiades mitjançant una anàlisi completa del contingut de mercuri en treballs publicats per Millán *et al.* [198] i Molina *et al.* [199], on assenyalen el diferent comportament de diverses plantes en l'absorció del mercuri. Un altre estudi determina el Hg en plantes cultivades al laboratori utilitzant sòl provinent d'Almadén i comparant els resultats amb plantes cultivades en sòl vermiculita:perlita enriquit amb Hg [197]. En aquest article, s'observa una baixa acumulació de mercuri a les plantes dels sòls provinents d'Almadén, que s'atribueix a la baixa biodisponibilitat del mercuri en aquests sòls. Malgrat això, en cap d'aquests estudis s'avaluen les PCs i els complexos Hg-PC com a marcadors de l'estrès per metalls pesants.

En el present estudi, es selecciona l'*Asparagus acutifolius* com a planta d'estudi, perquè és una espècie perenne que creix de forma natural en gairebé totes les zones del districte miner d'Almadén [199]. S'escullen diverses zones amb diferents concentracions de mercuri i es recullen mostres de plantes i de sòls. S'analitzen per separat les parts aèries i subterrànies de les plantes d'aquestes zones per determinar el contingut total de Hg, així com les concentracions de PCs i dels seus complexos amb Hg. El contingut de Hg dels sòls també es va analitzar, incloent tant el contingut de Hg total com les diferents fraccions extractables amb diferents solvents. En una segona part

del treball es considera també la *Retama sphaerocarpa*, un arbust pertanyent a la família de les lleguminoses, que només es va trobar en una de les zones de mostreig. Així, es correlacionen tots els paràmetres analitzats en les dues espècies diferents procedents de la mateixa zona. No obstant, aquesta part de l'estudi on es compara l'acumulació de Hg i la síntesi de PCs en dues espècies diferents no s'ha considerat en la preparació del manuscrit. Els objectius d'aquest estudi són: *i)* examinar si les plantes conreades al districte d'Almadén acumulen mercuri dels sòls contaminats; *ii)* analitzar aquestes mostres per HPLC amb detecció amperomètrica tenint en compte les PCs induïdes i els complexos Hg-PC formats tant a les parts aèries com a les arrels per tal d'obtenir més informació sobre els mecanismes que tenen les plantes per fer front a la toxicitat dels metalls; *iii)* correlacionar el contingut de PCs i dels seus complexos amb mercuri amb el metall extractable del sòl en unes determinades condicions i, *iv)* comparar els resultats de les anàlisis de les plantes d'esparreguera (*Asparagus acutifolius*) amb la ginesta (*Retama sphaerocarpa*) procedents de la mateixa zona.

11.2. Evaluation of mercury stress in plants from the Almadén mining district by analysis of phytochelatins and their Hg complexes

A. Dago, I. González, C. Ariño, A. Martínez-Coronado, P. Higuera, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban

Manuscrit enviat per a la seva publicació

Evaluation of mercury stress in plants from the Almadén mining district by analysis of phytochelatin and their Hg complexes

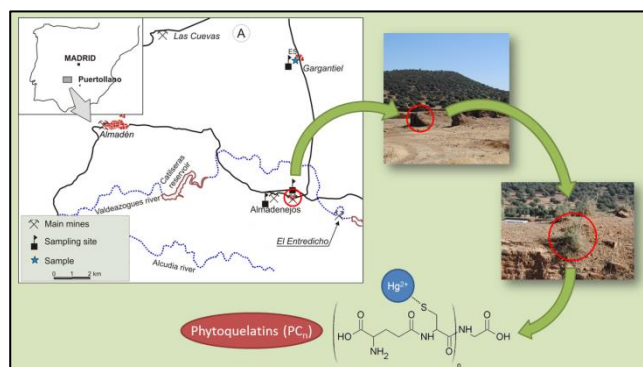
Àngela Dago^a, Inmaculada González^a, Cristina Ariño^{a,*}, Alba Martínez-Coronado^b, Pablo Higuera^b, José Manuel Díaz-Cruz^a and Miquel Esteban^a.

^aDepartament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès, 1-11, 08028 Barcelona (Spain). Phone: (+34) 93 402 15 45. Fax: (+34) 93 402 12 33. E-mail: cristina.arino@ub.edu

^bInstituto de Geología Aplicada, Escuela de Ingeniería Minera e Industrial de Almadén, Universidad de Castilla-La Mancha, Plaza M. Meca 1, 13400 Almadén (Spain).

ABSTRACT

To evaluate plant response to Hg stress, phytochelatin and their Hg complexes were analysed in samples of *Asparagus acutifolius* grown in the Almadén mining district (Ciudad Real, Spain), one of the most Hg-contaminated sites in the world. Soils of the Almadén mining district, and specifically from the Almadenejos zone, are highly contaminated, with some zones having values above 4,000 µg Hg g⁻¹ soil. Although soils have an extremely high concentration of mercury, generally less than 2% is available for plants, as is shown by various soil extractions simulating bioavailability. In plants, Hg concentration increases depending on the content of Hg in soils. In addition, Hg levels in roots are higher than in aerial parts, which is a strategy of plants for protecting their more sensitive aerial parts from the deleterious effects of metal stress. The content of phytochelatin (PCs) and their complexes are consistent with the amount of mercury in soils. These findings highlight the important role of thiol compounds and their metal complexes in capturing and fixing Hg from soils, giving plants the capacity to deal with the heavy metal toxicity of polluted soils.



1. Introduction

The development and growth of mining, metallurgy and industrial activities have increased the concentration of heavy metals in the environment, thus exposing animals and plants to high concentrations of these contaminants. This has made human exposure to these metals more likely, through ingestion, inhalation or skin contact. Since plants are the main source of human food, the presence of heavy metals in them is of great interest. Plants absorb metals from soils, water and air. However, the chief source of metal absorption is soil. Uptake from it depends not only on the total content of the respective metals, but also on their accessibility to roots and transfer across the soil-root interface. The total amount of metal in a soil is, in turn, affected by the inherent natural resources of the particular area, in addition to the agricultural and industrial activities.¹

Among the toxic trace metals, mercury (Hg) is one of the most hazardous environmental pollutants. The human and ecological concern for this contaminant is due to its multitude of sources (anthropogenic and natural), its toxicity, its mobility in the environment and its tendency to bioaccumulate and biomagnify in terrestrial and aquatic ecosystems.²⁻⁵ The toxicity and environmental mobility of mercury compounds are closely related to their chemical form. Cinnabar and other mercury sulphides, mercury oxides, metallic mercury and organo-mercury compounds are the most common mercury forms found near mercury mining sites. However, some other inorganic forms may also be available in this type of soil. Moreover, total concentrations of metals in soils are not a good indicator of phytoavailability, or a good tool for potential risk

assessment, due to the varied and complex distribution patterns of metals among various chemical species or solid phases.

The Almadén district (Spain) is known for the largest deposits of mercury in the world yet discovered.^{6,7} Because of this, the Almadén district can be regarded as one of the most Hg-contaminated places on Earth.⁸ The Almadén district covers an area of about 300 km² and comprises many mercury mines that are now inactive, but in their almost 2000 years of activity have produced about a third of the mercury consumed by mankind.⁶ Almadenejos village owes its origin to the discovery and exploitation of Hg mines near the village, including the nearby “Vieja Concepción” and “Nueva Concepción” mines.⁶ Almadenejos is also the site of a historic metallurgical enclosure that housed the furnaces where Hg was extracted from cinnabar ores. This old metallurgical precinct, known as “Cerro de Almadenejos”, can be regarded as one of the most contaminated sites in the whole Almadén district, as seen in its soils, water and sediments.⁹⁻¹¹

Knowledge of the physiological and molecular mechanisms that plants have to degrade or eliminate pollutants in contaminated soils is of great interest.¹² Among all contaminants, toxic heavy metals and organic pollutants are the most troubling for human health and environment. Several plants are known for their ability to accumulate the most environmentally important toxic metals such as lead, cadmium, arsenic and radionuclides in their tissues.¹³ Plants’ main mechanism for fighting against metal toxicity is phytochelatin synthesis. Phytochelatin (PCs) are small, cysteine-rich peptides that are synthesised in plants in response to heavy metal stress.¹⁴ PCs play an essential role in heavy metal detoxification by chelating heavy metals in the cytosol and

sequestering the metal-PC complexes in vacuoles *via* transport across the tonoplast. Thus, PCs are assumed to be involved in the accumulation, detoxification and metabolism of heavy metal ions in plant cells.¹⁵ The general structure of this set of peptides is $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2$ to 5).^{16,17} Glutathione serves as the substrate of PC biosynthesis through the transpeptidation of the $\gamma\text{-Glu-Cys}$ moiety of GSH onto a second GSH to form PC_2 or onto a PC molecule to produce an $n+1$ oligomer. The prominent function of $\gamma\text{-Glu-Cys}$ peptides is to sequester these metals *via* complexation and then transport to the vacuoles. For these reasons, the study of PC content in plants is highly relevant, as PCs could be used as indicators of metal pollution. Of all the studies of the Almadén mining district, none evaluates the heavy metal stress caused in plants by the high Hg concentrations found in soils, sediments, water or air. However, several researchers have studied mercury distribution in the environment. Higuera et al.⁹ and Martínez-Coronado et al.¹¹ emphasised the high amounts of Hg found in soils and postulate the possible sources of Hg. Ferrara et al.¹⁸ and Higuera et al.¹⁹ analysed the atmospheric Hg and determined the main emission sources and Hg fluxes over Almadén village. The aquatic environment has also been analysed by Berzas Nevado et al.²⁰, Gray et al.¹⁰ and Rodríguez Martín-Doimeadios et al.²¹, who determined Hg in waters, sediments and bivalves. A reconnaissance survey of Hg in sediments, soil and water and a comparison with other mining districts by Higuera et al.⁸ reached the main conclusion that the Almadén mining district is the most highly Hg-contaminated site in the world. A complete analysis of the Hg content in many plants of the Almadén mining district was published by Millán et al.²² and Molina et al.²³, who pointed out the differing behaviour of diverse plants in mercury uptake. Another study determined Hg in plants grown in the laboratory using Almadén soil and compared the results with plants grown in perlite:vermiculite soil spiked with Hg.²⁴ In this article, a decrease in mercury accumulation was observed in Almadén soil, which was attributed to the low bioavailability of mercury in this soil. However, PCs and Hg-PC, as markers for heavy metal stress, were not evaluated in any of these studies. Nevertheless, in the literature there are some studies of the effect of Hg in plants through examination of PC synthesis. In these studies, PCs are mainly determined by HPLC coupled with mass spectrometry,²⁵⁻²⁷ although in some cases fluorescence²⁸ or absorbance detection^{29,30} are used. In our research group, the interactions between Hg and PCs in several *in vitro* experiments were studied with electroanalytical techniques in either static experiments^{31,32} or chromatographic separations^{33,34} showing very low detection limits. Moreover, in previous studies *Hordeum vulgare* plants cultured with mercury or other heavy metals have been considered for the determination of the induced PCs and the Hg-PC complexes formed with HPLC with amperometric detection^{35,36}. For the present study, wild asparagus (*Asparagus acutifolius*) was selected, because it is a typical evergreen perennial plant that grows naturally in the mining zone of the Almadén district.²³ Several zones with different Hg concentrations were chosen and aerial and underground parts of plants from these zones were analysed separately to determine the total content of Hg, as well as the concentrations of PCs and their Hg complexes. The correlation with the Hg content of the source soil was also looked at, including both total Hg content and the extractable fractions. Therefore, the aims of this study were to examine whether natural plants, grown in the Almadén district, accumulated mercury from the contaminated soil; and to analyse these samples with HPLC-amperometric detection, considering the induced PCs and Hg-PC complexes formed in both aerial parts and roots, in order to find out more about plants' mechanisms for dealing with metal toxicity.

2. Experimental section

2.1. Plant and soil sampling

Samples of soils and plants were collected in four areas with different Hg content in Almadenejos: (E1) above the ruins of a furnace in the Almadenejos precinct, where the ore was heated to temperatures over 300°C; (E2) next to the ruins of a furnace, where Hg vapour was condensed in the pottery lines; (E3) at the entrance of the “Nueva Concepción” mine; (E4) the wall limiting the old metallurgical precinct called “Cerro de Almadenejos” in the closest area to the village. Other samples (E5) were collected in Gargantiel, a village 9 km from Almadenejos, which we used as a blank site, as there were low concentrations of mercury in the local soil. The location of the individual samples was recorded with a portable Global Position System (GPS) (Figure 1).

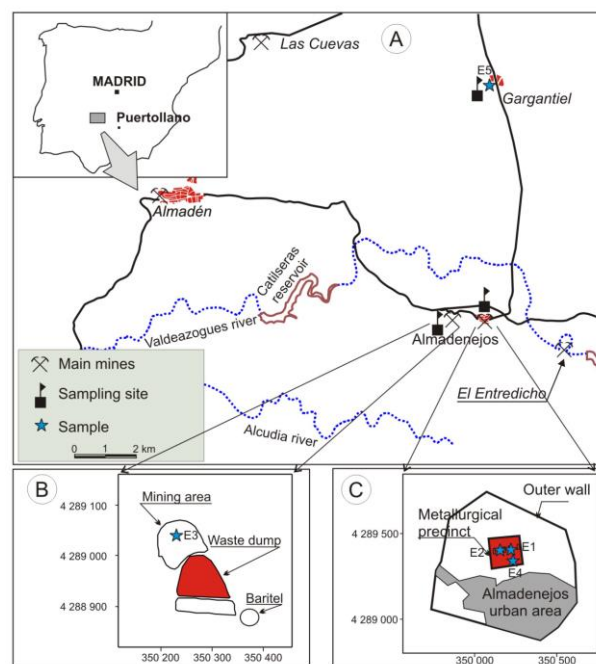


Figure 1. Sketch map of the area. A) General area; B) Nueva Concepción area, Baritel is an old type of mine shaft building; C) Almadenejos area. Numbers in the axis of B and C are UTM VGS 84 coordinates.

We also performed the edaphic characterization of soil samples, including the determinations of the main parameters relevant to mining areas: electrical conductivity (EC), pH and organic matter (OM) content. EC and pH were measured on soil suspensions: samples (10 g) were homogenized in 25 mL of ultrapure water and subjected to a process of mechanical stirring for 120 minutes with a Unitronic 320 OR stirring bath to homogenize and make the ion balance of the sample. Then, pH and EC were determined with a GLP Crison pH meter and a GLP 32 Crison conductivity meter. OM was determined by following the Walkley and Black method.³⁵ Table 1 shows the results of these measurements, emphasizing the physical and chemical similarities of these soils.

2.2. Sample preparation

Once plant samples had been collected (several portions of aerial parts and roots of different plants from each sampling zone), they were taken to the laboratory, cleaned with ultrapure filtered water and accurately cut into small pieces. Plants were frozen with liquid nitrogen separating the aerial parts of the plant (stems and leaves) from the underground one (roots).

Table 1. Edaphic characterisation of soil samples from the different sampling sites.

Sampling site	pH	Electrical conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Organic matter (%)	Soil texture
E1. Almadenejos precinct (above the furnace ruins)	7.66	214	4.35	Loam
E2. Almadenejos precinct (next to the furnace ruins)	7.38	162	4.14	Sandy-loam
E3. Mine entrance	7.67	170	6.02	Sandy-loam
E4. Almadenejos precinct (wall)	7.36	307	6.67	Loamy-sand
E5. Gargantiel	5.72	135	5.61	Sandy-loam

Afterwards, samples were ground with liquid nitrogen in a mortar and stored at -80°C until analysis.

Soils were ground and homogenized with an agate mortar and pestle and sieved through mesh to obtain a particle size lower than $100\ \mu\text{m}$.

2.3. SPE procedure and HPLC-ED analysis for the determination of PCs and their Hg complexes

Prior to HPLC analysis, water extraction and then a clean-up step in solid phase extraction (SPE) cartridges were performed. For this purpose, 50 mg of fresh sample were mixed with 250 μL of ultrapure filtered water at 1,500 rpm for 1 hour in an Eppendorf MixMate (Hamburg, Germany). For the preconcentration and clean-up of the samples, DSC-18 SPE cartridges (Supelco, Bellefonte, PA, USA) were used in a Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco). For the evaporation under nitrogen stream, a Visidry drying attachment was used. Prior to the clean-up procedure, samples were filtered through $0.45\ \mu\text{m}$ Nylon filter discs (Osmonics, Minnetonka, MN, USA) and pH was adjusted to 2.00 with trifluoroacetic acid (TFA). SPE tub packing was conditioned by rinsing with 2 mL methanol and 2 mL of 0.1% TFA in water. Then, the sample was accurately transferred to the tub and washed with 1 mL of 0.1% TFA in water. In this step, weakly retained materials were removed. Finally, the relevant compounds were eluted with 2 mL of methanol, leaving behind any impurities not removed in the wash step. After this, the eluent was evaporated and then reconstituted in 100 μL of ultrapure filtered water. This clean-up procedure eliminates many irrelevant signals that appear at low retention times and provides clearer chromatograms. An Agilent 1100 chromatographic system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used with an Ascentis C18 column (Supelco), particle size $5\ \mu\text{m}$, $25\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$ column. The mobile phase consisted of 0.1% TFA in ultrapure filtered water pH=2.00 and 0.1% TFA in acetonitrile. Separation was performed with gradient elution, as described in Dago et al.³⁴ The electrochemical detector (ED), consisting of a flow cell (BAS, West Lafayette, IN, USA) and an Autolab PGSTAT-12 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands), was coupled at the end of the column. The flow cell consisted of a glassy carbon working electrode (BAS) whose surface was polished daily, a stainless steel auxiliary electrode and an Ag/AgCl ($\text{NaCl}\ 3\ \text{mol L}^{-1}$) reference electrode. The optimised potential for the working electrode was 1.2 V. The complete HPLC-amperometric detection procedure, along with its calibration functions and its limits of detection and quantification, is given in Dago et al.³⁴

2.4. Analysis of Hg content in plants

To determine Hg content in roots and aerial parts, 50 mg of fresh sample were transferred into glass reactors with 2 mL of 65% HNO_3 . Digestion was conducted for 1 hour at 90°C . Cooled digested extracts were diluted with 20 mL of ultrapure filtered water. The appropriate volume of these solutions was then diluted with 1% HNO_3 with the addition of KMnO_4 to

stabilise Hg and 2% rhodium as internal standard. All samples were analysed in triplicate by an ICP-MS Elan-6000 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Hg concentration in procedure blanks and in all reagents were always below the detection limits.

2.5. Analysis of Hg content in soils

Total Hg content in soils was measured with a LUMEX RA-915+ analyser (Lumex, Saint Petersburg, Russia) with the RP-91C pyrolysis attachment (Lumex). In this equipment, based on Zeeman atomic absorption spectrometry, the sample is vaporised and mercury compounds are fully decomposed by heating to 800°C , whereas organic compounds and carbon particles are catalytically transformed to carbon dioxide and water.^{11,23} Quality control is accomplished by analysing equipment blanks ($<0.002\ \text{mg kg}^{-1}$), duplicate samples (Relative Standard Deviation: 1.51%) and the certified reference material NIST SRM 2710 ($32.6\ \text{mg kg}^{-1}\ \text{Hg}$), obtaining precision (1.23%) and accuracy (99.32%) for total mercury in solid samples under the conditions of these analyses.

Different extraction procedures were applied to each soil sample in order to determine the extractable fractions of Hg. These methods are summarised as follows:

a) Organic mercury was determined as described in Válega et al.,³⁸ in which a soil sample was first treated with acid leaching ($\text{KBr}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$), then by the extraction of the organic mercury halide with toluene and back-extracted with an aqueous sodium thiosulphate solution. Extracted solutions of each soil were analysed directly by atomic absorption spectrometry (AAS) with thermal decomposition, using an Advanced Mercury Analyser AMA-254 (Leco, St. Joseph, MI, USA). This simple methodology is based on thermal decomposition of the sample and collection of the mercury vapour on a gold amalgamator.

b) The United States Geological Survey (USGS) extraction method proposed by Hageman³⁹ simulates the leachability and the chemical reactions that occur when geological materials are in contact with water. For this purpose, 5 g of soil were mixed with deionized water at a 1:20 ratio for 2 h at 50 rpm in a shaking bath (Selecta, Barcelona, Spain). Prior to the analysis, the extracts were filtered using nitrocellulose syringe filters ($0.45\ \mu\text{m}$ pore size). Hg was determined by Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectroscopy (AFS-CV) with Millennium Merlin equipment (PS Analytical, Orpington, UK). With this method, mercury is oxidised with a bromide/bromate mixture and then reduced with Sn(II) chloride. Free mercury atoms in a carrier gas are excited by an ultraviolet light source at a wavelength of 254 nm. By measuring the radiation emitted, the specific element being measured is quantified.

c) The United States Environmental Protection Agency method (EPA 1312), known as the Synthetic Precipitation Leach Procedure (SPLP), determines the mobility of inorganic mercury present in waste materials in acid conditions caused by

Table 2. Total Hg and different extractable Hg concentrations in soils ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil) from the different sampling sites in the Almadenejos precinct and surrounding areas. Values are the mean of three independent replicates $\pm$ standard deviation.

Sampling site	Total Hg	Organic Hg	USGS	EPA	AcNH ₄ (pH=7)	AcNH ₄ (pH=4.5)	EDTA 0.05 M
E1. Almadenejos precinct (above the furnace)	4830 $\pm$ 520	16.1 $\pm$ 0.1	5.17 $\pm$ 0.05	6.28 $\pm$ 0.04	3.84 $\pm$ 0.08	87 $\pm$ 2	93.66 $\pm$ 0.03
E2. Almadenejos precinct (next to the furnace)	4260 $\pm$ 467	2.83 $\pm$ 0.06	4.36 $\pm$ 0.07	7.06 $\pm$ 0.01	2.25 $\pm$ 0.08	25.999 $\pm$ 0.005	76 $\pm$ 2
E3. Mine entrance	1995 $\pm$ 134	0.84 $\pm$ 0.02	1.05 $\pm$ 0.02	1.73 $\pm$ 0.01	0.4686 $\pm$ 0.0005	5.70 $\pm$ 0.02	11.2 $\pm$ 0.2
E4. Almadenejos precinct (wall)	1340 $\pm$ 99	0.11 $\pm$ 0.03	0.081 $\pm$ 0.004	0.110 $\pm$ 0.009	0.229 $\pm$ 0.005	0.234 $\pm$ 0.003	1.7 $\pm$ 0.7
E5. Gargantiel	2 $\pm$ 1	< LOD	< LOD	0.0024 $\pm$ 0.0009	< LOD	0.0179 $\pm$ 0.0009	0.033 $\pm$ 0.002

acidic rain. 5 g of soil of each sample were processed with 100 mL of the extracting solution ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{:HNO}_3$ in a proportion of 60:40 at a pH adjusted to 4.2), which is considered comparable to that of expected acid rain. The extraction was performed at 25°C in a bath for 18 h with shake at 30 rpm. The extracts were filtered with borosilicate glass fibre filters (0.7 μm pore size) and analysed by AFS-CV, as described above.

d) Other extraction procedures were performed by changing only the extracting solution and the conditions of the extractions to 2 h at 25°C, shaking at 50 rpm. The extractants were 0.05 mol L⁻¹ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at pH=4.5, ammonium acetate at pH=7 and ammonium acetate at pH=4.5. All solutions were filtered with 0.45 μm teflon filters prior to analysis. AFS-CV was used as described above to determine the Hg content.

Three independent replicates for each sample were analysed and a blank analysis of each extraction procedure was then subtracted.

3. Results and Discussion

3.1. Hg determination in soils

Several extraction methods were carried out in order to determine diverse metal fractions in soils and identify plant-available forms of Hg in soils for correlating with the synthesised PCs. The results for the different Hg fractions in soils are given in Table 2. For total Hg content, soils around Almadenejos have between 4,830 and 1,340 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil, which is consistent with the studies by Gray et al.¹⁰ and Martínez-Coronado et al.¹¹ The most contaminated soils are those from the furnace ruins (sampling sites E1 and E2), which have up to 1,960 times the Hg content of the control soil sampled at Gargantiel (sampling site E5), which has 2 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. As Senesi et al.⁴⁰ pointed out, the usual concentrations of non-polluted soils fall within the range 0.01-0.03 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$. Therefore, the soil of Gargantiel cannot be considered uncontaminated. Soils from the mine entrance (sampling site E3) also have a high level of Hg, 1,995 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil, more than the zone of the Almadenejos precinct next to the village (sampling site E4), with 1,340 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. Given these results, it is not exaggerated to consider the Almadén mining district one of the most Hg-contaminated places in the world, and the “Cerro de Almadenejos”, the most contaminated place in the Almadén area.

However, despite the very high Hg content in these soils, mercury associated with water-soluble phases and exchangeable forms is very low. For all the different extraction methodologies, Hg content at the different sites correlates with total Hg content, being the furnace ruins the site with the highest level of mercury. The highest amounts of Hg were extracted with EDTA, with values ranging from 93.66 to 0.033 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. The carbonate bound fraction, which is determined with ammonium acetate at pH value of 4.5, ranged from 87 to 0.0179 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. The ammonium acetate

extraction at pH=7 determined the exchangeable and weakly adsorbed fraction, with values from 3.84 to non-detected limits; this was the least effective extraction reagent. The EPA method, which could be associated with the Hg extractable in acidic conditions, caused by acid rain, showed values from 6.28 to 0.0024 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. Finally, the USGS method, which simulates the water leachability of geological materials, provided values similar to the ones obtained with the EPA method, with a maximum of 5.17 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil.

Determinations of total or inorganic mercury do not provide adequate information about its impact on the environment. In particular, organic mercury compounds are generally more toxic than inorganic mercury salts, due to their higher solubility in lipids, which increases the potential for biological uptake and bio-concentration. Organic mercury determined with the methodology described above ranges from 16.1 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil to non-detected values. The highest values were found in the furnace ruins, consistent with total Hg content. Nevertheless, only a maximum of 0.33% of the total mercury is in their organic forms. In this study, the most effective extractant was EDTA, with a maximum value in the furnace ruins zone (sampling site E1) of only 1.94% of Hg extracted. This highlights the immobility of Hg in this mining zone, where, despite soils' extremely high concentrations of mercury, only small fractions could be solubilised and were therefore available for plants. Thus, most of the mercury in the soils of Almadenejos could be in the form of cinnabar (HgS) particles which are not phytoavailable for plants, as was indicated by Higuera et al.⁹

3.2. Hg determination in plants

To determine the total Hg content in plants, both aerial parts and roots were analysed. The results are shown in Table 3. Hg concentration in plants of various origins was consistent with its concentration in related soils. As was foreseeable, plants from above the furnace ruins (zone E1) had more mercury, 76 and 74 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ for roots and aerial parts, respectively, than plants from Gargantiel (zone E5), with values of 0.14 and 0.12 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ in roots and aerial parts, respectively. In general, all plants from all sites accumulated more mercury in roots than in aerial parts, which can be seen as a strategy for protecting the more sensitive aerial parts from the deleterious effects induced by metal stress. Therefore, mercury ions are preferably retained in root tissues and only small portions are transferred to leaves.^{25,28,29} However, it has to be remarked that the atmospheric Hg pollution in these zones is very high as indicated by Higuera et al.¹⁹ and, therefore, possibly part of the mercury found in the aerial parts of plants could come from atmospheric deposition phenomena.⁴¹ In general, the correlation between the total Hg in plants, in both aerial parts and roots, and the Hg obtained by any of the different extraction procedures is close to linearity.

3.3. Analysis of phytochelatins and Hg-phytochelatin complexes

To explore a way of following heavy metal stress response, the variation in thiol composition was analysed, following the method of Dago et al.³⁴ Six biothiols were determined (GSH, γ -Glu-Cys and PC₂₋₅), as well as Hg complexes of GSH and PC₂. With this methodology, Hg complexes with other PCs (PC₃, PC₄, PC₅) could be detected, but they could not be individually identified as they were clustered at the same retention time.³⁴ With the aim of analysing PCs and their Hg complexes, cleaned-up and preconcentrated extracts of each sample were injected into the chromatograph and results of aerial parts and roots were analysed separately. Figure 2 shows, as an example, a chromatogram of roots of *Asparagus acutifolius* from the Almadenejos precinct (zone E1). Peaks were identified by comparing the retention times obtained with the injection of standards. External calibration curves for each thiol were used for quantification. Nevertheless, in the case of Hg complexes, no commercial standards were available and external calibration curves were done by mixing different concentrations of thiols with an excess of Hg. Thus, the concentration of the complex was the same as the concentration of the thiol added, whilst taking into account that with these injections only the complex peak appears in the chromatogram. This ensures that all the thiol is complexed. Thus, due to its ML stoichiometry, determined in previous studies by Dago et al.,³⁴ the concentration of the complex can be regarded as the same as the concentration of thiol added to the mixture. Figure 3 shows the average and the standard deviation obtained for three replicates of plants from the sampling sites. At first glance, samples with more mercury synthesise more phytochelatins as a response to metal toxicity. It is also noticeable that longer PCs are more abundant in roots than in aerial parts, indicating that PCs, which are mainly synthesised in roots, are not compounds for long-distance root-to-shoot Hg transfer.²⁶ Moreover, longer PCs increase their concentration with increasing metal content. However, GSH is more concentrated in aerial parts than in roots, as shown by Sobrino-Plata et al.,³⁰ who pointed out that GSH is synthesised in shoots and then exported to roots, where it could be converted into PCs. Furthermore, GSH generally reduces its concentration with an increase of Hg content, because other longer-chain thiols are formed using GSH as the substrate.

Table 3. Concentrations of total Hg in plants ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ fresh weight) in aerial parts and roots of *Asparagus acutifolius* from different sites of the Almadenejos precinct and the surrounding areas. Values are the mean $\pm$ standard deviation of three replicates.

Sampling site	Hg content ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ FW)	
	Aerial parts	Roots
E1. Almadenejos precinct (above the furnace ruins)	74 $\pm$ 8	76 $\pm$ 43
E2. Almadenejos precinct (next to the furnace ruins)	29 $\pm$ 5	66 $\pm$ 11
E3. Mine entrance	2.9 $\pm$ 0.1	5 $\pm$ 1
E4. Almadenejos precinct (wall)	1.4 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.7
E5. Gargantiel	0.12 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.02

Turning to the results from the analyses of aerial parts (Figure 3a), plants from the furnace ruins (sampling sites E1 and E2) generated an extremely large quantity of PC₃ (the maximum concentration of PC₃ is 132 $\pm$ 12 nmol g⁻¹ fresh weight in the extract of the aerial parts of E1 zone), as well as a relatively high level of GSH complex, in comparison with plants from other locations. These findings are consistent with the higher content of Hg in soils and also in plants. The concentrations of

other thiols did not increase visibly. However, PC₄, γ -Glu-Cys and GSH complex also reached their maximums in this extract, with 46 $\pm$ 9, 28 $\pm$ 12 and 35 $\pm$ 9 nmol g⁻¹ fresh weight, respectively. Unlike findings for other plant species,^{25,27} PC₂ is not the most abundant thiol in this case, either because it is the precursor molecule for the synthesis of longer-chain PCs or because it can be complexed by mercury. As explained in the literature on GSH,²⁶ GSH content diminishes as the Hg content in leaves increases, since GSH is the substrate of the PC synthesis that is activated by a rise in metal concentration. A similar explanation could be accepted for PC₂, as longer-chain PCs are formed by the successive addition of a Glu-Cys unit to the GSH or the precursor molecule (PC_{n-1}). Thus, for example, PC₃ is formed by adding a Glu-Cys unit to a molecule of PC₂. Aerial parts of plants from Gargantiel (sampling site E5) had small quantities of small thiols and also of some PCs. However, the presence of small amounts of Hg in plants and soils of this area, which could induce the synthesis of these PCs, is not a strange feature. For instance, Rauser¹⁴ detected the presence of GSH, PC₂ and PC₃ in plants grown under normal conditions, with no heavy metal stress.

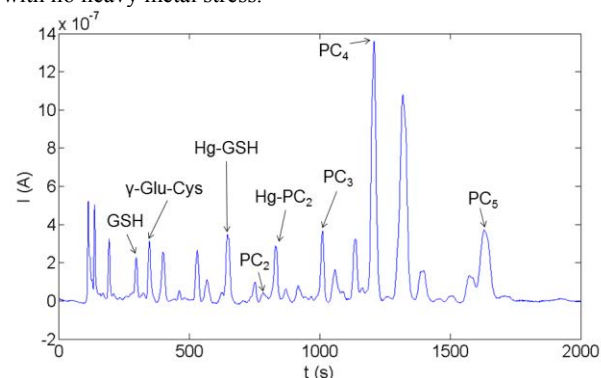


Figure 2. Chromatogram of roots of *Asparagus acutifolius* from above the furnace in the Almadenejos precinct zone (zone E1).

Concerning roots (Figure 3b), the extract with the most synthesised PCs came from above the furnace ruins (sampling site E1) and the most abundant thiol compounds in this extract were PC₄ and PC₅, with 154 $\pm$ 5 and 136 $\pm$ 8 nmol g⁻¹ fresh weight, respectively. In the other root extracts, the concentrations of these thiol compounds diminished more or less in accord with the mercury content at the sampling site. In roots, GSH and PC₂ complexes were relatively abundant at all sampling sites, with the exception of Gargantiel (sampling site E5). At sampling site E1, the PC₂ complex was less abundant, perhaps because of the synthesis of longer-chain phytochelatins from PC₂. PC₃, which was the most abundant thiol in aerial parts, was only detected in the extract with the greatest Hg contamination (sampling site E1). The GSH complex shows a big difference between samples from Gargantiel (sampling site E5) and from the wall of the Almadenejos precinct (sampling site E4), with values of 12 $\pm$ 2 and 63 $\pm$ 12 nmol g⁻¹ fresh weight, respectively. Values then remained more or less constant for the other sampling sites. In root extracts from sampling site E5, very low concentrations of thiols were appreciated, with a maximum of 18 $\pm$ 3 nmol g⁻¹ fresh weight of GSH.

To sum up, the content of phytochelatins (PCs) and their Hg complexes were consistent with the amount of mercury found in soils; more phytoavailable Hg in soils produces more phytochelatins in plants as a response to metal toxicity. Longer-chain PCs were more abundant in roots than in aerial parts of plants, the opposite of GSH, which was more concentrated in aerial parts than in roots. Knowing that these thiols are mainly

synthesised in roots, it is possible that the small GSH molecule could be transferred from roots to aerial parts, while the less mobile longer-chain PCs remain only in roots. When Hg concentration in soils increases, the concentrations of the longest-chain phytochelatin (PC₃, PC₄ and PC₅) increase and, in consequence, smaller thiols such as GSH and PC₂ decrease their concentrations because they serve as substrate for the synthesis of longer-chain PCs. Several differences between roots and aerial parts of plants were observed: in aerial parts the main PC synthesised is PC₃, while in roots PC₄ and PC₅ have higher concentrations; and the Hg complexes of GSH and PC₂ are more abundant in roots, as they accumulate more mercury than aerial parts.

With the aim of establishing the Hg extraction procedure that best relates the Hg content in soils with the synthesis of PCs in roots, the total SH groups, calculated as Cys-Gly units, and the extractable Hg concentrations were correlated. The extraction procedure that best relates the total content of SH groups in roots with the extractable Hg in soils is ammonium acetate extraction at pH 4.5, giving a linear regression of $y=0.0665x-17.161$ with a coefficient of determination (R^2) of 0.979, being y the Hg content ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil) and x the Cys-Gly units (nmol g^{-1} fresh weight).

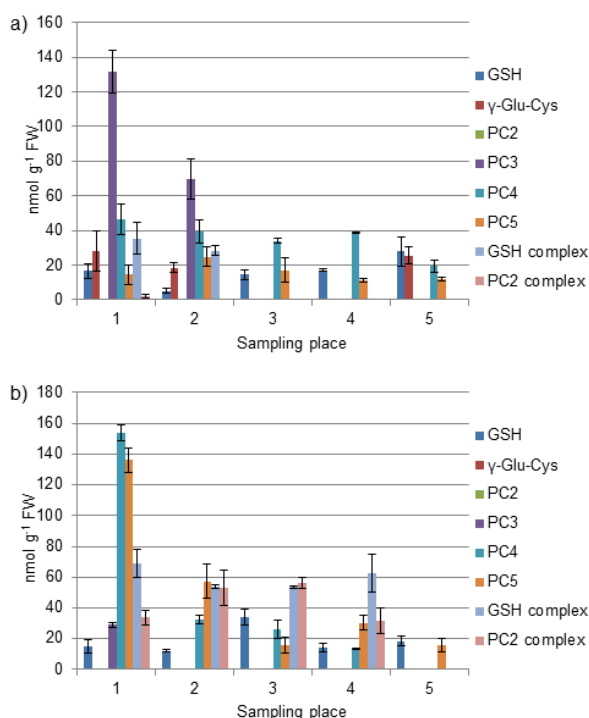


Figure 3. Quantification of thiols and some of its Hg complexes in *Asparagus acutifolius* aerial parts (a) and roots (b), grown in the different sampling places: (1) above a furnace ruins, (2) next to a furnace ruins, (3) in the mine entrance, (4) in the wall of the Almadenejos precinct, (5) Gargantiel.

These findings highlight the important role of thiol compounds and their metal complexes in capturing and fixing Hg from soils, giving plants the capacity to deal with the heavy metal toxicity of polluted soils.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (projects CTQ2009-09471, CTQ2012-32863 and CGL2009-13171). Angela Dago acknowledges the University of Barcelona for a PhD grant.

References

- (1) Lawrence, E.; Jackson, A. R. W.; Jackson, J. M. *Longman Dictionary of Environmental Science*; Longman, Harlow, 1998.
- (2) Fitzgerald, W. F.; Clarkson, T.W. Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environ. Health Perspect.* **1991**, *96*, 159-166.
- (3) Boening, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* **2000**, *40*, 1335-1351.
- (4) Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P.; Horvat, M. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 383-393.
- (5) Clarkson, T. W.; Magos, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **2006**, *36*, 609-662.
- (6) Hernández, A.; Jébrak, M.; Higuera, P.; Oyarzun, R.; Morata, D.; Munhá, J. The Almadén mercury mining district, Spain. *Miner. Deposita* **1999**, *34*, 539-548.
- (7) Higuera, P.; Oyarzun, R.; Lillo, J.; Morata, D. Intraplate mafic magmatism, degasification, and deposition of mercury: The giant Almadén mercury deposit (Spain) revisited. *Ore Geol. Rev.* **2013**, *51*, 93-102.
- (8) Higuera, P.; Oyarzun, R.; Lillo, J.; Sánchez-Hernández, J. C.; Molina, J. A.; Esbrí, J. M.; Lorenzo, S. The Almadén district (Spain): anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. *Sci. Total Environ.* **2006**, *356*, 112-124.
- (9) Higuera, P.; Oyarzun, R.; Biester, H.; Lillo, J.; Lorenzo, S. A first insight into mercury distribution and speciation in the Almadén mining district, Spain. *J. Geochem. Explor.* **2003**, *80*, 95-104.
- (10) Gray, J. E.; Hines, M. E.; Higuera, P. L.; Adatto, P.; Lasorsa, B. K. Mercury speciation and microbial transformations in mine wastes, stream sediments, and surface waters at the Almadén Mining District, Spain. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 4285-4292.
- (11) Martínez-Coronado, A.; Oyarzun, R.; Esbrí, J. M.; Llanos, W.; Higuera, P. Sampling high to extremely high Hg concentrations at the Cerco de Almadenejos, Almadén mining district (Spain): The old metallurgical precinct (1794 to 1861 AD) and surrounding areas. *J. Geochem. Explor.* **2011**, *109*, 70-77.
- (12) Salt, D. E.; Smith, R. D.; Raskin, I. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 643-668.
- (13) Padmavathiamma, P. K.; Li, L. Y. Phytoremediation technology: Hyperaccumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut.* **2007**, *184*, 105-126.
- (14) Rauser, W. E. Phytochelatin and related peptides. *Plant Physiol.* **1995**, *109*, 1141-1149.
- (15) Grill, E.; Winnacker, E.-L.; Zenk, M. H. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 439-443.
- (16) Cobbett, C. S. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 825-832.
- (17) Cobbett, C.; Goldsbrough, P. Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 159-182.
- (18) Ferrara, R.; Maserti, B. E.; Andersson, M.; Edner, H.; Ragnarson, P.; Svanberg, S.; Hernández, A. Atmospheric mercury concentrations and fluxes in the Almadén district (Spain). *Atmos. Environ.* **1998**, *32*, 3897-3904.
- (19) Higuera, P.; Esbrí, J. M.; Oyarzun, R.; Llanos, W.; Martínez-Coronado, A.; Lillo, J.; López-Berdonces, M. A.; García-Noguero, E. M. Industrial and natural sources of gaseous elemental mercury in the Almadén district (Spain): An updated report on this issue after the ceasing of mining and metallurgical activities in 2003 and major land reclamation works. *Environ. Res.* **2013**, *125*, 197-208.

- (20) Berzas Nevado, J. J.; García Bermejo, L. F.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C. Distribution of mercury in the aquatic environment at Almadén, Spain. *Environ. Pollut.* **2003**, *122*, 261-271.
- (21) Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Wasserman, J. C.; García Bermejo, L. F.; Amouroux, D.; Berzas Nevado, J. J.; Donard, O. F. X. Chemical availability of mercury in stream sediments from the Almadén area, Spain. *J. Environ. Monitor.* **2000**, *2*, 360-366.
- (22) Millán, R.; Gamarra, R.; Schmid, T.; Sierra, M. J.; Quejido, A. J.; Sánchez, D. M.; Cardona, A. I.; Fernández, M.; Vera, R. Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Sci. Total Environ.* **2006**, *368*, 79-87.
- (23) Molina, J.A.; Oyarzun, R.; Esbri, J. M.; Higuera, P. Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. *Environ. Geochem. Health* **2006**, *28*, 487-498.
- (24) Rodríguez, L.; Rincón, J.; Asencio, I.; Rodríguez-Castellanos, L. Capability of selected crop plants for shoot mercury accumulation from polluted soils: phytoremediation perspectives. *Int. J. Phytoremediat.* **2007**, *9*, 1-13.
- (25) Iglesia-Turiño, S.; Febrero, A.; Jauregui, O.; Caldelas, C.; Araus, J. L.; Bort, J. Detection and quantification of unbound phytochelatin 2 in plant extracts of *Brassica napus* grown with different levels of mercury. *Plant Physiol.* **2006**, *142*, 742-749.
- (26) Chen, L.; Yang, L.; Wang, Q. In vivo phytochelatin and Hg-phytochelatin complexes in Hg-stressed *Brassica chinensis* L. *Metallomics* **2009**, *1*, 101-106.
- (27) Carrasco-Gil, S.; Álvarez-Fernández, A.; Sobrino-Plata, J.; Millán, R.; Carpena-Ruiz, R. O.; Leduc, D. L.; Andrews, J. C.; Abadía, J.; Hernández, L. E. Complexation of Hg with phytochelatin is important for plant Hg tolerance. *Plant Cell Environ.* **2011**, *34*, 778-791.
- (28) Válega, M.; Lima, A. I. G.; Figueira, E. M. A. P.; Pereira, E.; Pardal, M. A.; Duarte, A. C. Mercury intracellular partitioning and chelation in a salt marsh plant, *Halimione portucaloides* (L.) aellen: Strategies underlying tolerance in environmental exposure. *Chemosphere* **2009**, *74*, 530-536.
- (29) Rellán-Álvarez, R.; Ortega-Villasante, C.; Álvarez-Hernández, A.; Del Campo, F. F.; Hernández, L. E. Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. *Plant Soil* **2006**, *279*, 41-50.
- (30) Sobrino-Plata, J.; Ortega-Villasante, C.; Flores-Cáceres, M. L.; Escobar, C.; Del Campo, F. F.; Hernández, L. E. Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere* **2009**, *77*, 946-954.
- (31) Chekmeneva, E.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M. Binding of Hg^{2+} with phytochelatin: Study by differential pulse voltammetry on rotating Au-disk electrode, electrospray ionization mass-spectrometry and isothermal titration calorimetry. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 7010-7015.
- (32) Chekmeneva, E.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M. Binding of Hg^{2+} by Cys, Cys-Gly and reduced glutathione: Study by differential pulse voltammetry on rotating Au-disk electrode, electrospray ionization mass-spectrometry and isothermal titration calorimetry. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *644*, 20-24.
- (33) Dago, A.; González-García, O.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M. Liquid chromatographic analysis of Hg(II) binding by thiol-rich peptides using both UV-vis and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6752-6757.
- (34) Dago, A.; González-García, O.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M. Characterization of Hg(II) binding with different length phytochelatin using liquid chromatography and amperometric detection. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *695*, 51-57.
- (35) Dago, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M. Analysis of phytochelatin and Hg-phytochelatin complexes in *Hordeum vulgare* plants stressed with Hg and Cd: HPLC study with amperometric detection. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **2013**, <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2013.864649>.
- (36) Dago, A.; González, I.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M. Chemometrics applied to the analysis of induced phytochelatin in *Hordeum vulgare* plants stressed with various toxic non-essential metals and metalloids. *Talanta* **2014**, *118*, 201-209.
- (37) Walkley, A.; Black, I. A. An Examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* **1934**, *37*, 29-38.
- (38) Válega, M.; Abreu, S.; Pato, P.; Rocha, L.; Gomes, A. R.; Pereira, M. E.; Duarte, A. C. Determination of organic mercury in biota, plants and contaminated sediments using a thermal atomic absorption spectrometry technique. *Water Air Soil Pollut.* **2006**, *174*, 223-234.
- (39) Hageman, P. L. A simple field leach test to assess potential leaching of soluble constituents from mine wastes, soils, and other geologic materials. *USGS Fact sheet* **2005**, *2005-3100*.
- (40) Senesi, S. S.; Baldassarre, G.; Senesi, N.; Radina, B. Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere* **1999**, *39*, 343-377.
- (41) Higuera, P.; Amorós, J. A.; Esbri, J. M.; García-Navarro, F. J.; Pérez de los Reyes, C.; Moreno, G. Time and space variations in mercury and other trace element contents in olive tree leaves from the Almadén Hg-mining district. *J. Geochem. Explor.* **2012**, *123*, 143-151.

11.3. Discussió de resultats

Les mostres dels sòls i les plantes es recullen en cinc zones amb diferents continguts de Hg i s'enregistra la ubicació de les mostres amb un sistema de posicionament global portàtil (GPS) (Figura 1 del treball 11.2 i Figura 27).

Es realitza la caracterització edàfica de les mostres de sòls, incloent les determinacions dels principals paràmetres d'interès a les àrees mineres, com són la conductivitat elèctrica, el pH i el contingut de matèria orgànica. També es determina la granulometria dels sòls per tal de fer-ne la caracterització textural. La Taula 1 del treball 11.2 i la Figura 52 mostren els resultats d'aquestes mesures. Els resultats obtinguts en aquestes determinacions posen de manifest que els sòls analitzats, tot i provenir de zones diferents, presenten propietats edàfiques similars i que, per tant, les característiques intrínseques del sòl no influiran en les relacions entre el sòl i les plantes.

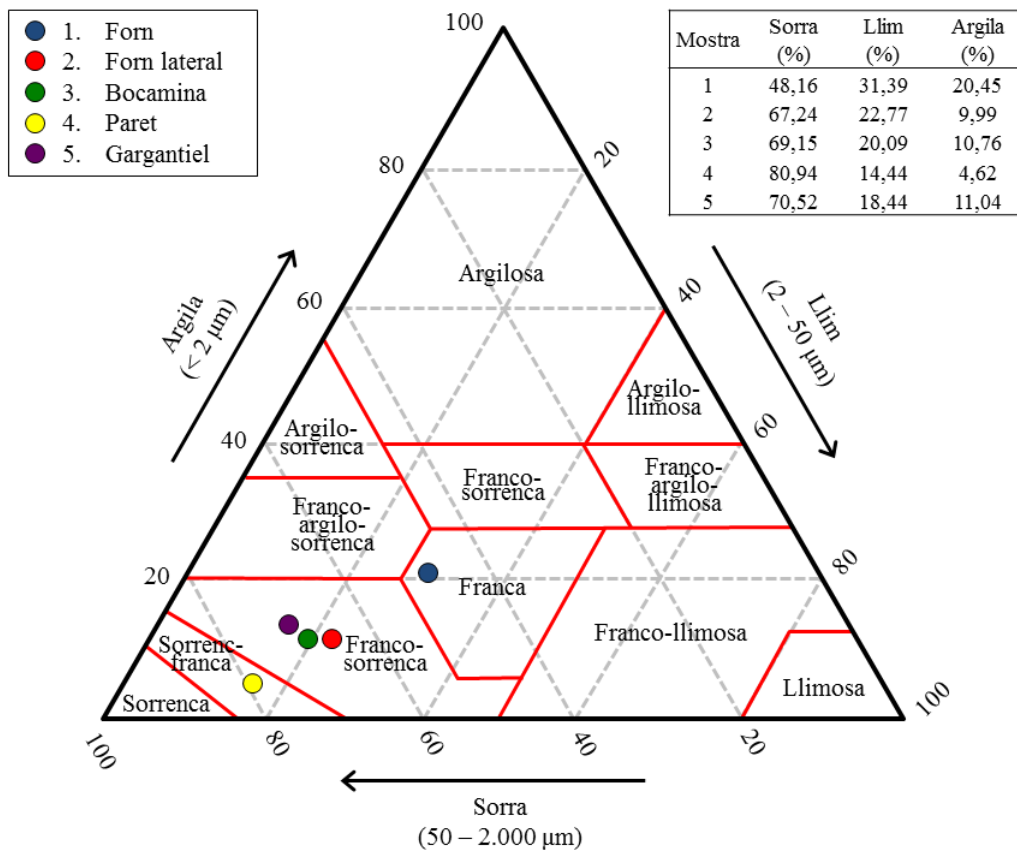


Figura 52. Classificació dels sòls dels diferents punts de mostreig de la zona d'Almadén en funció de la seva textura.

Com s'ha dit anteriorment, la determinació del contingut total de mercuri no és un bon indicador de la bioacumulació de mercuri a les plantes ja que la majoria d'espècies predominants en aquests sòls rics en mercuri són bastant immòbils. Així doncs, per avaluar la disponibilitat d'aquest element per a les plantes es realitzen diverses extraccions amb diferents solvents. Els resultats tant per a la determinació del contingut de Hg total com per a les diferents fraccions extractables del Hg en els sòls es presenten a la Taula 2 del treball 11.2. Aquestes determinacions s'han dut a terme en col·laboració amb els investigadors del *Instituto de Geología Aplicada de la Escuela de Ingeniería Minera e Industrial de Almadén (Universidad de Castilla-La Mancha)*.

Pel que fa al contingut total de Hg dels sòls, les zones properes a Almadenejos tenen entre 4.830 i 1.340 $\mu\text{g g}^{-1}$, la qual cosa és consistent amb els estudis realitzats per Gray *et al.* [24] i Martínez-Coronado *et al.* [192]. Els sòls més contaminats són els que provenen de les ruïnes dels forns (llocs de mostreig E1 i E2), que tenen fins a 1.960 vegades el contingut de Hg del sòl de control mostrejat a Gargantiel (mostreig E5), que en té 2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Tal i com Senesi *et al.* [19] assenyalen, les concentracions de Hg habituals dels sòls no contaminats es troben dins del rang de 0,01-0,03 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$. Per tant, el sòl de Gargantiel no pot ser considerat com a no contaminat, però comparant el seu valor amb l'obtingut a les altres zones, el sòl de Gargantiel pràcticament es pot considerar com a no contaminat. El sòl de l'entrada a la mina (lloc de mostreig E3) també té un alt nivell de mercuri, 1.995 $\mu\text{g g}^{-1}$, més que a la zona del recinte d'Almadenejos més propera al poble (mostreig E4), amb 1.340 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ de sòl. Tenint en compte aquests resultats, no és exagerat considerar el districte miner d'Almadén com un dels llocs més contaminats amb mercuri al món, i el *Cerco de Almadenejos*, el lloc més contaminat dins l'àrea d'Almadén.

No obstant això, malgrat l'alt contingut de Hg d'aquests sòls, el mercuri associat a les fases solubles en aigua i amb les formes intercanviables és molt baix. Per tots els diferents mètodes d'extracció assajats, el contingut de mercuri es correlaciona amb el contingut total de Hg dels diferents llocs, sent les ruïnes dels forns els llocs amb el major nivell de mercuri. Les quantitats més altes de Hg són les extreïdes amb EDTA, amb valors que van des de 93,66 a 0,033 $\mu\text{g g}^{-1}$. La fracció unida a carbonats, que es determina amb acetat d'amoni a pH 4,5, varia des de 87 a 0,0179 $\mu\text{g g}^{-1}$. L'extracció amb acetat d'amoni a pH = 7, amb valors de 3,84 $\mu\text{g g}^{-1}$ fins a límits no detectats, determina la fracció intercanviable i dèbilment adsorbida i és el solvent d'extracció

menys efectiu. El mètode de la EPA, que podria estar associat amb el Hg extractable en condicions àcides causades per pluja àcida, mostra valors entre 6,28 i 0,0024 $\mu\text{g g}^{-1}$. Finalment, el mètode del USGS, que simula la lixiviació dels materials geològics per l'aigua, proporciona valors similars als obtinguts amb el mètode de la EPA, amb un màxim de 5,17 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ de sòl.

Les determinacions de mercuri total o mercuri orgànic no proporcionen informació adequada sobre l'impacte d'aquest metall tòxic per al medi ambient. En particular, els compostos orgànics de mercuri són generalment més tòxics que les sals inorgàniques de mercuri per la seva major solubilitat en els lípids, que fa augmentar l'absorció biològica i la bioconcentració. El contingut de mercuri orgànic, determinat amb la metodologia descrita a la part experimental, oscil·la de 16,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ a valors no detectats. Els valors més alts es troben a les ruïnes dels forns, d'acord amb el contingut de Hg total. Malgrat això, només un màxim de 0,33% del mercuri total es troba en les seves formes orgàniques.

En aquest estudi, l'agent d'extracció més eficaç va ser l'EDTA, amb un valor màxim a la zona de les ruïnes del forn (zona E1) de només 1,94% de Hg extractable sota aquestes condicions. Això posa de manifest la immobilitat del Hg en aquesta zona minera, on, tot i les concentracions extremadament altes de mercuri al sòl, només petites fraccions poden solubilitzar-se i, per tant, estar disponibles per a les plantes. Per tant, la major part del mercuri en els sòls d'Almadenejos podria estar en forma de partícules de cinabri (HgS) que no estan disponibles per a les plantes, com indiquen Higuera *et al.* [25].

Per determinar el contingut total de Hg a les plantes, s'analitzen les parts aèries i les arrels per separat. Els resultats es mostren a la Taula 3 del treball 11.2 i a la Figura 53. La concentració de Hg a les plantes dels diferents llocs de presa de mostra és consistent amb la concentració de Hg dels respectius sòls. Com és previsible, les plantes de la zona de sobre de les ruïnes del forn (zona E1) acumulen més mercuri (76 i 74 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ a les arrels i a les parts aèries, respectivament) que les plantes de la zona de Gargantiel (zona E5), amb valors de 0,14 i 0,12 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ a les arrels i a les parts aèries, respectivament. En general, les plantes de tots els llocs de mostreig acumulen més mercuri a les arrels que a les parts aèries, aquest fet pot ser una estratègia per a la protecció de les parts aèries més sensibles als efectes perjudicials induïts per l'estrès

metàl·lic. Per tant, els ions de mercuri s'emmagatzemen preferentment als teixits de les arrels i porcions una mica més petites són transferides a les fulles [121, 139, 143]. En general, la correlació entre el contingut de Hg a les plantes, tant a les parts aèries com a les arrels, i la concentració de Hg obtinguda per qualsevol dels diferents procediments d'extracció és gairebé lineal.

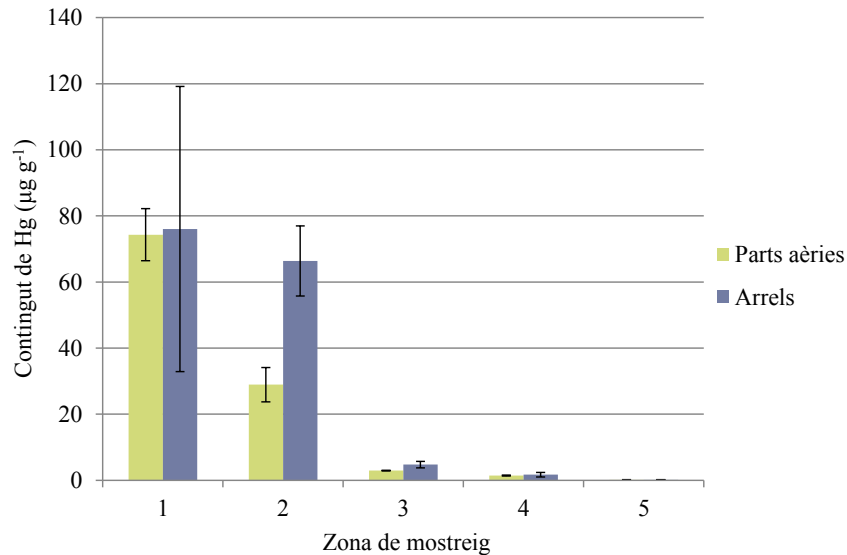


Figura 53. Contingut de mercuri a les parts aèries i a les arrels de plantes de l'espècie *Asparagus acutifolius* recol·lectades en diferents zones de mostreig del recinte miner d'Almadén.

Una forma de seguir la resposta de les plantes a l'estrès per metalls pesants, és analitzar la variació de la síntesi de tiols seguint el mètode descrit als treballs previs de la present Tesi Doctoral. En aquest estudi es determinen sis tiols (GSH, γ -Glu-Cys i PC₂₋₅), així com els complexos del GSH i de la PC₂ amb Hg. Amb aquesta metodologia, com s'ha vist anteriorment, els altres complexos de les PCs de cadena més llarga amb Hg també poden ser detectats, però no es poden identificar individualment ja que apareixen agrupats al mateix temps de retenció.

La Figura 2 del treball 11.2 mostra, com a exemple, un cromatograma de les arrels d'*Asparagus acutifolius* procedents del recinte d'Almadenejos (zona E1). Els pics s'identifiquen comparant els temps de retenció obtinguts amb la injecció d'estàndards. Per a la quantificació es construeixen rectes de calibratge externes per a cada tiol. La Figura 3 del treball 11.2 mostra els resultats obtinguts de la quantificació dels tiols. A primera vista, les mostres amb més mercuri sintetitzen més fitoquelatines com a

resposta a la toxicitat del metall. A més, en augmentar el contingut de metall també augmenta la concentració de les PCs de cadena més llarga. També s'observa que aquestes són més abundants a les arrels que a les parts aèries, fet que indica que les PCs, que se sintetitzen principalment a les arrels, no són compostos hàbils per al transport del Hg a llarga distància (de les arrels a les fulles) [131]. No obstant això, hi ha més quantitat de GSH a les parts aèries que no pas a les arrels. D'acord amb Sobrino-Plata *et al.* [124], el GSH es sintetitza principalment a les fulles i després s'exporta a les arrels, on podria actuar de substrat per a la síntesi de PCs. A més, la concentració de GSH disminueix amb un augment del contingut de Hg, ja que es formen altres tiols de cadena més llarga utilitzant el GSH com a substrat.

Pel que fa als resultats de les anàlisis de les parts aèries (Figura 3a del treball 11.2 i Taula 17), les plantes de les ruïnes del forn (llocs de mostreig E1 i E2) generen una quantitat extremadament gran de PC₃ (la concentració màxima de PC₃ és 132 ± 12 nmol g⁻¹ a l'extracte de les parts aèries de les plantes de la zona E1), així com un nivell relativament alt de complex de GSH, en comparació amb les plantes d'altres ubicacions. Aquestes troballes són consistents amb el contingut més alt de Hg als sòls i també a les plantes d'aquesta zona. Les concentracions d'altres tiols no augmenten visiblement en aquests extractes. No obstant això, la PC₄, la γ -Glu-Cys i el complex de GSH també aconseguixen els seus màxims en aquest extracte. A diferència de les troballes per a altres espècies de plantes [125, 139], en aquest cas la PC₂ no és el tiol més abundant, ja sigui a causa de què és la molècula precursora per a la síntesi de PCs de cadena més llarga o, de què pot ser complexada pel mercuri. Com s'explica a la literatura pel cas del GSH [131], el contingut d'aquest pèptid disminueix a mesura que el contingut de Hg a les fulles augmenta atès que el GSH és el substrat per a la síntesi de les PCs que s'activa per un augment de concentració de metall. Per a la PC₂, es pot acceptar una explicació similar ja que un dels principals mecanismes de formació de PCs de cadena més llarga és per l'addició successiva d'una unitat γ -Glu-Cys a una molècula de GSH o a una molècula de PC precursora (PC_{n-1}). Així, per exemple, la PC₃ es formaria mitjançant l'addició d'una unitat γ -Glu-Cys a una molècula de PC₂. Les parts aèries de les plantes de Gargantiel (lloc de mostreig E5) tenen petites quantitats de tiols petits i també d'algunes PCs. De fet, com s'ha comentat en els treballs anteriors, això no és un fet estrany tenint en compte la presència de petites quantitats de mercuri a les plantes i als sòls d'aquesta zona que podria induir la síntesi d'aquestes PCs. Per

exemple, Rauser [87] va detectar la presència de GSH, PC₂ i PC₃ a les plantes cultivades en condicions normals, sense l'estrès per metalls pesants.

Taula 17. Quantificació dels tiols estudiats (nmol g⁻¹) en els extractes de les parts aèries d'esperguera mostrejada a les diferents zones del recinte miner d'Almadén. Els valors corresponen a la mitjana de tres replicats ± la desviació estàndard (n.d. no detectable, n.q. no quantificable).

	Lloc de mostreig				
	E1	E2	E3	E4	E5
GSH	17 ± 4	5 ± 1	15 ± 3	17,2 ± 0,8	28 ± 8
γ-Glu-Cys	28 ± 12	18 ± 3	n.q.	n.d.	26 ± 5
PC ₂	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
PC ₃	132 ± 12	69 ± 12	n.q.	n.d.	n.q.
PC ₄	46 ± 9	39 ± 7	34 ± 1	39,0 ± 0,3	20 ± 3
PC ₅	14 ± 5	25 ± 6	17 ± 7	11 ± 1	11,7 ± 0,9
Hg-GSH	35 ± 9	28 ± 3	n.q.	n.q.	n.q.
Hg- PC ₂	n.d.	n.d.	n.q.	n.q.	n.q.

Quant a les arrels (Figura 3b del treball 11.2 i Taula 18), l'extracte amb més PCs sintetitzades prové de la zona de sobre de les ruïnes del forn (lloc de mostreig E1) i els tiols més abundants en aquest extracte són la PC₄ i la PC₅. En els altres extractes d'arrels, les concentracions d'aquests compostos tiòlics disminueixen més o menys d'acord amb el contingut de mercuri del lloc de mostreig. A les arrels, els complexos de GSH i de PC₂ són relativament abundants en tots els llocs de mostreig, amb l'excepció de Gargantiel (E5). Al lloc de mostreig E1, el complex de PC₂ és menys abundant, potser a causa de la síntesi de fitoquelatines de cadena més llarga. La PC₃, que és el tiol més abundant a les parts aèries, només es detecta a l'extracte de la zona amb major contaminació de Hg (lloc de presa de mostra E1). El complex de GSH mostra una gran diferència entre les mostres de Gargantiel (E5) i les de la paret del recinte d'Almadenejos (E4), amb valors de 12 ± 2 i 63 ± 12 nmol g⁻¹, respectivament; a partir d'aquí els valors d'aquest complex més o menys es mantenen constants per a la resta dels llocs de mostreig. En els extractes d'arrels de la zona E5, s'aprecien concentracions molt baixes de tiols.

Taula 18. Quantificació dels tiols estudiats (nmol g⁻¹) en els extractes de les arrels d'esperguera mostrejada a les diferents zones del recinte miner d'Almadén. Els valors corresponen a la mitjana de tres replicats $\pm$ la desviació estàndard (n.d. no detectable, n.q. no quantificable).

	Lloc de mostreig				
	E1	E2	E3	E4	E5
GSH	15 $\pm$ 4	12,0 $\pm$ 0,8	34 $\pm$ 5	14 $\pm$ 3	18 $\pm$ 3
γ -Glu-Cys	n.q.	n.q.	n.d.	n.q.	n.q.
PC ₂	n.d.	n.q.	n.d.	n.q.	n.d.
PC ₃	29 $\pm$ 2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PC ₄	154 $\pm$ 5	33 $\pm$ 3	26 $\pm$ 6	13,5 $\pm$ 0,5	n.q.
PC ₅	136 $\pm$ 8	57 $\pm$ 11	16 $\pm$ 5	30 $\pm$ 5	16 $\pm$ 4
Hg-GSH	69 $\pm$ 9	54 $\pm$ 1	53,6 $\pm$ 0,8	63 $\pm$ 12	n.q.
Hg-PC ₂	34 $\pm$ 5	53 $\pm$ 11	56 $\pm$ 3	32 $\pm$ 8	n.d.

En resum, el contingut de fitoquelatines i els seus complexos amb Hg és consistent amb la quantitat de mercuri que es troba als sòls; més Hg biodisponible als sòls produeix més fitoquelatines a les plantes com a resposta a la toxicitat del metall. Les PCs de cadena llarga són més abundants a les arrels que no pas a les parts aèries de les plantes, al contrari que el GSH, que està més concentrat a les parts aèries que no pas a les arrels. Sabent que les PCs es sintetitzen principalment a les arrels i el GSH majoritàriament a les fulles, és possible que la petita molècula de GSH pugui ser més fàcilment transferida de les parts aèries a les arrels, mentre que les PCs de cadena més llarga siguin menys mòbils i es trobin només a les arrels. Quan la concentració de Hg dels sòls augmenta, les concentracions de fitoquelatines de cadena més llarga també augmenten i, en conseqüència, els tiols més petits, com ara el GSH o la PC₂ disminueixen les seves concentracions, ja que serveixen de substrat per a la síntesi de les PCs de cadena més llarga. S'observen diverses diferències entre les arrels i les parts aèries de les plantes: a les parts aèries la principal PC sintetitzada és la PC₃, mentre que a les arrels la PC₄ i la PC₅ tenen concentracions més altes. Els complexos de GSH i PC₂ amb Hg són més abundants a les arrels, ja que aquestes acumulen més mercuri que les parts aèries.

Amb l'objectiu d'establir el procediment d'extracció de Hg que millor relaciona el contingut de Hg als sòls amb la síntesi de fitoquelatines a les arrels, es correlacionen els grups SH totals, calculats com a unitats γ -Glu-Cys, i les concentracions de Hg de les diferents extraccions. El procediment d'extracció que millor els relaciona és l'extracció amb acetat d'amoni a pH 4,5, donant una regressió lineal de $y = 0,0665x - 17,161$ amb un coeficient de determinació (R^2) de 0,979, sent y el contingut de Hg ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$ de sòl) i x les unitats γ -Glu-Cys (nmol g^{-1}).

Per aprofundir una mica més en el tema, en aquest treball s'analitzen també mostres de *Retama sphaerocarpa* (ginesta) provinents de la zona de l'entrada a la mina (zona E3), per tal de comparar l'estrès metàl·lic produït en dues espècies de plantes diferents mostrejades a la mateixa zona. Aquesta part de l'estudi, com s'ha dit amb anterioritat, no s'inclou en el manuscrit en preparació. Els resultats de la determinació del contingut de Hg a les parts aèries i les arrels es mostren a la Figura 54. Comparant aquests valors amb el contingut de Hg determinat a l'*Asparagus acutifolius* de la mateixa zona, no s'observen diferències significatives. Així es pot concloure que les dues espècies tenen habilitats similars en l'acumulació del Hg.

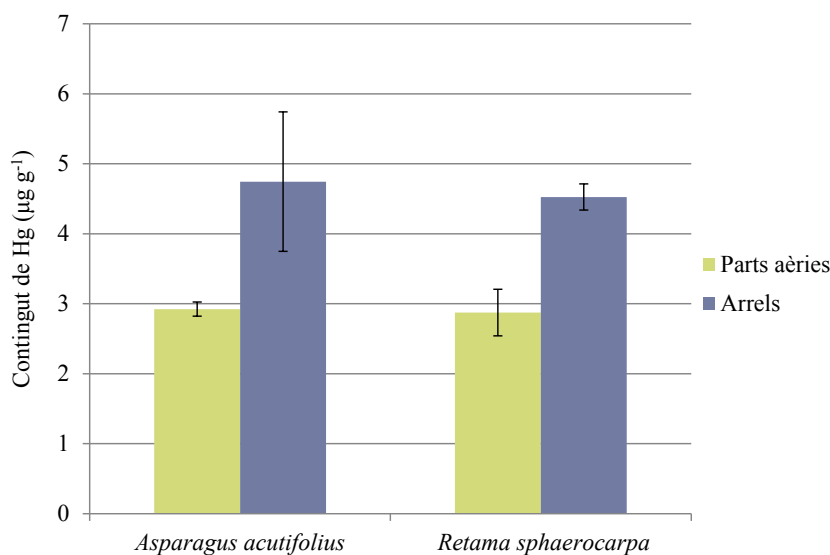


Figura 54. Contingut de Hg de les arrels i les parts aèries de les plantes d'*Asparagus acutifolius* i *Retama sphaerocarpa* ambdues procedents de la zona de mostreig E3.

La quantificació de les PCs de les plantes d'esperreguera i de la ginesta es mostra a la Taula 19. Es pot observar que la *Retama sphaerocarpa* sintetitza més fitoquelatines que l'*Asparagus acutifolius* tant a les arrels com a les parts aèries. A les parts aèries,

tots els tiols es troben més concentrats a la ginesta que a l'esperguera, excepte la γ -Glu-Cys i el complex de la PC₂, que no es detecten als extractes de la ginesta, i el GSH i la PC₅, que mostren valors similars a les parts aèries d'ambdues espècies. La PC més abundant a les parts aèries de l'esperguera i de la ginesta és la PC₄. A la ginesta, la PC₂, la PC₃ i el complex de GSH també hi són força abundants, amb nivells que van de 57 ± 27 a 34 ± 18 nmol g⁻¹. La PC₅ i el GSH són els menys concentrats a les parts aèries de la ginesta. A l'esperguera només es pot quantificar el GSH, la PC₄ i la PC₅, essent la PC₄ el tiol més concentrat (34 ± 1 nmol g⁻¹).

Taula 19. Concentracions de tiols i complexos Hg-tiol (nmol g⁻¹) dels extractes de les parts aèries i de les arrels de plantes d'Asparagus acutifolius i Retama sphaerocarpa ambdues provinents de la zona E3. Els valors corresponen a la mitjana de tres replicats $\pm$ la desviació estàndard (n.d. no detectable, n.q. no quantificable).

	<i>Asparagus acutifolius</i>		<i>Retama sphaerocarpa</i>	
	Parts aèries	Arrels	Parts aèries	Arrels
GSH	15 ± 3	34 ± 5	13 ± 1	8 ± 3
γ -Glu-Cys	n.q.	n.d.	n.d.	n.q.
PC ₂	n.q.	n.d.	57 ± 27	42 ± 17
PC ₃	n.q.	n.d.	34 ± 18	39 ± 11
PC ₄	34 ± 1	26 ± 6	66 ± 9	154 ± 18
PC ₅	17 ± 7	16 ± 5	$10,3 \pm 0,8$	67 ± 24
Hg-GSH	n.q.	$53,6 \pm 0,8$	40 ± 8	35 ± 10
Hg-PC ₂	n.q.	56 ± 3	n.d.	18 ± 9

A les arrels, el tiol més abundant als extractes de la ginesta és la PC₄, amb 154 ± 18 nmol g⁻¹. A l'esperguera, els tiols més abundants són, com s'ha vist abans, el GSH, el complex Hg-GSH i el complex Hg-PC₂, amb valors de 34 ± 5 , $53,6 \pm 0,8$ i 56 ± 3 nmol g⁻¹, respectivament, que també són més abundants que en els extractes de la ginesta. Encara que els complexos de Hg són més abundants als extractes d'arrels d'esperguera que en els de la ginesta, als extractes de la ginesta hi ha una major concentració de tiols de cadena llarga (67 ± 24 , 42 ± 17 i 39 ± 11 nmol g⁻¹ de PC₅, PC₂ i

PC₃, respectivament). El GSH i el complex Hg-PC₂ són els menys abundants en aquests extractes, amb concentracions de 8 ± 3 i 18 ± 9 i nmol g⁻¹, respectivament.

Aquestes troballes porten a la conclusió que, tot i que el contingut de Hg a les arrels i a les parts aèries és similar en ambdues espècies de plantes, la *Retama sphaerocarpa* té la capacitat de sintetitzar quantitats més grans de PCs de cadena més llarga que l'*Asparagus acutifolius*, que prefereix sintetitzar tiols petits i després complexar-los amb Hg. Aquest fet destaca la important funció que desenvolupen els tiols i els seus complexos metàl·lics en la captura i la fixació del Hg dels sòls, donant a les plantes la capacitat de fer front a la toxicitat dels metalls pesants en sòls contaminats.

Glutathione study in silver-based electrodes

This chapter presents the work done during the three months stay at the Faculty of Pharmacie of the *Université Libre de Bruxelles* (ULB) in Brussels (Belgium) under the supervision of the Professor Jean-Michel Kauffmann. The study is mainly centred on the analysis of GSH by flow injection analysis (FIA) with amperometric detection at a pure silver electrode or at a silver-modified carbon paste electrode (AgCPE). Repetitively and limits of detection and quantification have been evaluated for glutathione as well as calibration curves in a wide range of concentrations. The work also studies the complexation of this thiol with Hg and Cd.

This study is a preliminary work to assay the performance of the silver-modified carbon paste electrode for the analysis of thiols comparing it with the pure silver electrode.

12.1. Introduction

The biological aminothiols, such as cysteine (Cys), N-acetylcysteine (NAC), homocysteine (HCys) and glutathione (GSH) are critical physiological components and widely occur in animal tissues and fluids. The altered levels of the thiols (reduced forms) and their disulphides (oxidised forms) in physiological liquids have been linked to specific pathological conditions and are closely associated with several human diseases, especially premature arteriosclerosis, occlusive vascular and neurodegenerative disorders, leukaemia, diabetes, and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Furthermore, cysteine-rich peptides, such as metallothioneins (MTs) and phytochelatins (PCs) are important markers of metal stress in mammals and plants and the study of these compounds is fundamental for the understanding of their physiological roles. Several sulfhydryl-containing compounds, *e.g.*, d-penicillamine and tiopronin, are also well known as therapeutic pharmaceuticals [200].

In this work, the studied thiol is GSH (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine), a tripeptide which occurs in various cells of animals, plants and bacteria. It is the most abundant non-protein thiol in biological systems. GSH can be obtained from diet or synthesised *de novo* in the liver. GSH plays numerous important physiological roles in many biological processes, such as protein and DNA syntheses, transport, catabolism, and metabolism. GSH can be readily oxidised to its disulphide form (GSSG). Therefore, the ratio of both forms is crucial for the characterization of the oxidative stress in living systems. GSH participates in the protection against free radicals and reactive oxygen species (ROS) generated during metabolism. As a scavenger or reducing agent, GSH protects the living cells against hypoxia, toxicity, mutagenicity or transformation by radiation and carcinogens. GSH also functions to inactivate a number of exogenous compounds such as drugs and pollutants.

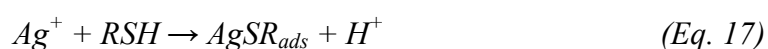
The determination of low molecular weight thiols in biological matrices is a topic of high interest due to the physiological importance and ubiquitous nature of thiols in animals and vegetables [201-207]. The analysis of these thiols in complex samples requires instrumentation optimization and great care in sample handling (storage and pre-treatment) in order to prevent their degradation by oxidation and/or by enzymatic digestion [201, 205]. A prolific number of analytical procedures have been developed for the determination of thiols. These molecules exhibit low UV-vis absorbance and

their sensitive and selective determination in complex matrices requires often pre- or post-chromatographic derivatization into UV absorbing or fluorescing species [200, 201]. Various electrochemical techniques have been successfully applied to the assay of aminothiols [202, 206, 208]. The direct oxidation of a thiol to its corresponding disulphide occurs at high positive potentials at carbon based electrodes therefore several strategies and different electrodes have been implemented for improving the amperometric detection of thiols in LC.

When electroanalytical methodologies are optimised with respect to the detection of a particular species, one must take into account several factors such as the nature of solution, the voltammetric or polarographic technique used, the electrode material and its structure. The present work is focused on the latter points.

Among all the different electrode materials, silver is of great importance and is usually used in reference or counter electrodes. However, it can also be used in the manufacture of working electrodes. Silver is stable in air and water, but tarnishes when exposed to ozone, hydrogen sulphide, or air containing sulphur. Macro silver electrodes have been used to detect hydrogen peroxide, cyanide, sulphide, iodide, bromide, and organic compounds such as enzymes, DNA and haemoglobin [209].

The amperometric detection of thiol compounds on a silver electrode is based on the oxidation of silver on the electrode surface (Eq. 16) followed by the complexation with the thiol species to form silver thiolates (Eq. 17) [210].



In recent years electrode developments have concentrated on miniaturisation and on the use of nanotubes, nanoballs, nanodots and nanoparticles. With regards to electroanalysis, there are four main advantages using nanoparticle-modified electrodes comparing with normal size electrodes. These are high effective surface area, high rate of mass transport, catalytic effects and control over local microenvironment [209].

Cost considerations are also important when an electrode is manufactured for the use in any real system. This can lead to expensive materials such as gold and platinum being avoided because of the cost incurred when using large amounts to create

macroelectrodes. Nanoparticle modification of an inexpensive base material, however, can lead to a larger surface area-to-volume ratio for the expensive metal, lowering the cost of the electrode. The large effective surface area may also offer a larger number of active sites and often a higher signal-to-noise ratio [209].

In the field of cathodic reductions, as well as anodic oxidations, the so-called composite solid electrodes (CSE) can be successfully utilised and can be a useful alternative to mercury, solid metal, or carbonaceous electrodes. CSEs are composed of at least one conducting and one insulating phase, which are mixed keeping their final solid state. They have been intensively developed and used for the last twenty years and, in some cases, they can successfully compete with traditional electrodes consisting of only one conducting phase [161]. They offer certain advantages, *e.g.*, low cost, high signal-to-noise ratio, broad potential window, resistance toward passivation and/or easy mechanical and electrochemical cleaning, compatibility with the concept of so-called “green analytical chemistry”, and the possibility of chemical modification of the conductor or the insulator phase or of their surface. Their mechanical robustness enables their application in flowing systems and/or in field measurements. The resistance towards passivation and the possibility of electrochemical cleaning is especially important because electrode fouling is probably the biggest obstacle to wider applications of electroanalytical methods in environmental analysis. The CSEs have found their applications in practically all branches of electrochemistry. The construction and composition of CSEs depends on the intended purpose of application. In this work it is demonstrated that a silver-modified carbon paste electrode, implemented as a detector in liquid chromatography, permits repetitive assays over a long period of time showing good selectivity and high sensitivity [161].

Silver-modified carbon paste electrodes (AgCPE), prepared from silver and graphite micronised powders and methacrylate resin, have been presented as a suitable sensor for the voltammetric measurements [160]. Silver-modified carbon paste electrodes bring together the advantages of using a silver sensor and being a nanoparticle-modified electrode. In this study, the use of a pure silver working electrode and a handmade silver-modified carbon paste electrode in amperometric detection is compared. This hand-made electrode was first developed for the determination of iodide [211], obtaining a wide linear concentration range and very low detection and quantification limits.

The aim of this work is the development of a new silver-modified carbon paste working electrode for the study of GSH and its complexes with heavy metal ions, and the comparison of the obtained results with those obtained on a pure silver electrode.

12.2. Results and discussion

12.2.1. Study of the response of silver-based electrodes

For the optimisation of the methodology, different silver based electrodes were tested: a pure silver electrode and a silver-modified carbon paste electrode (AgCPE) with 35% of micronised silver powder. This proportion had been previously optimised in the research group. The applied potential was optimised in previous studies [210] and the best results were obtained at a working potential of 0.08 V. For this reason, 0.08 V was selected as the working potential for both electrodes. A FIA system (without separation column) was used with two different mobile phases: one acidic mobile phase formed by NaNO_3 and formic acid at a pH of 4.5 with 10% of methanol, and the other one consisting of phosphate buffer $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ at the physiologic pH of 7.4, containing NaNO_3 and 2% of methanol. The first mobile phase was selected due to a good compromise in terms of peak shape, peak resolution, post-peak drop and signal/noise ratio, as previous studies indicate [210]. The second one was selected because of the possible future application to the determination of thiols in biological fluids.

The signal obtained results from the oxidation of Ag^0 on the electrode surface that is favoured by the presence of GSH (Eq. 16 and Eq. 17), and takes place at less positive potential than in the absence of thiol. In other words, the interaction of an aminothiols (RSH) with silver ions at the electrode/solution interface (Eq. 17) forces the reaction generating silver ions from the bare silver electrode (Eq. 16) which gives rise to the amperometric anodic current.

Table 20 presents the calibration curves and the limits of detection and quantification for GSH injections using both silver based electrodes in two mobile phases. From these data it can be observed that in our case the pure silver electrode is more appropriate for the analysis of GSH because it has lower limits of detection and

quantification. Among the mobile phases used, although they seem to behave similarly, it can be seen that the most appropriate one is that with a physiological pH of 7.4.

Table 20. Calibration curves and limits of detection and quantification for the determination of GSH using FIA and different silver based electrodes with different mobile phases.

Methodology	Calibration curves ^a	LOD ^b (mol L ⁻¹)	LOQ ^c (mol L ⁻¹)
Pure silver electrode, pH=4.5	$y=1.46 \cdot 10^{-7}x+0.207$, $r^2=0.999$	$9.34 \cdot 10^{-8}$	$3.11 \cdot 10^{-7}$
AgCPE, pH=4.5	$y=1.23 \cdot 10^{-6}x+0.536$, $r^2=0.949$	$1.31 \cdot 10^{-6}$	$4.36 \cdot 10^{-6}$
Pure silver electrode, pH=7.4	$y=3.58 \cdot 10^{-7}x-0.366$, $r^2=0.999$	$3.03 \cdot 10^{-8}$	$1.01 \cdot 10^{-7}$
AgCPE, pH=7.4	$y=4.94 \cdot 10^{-6}x+0.660$, $r^2=0.951$	$2.35 \cdot 10^{-7}$	$7.82 \cdot 10^{-7}$

^a Where y is the peak area (nA s) and x the injected concentration (mol L⁻¹).

^b Limit of detection calculated with the 3σ criterion.

^c Limit of quantification calculated with the 10σ criterion.

The repeatability is defined as the relative standard deviation (RSD) associated with a number of measurements done at the same experimental conditions and on the same day. To assay the repeatability of the method, successive injections of GSH were done and the peak area was compared. This study was performed using the mobile phase at pH 7.4 and both electrodes. Table 21 presents the obtained results. As it can be seen, pure silver electrode shows the best repeatability with lower relative standard deviation and higher response (peak area average).

Table 21. Repeatability of GSH (10^{-6} mol L⁻¹) in a FIA system using different silver based electrodes.

Methodology	Number of injections	Area average (nA s)	RSD (%)
Pure silver electrode, pH=7.4	10	45	3
AgCPE, pH=7.4	9	30	7

This study points out that the AgCPE developed in this work does not offer better sensibility nor repeatability than pure silver electrode. Nevertheless, the preparation of

AgCPE electrodes could be optimised to offer better results. For this reason further studies are required.

12.2.2. Analysis of metal:GSH mixtures

The studied silver-based electrodes have been further used for studying the complexation of Hg(II) and Cd(II) with GSH. In the following lines, some results of these studies are presented.

For pure silver electrode and using a mobile phase at pH 4.5, the complexation of GSH with Cd and Hg was assayed by injecting mixtures of different metal:GSH ratio (Figure 55 and Figure 57).

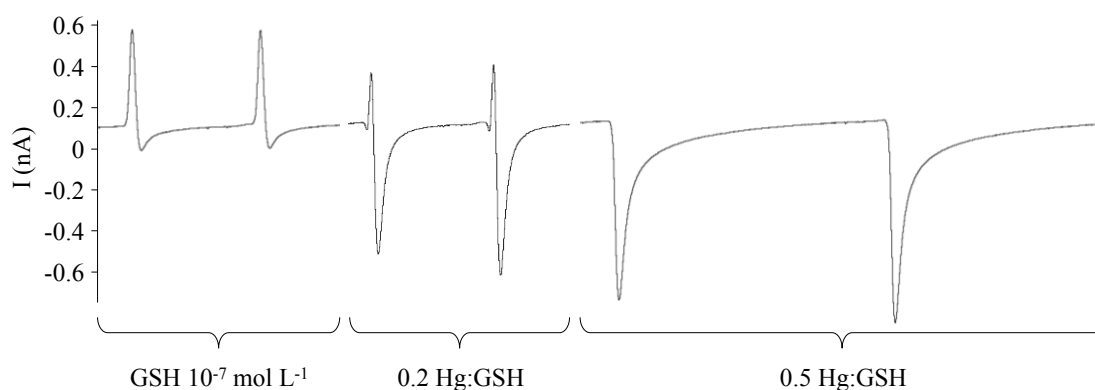


Figure 55. Diagrams of mixtures of $\text{GSH } 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and mixtures of GSH with Hg (molar ratio Hg:GSH of 0.2 and 0.5) using pure silver electrode and mobile phase at $\text{pH}=4.5$. Two different injections of each mixture have been done.

In the case of Hg(II) (Figure 55), a single peak appears when no metal is present in the solution which corresponds to the oxidation of Ag^0 to generate Ag^+ to form the Ag-GSH complex according to the concentration of GSH present in the mixture. This peak related to GSH decrease at a molar ratio of 0.2 due to the partial complexation of GSH with Hg and, therefore, there are less free GSH for complexing Ag^+ . Moreover the injections of Hg:GSH mixtures yield intense reduction signals which could be associated to the reduction of mercury at the electrode surface. At a Hg:GSH molar ratio of 0.5, no oxidation peak is observed because at this Hg proportion all the GSH is complexed into a ML_2 complex avoiding the oxidation of silver. For this reason only a reduction signal is noticed which could be associated with the reduction of either free Hg(II) or Hg(II) from the Hg-GSH complex.

For a better understanding of their behaviour, different Hg(II):GSH mixtures with increasing GSH concentrations have been prepared to simulate an inverse titration (Figure 56). When injecting Hg alone, a large reduction peak is observed due to the reduction of Hg(II). When Hg:GSH mixtures are injected the peak related to mercury reduction sharply decreases in agreement with the GSH concentration added because of the formation of Hg-GSH complexes. At high proportions of GSH (ratio 0.25 Hg:GSH), apart from the smaller reduction peak, an oxidation peak is observed which is related to the oxidation of Ag^0 favoured by the presence of free GSH in the solution.

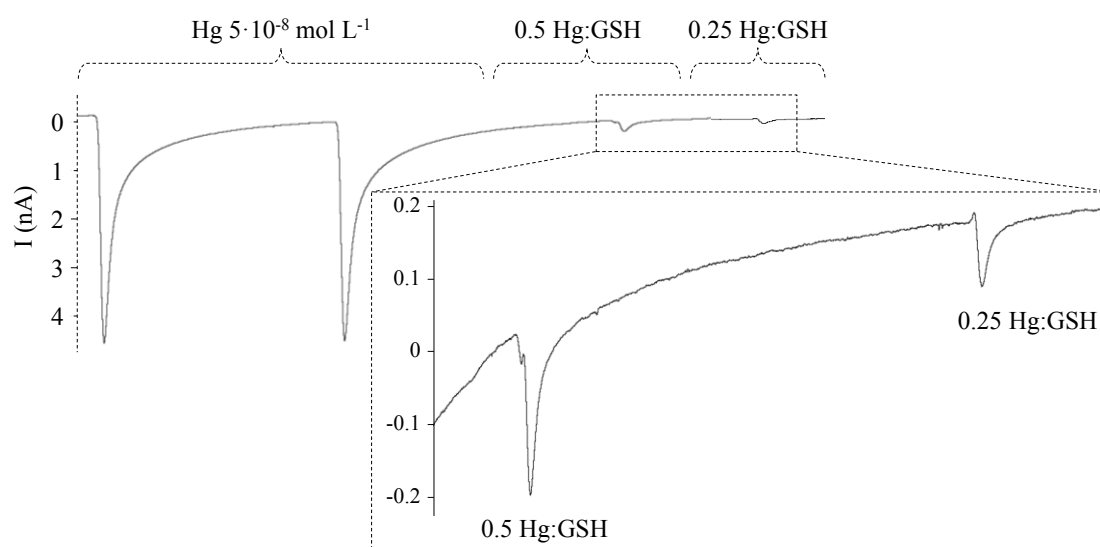
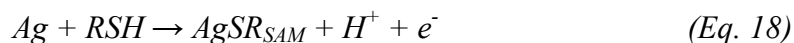


Figure 56. Cyclic voltammograms of Hg(II) ($5 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) and Hg:GSH mixtures (molar ratio 0.5 and 0.25) using pure silver electrode and mobile phase at pH=4.5. A zoom of the Hg:GSH mixtures zone is shown as an insert.

In the case of cadmium (Figure 57), the peak related to GSH decrease at a molar ratio of 0.2 due to the partial complexation of GSH with Cd and, therefore, there are less free GSH for complexing Ag^+ . In this case, no reduction peak is observed because the reduction of the metal is not possible at this potential. At a higher molar ratio (0.5), the oxidation peak seems to increase probably due to the competition between Cd^{2+} and Ag^+ to complex GSH. At this molar ratio, a poor repetitivity is observed which may be caused by this equilibrium. A drop of the baseline following the aminothiols peak is noticed always, although it reaches quickly its original value. From these data it is inferred that aminothiols chemisorption (AgSR_{SAM}) and likely some silver-aminothiols deposit (AgSR_{ads}) occur on the silver electrode during the relatively short residence time of the aminothiols in the thin-layer cell blocking some part of the working electrode.

Chemisorption and Ag-SR deposit induce changes in the electrode capacitance and explain the post-peak drop. Amino-thiol chemisorption by spontaneous self-assembling is a well-known and relatively complex phenomenon involving an oxidation process expressed as in Eq. 18.



Aminothiols react strongly with silver and silver ions via their thiol group even in acidic media. Under the present hydrodynamic conditions, the chemisorbed layer on silver (AgSR_{SAM}) is likely thin and poorly packed due to steric hindrance allowing subsequently injected aminothiols to react with silver ions at the electrode/solution interface. The post peak drop and progressive signal return to the original baseline level permit to infer fast adsorption and slow desorption of the silver aminothiolate (AgSR_{ads}) species [210].

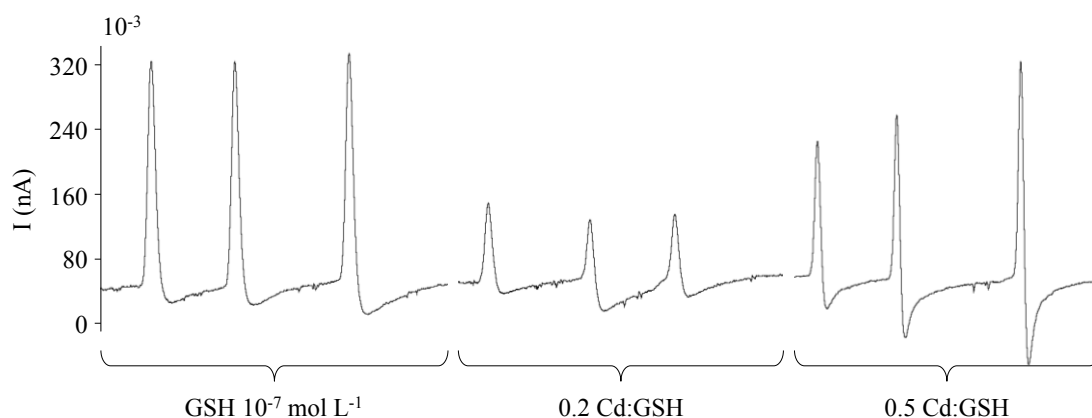


Figure 57. Diagrams of $\text{GSH } 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and mixtures of GSH with Cd (molar ratio Cd:GSH of 0.2 and 0.5) using pure silver electrode and mobile phase at $\text{pH}=4.5$. Three different injections of each mixture have been done.

Although numerous further studies are required in order to assess the complexation processes using all the electrodes in both mobile phases, the obtained initial results show that the handmade silver-based electrode does not offer the expected results since there is no improvement in the detection limits or in the repeatability in comparison with the pure silver electrode. For this reason, more studies are needed to find the best conditions for the preparation of the electrodes to provide better sensibility in the determination of GSH and to extend the study to other biological aminothiols.

Part V

CONCLUSIONS

The results obtained throughout the Thesis have led to the following conclusions:

1. The use of a C18 column in reversed-phase HPLC has permitted the separation of phytochelatins, their fragments and their Hg complexes. The amperometric detection at a glassy carbon electrode combined with HPLC is a promising tool for the analysis of phytochelatins and their Hg(II) complexes at the low concentration levels that are expected to occur in natural extracts from plants suffering from mercury contamination. Quality parameters of the amperometric methodology have been evaluated and compared with those obtained with UV detection showing lower detection limits for the first one. This methodology can distinguish the free phytochelatins and their Hg(II) complexes, and also can resolve the complexes of the shorter PCs and their fragments. However, for PC₃ and longer chain PCs, the Hg(II) complexes produce many broad and overlapping peaks which hinder an accurate analysis. In these cases, ESI-MS has been used as a complementary technique to find out the stoichiometry of these long chain PC complexes.
2. The separation and detection of the complexes of glutathione with Cd(II) and Pb(II) has not been possible with this methodology probably due to the lability of the formed complexes. For this reason, the work has been centred on the analysis of Hg(II) complexes, which have larger formation constants and permits their separation and detection.
3. *Hordeum vulgare* (barley) plants stressed with Hg(II) showed a clear growth inhibition with an increase of Hg concentration in the medium which resulted in a progressive decrease of root and shoot fresh weight. However, 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Hg(II) treatment was not enough to completely inhibit plant growth. Moreover, these plants show a high ability to uptake and accumulate Hg in both shoots and roots although the concentration of Hg accumulated in roots is higher than the accumulated in shoots. Phytochelatins and their Hg complexes have been evaluated in both shoots and roots. In general, the concentration of thiols in roots was higher than in shoots and their concentration increased according to the amount of metal applied. The most abundant thiols in shoots were GSH and its Hg complex, while in roots PC₂ and its complex had higher values letting us to

consider PC₂ as a marker of metal stress in roots of barley as it increases in concordance with the Hg concentration applied.

4. In plants stressed simultaneously with Cd(II) and Hg(II), despite of the fact that the amount of Hg(II) applied was the same as in plants stressed only with Hg(II), the biomass of these plants was bigger, probably due to the capacity of Cd to induce more PCs which could help the plant to diminish the toxicity of Hg. To confirm it, the PCs analysis was performed showing a clear increase of PC₂ and its Hg complex, with concentrations that nearly double its values in comparison with roots stressed only with Hg(II) thus confirming the PCs-inductor function of Cd. On the other hand, when both metals were present, regardless of their concentration, a lower uptake of Hg was observed leading to a conclusion that *Hordeum vulgare* plants have less affinity for Hg(II) in the simultaneous presence of Cd(II) than when Hg is alone.
5. To compare the induction effect of different metals and metalloids, *Hordeum vulgare* plants stressed with Hg(II), Cd(II), As(III) and Pb(II) were considered. Due to the precipitation of lead in the nutritive solution, the observed symptoms cannot be related to the applied concentration despite the results are also presented in the Thesis. Plants stressed with the other heavy metals, suffer clear symptoms of phytotoxicity as reflected in the marked reduction of their biomass indicating the plants' capacity to uptake heavy metals into their tissues. The content of heavy metal in shoots and roots increase in a dose-dependent manner. Furthermore, the concentration of heavy metals in roots was higher than in shoots. The highest uptake in both shoots and roots has been observed for Cd(II). In shoots, the uptake of Cd and As was similar and much higher than for Hg. Conversely, roots accumulated similar values of Cd and Hg, whereas uptake of As was lower. Comparing shoots and roots, As seem to be much more mobile in view of the amount absorbed by roots and the concentration in roots. Nevertheless, *Hordeum vulgare* plants are considered a shoot metal excluder which, due to a tendency to store heavy metals in root tissues, is suitable for phytostabilisation of metal-contaminated soils.
6. The induction of PCs by Hg(II), Cd(II) and As(III) in *Hordeum vulgare* plants increased according to the heavy metal concentration supplied to the plant and

was higher in roots than in shoots. The length of the PC chain depended on the level of metal concentration as well as the metal supplied. In Hg-stressed roots the most synthesised PC was PC₂ and in shoots GSH was the mainly found thiol. Cd(II) is more likely to induce the synthesis of longer-chain PCs in both shoots and roots. Moreover, the amount of PCs synthesised in the experiments with Cd was higher by far than in the other ones, indicating that among the metals studied, Cd(II) is the most potent inducer of PCs. As-stressed plants tended to synthesise small thiols and only PC₂ was detected in shoots and PC₃ in roots. PCA was performed to the obtained thiols concentration data to establish a pattern of PC synthesis depending on the stressor metal or its concentration. The PCA results indicate that smaller thiols are almost always important at low metal concentration levels, whereas long-chain PCs are more characteristic at high metal concentration. As explained by the PCA model and as pointed before, As(III) is not a very good inducer of PCs and tends to synthesise small thiols comparing to Cd which is completely related to PCs.

7. Soils collected in the Almadén mining district are highly contaminated although the maximum organic mercury found is only 0.33% of the total mercury content. This mercury is practically immobile since only 1.94% is extracted with the most effective extracting agent used (EDTA). As it was foreseeable, plants from these zones are highly contaminated with Hg as inferred from the analysis of aerial parts and roots of *Asparagus acutifolius* where Hg concentration was consistent with its concentration in soils. In general, plants from all sites accumulated more mercury in roots than in aerial parts, being plants from above the furnace ruins the most Hg-contaminated plants in both aerial parts and roots.
8. The PCs content in these plants was consistent with the concentration of Hg found in aerial parts and roots; more mercury induces the synthesis of higher amounts of PCs as a response to metal toxicity. Longer-chain PCs were more abundant in roots than in aerial parts of plants, opposite to GSH which was more concentrated in aerial parts. When Hg concentration in soils increases, the concentrations of the longest-chain phytochelatins (PC₃, PC₄ and PC₅) increase and, in consequence, smaller thiols such as GSH and PC₂ decrease their concentrations because they serve as substrate for the synthesis of longer-chain PCs. Several differences between roots and aerial parts of plants were observed: in aerial parts the main PC

synthesised is PC₃, while in roots PC₄ and PC₅ have higher concentrations; and the Hg complexes of GSH and PC₂ are more abundant in roots, as they accumulate more mercury than aerial parts.

9. Silver electrodes are good sensors for the analysis of thiol compounds. In this study, the pure silver electrode has been compared with a hand-made silver-modified carbon paste electrode both giving low detection limits and a linear response. Nevertheless, more studies have to be done to improve the repeatability of AgCPE. When analysing metal:GSH mixtures in a FIA system using a silver-based electrode, the oxidation signal of the silver from the electrode, which is favoured and related to the concentration of free glutathione, diminishes with the addition of heavy metal due to the formation of the M-GSH complexes. When adding more metal to the mixture, the metal reduction signal is observed, especially in the case of Hg(II). This work is incomplete and more studies are needed to find the best conditions for the preparation of AgCPE and to apply this electrode in HPLC for the analysis of other biological aminothiols and their complexation with metal ions.

Part VI

BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/overview-of-contaminants-affecting-soil-and-groundwater-in-europe>, consultada el 15 de gener de 2014.
2. J.H. Duffus. "Heavy Metals"—*A meaningless term?* Pure Appl. Chem. 74 (2002) 793-807.
3. K-J. Appenroth. *Definition of "heavy metals" and their role in biological systems*. A: I. Sherameti, A. Varma (eds), Soil heavy metals Vol. 19 (Soil biology), Springer, Berlin, 2010.
4. http://ofmpub.epa.gov/sor_internet/registry/termreg/searchandretrieve/termsandacronyms/search.do?matchCriteria=Contains&checkedTerm=on&checkedAcronym=on&search=Search&term=heavy%20metals, consultada el 15 de gener de 2014.
5. Directiva 2008/1/CE del Parlament Europeu i del Consell de la Unió Europea de 15 de gener de 2008. Diario Oficial de la Unión Europea, 29/01/2008, 24, 8-29.
6. Directiva 2008/105/CE del Parlament Europeu i del Consell de la Unió Europea de 16 de desembre de 2008. Diario Oficial de la Unión Europea, 24/12/2008, 348, 84-97.
7. Reial Decret 140/2003 del Ministeri de la Presidència de 7 de febrer de 2003. Boletín Oficial del Estado, 21/02/2003, 45, 7.228-7.245.
8. World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality. 4th Edition 2011.
9. Resolució de la Secretaria d'Estat de Medi Ambient i Habitatge de 28 d'abril de 1995. Boletín Oficial del Estado, 13/05/1995, 114, 13.926-13.930.
10. Reial Decret 9/2005 del Ministeri de la Presidència de 14 de gener de 2005. Boletín Oficial del Estado, 18/01/2005, 15, 1.833-1.843.
11. <http://www20.gencat.cat/portal/site/arc/menuitem.60fb2478680e61fd624a1d25b0c0e1a0/?vgnextoid=e55a1573d17d6210VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD&vgnnextchannel=e55a1573d17d6210VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD&vgnnextfmt=default>, consultada el 15 de gener de 2014.
12. <http://www20.gencat.cat/portal/site/arc/menuitem.60fb2478680e61fd624a1d25b0c0e1a0/?vgnextoid=fd370431b17d6210VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD&vgnnextchannel=fd370431b17d6210VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD&vgnnextfmt=default>, consultada el 15 de gener de 2014.
13. Resolució de la Secretaria d'Estat de Canvi Climàtic de 20 de gener de 2009. Boletín Oficial del Estado, 26/02/2009, 49, 19.893-20.016.

14. Reial Decret 102/2011 del Ministeri de la Presidència de 28 de gener de 2011. Boletín Oficial del Estado, 29/01/2011, 25, 9.574-9.626.
15. World Health Organization, Air quality guidelines for Europe. WHO Regional Publications 1987.
16. A. Kabata-Pendias. *Trace elements in soils and plants*. 3a edició, CRC Press, Boca Raton, 2001.
17. H.B. Bradl. *Heavy metals in the environment: Origin, Interaction and Remediation*, Volume 6, Academic Press, London, 2005.
18. <http://sparkcharts.sparknotes.com/gensci/envsci/section3.php>, consultada el 15 de gener de 2014.
19. G.S. Senesi, G. Baldassarre, N. Senesi, B. Radina. *Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health*. Chemosphere 39 (1999) 343-377.
20. http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/daviz/sector-split-of-emissions-of-6#tab-chart_1, consultada el 15 de gener de 2014.
21. W. Lynn. *The industrial landscape of Rio Tinto, Huelva, Spain*. Ind. Arch. Rev. 12 (1989) 67-76.
22. W. Salomons. *Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention*. J. Geochem. Explor. 52 (1995) 5-23.
23. P. Higuera, R. Oyarzun, J. Lillo, J.C. Sánchez-Hernández, J.A. Molina, J.M. Esbrí, S. Lorenzo. *The Almadén district (Spain): anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites*. Sci. Total Environ. 356 (2006) 112-124.
24. J.E. Gray, M.E. Hines, P.L. Higuera, I. Adatto, B.K. Lasorsa. *Mercury speciation and microbial transformations in mine wastes, stream sediments, and surface waters at the Almadén mining district, Spain*. Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 4.285-4.292.
25. P. Higuera, R. Oyarzun, H. Biester, J. Lillo, S. Lorenzo. *A first insight into mercury distribution and speciation in soils from the Almadén mining district*. J. Geochem. Explor. 80 (2003) 95-104.
26. M. López, I. González, A. Romero. *Trace elements contamination of agricultural soils affected by sulphide exploitation (Iberian Pyrite Belt, Sw Spain)*. Environ. Geol. 54 (2008) 805-818.

27. D.J. Pain, A. Sánchez, A.A. Meharg. *The Doñana ecological disaster: contamination of a world heritage estuarine marsh ecosystem with acidified pyrite mine waste*. Sci. Total Environ. 222 (1998) 45-54.
28. A. Gómez-Parra, J.M. Forja, T.A. Delvalls, I. Sáenz, I. Riba. *Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill (SW Spain)*. Mar. Pollut. Bull. 40 (2000) 1.115-1.123.
29. P. Burgos, P. Madejón, E. Madejón, I. Girón, F. Cabrera, J.M. Murillo. *Natural remediation of an unremediated soil twelve years after a mine accident: trace element mobility and plant composition*. J. Environ. Manage. 114 (2013) 36-45.
30. F. Cabrera, L. Clemente, E. Díaz Barrientos, R. Lopez, J.M. Murillo. *Heavy metal pollution of soils affected by the Guadiamar toxic flood*. Sci. Total Environ. 242 (1999) 117-129.
31. E. López-Pamo, D. Baretino, C. Anóon-Pacheco, G. Ortiz, J.C. Arránz, J.C. Gumiel, B. Martínez-Pledel, M. Aparicio, O. Montouto. *The extent of the Aznalcóllar pyritic sludge spill and its effects on soils*. Sci. Total Environ. 242 (1999) 57-88.
32. <http://www.epa.gov/raf/metalsframework/pdfs/metals-risk-assessment-final.pdf>, consultada el 15 de gener de 2014.
33. M.N.V. Prasad. *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. Springer, New Delhi, 1999.
34. A. Violante, V. Cozzolino, L. Perelomov, A.G. Caporale, M. Pigna. *Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments*. J. Soil Sci. Plant Nut. 10 (2010) 268-292.
35. S.K. Gupta, M.K. Vollmer, R. Krebs. *Importance of mobile, mobilisable and pseudo total metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management*. Sci. Total Environ. 178 (1996) 11-20.
36. D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H.P. Van Leeuwen, R. Łobiński. *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)*. Pure Appl. Chem. 72 (2000) 1.453-1.470.
37. M.M. Lasat. *Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues*. J. Hazard. Subst. Res. 2 (2000) 1-25.

38. P. Quevauviller. *Methodologies for soil and sediment fractionation studies*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002.
39. A. Tessier, P.G.C. Campbell, M. Bisson. *Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals*. Anal. Chem. 51 (1979) 844-851.
40. G. Rauret. *Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment*. Talanta 46 (1998) 449-455.
41. J. Hlavay, T. Prohaska, M. Weisz, W.W. Wenzel, G.J. Stinger. *Determination of trace elements bound to soils and sediment fractions (IUPAC Technical Report)*. Pure Appl. Chem. 76 (2004) 415-442.
42. A.V. Filgueiras, I. Lavilla, C. Bendicho. *Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples*. J. Environ. Monitor. 4 (2002) 823-857.
43. <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>, consultada el 15 de gener de 2014.
44. T.W. Clarkson, L. Magos. *The toxicology of mercury and its chemical compounds*. Crit. Rev. Toxicol. 36 (2006) 609-662.
45. B.V. Tangahu, S.R.S. Abdullah, H. Basri, M. Idris, N. Anuar, M. Mukhlisin. *A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation*. Int. J. Chem. Eng. 2011 (2011) 1-31.
46. J.F. Risher. *Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects*. Concise International Chemical Assessment Document 50. World health Organization, Geneva 2003.
47. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>, consultada el 15 de gener de 2014.
48. R. Azevedo, E. Rodríguez. *Phytotoxicity of mercury in plants: a review*. J. Bot. 2012 (2012) 1-6.
49. F. Fitzgerald, T.W. Clarkson. *Mercury and monomethylmercury: present and future concerns*. Environ. Health Perspect. 96 (1991) 159-166.
50. D.W. Boening. *Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review*. Chemosphere 40 (2000) 1.335-1.351.
51. T.L. Leonard, G.E. Taylor, M.S. Gustin, G.C.J. Fernández. *Mercury and plants in contaminated soils: 1. uptake, partitioning, and emission to the atmosphere*. Environ. Toxicol. Chem. 17 (1998) 2.063-2.071.
52. Reglament 1907/2006 del Parlament Europeu i del Consell de la Unió Europea de 18 de desembre de 2006. Diario Oficial de la Unión Europea, 30/12/2006, 396, 1-852.

53. Reglament 552/2009 de la Comissió de 22 de juny de 2009. Diario Oficial de la Unión Europea, 26/06/2009, 164, 7-31.
54. Reglament 847/2012 de la Comissió de 19 de setembre de 2012. Diario Oficial de la Unión Europea, 20/09/2012, 253, 1-4.
55. Reglament 1102/2008 del Parlament Europeu i del Consell de la Unió Europea de 22 d'octubre de 2008. Diario Oficial de la Unión Europea, 14/11/2008, 304, 75-79.
56. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0056.pdf>, consultada el 15 de gener de 2014.
57. G. Ziemacki, G. Viviano, F. Merli. *Heavy metals: sources and environmental presence*. Ann. Ist. Super. Sanita 25 (1989) 531-536.
58. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>, consultada el 15 de gener de 2014.
59. <http://www.epa.gov/ttnchie1/le/arsenic.pdf>, consultada el 15 de gener de 2014.
60. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>, consultada el 15 de gener de 2014.
61. E. Smith, R. Naidu, A.M. Alston. *Arsenic in the soil environment: a review*. Adv. Agron. 64 (1998) 149-195.
62. B.K. Mandal, K.T. Suzuki. *Arsenic round the world: a review*. Talanta 58 (2002) 201-235.
63. Reial Decret 403/2000 del Ministeri d'Indústria i Energia de 24 de març de 2000. Boletín Oficial del Estado, 12/04/2000, 88, 14.959.
64. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>, consultada el 15 de gener de 2014.
65. J. Barceló, C. Poschenrieder. *Phytoremediation: principles and perspectives*. Contrib. Sci. 2 (2003) 333-344.
66. C.N. Mulligan, R.N. Yong, B.F. Gibbs. *Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation*. Eng. Geol. 60 (2001) 193-207.
67. P.K. Padmavathiamma, L.Y. Li. *Phytoremediation Technology: hyper-accumulation metals in plants*. Water Air Soil Pollut. 184 (2007) 105-126.
68. C. Garbisu, I. Alkorta. *Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment*. Bioresour. Technol. 77 (2001) 229-236.
69. K. Shah, J.M. Nongkynrih. *Metal hyperaccumulation and bioremediation*. Biol. Plant. 51 (2007) 618-634.
70. <http://www.algoflash.com/whyUseAlgoflash.html>, consultada el 15 de gener de 2014.

71. D.E. Salt, R.D. Smith, I. Raskin. *Phytoremediation*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49 (1998) 643-668.
72. A. Sas-Nowosielska, R. Kucharski, E. Małkowski, M. Pogrzeba, J.M. Kuperberg, K. Kryński. *Phytoextraction crop disposal—an unsolved problem*. Environ. Pollut. 128 (2004) 373-379.
73. M. Rezvani, F. Zaefarian. *Bioaccumulation and translocation factors of cadmium and lead in Aeluropus littoralis*. Aust. J. Agr. Eng. 2 (2011) 114-119.
74. S.S. Andra, R. Datta, D. Sarkar, K.C. Makris, C.P. Mullens, S.V. Sahi, S.B.H. Bach. *Synthesis of phytochelatins in vetiver grass upon lead exposure in the presence of phosphorus*. Plant Soil 326 (2010) 171-185.
75. J.L. Hall. *Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance*. J. Exp. Bot. 53 (2002) 1-11.
76. L. Sanità di Toppi, R. Gabrielli. *Response to cadmium in higher plants*. Environ. Exp. Bot. 41 (1999) 105-130.
77. S. Clemens. *Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants*. Biochimie 88 (2006) 1.707-1.719.
78. J.P. Navarro-Aviñó, I. Aguilar Alonso, J.R. López-Moya. *Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas*. Ecosistemas 16 (2007) 10-25.
79. J.-M. Gong, D.A. Lee, J.I. Schroeder. *Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (2003) 10.118-10.123.
80. D.E. Salt, R.C. Prince, I.J. Pickering, I. Raskin. *Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in India Mustard*. Plant Physiol. 109 (1995) 1.427-1.433.
81. Y. Li, O.P. Dankher, L. Carreira, A.P. Smith, R.B. Meagher. *The shoot-specific expression of γ -glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercuri and arsenic*. Plant Physiol. 141 (2006) 288-298.
82. E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk. *Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (1987) 439-443.
83. E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk. *Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants*. Science 230 (1985) 674-676.

84. C.S. Cobbett. *Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification*. Plant Physiol. 123 (2000) 825-832.
85. M.H. Zenk. *Heavy metal detoxification in higher plants—a review*. Gene 179 (1996) 21-30.
86. C. Cobbett, P. Goldsbrough. *Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis*. Annu. Rev. Plant Biol. 53 (2002) 159-182.
87. W.E. Rauser. *Phytochelatins and related peptides*. Plant Physiol. 109 (1995) 1.141-1.149.
88. E. Grill, S. Löffler, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk. *Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase)*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1989) 6.838-6.842.
89. C.S. Cobbett. *Phytochelatase biosynthesis and function in heavy-metal detoxification*. Curr. Opin. Plant Biol. 3 (2000) 211-216.
90. T. Maitani, H. Kubota, K. Sato, T. Yamada. *The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatase and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of Rubia tinctorum*. Plant Physiol. 110 (1996) 1.145-1.150.
91. S. Loeffler, A. Hochberger, E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk. *Termination of the phytochelatase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product*. FEBS Lett. 258 (1989) 42-46.
92. R.K. Mehra, J. Miclat, V.R. Kodati, R. Abdullah, T.C. Hunter, P. Mulchandani. *Optical spectroscopic and reverse-phase HPLC analyses of Hg(II) binding to phytochelatins*. Biochem. J. 314 (1996) 73-82.
93. R.K. Mehra, K. Tran, G.W. Scott, P. Mulchandani, S.S. Saini. *Ag(I)-Binding to Phytochelatins*. J. Inorg. Biochem. 61 (1996) 125-142.
94. W. Bae, R.K. Mehra. *Properties of glutathione- and phytochelatase-capped CdS bionanocrystallites*. J. Inorg. Biochem. 69 (1998) 33-43.
95. I. Šestáková, H. Vodičková, P. Mader. *Voltammetric methods for speciation of plant metallothioneins*. Electroanal. 10 (1998) 764-770.
96. B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, I. Šestáková, J. Velek, C. Ariño, M. Esteban. *Differential pulse voltammetric study of the complexation of Cd(II) by the phytochelatase (γ -Glu-Cys)₂Gly assisted by multivariate curve resolution*. J. Electroanal. Chem. 520 (2002) 111-118.

97. V. Dorčák, I. Šestáková. *Electrochemical behavior of phytochelatins and related peptides at the hanging mercury drop electrode in the presence of cobalt(II) ions.* Bioelectrochemistry 68 (2006) 14-21.
98. N. Serrano, I. Šestáková, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño. *Adsorptive accumulation in constant current stripping chronopotentiometry as an alternative for the electrochemical study of metal complexation by thiol-containing peptides.* J. Electroanal. Chem. 591 (2006) 105-117.
99. E. Chekmeneva, R. Prohens, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban. *Competitive binding of Cd^{2+} and Zn^{2+} with the phytochelatin $(\gamma\text{-glu-cys})_4\text{-gly}$: comparative study by mass spectrometry, voltammetry-multivariate curve resolution and isothermal titration calorimetry.* Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 2.860-2.866.
100. E. Chekmeneva, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban. *Binding of Hg^{2+} with phytochelatins: Study by differential pulse voltammetry on rotating au-disk electrode, electrospray ionization mass-spectrometry, and isothermal titration calorimetry.* Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 7.010-7.015.
101. R. Gusmão, S. Cavanillas, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban. *Circular dichroism and voltammetry, assisted by multivariate curve resolution, and mass spectrometry of the competitive metal binding by phytochelatin PC₅.* Anal. Chem. 82 (2010) 9.006-9.013.
102. S. Cavanillas, R. Gusmão, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban. *Voltammetric analysis of phytochelatin complexation in ternary metal mixtures supported by multivariate analysis and ESI-MS.* Electroanal. 24 (2012) 309-315.
103. R. Gusmão, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban. *Cadmium binding in mixtures of phytochelatins and their fragments: a voltammetric study assisted by multivariate curve resolution and mass spectrometry.* Analyst 135 (2010) 86-95.
104. R. Gusmão, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban. *Electrochemical survey of the chain length influence in phytochelatins competitive binding by cadmium.* Anal. Biochem. 406 (2010) 61-69.
105. D. Potesil, J. Petrlova, V. Adam, J. Vacek, B. Klejdus, J. Zehnalek, L. Trnkova, L. Havel, R. Kizek. *Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* J. Chromatogr. A 1.084 (2005) 134-144.

106. J. Petrlova, R. Mikelova, K. Stejskal, A. Kleckerova, O. Zitka, J. Petrek, L. Havel, J. Zehnalek, V. Adam, L. Trnkova, R. Kizek. *Simultaneous determination of eight biologically active thiol compounds using gradient elution liquid chromatography with Coul-Array detection*. J. Sep. Sci. 29 (2006) 1.166-1.173.
107. V. Supalkova, D. Huska, V. Diopan, P. Hanustiak, O. Zitka, K. Stejskal, J. Baloun, J. Pikula, L. Havel, J. Zehnalek, V. Adam, L. Trnkova, M. Beklova, R. Kizek. *Electroanalysis of plant thiols*. Sensors 7 (2007) 932-959.
108. O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban. *Comparison of voltammetric detection assisted by multivariate curve resolution with amperometric detection in liquid chromatographic analysis of cysteine-containing compounds*. J. Chromatogr. A 1.062 (2005) 95-101.
109. E. Morelli, G. Scarano. *Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom Phaeodactylum tricornutum*. Marine Environ. Res. 52 (2001) 383-395.
110. E. Morelli, B.H. Cruz, S. Somovigo, G. Scarano. *Speciation of cadmium- γ -glutamyl peptides complexes in cells of the marine microalga Phaeodactylum tricornutum*. Plant Sci. 163 (2002) 807-813.
111. G. Scarano, E. Morelli. *Characterization of cadmium- and lead- phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure*. Biometals 15 (2002) 145-151.
112. E. Morelli, G. Scarano. *Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga Phaeodactylum tricornutum*. Plant Sci. 167 (2004) 289-296.
113. V. Loreti, D. Toncelli, E. Morelli, G. Scarano, J. Bettmer. *Biosynthesis of Cd-bound phytochelatins by Phaeodactylum tricornutum and their speciation by size-exclusion chromatography and ion-pair chromatography coupled to ICP-MS*. Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 398-403.
114. E. Morelli, M.C. Mascherpa, G. Scarano. *Biosynthesis of phytochelatins and arsenic accumulation in the marine microalga Phaeodactylum tricornutum in response to arsenate exposure*. Biometals 18 (2005) 587-593.
115. V. Vacchina, H. Chassaigne, M. Oven, M.H. Zenk, R. Łobiński. *Characterisation and determination of phytochelatins in plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry*. Analyst 124 (1999) 1.425-1.430.

116. V. Vacchina, R. Łobiński, M. Oven, M.H. Zenk. *Signal identification in size-exclusion HPLC-ICP-MS chromatograms of plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry (ES MS/MS)*. J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 529-534.
117. J. Hartley-Whitaker, G. Ainsworth, R. Vooijs, W.T. Bookum, H. Schat, A.A. Meharg. *Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in Holcus lanatus*. Plant Physiol. 126 (2001) 299-306.
118. A. Raab, J. Feldmann, A.A. Meharg. *The nature of arsenic-phytochelatin complexes in Holcus lanatus and Pteris cretica*. Plant Physiol. 134 (2004) 1.113-1.122.
119. E.M. Krupp, A. Mestrot, J. Wielgus, A.A. Meharg, J. Feldmann. *The molecular form of mercury in biota: Identification of novel mercury peptide complexes in plants*. Chem. Commun. (2009) 4.257-4.259.
120. C. Ortega-Villasante, R. Rellán-Álvarez, F.F. Del Campo, R.O. Carpena-Ruiz, L.E. Hernández. *Cellular damage induced by cadmium and mercury in Medicago sativa*. J. Exp. Bot. 56 (2005) 2.239-2.251.
121. R. Rellán-Álvarez, C. Ortega-Villasante, A. Álvarez-Hernández, F.F. Del Campo, L.E. Hernández. *Stress responses of Zea mays to cadmium and mercury*. Plant Soil 279 (2006) 41-50.
122. R. Rellán-Álvarez, L.E. Hernández, J. Abadía, A. Álvarez-Fernández. *Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homoglutathione by liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry in plant tissue extracts*. Anal. Biochem. 356 (2006) 254-264.
123. C. Ortega-Villasante, L.E. Hernández, R. Rellán-Álvarez, F.F. Del Campo, R.O. Carpena-Ruiz. *Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings*. New Phytol. 176 (2007) 96-107.
124. J. Sobrino-Plata, C. Ortega-Villasante, M.L. Flores-Cáceres, C. Escobar, F.F. Del Campo, L.E. Hernández. *Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa*. Chemosphere 77 (2009) 946-954.
125. S. Carrasco-Gil, A. Álvarez-Fernández, J. Sobrino-Plata, R. Millán, R.O. Carpena-Ruiz, D.L. Leduc, J.C. Andrews, J. Abadía, L.E. Hernández. *Complexation of Hg with phytochelatins is important for plant Hg tolerance*. Plant Cell Environ. 34 (2011) 778-791.

126. A. Tukendorf, W.E. Rauser. *Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium*. Plant Sci. 70 (1990) 155-166.
127. H. Harmens, P.R. Den Hartog, W.M. Ten Bookum, J.A.C. Verkleij. *Increased zinc tolerance in silene vulgaris (moench) garcke is not due to increased production of phytochelatins*. Plant Physiol. 103 (1993) 1.305-1.309.
128. J.A. de Knecht, M. van Dillen, P.L.M. Koevoets, H. Schat, J.A.C. Verkleij, W.H.O. Ernst. *Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant Silene vulgaris (chain length distribution and sulfide incorporation)*. Plant Physiol. 104 (1994) 255-261.
129. F.E. Sneller, L.M. van Heerwaarden, P.L. Koevoets, R. Vooijs, H. Schat, J.A. Verkleij. *Derivatization of phytochelatins from Silene vulgaris, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane*. J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 4.014-4.019.
130. A. Bräutigam, D. Schaumlöffel, G.-J. Krauss, D. Wesenberg. *Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides-a case study using Chlamydomonas reinhardtii*. Anal. Bioanal. Chem. 395 (2009) 1.737-1.747.
131. L. Chen, L. Yang, Q. Wang. *In vivo phytochelatins and Hg-phytochelatin complexes in Hg-stressed Brassica chinesis L*. Metallomics 1 (2009) 101-106.
132. S. Döring, S. Korhammer, M. Oetken, B. Markert. *Analysis of phytochelatins in plant matrices by pre-column derivatization, high-performance liquid chromatography and fluorescence-detection*. Fresenius J. Anal. Chem. 366 (2000) 316-318.
133. S.K. Kawakami, M. Gledhill, E.P. Achterberg. *Determination of phytochelatins and glutathione in phytoplankton from natural waters using HPLC with fluorescence detection*. Trends Anal. Chem. 25 (2006) 133-142.
134. A.I.G.L. Lima, S.I.A.P. Pereira, E.M.A.P. Figueira, G.C.N. Caldeira, H.D.S.Q. Caldeira. *Cadmium detoxification in roots of Pisum sativum seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth*. Environ. Exp. Bot. 55 (2006) 149-162.
135. R. Minocha, P. Thangavel, O.P. Dhankher, S. Long. *Separation and quantification of monothiols and phytochelatins from a wide variety of cell cultures and tissues of trees and other plants using high performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. A 1.207 (2008) 72-83.

136. I. Leopold, D. Günther, D. Neumann. *Application of high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry to the investigation of phytochelatin complexes and their role in heavy metal detoxification in plants*. *Analisis* 26 (1998) M28-M32.
137. T.-Y. Yen, J.A. Villa, J.G. DeWitt. *Analysis of phytochelatin-cadmium complexes from plant tissue culture using nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry and capillary liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 930-941.
138. M.H.A. El-Zohri, R. Cabala, H. Frank. *Quantification of phytochelatin in plants by reversed-phase HPLC-ESI-MS-MS*. *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1.871-1.876.
139. S. Iglesia-Turiño, A. Febrero, O. Jauregui, C. Caldelas, J.L. Araus, J. Bort. *Detection and quantification of unbound phytochelatin 2 in plant extracts of Brassica napus grown with different levels of mercury*. *Plant Physiol.* 142 (2006) 742-749.
140. B.B.M. Sadi, A.P. Vonderheide, J.-M. Gong, J.I. Schroeder, J.R. Shann, J.A. Caruso. *An HPLC-ICP-MS technique for determination of cadmium-phytochelatin in genetically modified Arabidopsis thaliana*. *J. Chromatogr. B* 861 (2008) 123-129.
141. Z.S. Zhou, S.J. Wang, Z.M. Yang. *Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (Medicago sativa) plants*. *Chemosphere* 70 (2008) 1.500-1.509.
142. E.M. Krupp, B.F. Milne, A. Mestrot, A.A. Meharg, J. Feldmann. *Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI-ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS*. *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1.753-1.764.
143. M. Válega, A.I.G. Lima, E.M.A.P. Figueira, E. Pereira, M.A. Pardal, A.C. Duarte. *Mercury intracellular partitioning and chelation in a salt marsh plant, Halimione portucaloides (L.) aellen: Strategies underlying tolerance in environmental exposure*. *Chemosphere* 74 (2009) 530-536.
144. V. Diopan, V. Shetivska, O. Zitka, M. Galiova, V. Adam, J. Kaiser, A. Horna, K. Novotny, M. Liska, L. Havel, J. Zehnalek, R. Kizek. *Determination of plant thiols by liquid chromatography coupled with coulometric and amperometric detection in lettuce treated by lead(II) ions*. *Electroanal.* 22 (2010) 1.248-1.259.

145. L.S. Ettre. *Nomenclature for chromatography*. Pure Appl. Chem. 65 (1993) 819-872.
146. C.F. Poole. *The essence of chromatography*. Elsevier, Amsterdam, 2003.
147. V.G. Berezkin. *Biography of Mikhail Semenovich Tswett and translation of Tswett's preliminary communication on a new category of adsorption phenomena*. Chem. Rev. 89 (1989) 279-285.
148. M.H. Abraham. *100 years of chromatography—or is it 171?* J. Chromatogr. A 1.061 (2004) 113-114.
149. H.H. Strain, J. Sherma. *M. Tswett: Adsorption analysis and chromatographic methods. Application to the chemistry of the chlorophylls*. J. Chem. Educ. 44 (1967) 238-242.
150. L.S. Ettre. *The development of chromatography*. Anal. Chem. 43 (1971) 20A-31A.
151. D.A. Skoog, F.J. Hooler, T.A. Nieman. *Principios de análisis instrumental*, 5a edición, Mc Graw Hill, Madrid, 2001.
152. M. Valcárcel Cases, A. Gómez Hens. *Técnicas analíticas de separación*, Reverté, Barcelona, 1988.
153. J.M. Miller. *Chromatography: concepts & contrasts*, John Wiley & Sons, Nova York, 1988.
154. C.F. Poole, S.K. Poole. *Chromatography today*, Elsevier, Amsterdam, 1991.
155. O.A. Quattrocchi, S.A. De Andrizzi, R.F. Laba. *Introducción a la HPLC, aplicación y práctica*, Artes Gráficas Farro S.A., Buenos Aires, 1992.
156. J. Wang. *Analytical Electrochemistry*, John Wiley and Sons, New Jersey, 2006.
157. <http://www.basinc.com/products/ec/flowcells.php>, consultada el 15 de gener de 2014.
158. W.T. Kok. *Electrochemical reaction techniques for detection in HPLC*, Sneldruk Enschede, Amsterdam, 1986.
159. <http://www.basinc.com/products/ec/working.php>, consultada el 15 de gener de 2014.
160. T. Navrátil, M. Kopanica. *Analytical application of silver composite electrodes*. Crit. Rev. Anal. Chem. 32 (2002) 153-166.
161. T. Navrátil, J. Barek. *Analytical applications of composite solid electrodes*. Crit. Rev. Anal. Chem. 39 (2009) 131-147.
162. R.G. Cooks, G. Chen, P. Wong, H. Wollnik. *Mass spectrometers* a Encyclopedia of Applied Physics, Vol. 19, 289-330, G.L. Trigg, Wiley VCH, Chichester, 2003.

163. A.P. Bruins. *Mechanistic aspects of electrospray ionization*. J. Chromatogr. A 794 (1998) 345-357.
164. S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak. *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*, Elsevier, Oxford, 2009.
165. H. Martens, M. Martens. *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction*, John Wiley & Sons, Chichester, 2001.
166. S. Wold. *Principal Component Analysis*. Chemometr. Intell. Lab. Syst. 2 (1987) 37-52.
167. D.R. Hoagland, D.I. Arnon. *The water-culture method for growing plants without soil*. Circular 347, Berkeley, California, 1950.
168. A. Walkley, I.A. Black. *An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method*. Soil Sci. 37 (1934) 29-38.
169. M. Válega, S. Abreu, P. Pato, L. Rocha, A.R. Gomes, M.E. Pereira, A.C. Duarte. *Determination of organic mercury in biota, plants and contaminated sediments using a thermal atomic absorption spectrometry technique*. Water Air Soil Pollut. 174 (2006) 223-234.
170. P.L. Hageman. *A simple field leach test to assess potential leaching of soluble constituents from mine wastes, soils, and other geologic materials*. USGS Fact sheet (2005) 2005-3100.
171. J.N. Miller, J.C. Miller. *Estadística y quimiometría para química analítica*. Pearson educación, Madrid, 2002.
172. I. Raskin, B.D. Ensley. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*, Wiley, New York, 2000.
173. J. Johanning, H. Strasdeit. *A coordination-chemical basis for the biological function of the phytochelatins*. Angew. Chem. Int. Ed. 37 (1998) 2.464-2.466.
174. A. Alberich, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban. *Soft modelling for the resolution of highly overlapped voltammetric peaks: application to some Pb-phytochelatin systems*. Talanta 71 (2007) 344-352.
175. A.M. Svardal, M.A. Mansoor, P.M. Ueland. *Determination of reduced, oxidized, and protein-bound glutathione in human plasma with precolumn derivatization with monobromobimane and liquid chromatography*. Anal. Biochem. 184 (1990) 338-346.

176. A.A. Hunaiti, I.K. Abukhalaf, N. Silvestrov, M. Bayorh. *Rapid HPLC procedure for the quantitation of phytochelatins in plant tissue extracts*. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 26 (2003) 3.463-3.473.
177. F.M. Rubino, C. Verduci, R. Giampiccolo, S. Pulvirenti, G. Brambilla, A. Colombi. *Molecular characterization of homo- and heterodimeric mercury(II)-bis-thiolates of some biologically relevant thiols by electrospray ionization and triple quadrupole tandem mass spectrometry*. J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom. 15 (2004) 288-300.
178. N. Burford, M.D. Eelman, K. Groom. *Identification of complexes containing glutathione with As(III), Sb(III), Cd(II), Hg(II), Tl(I), Pb(II) or Bi(III) by electrospray ionisation mass spectrometry*. J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 1.992-1.997.
179. P. Kubáň, P. Houserova, P. Kubáň, P.C. Hauser, V. Kubáň. *Mercury speciation by CE: a review*. Electrophoresis 28 (2007) 58-68.
180. L. Manna, L. Valvo, P. Betto. *Determination of oxidized and reduced glutathione in pharmaceuticals by reversed-phase high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection*. J. Chromatogr. A 846 (1999) 59-64.
181. E. Chekmeneva, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban. *Binding of Hg^{2+} by Cys, Cys-Gly and reduced glutathione: study by differential pulse voltammetry on rotating Au-disk electrode, electrospray ionization mass-spectrometry and isothermal titration calorimetry*. J. Electroanal. Chem. 644 (2010) 20-24.
182. J. Najmanova, E. Neumannova, T. Leonhardt, O. Zitka, R. Kizek, T. Macek, M. Mackova, P. Kotrba. *Cadmium-induced production of phytochelatins and speciation of intracellular cadmium in organs of *Linum usitatissimum* seedlings*. Ind. Crops Prod. 35 (2012) 536-542.
183. A.A. Mohamed, A. Castagna, A. Ranieri, L. Sanità di Toppi. *Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis*. Plant Physiol. Biochem. 57 (2012) 15-22.
184. M. Quaghebeur, Z. Rengel. *The distribution of arsenate and arsenite in shoots and roots of *Holcus lanatus* is influenced by arsenic tolerance and arsenate and phosphate supply*. Plant Physiol. 132 (2003) 1.600-1.609.
185. N. Scott, K.M. Hatlelid, N.E. MacKenzie, D.E. Carter. *Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione*. Chem. Res. Toxicol. 6 (1993) 102-106.

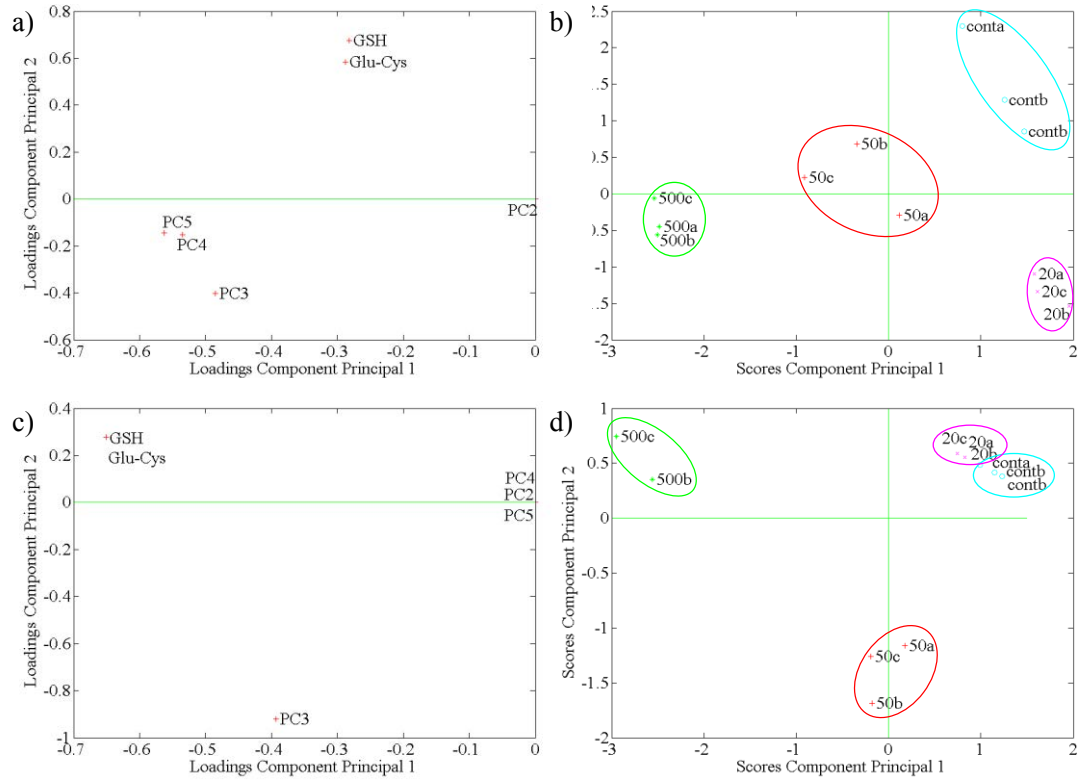
186. F.E.C. Sneller, L.M. Van Heerwaarden, F.J.L. Kraaijeveld-Smit, W.M. Ten Bookum, P.L.M. Koevoets, H. Schat, J.A.C. Verkleij. *Toxicity of arsenate in Silene vulgaris, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins*. New Phytol. 144 (1999) 223-232.
187. M.E.V Schmöger, M. Oven, E. Grill. *Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants*. Plant Physiol. 122 (2000) 793-801.
188. E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk. *Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed Schizosaccharomyces pombe cells*. FEBS Lett. 197 (1986) 115-119.
189. P.M. Kopittke, C.J. Asher, N.W. Menzies. *Prediction of Pb speciation in concentrated and dilute nutrient solutions*. Environ. Pollut. 153 (2008) 548-554.
190. A. Hernández, M. Jébrak, P. Higuera, R. Oyarzun, D. Morata, J. Munhá. *The Almadén mercury mining district, Spain*. Miner. Deposita 34 (1999) 539-548.
191. P. Higuera, R. Oyarzun, J. Lillo, D. Morata. *Intraplate mafic magmatism, degasification, and deposition of mercury: the giant Almadén mercury deposit (Spain) revisited*. Ore Geol. Rev. 51 (2013) 93-102.
192. A. Martínez-Coronado, R. Oyarzun, J.M. Esbrí, W. Llanos, P. Higuera. *Sampling high to extremely high Hg concentrations at the Cerco de Almadenejos, Almadén mining district (Spain): the old metallurgical precinct (1794 to 1861 AD) and surrounding areas*. J. Geochem. Explor. 109 (2011) 70-77.
193. E. Lawrence, A.R.W. Jackson, J.M. Jackson. *Longman Dictionary of Environmental Science*, Longman, Harlow, 1998.
194. R. Ferrara, B.E. Maserti, M. Andersson, H. Edner, P. Ragnarson, S. Svanberg, A. Hernández. *Atmospheric mercury concentrations and fluxes in the Almadén district (Spain)*. Atmos. Environ. 32 (1998) 3.897-3.904.
195. P. Higuera, J.M. Esbrí, R. Oyarzun, W. Llanos, A. Martínez-Coronado, J. Lillo, M.A. López-Berdones, E.M. García-Noguero. *Industrial and natural sources of gaseous elemental mercury in the Almadén district (Spain): an updated report on this issue after the ceasing of mining and metallurgical activities in 2003 and major land reclamation works*. Environ. Res. 125 (2013) 197-208.
196. J.J. Berzas Nevado, L.F. García Bermejo, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios. *Distribution of mercury in the aquatic environment at Almadén, Spain*. Environ. Pollut. 122 (2003) 261-271.

197. R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, J.C. Wasserman, L.F. García Bermejo, D. Amouroux, J.J. Berzas Nevado, O.F.X. Donard. *Chemical availability of mercury in stream sediments from the Almadén area, Spain*. J. Environ. Monitor. 2 (2000) 360-366.
198. R. Millán, R. Gamarra, T. Schmid, M.J. Sierra, A.J. Quejido, D.M. Sánchez, A.I. Cardona, M. Fernández, R. Vera. *Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain)*. Sci. Total Environ. 368 (2006) 79-87.
199. J.A. Molina, R. Oyarzun, J.M. Esbrí, P. Higuera. *Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth*. Environ. Geochem. Health 28 (2006) 487-498.
200. T. Toyo'oka. *Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples*. J. Chromatogr. B 877 (2009) 3.318-3.330.
201. E. Camera, M. Picardo. *Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes*. J. Chromatogr. B 781 (2002) 181-206.
202. J. Kruusma, A.M. Behnm, G.J.A. Williams, R. Katakya. *An introduction to thiol redox proteins in the endoplasmic reticulum and a review of current electrochemical methods of detection of thiols*. Analyst 131 (2006) 459-473.
203. K. Kusmierek, E. Bald. *Reduced and total glutathione and cysteine profiles of citrus fruit juices using liquid chromatography*. Food Chem. 106 (2008) 340-344.
204. I. Dalle-Donne, R. Rossi. *Analysis of thiols*. J. Chromatogr. B 877 (2009) 3.271-3.273.
205. R.E. Hansen, J.R. Winther. *An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations*. Anal. Biochem. 394 (2009) 147-158.
206. P. Monostori, G. Wittmann, E. Karg, S. Turi. *Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review*. J. Chromatogr. B 877 (2009) 3.331-3.346.
207. K.R. Manda, C. Adams, N. Ercal. *Biologically important thiols in aqueous extracts of spices and evaluation of their in vitro antioxidant properties*. Food Chem. 118 (2010) 589-593.
208. J.C. Harfield, C. Batchelor-McAuley, R. Compton. *Electrochemical determination of glutathione: a review*. Analyst 137 (2012) 2.285-2.296.

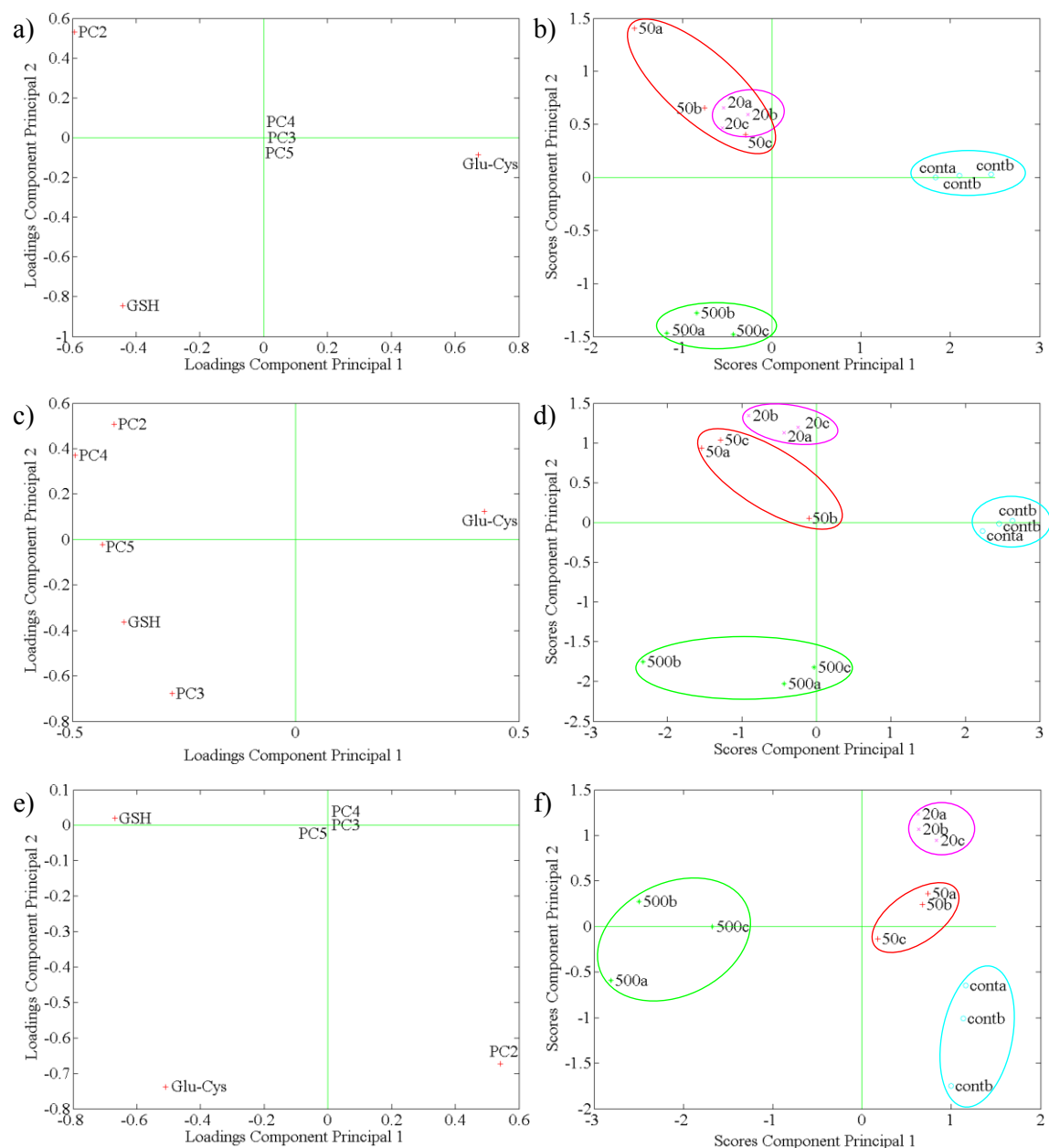
209. C.M. Welch, R.G. Compton. *The use of nanoparticles in electroanalysis: a review*. Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 601-619.
210. A. Sarakbi, Z. Aydogmus, A. Dago, D. Mertens, J.-Y. Dewert, J.-M. Kauffmann. *Determination of aminothiols by liquid chromatography with amperometric detection at a silver electrode: Application to white wines*. Anal. Chim. Acta 786 (2013) 22-28.
211. T.K. Malongo, S. Patris, P. Macours, F. Cotton, J. Nsangu, J.-M. Kauffmann. *Highly sensitive determination of iodide by ion chromatography with amperometric detection at a silver-based carbon paste electrode*. Talanta 76 (2008) 540-547.

Part VII

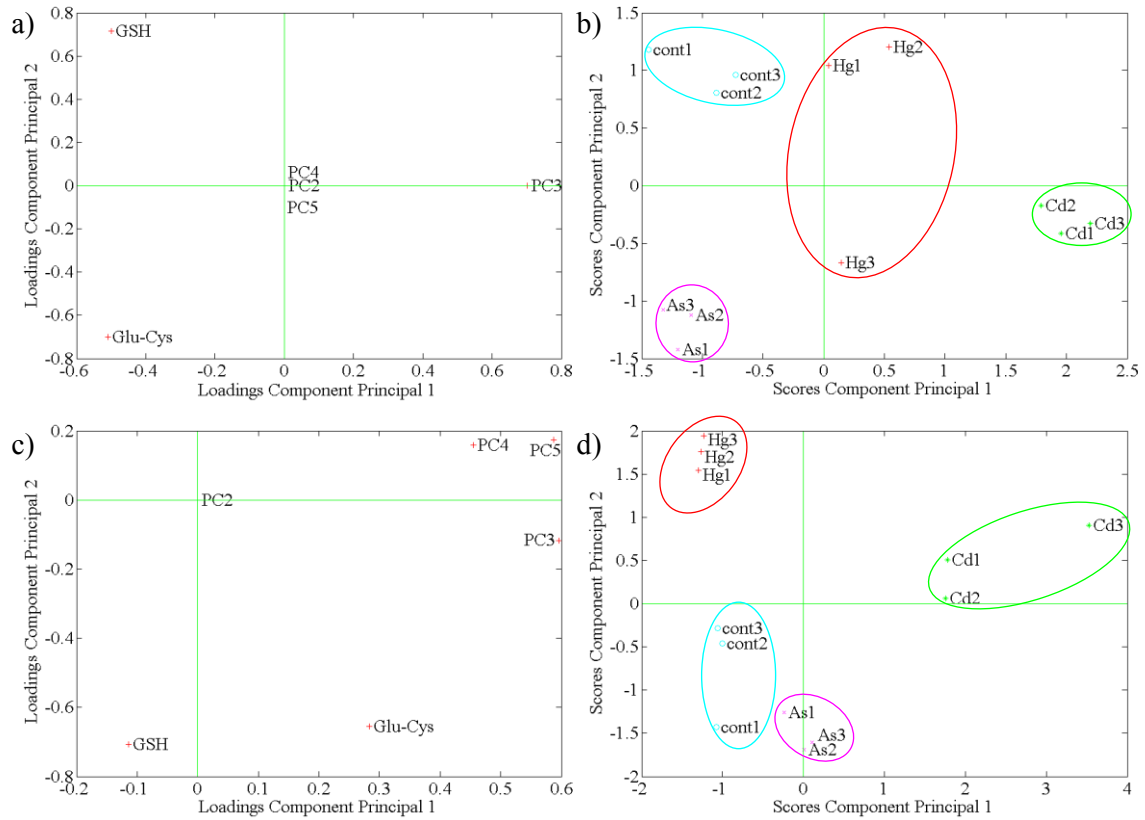
APÈNDIX



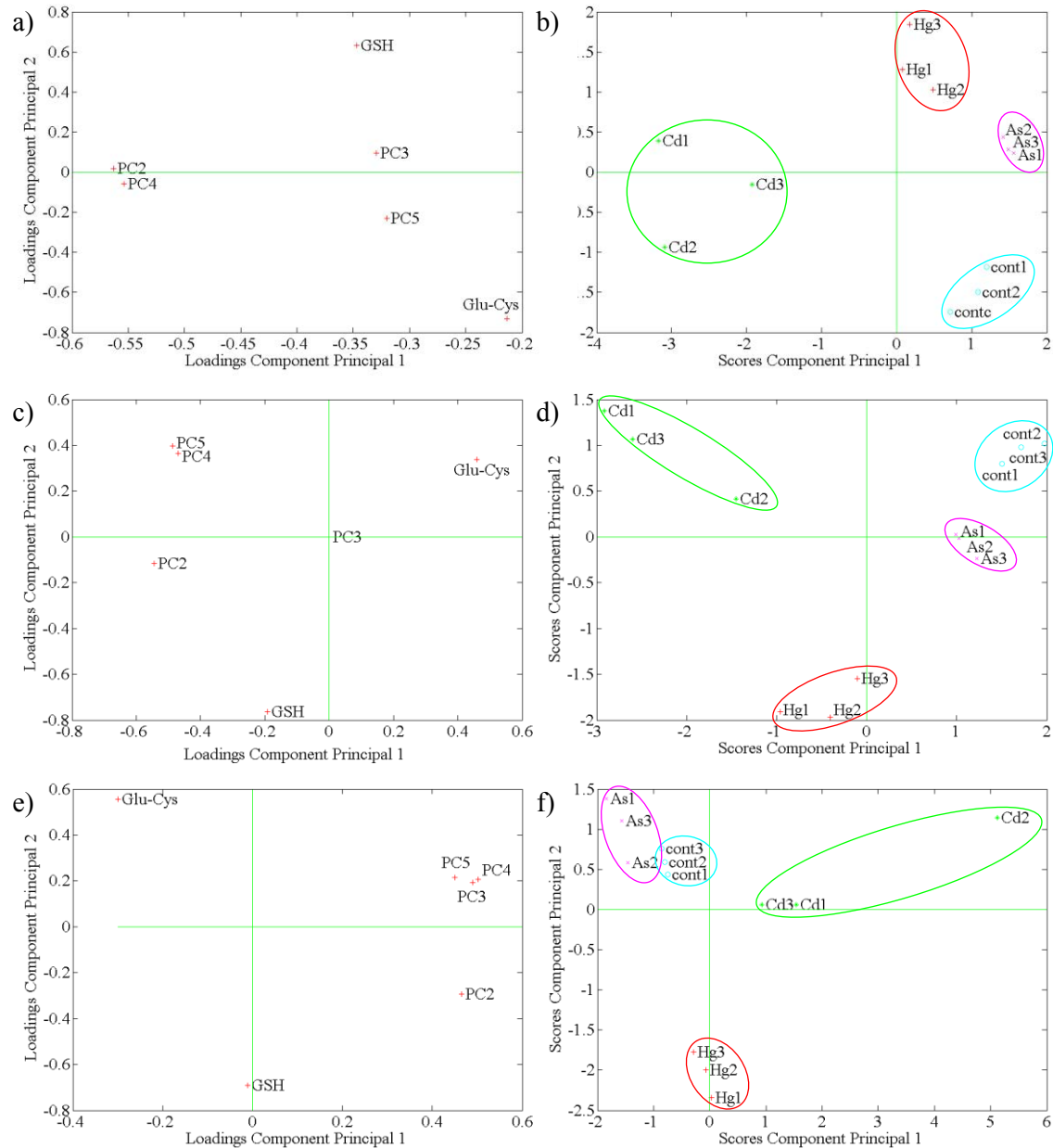
A.1. Caracterització per PCA de brots d'ordi sotmesos a diferents nivells de Cd (a, b) i As (c, d). Gràfics de loadings (a, c) on Glu-Cys, GSH, PC₂, PC₃, PC₄ i PC₅ són els tiols estudiats. Gràfics de scores (b, d) on cont és el nivell de control i 20, 50 i 500 la concentració de metall aplicada en $\mu\text{mol L}^{-1}$. a, b i c són els tres replicats de cada nivell.



A.2. Caracterització per PCA d'arrels d'ordi sotmesos a diferents nivells de Hg (a, b), Cd (c, d) i As (e, f). Gràfics de loadings (a, c, e) on Glu-Cys, GSH, PC₂, PC₃, PC₄ i PC₅ són els tiols estudiats. Gràfics de scores (b, d, f) on conta és el nivell de control i 20, 50 i 500 la concentració de metall aplicada en $\mu\text{mol L}^{-1}$. a, b i c són els tres replicats de cada nivell.



A.3. Caracterització per PCA de brots d'ordi sotmesos a 20 (a, b) i 50 (c, d) $\mu\text{mol L}^{-1}$ dels diferents metalls estudiats. Gràfics de loadings (a, c) on Glu-Cys, GSH, PC₂, PC₃, PC₄ i PC₅ són els tiols estudiats. Gràfics de scores (b, d) on cont és el nivell de control, Hg, Cd i As els diferents metalls aplicats i 1, 2 i 3 són els tres replicats de cada nivell.



A.4. Caracterització per PCA d'arrels d'ordi sotmesos a 20 (a, b), 50 (c, d) i 500 (e, f) $\mu\text{mol L}^{-1}$ dels diferents metalls estudiats. Gràfics de loadings (a, c, e) on Glu-Cys, GSH, PC₂, PC₃, PC₄ i PC₅ són els tiols estudiats. Gràfics de scores (b, d, f) on cont és el nivell de control, Hg, Cd i As els diferents metalls aplicats i 1, 2 i 3 són els tres replicats de cada nivell.