

# UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

CAMPUS GUANAJUATO

POSGRADO EN QUÍMICA



***“ESTUDIO SOBRE DIFERENTES  
ASPECTOS DE ESPECIACIÓN DE  
ELEMENTOS TRAZA EN MATERIAL DE  
PLANTAS CON ENFOQUE A LAS  
FITOQUELATINAS”***

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN QUÍMICA

PRESENTA

**Q.I. JULIO ALBERTO LANDERO FIGUEROA**

GUANAJUATO, GTO. NOVIEMBRE DE 2009

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>x</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>I.1. Contaminación ambiental</b>	<b>6</b>
<b>I.2. Formas naturales de algunos elementos metálicos en la corteza terrestre.</b>	<b>9</b>
<b>I.3. Guanajuato como zona potencialmente contaminada por metales pesados.</b>	<b>11</b>
<b>I.4. Mecanismos de adaptación de organismos vegetales en respuesta a altas concentraciones de xenobióticos metálicos.</b>	<b>16</b>
<b>I.5. Fitoquelatinas.</b>	<b>12</b>
<b>I.6. Fitorremediación.</b>	<b>20</b>
<b>I.7. Especiación analítica de elementos.</b>	<b>24</b>
<b>I.8. Herramientas analíticas empleadas en los estudios de especiación.</b>	<b>25</b>
<b>I.8.1. Espectrometría de absorción atómica.</b>	<b>25</b>
<b>I.8.2. Espectrometría de Emisión atómica</b>	<b>28</b>
<b>I.8.3. Espectrometría de masas, ICP-MS como herramienta analítica en estudios de especiación.</b>	<b>31</b>
<b>I.8.4. Técnicas híbridas o acopladas</b>	<b>36</b>
<b>I.9. Revisión de las metodologías analíticas utilizadas en el análisis de fitoquelatinas.</b>	<b>40</b>
<b>I.10. Control de calidad en los procedimientos analíticos.</b>	<b>44</b>

<b>I.11. Cuenca del Río Lerma</b>	<b>46</b>
<b>II. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>49</b>
<b>II.1. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>49</b>
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>51</b>
<b>III.1. Equipo de Laboratorio</b>	<b>51</b>
<b>III.2. Material de laboratorio.</b>	<b>52</b>
<b>III.3. Estándares, reactivos y disolventes.</b>	<b>53</b>
<b>III.4. Software</b>	<b>54</b>
<b>III.5. Manuales para la toma de muestras.</b>	<b>54</b>
<b>III.5.1. Agua superficial</b>	<b>55</b>
<b>III.5.2. Suelos y lodos</b>	<b>57</b>
<b>III.5.3. Plantas</b>	<b>58</b>
<b>III.5.4 Levaduras</b>	<b>59</b>
<b>III.6. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS</b>	<b>60</b>
<b>III.6.1. Determinación de Ag, Cd, Cu y Pb en suelos y raíces de plantas por ETA-AAS.</b>	<b>60</b>
<b>III.6.2. Determinación de los niveles de concentración total de elementos por ICP-MS.</b>	<b>60</b>
<b>III.6.3. Extracción secuencial de metales en muestras de suelo, Método Tessier.</b>	<b>62</b>
<b>III.6.4. Especiación de elementos unidos a fitoquelatinas en tejidos de plantas.</b>	<b>63</b>
<b>III.6.5. Especiación de elementos unidos a las sustancias húmicas presentes en las muestras de suelos.</b>	<b>64</b>
<b>III.6.6. Determinación de sustancias húmicas en suelos.</b>	<b>65</b>

<b>III.6.7. Determinación de tioles de bajo peso molecular en muestras biológicas.</b>	<b>66</b>
<b>IV.-RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>IV.1. Desarrollo del procedimiento analítico para la determinación de fitoquelatinas en muestras biológicas: aplicación a levaduras.</b>	<b>71</b>
<b>IV.1.1 Resultados obtenidos en el análisis de levaduras.</b>	<b>73</b>
<b>IV.2. Resultados de los análisis llevados a cabo en muestras del cauce del río Lerma (Área de estudio I).</b>	<b>78</b>
<b>IV.2.1. Selección de los sitios de muestreo.</b>	<b>79</b>
<b>IV.2.2. Resultados obtenidos del análisis de aguas.</b>	<b>84</b>
<b>IV.2.3. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en aguas.</b>	<b>95</b>
<b>IV.2.4. Resumen de los resultados obtenidos en lodos.</b>	<b>100</b>
<b>IV.2.5. Resumen de los resultados obtenidos en plantas.</b>	<b>104</b>
<b>IV.3. Resultados obtenidos en los análisis realizados en muestras provenientes de la ciudad de Guanajuato, (área de estudio II).</b>	<b>109</b>
<b>IV.3.1 Estudios preliminares.</b>	<b>109</b>
<b>IV.3.2. Análisis de PCs en muestras de <i>R. communis</i>.</b>	<b>112</b>
<b>IV.3.3. Análisis de muestras de <i>Opuntia ficus</i>.</b>	<b>120</b>
<b>IV.3.3.1. Estudios preliminares.</b>	<b>120</b>
<b>VI.3.3.2. Resultados analíticos obtenidos en muestras de <i>O. ficus</i>.</b>	<b>123</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>133</b>
<b>V.1. Conclusiones analíticas:</b>	<b>134</b>
<b>V.2. Conclusiones de relevancia biológica:</b>	<b>135</b>
<b>V.3. Conclusiones de relevancia medio ambiental:</b>	<b>137</b>

## **VI. ANEXOS**

- Portada en la revista: Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 153**  
**Volume 22, Number 8, August 2007.**
- Analysis of phytochelatins in nopal (*Opuntia ficus*): a metallomics 154**  
**approach in the soil- plant system**
- Perfil de Elementos Metálicos y de Algunos Metaloides en Aguas de 162**  
**Grifo de la Ciudad de Guanajuato.**
- Effect of Some Heavy Metals and Soil Humic Substances on the 168**  
**Phytochelatin Production in Wild Plants from Silver Mine Region in**  
**Guanajuato, Mexico.**
- ICP-MS multi-element profiles and hplc determination of furanic 176**  
**compounds in commercial tequila.**
- Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid 184**  
**chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry with**  
**Bi<sup>3+</sup> as internal standard.**
- Effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on the degradation of 191**  
**humic acid associated with Cu, Pb, and Ni: an in vitro study.**
- Phytochelatins in the wild plants from Guanajuato city an important 200**  
**silver and gold mining center in Mexico**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Número de Figura</b>	<b>Pie de figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Resumen de algunos mecanismos defensivos reportados en las células vegetales.	13
<b>Figura 2</b>	Estructura química de las fitoquelatinas, donde n puede variar de 2 a 11.	16
<b>Figura 3</b>	Ruta de la síntesis de las PCs en plantas superiores.	17
<b>Figura 4</b>	Esquema de los complejos formados entre las PCs y el ion Cd(II)	19
<b>Figura 5</b>	Interacciones que se pueden llevar a cabo en la interfase suelo-raíz, en presencia de microorganismos	22
<b>Figura 6</b>	Esquema de un espectrómetro de absorción atómica.	27
<b>Figura 7</b>	Atomizador en llama utilizada en espectrometría de absorción atómica	27
<b>Figura 8</b>	Atomizador electrotérmico utilizado en la espectrometría de absorción atómica ETAAS.	28
<b>Figura 9</b>	(a) Esquema de un espectrómetro de emisión atómica con fuente de excitación en plasma acoplado por inducción. (b) Antorcha de un espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción como fuente de excitación.	30
<b>Figura 10</b>	Diagrama de operación de un filtro de masas tipo cuadrupolo.	32
<b>Figura 11</b>	Esquema de un analizador de masas de sector magnético de simple enfoque.	33
<b>Figura 12</b>	Espectrómetro de masas con plasma acoplado por inducción como fuente de ionización con filtro de masas tipo cuadrupolo.	35
<b>Figura 13</b>	Diagrama de la celda de colisiones/reacciones del ICP-MS Agilent 7500ce.	36
<b>Figura 14</b>	Esquema de la reacción de monobromobimano con el grupo tiol para formar un compuesto fluorescente.	72
<b>Figura 15</b>	Cromatogramas de estándares de los tioles derivatizados con mBrB, obtenidos utilizando la cromatografía en fase inversa con detección fluorimétrica.	73

<b>Figura 16</b>	Cromatogramas típicos de extractos de <i>Y. lipolítica</i> .	74
<b>Figura 17</b>	Cromatogramas típicos de extractos de <i>K. marxianus</i>	75
<b>Figura 18</b>	Cromatogramas típicos de extractos de <i>S. cerevisiae68</i>	76
<b>Figura 19</b>	Mapa de la región estudiada, donde se señalan los sitios de toma de muestra seleccionados.	80
<b>Figura 20</b>	Ejemplos de las rectas de calibración, obtenidas a partir de diluciones del estándar multielemental, para la determinación de los elementos por ICP-MS.	82
<b>Figura 21</b>	Distribución de As en los sitios de muestreo, en seis campañas de muestreo.	88
<b>Figura 22</b>	Distribución de V en los sitios de muestreo, en seis campañas de muestreo.	89
<b>Figura 23</b>	Distribución de Cr en los sitios de muestreo, en seis campañas de muestreo.	89
<b>Figura 24</b>	Distribución de Ba en los sitios de muestreo, en seis campañas de muestreo.	90
<b>Figura 25</b>	Resultados de determinación de los elementos en Salamanca.	91
<b>Figura 26</b>	Niveles de concentración de elementos, encontrados en la entrada y en la salida del río Lerma del Estado de Guanajuato, en cada una de las seis campañas de muestreo.	94
<b>Figura 27</b>	El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo II.	97
<b>Figura 28</b>	El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo III.	97
<b>Figura 29</b>	El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo IV.	98
<b>Figura 30</b>	El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo V.	98
<b>Figura 31</b>	El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo VI.	99
<b>Figura 32</b>	Niveles de concentración de As, V, Cr, Pb en lodos, encontrados en MIII, MIV y MVI.	103

<b>Figura 33</b>	Niveles de concentración de Ag en lodos, correspondientes a los muestreos MIII, MIV y MVI.	104
<b>Figura 34</b>	Niveles de concentración de algunos elementos en raíces y hojas de nopal recolectados en nueve sitios de muestreo (muestreo II – octubre 2007).	107
<b>Figura 35</b>	Niveles de concentración de algunos elementos en raíces y hojas de nopal recolectados en nueve sitios de muestreo (muestreo II – octubre 2007).	107
<b>Figura 36</b>	Análisis de PCs por HPLC-FLD en muestras de levadura (—) y en raíz de una planta colectada en el sitio 11 de muestreo (Salida de salamanca).	108
<b>Figura 37</b>	Cromatogramas de extractos de <i>R. communis</i> , <i>T. diversifolia</i> en los sitios de muestreo 1, 2 y 3. Cromatograma de estándares de PC-2, PC-3 y PC-4, sobreexposto al cromatograma de <i>R. communis</i> del sitio 1.	112
<b>Figura 38</b>	Mapa de localización de los lugares de muestreo en la Cd. de Guanajuato.	113
<b>Figura 39</b>	Cromatogramas de extractos de <i>R. communis</i> provenientes de los sitios 4, 5 y 6.	114
<b>Figura 40</b>	Cromatogramas típicos de exclusión por tamaño molecular de extractos de suelo.	116
<b>Figura 41</b>	Matriz de correlación obtenida con los parámetros medidos en las muestras de suelo y raíz de <i>R. communis</i> , en los 6 sitios de muestreo en la ciudad de Guanajuato.	119
<b>Figura 42</b>	Cromatogramas obtenidos a partir de las muestras: (a) Nopal, (b) Sávila, (c) Castillo, (d) Chicalote, (e) Cactus y (f) Maguey. Análisis por HPLC-FLD.	122
<b>Figura 43</b>	Distribución de los elementos en las 5 fracciones extraídas de las muestras de suelo provenientes de los 5 sitios de muestreo.	125
<b>Figura 44</b>	Comparación entre los niveles de concentración de sustancias húmicas encontrado en los suelos cercanos a las muestras de <i>O. ficus</i> y los encontrados en las muestras de <i>T. diversifolia</i> .	128
<b>Figura 45</b>	Cromatogramas obtenidos por SEC-ICP-MS, de los extractos neutros de raíz y Hoja de nopal del sitio 3, en la ciudad de Guanajuato.	130

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Número de tabla</b>	<b>Encabezado</b>	<b>Página</b>
Tabla 1	Nombre común de algunos minerales abundantes en la corteza terrestre, elementos que contienen y solubilidad en orden decreciente.	10
Tabla 2	Minerales no ferrosos comunes, encontrados en los yacimientos naturales.	11
Tabla 3	Varios análogos de PCs encontrados en plantas y levaduras.	17
Tabla 4	Resumen de los procedimientos analíticos empleados en los estudios sobre caracterización de fitoquelatinas y sus complejos con algunos elementos.	41
Tabla 5	Límites máximos permisibles para metales pesados y fósforo total, establecidos por NOM-001-ECOL-1996. Los valores corresponden a promedio diario, calculado en base a los resultados de al menos dos muestras compuestas.	47
Tabla 6	Niveles de fitoquelatinas (PC-2) encontrados en los extractos de levaduras controles y expuestas al ion cadmio.	76
Tabla 7	Niveles de fitoquelatinas (PC-2) encontrados en los extractos de levaduras controles y expuestas al ion AS(III).	77
Tabla 8	Listado de sitios de muestreo seleccionados para el monitoreo del río Lerma.	79
Tabla 9	Ejemplo de datos de calibración multielemental.	83
Tabla 10	Isótopos monitoreados, valores certificados y resultados típicos obtenidos de determinación de elementos en material certificado NIST 1643d.	84
Tabla 11	Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de agua del río Lerma.	86
Tabla 12	Niveles establecidos por Norma Oficial Mexicana, incluidos en la propuesta de nueva NOM y marcados por Agencia de Protección del Medio Ambiente.	87
Tabla 13	Niveles máximos permisibles de elementos en lodos y biosólidos en la normatividad mexicana y los respectivos valores guía en otros países.	100
Tabla 14	Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de lodos del río Lerma.	102

Tabla 15	Resultados de determinación de elementos en raíces y hojas de nopal, recolectado en los sitios 1, 2, 7, 8, 9, 11, 15, 21, 22 durante el segundo muestreo.	105
Tabla 16	Niveles de concentración de los elementos del estudio reportados en plantas silvestres (no-acumuladoras) provenientes de los sitios no contaminados.	106
Tabla 17	Resultados de las determinaciones de Ag, Cd, Cu y Pb en suelos y raíces de plantas.	110
Tabla 18	Fitoquelatinas (PC-2) determinadas en extractos de raíz de <i>R. communis</i> ; contenido de sustancias húmicas en los suelos y distribución relativa de elementos en la fracción correspondiente a las sustancias húmicas, en cromatografía de exclusión por tamaño molecular.	117
Tabla 19	Resultado del análisis de PCs totales en raíces y hojas de nopal.	124
Tabla 20	Resultados de las determinaciones de Cu, Ag, Cd y Pb obtenidos por ICP-MS. Contenidos totales de elementos encontrados en las muestras de hoja y raíz de nopal.	121
Tabla 21	Análisis de correlación, entre los contenidos de elementos determinados en las fracciones de suelo y los encontrados en las muestras de raíz.	127

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometría de absorción atómica
BEC	Blank equivalent concentration
CID	Charge induction detector
CPS	Cuentas por segundo
Cys	Cisteína
dc	Corriente directa
DE	Desviación estándar
DTNB	Ácido 5, 5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
DTPA	Ácido dietileno diamino pentaacético
EPA	Environment protection agency
ESI-Q-TOF	Electrospray-quadrupole-time of flight
FLD	Fluorimetric detection
GC	Gas chromatography
GPS	Sistema de posicionamiento global
GSH	Glutathione
h	Horas
HEPPS	Ácido 3-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil] propanosulfónico
HPLC	High performance liquid chromatography
ICP-AES	Espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción.
ICP-MS	Espectrómetro de masas con plasma acoplado por inducción
IE	Ionic exchange
IUPAC	International union of pure and applied chemistry
KDa	Kilodaltones
LD	Límite de detección
m/z	Relación masa/carga
mBBr	Monobromobimano
MHz	Mega hertz
MI	Primer muestreo
MII	Segundo muestreo

MIII	Tercer muestreo
MIV	Cuarto muestreo
MO	Microorganismos
MT	Metalotioneinas
MV	Quinto muestreo
MVI	Sexto muestreo
MΩ cm <sup>2</sup>	Mega ohmios por centímetro cuadrado
NA	No aplica
ne	No encontrado
NMR	Resonancia magnética nuclear
NOM	Norma Oficial Mexicana
ORC	Octapole reaction cell
p	Nivel de probabilidad
PCA	Principal Component Analysis
PC-M	Complejo fitoquelatina-metal
PCs	Fitoquelatinas
PMT	Photo multiplier tube
r <sup>2</sup>	Coefficiente de regresión lineal
RF	Radio frecuencia
rf	Energía de radiofrecuencia
RP	Reverse phase
SEC	Size exclusion chromatography
SH	Sustancias húmicas
-SH	Grupo tiol
SOP	Standard Operating Procedure
TPB	Tri-n-butil fosfina
UV-Vis	Ultravioleta visible
v/v	Volumen/volumen

## RESUMEN

Hace aproximadamente treinta años, se ha reportado un grupo de pequeños péptidos de estructura general  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  (n entre 2 hasta 11), denominados fitoquelatinas (PCs). Estos compuestos fueron encontrados principalmente en organismos vegetales y son considerados como los principales acomplejantes de metales y algunos metaloides en estos organismos. La biosíntesis de las PCs es uno de los mecanismos defensivos desarrollados por las plantas contra la toxicidad de este tipo de xenobióticos. Durante las últimas décadas, se han estudiado la inducción y las rutas de la síntesis de las PCs, la formación de sus complejos con diferentes elementos, así como su estructura molecular. A pesar de un importante avance en el conocimiento sobre PCs, los mecanismos responsables por la incorporación y/o acumulación de metales en relación a la producción de las PCs no se conocen con exactitud. La biodisponibilidad de metales en suelo se considera uno de los factores importantes, pero la complejidad de las condiciones medio ambientales dificulta evaluar dicha biodisponibilidad en los ambientes naturales.

Para profundizar en este tema, el objetivo principal del presente trabajo ha sido contribuir al conocimiento sobre la formación de fitoquelatinas en plantas silvestres, provenientes de ambientes naturales, donde se encuentran expuestas de manera crónica a una variedad de los parámetros medio ambientales, tales como niveles variables de concentración de especies metálicas, materia orgánica, condiciones de pH, etc.

El enfoque original fue en el desarrollo, adaptación y aplicación de diferentes tipos de procedimientos para el análisis de muestras de plantas y de muestras ambientales. Para ello, se definieron dos áreas del estudio: Área I - correspondiente al cauce del río Lerma por el Estado de Guanajuato (22 sitios) y Área II – cinco sitios en la ciudad de Guanajuato y se examinaron diferentes tipos de plantas silvestres.

Los tipos de análisis realizados se pueden clasificar en dos grupos:

### I. Análisis de contenidos totales:

- Determinación de elementos en agua superficial, suelos y material de plantas por ICP-MS.
- Determinación de fitoquelatinas totales en material de plantas, mediante cromatografía de líquidos en fase inversa con la detección espectrofluorimétrica.
- Determinación espectrofotométrica de sustancias húmicas en suelos.

## II. Estudios de especiación analítica:

- Fraccionamiento de especies metálicas asociadas con diferentes fracciones de masa molecular en extractos de suelos, mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular con dos detectores en línea: UV e ICP-MS (asociación de metales con sustancias húmicas),
- Lixiviación secuencial de metales del suelo, mediante el método de Tessier (asociación de metales con diferentes tipos de compuestos en suelo),
- Análisis de distribución de especies metálicas en fracciones de masa molecular en extractos neutros de plantas mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular con dos detectores en línea: UV e ICP-MS (asociación de metales con fitoquelatinas).

Con base en los resultados obtenidos, se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos, lo que permitió encontrar ciertas correlaciones entre los parámetros estudiados y de esta manera conocer mejor el proceso de captación de metales por plantas y el proceso de formación de fitoquelatinas en estos organismos. Para ello, se emplearon los algoritmos de análisis de correlación y el método multivariante de componente principal (PCA).

Con el diseño experimental que se acaba de presentar, se buscó la respuesta a las siguientes preguntas:

- ¿Cuales plantas silvestres de las recolectadas en el Estado de Guanajuato son capaces de sintetizar PCs?
- ¿Cuales son los parámetros medioambientales que contribuyen en la captación de elementos por las plantas?
- ¿Cuales son los metales que inducen las PCs en las plantas, y si se puede distinguir entre estos metales y aquellos que se unen a las PCs existentes en las plantas?

El presente documento está organizado en seis secciones: (I) Introducción; (II) Objetivos; (III) Parte experimental, (IV) Resultados y discusiones; (V) Conclusiones y (VI) Referencias bibliográficas.

En la parte de Introducción se presentan los aspectos generales de la contaminación ambiental por metales y metaloides, los avances en los estudios sobre las fitoquelatinas y la importancia de especiación analítica como una de las herramientas en este tipo de estudios.

Finalmente, se hace una breve presentación de las técnicas analíticas utilizadas en el desarrollo del presente trabajo.

En la Parte Experimental, se describen los equipos, estándares, reactivos y muestras analizadas, así como las herramientas de software. Esta sección contiene también los manuales de toma de muestras y la descripción de los procedimientos analíticos.

En la sección IV se describen los resultados obtenidos en el desarrollo del trabajo, incluyendo dos áreas del estudio. Asimismo, se presenta la discusión de estos resultados y se reportan los resultados obtenidos del tratamiento estadístico de los datos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, han permitido responder a las preguntas iniciales y también formular una serie de conclusiones analíticas, de relevancia biológica y medio ambiental, mismas que se presentan en la sección V.

De manera general, la principal contribución de este trabajo de tesis en el ámbito de química analítica ha sido demostrar que, con el uso de procedimientos basados en diferentes principios fisicoquímicos se obtiene la información analítica que permite describir cualitativa y cuantitativamente el sistema estudiado y, en particular, elucidar los mecanismos moleculares responsables por los efectos observados en los organismos vivos.

# **INTRODUCCIÓN**

## I. INTRODUCCIÓN

Entre los elementos químicos, aquellos que están presentes en un sistema dado en bajas concentraciones (no mayores a  $100 \mu\text{g g}^{-1}$ ) se denominan elementos traza. Tradicionalmente, estos elementos se clasifican en tres grupos dependiendo de su actividad biológica: esenciales, si se conocen sus funciones biológicas específicas; tóxicos, si sus niveles bajos provocan efectos adversos en los organismos vivos; y elementos neutros, que aparentemente no son necesarios ni perjudiciales para los organismos. Gracias a los avances en las ciencias de la vida, hoy en día se sabe que los conceptos de esencialidad y toxicidad se relacionan no solamente con las propiedades del elemento, sino también con su concentración y distribución entre las formas fisicoquímicas en un sistema dado (1). Cabe aclarar que la IUPAC define el término “especie” como una estructura molecular, electrónica y/o nuclear única y bien definida. Así mismo, el término “análisis de especiación” se define como la medición de la cantidad de una o más formas/especies presentes en la muestra (2).

Los estudios de especiación de elementos traza tienen una gran importancia en la conservación del medio ambiente y en el bienestar de los seres vivos (3-5), ya que la toxicidad de los elementos depende en gran medida de la forma química presente, en un sistema dado.

Las plantas por su naturaleza están expuestas a una variedad de elementos traza, cuyas diversas formas fisicoquímicas están en la corteza terrestre de manera natural o son introducidos por las actividades humanas. Al ser la base de las cadenas alimenticias terrestres, las plantas que acumulan especies tóxicas de metales y algunos metaloides pueden tener un fuerte impacto en los organismos vivos.

Uno de los temas actuales es conocer los mecanismos defensivos que han desarrollado los organismos vegetales en respuesta a diferentes xenobióticos, en particular a los metales pesados, para poder explorar la posible utilidad de las plantas como agentes biorremediadores de suelos contaminados. Dentro de los mecanismos defensivos desarrollados por las plantas contra los metales pesados destaca la síntesis de fitoquelatinas (PCs) (6). Estos compuestos fueron descritos hace más de veinte años como péptidos que contienen cisteína, cuyo grupo tiol es responsable del poder de acomplejamiento de muchos iones metálicos y algunos metaloides.

En estudios realizados a lo largo de las últimas décadas se sugiere que este acomplejamiento de los metales pesados disminuye su toxicidad hacia algunas plantas.

Sin embargo este no es un tema con todas las interrogantes contestadas, ya que los factores que contribuyen a la inducción de las fitoquelatinas así como la importancia que éstas presentan como mecanismo defensivo, son temas que siguen discutiéndose en trabajos científicos (7-10).

El enfoque del presente trabajo ha sido avanzar en el conocimiento sobre la inducción de fitoquelatinas en plantas silvestres, provenientes de suelos naturales, con niveles bajos a moderados de concentración de metales. A diferencia de los estudios llevados a cabo en condiciones controladas, las plantas silvestres están expuestas a una variedad de parámetros medio ambientales que pueden afectar la especiación química de los elementos de interés, y por lo tanto su biodisponibilidad y posible papel en la inducción de fitoquelatinas (11, 12).

La importancia de la contaminación ambiental por metales y metaloides, su interacción con las PCs, así como las herramientas de análisis utilizadas en este trabajo, son los temas tratados en las siguientes secciones, con el fin de introducir en el tema tratado y en las técnicas de análisis utilizadas.

## **I.1. Contaminación ambiental**

Se define como contaminación la presencia de compuestos ajenos a un entorno natural que causan un desequilibrio en el ambiente (13). Entre los tipos de contaminación ambiental es posible hacer una clasificación entre los contaminantes persistentes y los degradables o biodegradables. Puesto que las especies de los elementos metálicos o metaloides permanecen en el ambiente casi siempre conservando su toxicidad, a menos que sean físicamente removidos, la contaminación con este tipo de xenobióticos es uno de los grandes problemas del mundo moderno. Por otro lado existen zonas con niveles altos de metales/metaloides naturalmente, pero en la actualidad las actividades antropogénicas son una fuente muy importante de contaminación de elementos que han generado graves daños a la salud pública (14).

Dentro de los elementos considerados tóxicos destacan los metales pesados, definidos usualmente como elementos metálicos que presentan una densidad mayor a  $4.5 \text{ g/cm}^3$  (15). Los metales pesados han sido utilizados durante cientos de años por el hombre. El plomo se usa desde hace aproximadamente cinco mil años, por ejemplo, los romanos lo usaban como aditivo en vinos. Por su parte el mercurio era usado para el alivio de los dolores de dentición en niños,

posteriormente se usó como remedio en el tratamiento de la sífilis; y se puede mencionar la utilización de pigmentos que contienen metales como el cadmio, plomo, zinc, cromo o hierro (16).

A pesar de conocerse los efectos tóxicos de los metales pesados desde hace bastante tiempo, la exposición a ellos aumenta cada vez más en algunas áreas. Por ejemplo el mercurio es aun empleado en la extracción de oro en minas de Sudamérica, y compuestos de arsénico son comunes como preservantes de madera. En el último siglo la producción de compuestos que contienen metales pesados se ha incrementado de manera sustancial, por lo que actualmente existe una contribución alta de metales pesados debido a actividades antropogénicas. La industrialización de las ciudades ha provocado una excesiva demanda de materias primas y productos terminados que, en su proceso de fabricación, generan grandes cantidades de residuos, que tienden a acumularse con el tiempo en zonas urbanas (17).

Las emisiones industriales se han convertido en la principal fuente de contaminación en el aire. Las emisiones antropogénicas de plomo, cadmio, vanadio y zinc exceden las fuentes naturales varias veces, mientras que la contribución de arsénico, cobre, mercurio, níquel y antimonio es de 100 a 200 % mayor a las emisiones naturales. Los metales liberados al medio ambiente son rápidamente dispersados en diferentes compartimentos medioambientales por lo que los ambientes urbanos son normalmente mucho más contaminados que los ambientes rurales (14, 18).

Los estudios llevados a cabo en aguas marinas revelan concentraciones altas de plomo cerca de áreas industriales en las costas europeas y en el este de los Estados Unidos, mientras que en la Antártica los niveles encontrados fueron mucho más bajos (19), lo que refleja el impacto hacia el medio ambiente circundante de las emisiones industriales en los países más desarrollados. Otros estudios realizados demuestran la movilidad de las emisiones hacia ambientes relativamente cercanos geográficamente. Esta movilidad produce un aumento de extensiones geográficas afectadas por fuentes puntuales de emisiones de contaminantes al medio ambiente.

Debido al problema que genera la contaminación por metales pesados, en diferentes regiones del mundo se ha dado importancia al análisis de estos en el medio ambiente, para conocer el estado actual y en su caso proponer estrategias de remediación (20-24). Es importante que, dependiendo de las fuentes de los elementos y las características de los suelos, los acuíferos pueden actuar como medios de transporte de la contaminación, y tener así un papel importante en

la distribución y movilidad de los elementos. Dentro de las industrias que generan contaminación por metales se pueden mencionar las siguientes:

- Industria cromadora: el electrodeposito de cromo es uno de los procedimientos industriales más comunes en la actualidad. Su eficacia se debe a la formación de una capa de óxido de cromo muy compacta en la superficie del metal a cubrir que lo protege de la corrosión. El proceso se utiliza en la industria automotriz, siderúrgica, en la industria de la construcción entre otras. Los residuos generados contienen cromo, zinc, manganeso, hierro, níquel, cobalto y cobre (25).
- Industria petrolera: La presencia de cadmio, cromo, níquel, plomo, y principalmente Vanadio en el petróleo representa una de las principales fuentes de emisión de estos elementos en países industrializados. Sobre todo con la alta demanda y uso de combustibles provenientes de esta fuente. A pesar de existir nuevas tecnologías que pretenden disminuir estas emisiones, estos procesos no son aplicados en todo el mundo, debido a sus elevados costos, tanto de operación como de instalación.
- Industria minera y siderúrgica: en estudios llevados a cabo en varias regiones, se ha reportado de manera directa a la actividad minera como una de las fuentes de contaminación por metales pesados (21, 22, 26). En esta actividad se remueven grandes cantidades de tierra de diferentes profundidades, alterando la composición natural de los suelos y exponiendo minerales que contienen metales y metaloides. El contenido de metales de interés comercial en el material removido suele ser bajo y por esta razón es desechado, lo que produce residuos que se acumulan en el ambiente durante periodos de tiempo que van hasta los 400 años o más. Esto genera áreas extensas con niveles potencialmente peligrosos de elementos tóxicos.

Es importante mencionar que, para cada uno de los elementos existen fuentes características de emisión, relacionadas con los productos y procesos en los que son utilizados.

En el presente trabajo, la presencia de diferentes concentraciones de metales pesados en suelos de Guanajuato fue el punto de partida para estudiar la inducción de fitoquelatinas en plantas silvestres provenientes de estos suelos.

La captación de un elemento mediante la interfase suelo-raíz de planta, depende de la presencia de especies biodisponibles de este elemento en vecindad cercana de la raíz y por tiempo suficiente. La concentración de estas especies biodisponibles es determinante para la velocidad y magnitud de la acumulación de elementos tóxicos (27). La biodisponibilidad de los compuestos que contienen elementos tóxicos puede ser muy diferente dependiendo de la naturaleza de los mismos, y a su vez la distribución actual de las especies depende de factores tales como el pH del suelo, el potencial redox, la presencia de ligantes potenciales y de la actividad microbiana. Así pues, la caracterización de los suelos es de suma importancia para entender los mecanismos responsables de la captación de los elementos (28, 29).

## **I.2. Formas naturales de algunos elementos metálicos en la corteza terrestre.**

Algunas de las fuentes mineralógicas presentes en la corteza terrestre que aportan metales pesados se presentan en la Tabla 1, donde se observa claramente como el tipo de mineral y en particular el tipo de enlace químico deciden sobre la solubilidad (15). Dado que cada zona geográfica tiene orígenes geológicos diferentes, la composición de cada lugar varía de forma importante, así como la disponibilidad de los elementos tóxicos presentes. Asimismo los rangos de concentraciones pueden ir desde algunas partes por billón hasta cientos de partes por millón de algunos elementos en zonas determinadas.

**Tabla 1.** Nombre común de algunos minerales abundantes en la corteza terrestre, elementos que contienen y solubilidad en orden decreciente (15).

Fórmula genérica	Mineral	Elementos que contiene	Movilidad
$(\text{Mg,Fe,Mn})_2\cdot\text{SiO}_4$	Olivina	Ni, Co, Mn, Li, Zn, Cu, Mo	Muy soluble
$\text{Ca}_2(\text{Mg,Fe,Al})_5(\text{Al,Si})_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$	Hornblenda	Ni, Co, Mn, Sc, Li, V, Zn, Cu, Ga	↓
$\text{CaFeSi}_2\text{O}_6$	Augita	Ni,Co, Mn, Sc, Li, V, Zn, Pb,Cu, Ga	
$[\text{K}(\text{Mg,Fe})_3(\text{Al,Fe})\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH,F})_2]$	Biotita	Rb, Ba, Ni, Co, Sc, Li, Mn, V, Zn, Cu, Ga	
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F,Cl,OH})$	Apatita	Tierras raras, Pb, Sr	
$\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$	Anorita	Sr, Cu, Ga, Mn	
$\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$	Albita	Cu, Ga	
$\text{Mg}_3\text{Al}_2\text{Si}_3\text{O}_{12}$	Garnet	Mn, Cr, Ga	↓
$\text{KAl}_2(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_{10}(\text{OH,F})_2$	Muscovita	Rb, Ba, Sr, Cu, Ga, V	
$\text{CaTiSiO}_5$	Titanita	Tierras raras, V, Sn	
$\text{FeTiO}_3$	Ilmenita	Co, Ni, Cr, V	
$\text{ZrSiO}_4$	Zircon	Hf, U	
$\text{SiO}_2$	Cuarzo	-	Muy insoluble

Es importante mencionar que los yacimientos de uno o más elementos generalmente son acompañados por un importante número de otros elementos presentes en varios niveles de concentración. En la Tabla 2 se observa una clasificación de estos elementos llamados asociados encontrados comúnmente en yacimientos minerales no ferrosos. La extracción de los elementos asociados suele no ser económicamente viable, pero su presencia en los jales contribuye de manera significativa a la contaminación de la zona.

Aunque las especies presentes en yacimientos presentan baja biodisponibilidad, varios factores, como la actividad microbiana, la presencia de materia orgánica, así como el uso de fertilizantes y el efecto de la lluvia ácida, pueden aumentar la movilidad de los elementos en el medio ambiente.

En resumen, las actividades humanas hacen que las fracciones biodisponibles de elementos sean mucho mayores a las naturalmente encontradas en los suelos, esto genera riesgo para los ecosistemas así como para las poblaciones.

**Tabla 2.** Minerales no ferrosos comunes encontrados en los yacimientos naturales, y elementos asociados que pueden encontrarse en menor proporción (15).

Elemento	Mineral	Metales asociados
Ag	Ag <sub>2</sub> S, PbS	Au, Cu, Sb, Zn, Pb, Se, Te
As	AsS, Cu	Au, Ag, Sb, Hg, U, Bi, Mo, Sn, Cu
Ba	BASO <sub>4</sub>	Pb, Zn
Cd	ZnS	Zn, Pb, Cu
Cr	FeCr <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Ni, Co
Cu	CuFS <sub>2</sub> , Cu <sub>3</sub> FeS <sub>4</sub> , Cu <sub>2</sub> S, Cu <sub>3</sub> AsS, CuS, Cu	Zn, Cd, Pb, As, Se, Sb, Ni, Pt, Mo, Au, Te
Hg	HgS, Hg, Zn	Sb, Se, Te, Ag, Zn, Pb
Mn	MnO <sub>2</sub>	Fe, Co, Ni, Zn, Pb
Mo	MoS <sub>2</sub>	Cu, Re, W, Sn
Ni	(Ni,Fe) <sub>9</sub> S <sub>8</sub> , NiAs, (Co,Ni) <sub>3</sub> S <sub>4</sub>	Co, Cr, As, Pt, Se, Te
Pb	PbS	Ag, Zn, Cu, Cd, Sb, Tl, Se, Tl
Pt	Pt, PtAs <sub>2</sub>	Ni, Cu, Cr
Sb	Sb <sub>2</sub> S <sub>3</sub> , Ag <sub>3</sub> SbS <sub>3</sub>	Ag, Au, Hg, As
Se	Cu	As Sb, Cu, Ag, Au
Sn	SnO <sub>2</sub> , Cu <sub>2</sub> (Zn, Fe), SnS <sub>4</sub>	Nb, Tl, W, Rb
U	U <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	V, As, Mo, Se, Pb, Cu, Co, Ag
V	VS <sub>4</sub>	U
W	WO <sub>3</sub> , CaWO <sub>4</sub>	Mo, Sn, Nb
Zn	ZnS	Cd, Cu, Pb, As, Se, Sb, Ag, Au, In

### I.3. Guanajuato como zona potencialmente contaminada por metales pesados.

La ciudad de Guanajuato capital ha sido por aproximadamente cinco siglos, una zona minera de gran importancia, considerada como una de las regiones de mayor producción de plata en el mundo. Como consecuencia del largo periodo de actividades mineras en la región, se han removido aproximadamente 150 millones de toneladas de minerales, como desechos de bajo contenido comercial de metales, lo cual ha cubierto superficies de entre 15 a 20 km<sup>2</sup> por mina, abarcando una superficie total de más de 100 km<sup>2</sup> (30-33).

El depósito de desechos en forma de jales ricos en elementos como el Fe, Mn, Zn, Pb y As ha generado preocupación por posible contaminación de suelos y acuíferos de la región. La movilidad de potenciales contaminantes ha sido estudiada por varios autores (30, 31, 33).

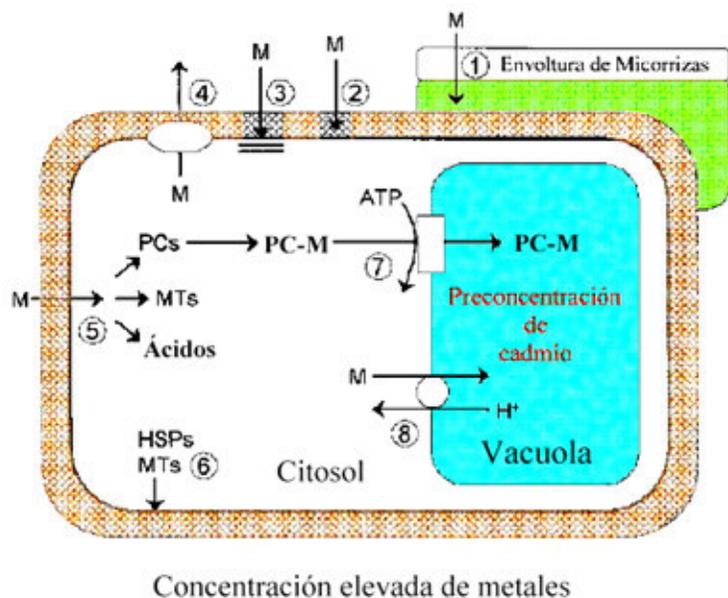
Esta es una de las razones por las que se decidió llevar a cabo los estudios de especiación de elementos tóxicos y su asociación con las PCs en la región.

#### **I.4. Mecanismos de adaptación de organismos vegetales en respuesta a altas concentraciones de xenobióticos metálicos.**

En épocas muy remotas en historia de la tierra los organismos vegetales fueron de los primeros en salir del mar, resolviendo así los problemas que presentaban el habitar en el agua. De esta manera pudieron incrementar su capacidad fotosintética y tuvieron mayor disponibilidad de nutrientes, normalmente escasos en el agua; lograron aumentar su biomasa y obtuvieron una superficie donde crecer. Sin embargo, al mismo tiempo perdieron su capacidad de trasladarse. Como consecuencia, la presencia de sustancias tóxicas (incluyendo especies metálicas y de metaloides) en el suelo afecta potencialmente al desarrollo de las plantas con la acumulación de estos elementos en su interior. Es importante que concentraciones elevadas de metales tanto esenciales, como no esenciales en suelos pueden causar toxicidad e inhibir el crecimiento de muchas plantas (34, 35). Así se han observado síntomas de toxicidad que a nivel molecular han sido relacionados con estados de estrés oxidativo e interacción específica con biomoléculas,

Algunas especies de plantas sin embargo han evolucionado desarrollando mecanismos de defensa y/o tolerancia de tal manera que pueden sobrevivir en suelos altamente contaminados. Estas estrategias desarrolladas por diferentes familias de plantas son muy diversas. Algunos de los mecanismos de defensa y/o tolerancia pueden tener lugar fuera de la planta como es el caso de las asociaciones simbióticas con hongos microscópicos y bacterias, además de los exudados de la pared y la membrana celular. La tolerancia también puede involucrar la membrana plasmática, reduciendo la captación o bien expulsado de manera activa los metales ya presentes en el citosol. Ya en el protoplasto existe una gran variedad de mecanismos posibles, por ejemplo la reparación activa de proteínas, y se han reportado la presencia de ácidos orgánicos, aminoácidos y péptidos, capaces de acomplejar iones metálicos. Estos pueden ser transportados dentro de la vacuola para aislar los iones metálicos del resto de organelos susceptibles a sus efectos tóxicos. En la Figura 1

se presentan de manera esquemática algunos procesos de captación y transporte de metales reportados en las células vegetales superiores (36). Se resumen 8 de los mecanismos que brindan la capacidad de tolerar concentraciones altas de metales pesados en los suelos de crecimiento.



1. Restricción del acceso de metales hacia raíz por micorrizas, y mecanismos de tolerancia causados por rizobacterias.
2. Ligadura a la pared celular.
3. Ligadura a la membrana plasmática.
4. Transporte activo hacia el exterior de la célula vegetal.
5. Acomplejamiento en citosol.
6. Protección de la membrana plasmática bajo condiciones de estrés.
7. Transporte de los complejos PC-Metal (PC-M) a la vacuola.
8. Transporte y acumulación de PC-M en la vacuola

**Figura 1.-** Resumen de algunos mecanismos defensivos reportados en las células vegetales (36). Se representa una concentración elevada de metales (M) en el exterior de la célula, así como los mecanismos de protección que se pueden llevar a cabo contra la toxicidad de los iones metálicos.

La tolerancia a los metales pesados en muchas plantas puede ser definida como la habilidad de sobrevivir en suelos que son tóxicos para otras plantas, y se manifiestan por la interacción entre un genotipo y su medio ambiente. Sin embargo el término es más frecuente usado en la literatura para mencionar los cambios que pueden ocurrir en la respuesta a la exposición a los metales pesados (35). A través de estudios genéticos se ha encontrado que la resistencia hacia los metales pesados puede ser controlada por un pequeño número de genes (37).

A continuación se resumen algunos de los factores y mecanismos, implicados en la resistencia y/o tolerancia de los organismos vegetales contra la toxicidad de los metales pesados.

*Micorrizas y rizobacterias.* La influencia de los microorganismos en la captación de elementos por las plantas puede jugar un papel importante en algunas especies, siempre que las condiciones del suelo permitan la colonización de la interfase raíz-suelo. Por un lado la asociación simbiótica llevada a cabo por hongos llamados micorrizas con algunas plantas, puede ofrecer cierta protección contra la entrada de elementos tóxicos. Los mecanismos propuestos para la tolerancia hacia metales por parte de las micorrizas son similares a los empleados por las plantas superiores, como la captación por compuestos extracelulares, o la inmovilización dentro de las vacuolas. Adicionalmente se puede dar la absorción de los compuestos en la envoltura de las hifas, cuya hidrofobicidad ayuda a reducir la movilidad de los metales (38, 39). Por otro lado la presencia de las bacterias es más común en las cercanías de las raíces, y estas juegan un rol importante en el reciclaje de nutrientes, mantenimiento de las características del suelo, control de plagas que atacan a la planta; y resultan ser de gran importancia para la captación tanto de nutrientes, como de elementos tóxicos por las plantas (40).

En lo que respecta a la tolerancia contra metales, se puede mencionar la actividad bacteriana como responsable de algunas reacciones químicas que disminuyen la movilidad de elementos. Como ejemplo la bacteria *Xanthomonas maltophyla* cataliza la reducción de Cr(VI) a Cr(III) mucho menos tóxico (41). Se ha reportado que el mismo microorganismo puede inducir cambios en la especiación de iones metálicos como Pb(II), Hg(II), Au(III), Te(IV) y Ag(I). También se han reportado mecanismos similares en cepas de *Escherichia coli* Y *Pseudomonas putida*. Aún más importante resulta ser la exudación de compuestos con propiedades acomplejantes como ácidos orgánicos y aminoácidos o péptidos, los cuales pueden disminuir la movilidad de los elementos tóxicos y permitir el crecimiento de las plantas (41).

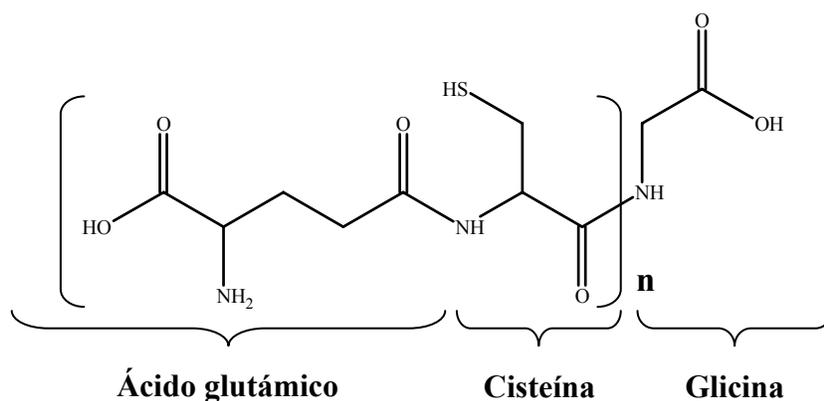
*Función de la pared y membrana celular.* Una de las diferencias estructurales fundamentales entre las células animales y las vegetales es la presencia de la pared celular en estas últimas, formada en su mayoría por fibras de celulosa, las cuales confieren la rigidez necesaria para el sostén. Junto con compuestos como ligninas ayuda a evitar la pérdida excesiva de agua. Al ser una de las primeras partes anatómicas de la planta, cuando esta en contacto con los metales contenidos en el suelo, puede de ser capaz de ofrecer cierta protección contra la entrada de metales hacia la célula, y en algunos estudios se ha encontrado la acumulación de elementos metálicos tóxicos en esta parte de la planta (42). Pero las funciones de la pared celular

en las raíces también abarcan la exudación de compuestos capaces de reducir la captación de los iones metálicos fuera de la planta como, ácidos orgánicos, así como algunos aminoácidos, que juegan un papel importante en la detoxificación de metales tanto fuera, como dentro de las células de la raíz (43). Una vez que los iones metálicos han permeado la pared celular, llegan a la membrana plasmática donde comienzan realmente los efectos dañinos de algunos metales pesados, alterando el flujo de iones como el potasio y causando alteraciones en la proteínas. Específicamente algunos iones metálicos presentan afinidad a los grupos tiol que juegan un papel importante en las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas. También se han reportado cambios en la estructura y permeabilidad de las barreras lipídicas de la membrana celular (44). Como respuesta a estos efectos tóxicos, la membrana plasmática debe ser capaz de llevar a cabo un transporte activo de elementos tóxicos al exterior de la célula, así como tener la capacidad de reparar las zonas dañadas para poder permitir a la planta la tolerancia hacia los iones metálicos.

*Acomplejamiento intracelular.* La concentración total de metales pesados dentro de las células vegetales puede llegar a niveles de concentración altos, sin que se produzcan efectos tóxicos, esto es debido principalmente al acomplejamiento de los iones metálicos por compuestos presentes o producidos en el interior de la célula, lo cual disminuye su reactividad e impide su asociación con proteínas y otras estructuras celulares. Dentro de los compuestos reportados como capaces de acomplejar metales pesados dentro de las células vegetales destacan la fitoquelatinas (45), descubiertas en los años 80s y nombradas de esta manera en 1985 (6). Las fitoquelatinas son péptidos con estructura básica  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , donde n varía entre 2 hasta 11 (46). Estos compuestos son sintetizados enzimáticamente, lo que implica su codificación en el genotipo de las plantas que las producen (47). Una vez formados los complejos entre las PCs y los iones metálicos, se puede llevar a cabo un transporte activo de estos hacia el interior de la vacuola, donde se concentran. Otros compuestos que intracelularmente pueden disminuir la toxicidad de los iones metálicos son las metalotioneinas (36) (mejor caracterizadas en animales) y los ácidos orgánicos.

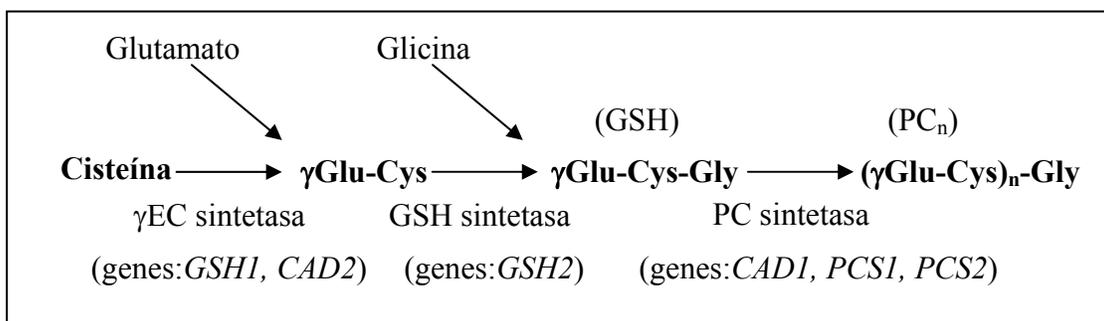
## I.5. Fitoquelatinas

Se considera que las fitoquelatinas fueron desarrolladas como mecanismo defensivo contra los metales pesados por primera vez en organismos unicelulares marinos (48-51), dado su origen antiguo en organismos predecesores a las plantas superiores actuales, es posible encontrar estos compuestos en varios tipos de organismos marinos, tanto unicelulares como pluricelulares (48, 50, 52-64). La estructura general de estos compuestos se puede observar en la Figura 2.



**Figura 2.** Estructura química de las fitoquelatinas, donde  $n$  puede variar de 2 a 11.

La ruta sintética de la PCs en las plantas tiene como sustrato la glutatióna ( $\gamma$ -Glu-Cys), y está implicado un pequeño número de genes que codifican las enzimas denominadas PC-sintetasas que unen las moléculas de glutatióna, con glicina como aminoácido terminal, dando lugar a las PCs (65). Esto hace que la ruta sintética de las PCs traslape en gran medida con la de la glutatióna. La ruta sintética se resume en la Figura 3, donde se mencionan las enzimas participantes y los genes que las codifican, es importante mencionar que se trata de una representación y que existen algunas variantes a esta ruta descritos en investigaciones recientes.



**Figura 3.** Ruta de la síntesis de las PC's en plantas superiores.

Es bien conocida la importancia biológica de los compuestos que contienen en su estructura átomos de azufre. En cuanto a la interacción de biomoléculas con metales pesados, en el reino animal existe un grupo de proteínas ricas en cisteína llamadas metalotioneínas (66, 67), las cuales cumplen una función similar a las PC's en plantas, acomplejar los iones metálicos para evitar sus efectos tóxicos. Y en algunos microorganismos como las levaduras, se han encontrado ambos grupos de compuestos, metalotioneínas y fitoquelatinas (10, 68, 69).

Sin embargo en las plantas superiores la presencia de metalotioneínas es rara vez observada (43, 70), siendo la PC's las principales responsables del acomplejamiento de metales pesados. Las fitoquelatinas pueden presentar variaciones estructurales, producto de diferencias en las rutas sintéticas, como el uso de homoglutationa ( $\gamma$ Glu-Cys-Ala) como sustrato de reacción. Las principales variantes se mencionan en la Tabla 3, en la cual podemos observar que el aminoácido C terminal es diferente mientras que las unidades de  $\gamma$ Glu-Cys son presentes en todos los homólogos de PC's. La función de las variantes de las PC's no está muy clara pero se sabe que muchas plantas así como levaduras son capaces de sintetizarlas (71-74).

**Tabla 3.** Varios análogos de PC's encontrados en plantas y levaduras (75-77).

Péptidos relacionados con las PC's	Estructura	Ocurrencia
Fitoquelatinas	$(\gamma$ -Glu-Cys) <sub>n</sub> -Gly	Plantas, levaduras
Homofitoquelatinas	$(\gamma$ -Glu-Cys) <sub>n</sub> -Ala	Leguminosas
Desglicil fitoquelatinas	$(\gamma$ -Glu-Cys) <sub>n</sub>	Maíz, levaduras
Hidroximetil fitoquelatinas	$(\gamma$ -Glu-Cys) <sub>n</sub> -Ser	Gramineas
Iso-fitoquelatinas (Gln)	$(\gamma$ -Glu-Cys) <sub>n</sub> -Gln	Maíz

La importancia de las PCs en la tolerancia a metales pesados ha sido ampliamente documentada tanto en plantas de interés comercial incluyendo el tomate (78) y tabaco(79), como en muchas especies resistentes a metales pesados (7, 76, 80-105). Los estudios se han llevado a cabo de diferentes maneras, generalmente con plantas cultivadas en el laboratorio, en presencia de sales inorgánicas de metales pesados. Por otro lado, se han hecho modificaciones genéticas para aumentar o disminuir la biosíntesis de PCs, lo que ha demostrado que las plantas deficientes en PCs son más sensibles a la toxicidad de los metales pesados, respecto a las plantas con sobre expresión de los genes responsables de la producción de PCs.

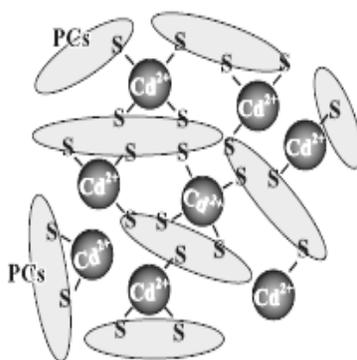
Se ha demostrado así la gran importancia que tienen como mecanismo defensivo en organismos vegetales, así como en levaduras y en otros microorganismos. Es importante resaltar que no se han encontrado reportes anteriores a este trabajo que hayan estudiado la síntesis de PCs y su importancia en plantas silvestres, recolectadas en ambientes naturales.

Las PCs han sido encontradas también en animales simples, como gusanos y otros microorganismos unicelulares (106, 107), también se ha podido introducir información genética de plantas a cultivos celulares de mamíferos y se ha demostrado el incremento en la resistencia al Ion Cd(II) en estos cultivos (108).

Existen algunos trabajos dedicados a tratar de elucidar la estructura molecular de las PCs, y sus complejos con iones metálicos (48, 71, 109, 110). En estos reportes se han encontrado diferencias entre las concentraciones de PC-1, PC-2 y PC-3 dependiendo del tipo de planta, del ion metálico y de su concentración en el medio. Cabe mencionar que las cadenas más largas de fitoquelatinas (PC-4 y PC-5) solo se han reportado en plantas modificadas genéticamente. Los elementos reportados como inductores de PCs, en plantas son principalmente: cadmio, seguido por plomo, mercurio, cobre, plata, zinc, arsénico, níquel y cobalto (6, 53, 71, 76, 80, 86, 101, 111-115). Aunque dependiendo del genotipo estudiado, la respuesta varía ampliamente, desde la clara inducción de PCs hasta la carencia de la síntesis de las mismas.

Se ha encontrado que la estequiometría de los complejos PC-Metal (PC-M) va desde 1:1 hasta 4:1, dependiendo del estado de oxidación del ion metálico, así como de la longitud de la cadena peptídica (110). La estructura típica mencionada en los trabajos es la ilustrada en la

Figura 4, donde se puede observar los diferentes arreglos que pueden resultar de la presencia de PC-2, PC-3 y PC-4 con el ion Cd(II). La coordinacion entre los grupos tiol y el ion metálico hacen que las PCs sean capaces de acomplejar a un número mayor de iones que los que pueden inducir su síntesis, este hecho es de gran importancia para la homeostasis de las plantas.



**Figura 4.** Esquema de los complejos formados entre las PCs y el ion Cd(II) (116).

Existen reportes que proponen el uso de los niveles de PCs y sus análogos en tejidos de plantas como indicadores bioquímicos de la contaminación por metales pesados así como de su toxicidad. (86) Como se ha descrito, la inducción de fitoquelatinas en tejidos de plantas ocurre en respuesta a concentraciones elevadas de metales, sin embargo para que la inducción sea posible se ha encontrado que las especies que contiene los metales pesados deben ser formas libres, o altamente tóxicas para que se lleve a cabo el proceso inducción.

La producción de PCs se ha observado principalmente en raíces, sin embargo también se ha visto que las partes aéreas de los organismos vegetales expuestas a metales contienen niveles más altos de cisteína y glutatona, respecto a las plantas no expuestas. En algunos casos se lleva cabo la síntesis de fitoquelatinas en las partes aéreas de las plantas (117). Estos cambios pueden ser usados como indicadores bioquímicos de la contaminación por metales pesados en varios ambientes naturales (117, 118).

Sin embargo a pesar de establecerse la importancia que tienen las PCs en la tolerancia de algunas plantas hacia metales pesados, existen reportes que indican que las PCs no son responsables de la resistencia a metales pesados presentada en algunas plantas (82, 90, 119-121).

En estos reportes se ha mencionado la importancia de otros compuestos, algunas veces relacionados con las PCs, como la glutatona y la cisteína, como responsables directos de la tolerancia o acumulación de metales. En relevancia a este trabajo, algunos autores proponen que las PCs presentes en la planta pueden acomplejar los iones metálicos que están presentes en el ambiente intracelular pero no son capaces de inducir la síntesis de PCs. Resulta de gran importancia pues entender mejor cuales son los alcances de las PCs como sistema defensivo, y que papel juegan en la acumulación de elementos tóxicos en ambientes naturales. También es interesante extender el estudio a especies nativas de México, y explorar la importancia de las PCs como mecanismo de defensa en estas, ya que los reportes tienden a extender el conocimiento de las estrategias defensivas en plantas regionales en diversos países (122-125).

## **I.6. Fitorremediación**

La fitorremediación es el uso de plantas para la restauración ambiental, es una tecnología emergente para la limpieza de suelos y acuíferos. Las plantas pueden extraer, secuestrar, volatilizar y/o detoxificar contaminantes, a través de procesos físicos, químicos o biológicos (126).

De acuerdo a estos principios la fitorremediación puede llevarse a cabo de diferentes maneras, que pueden clasificarse como: fitoextracción, rizofiltración, fitoestabilización, y fitovolatilización (40).

La fitoextracción es el uso de plantas superiores para remover contaminantes orgánicos o metales de suelos contaminados. En este caso, se emplean plantas capaces de acumular niveles altos de metales mismas que son sembradas en suelos contaminados. La biomasa recolectada es enriquecida con metales, removiendo así contaminantes de los suelos (13, 35).

La rizofiltración es el uso de las raíces de plantas para absorber, concentrar o precipitar metales en afluentes acuosos. La fitoestabilización es el uso de plantas para reducir la movilidad de los elementos tóxicos, a través de la adsorción y/o precipitación, lo que reduce su biodisponibilidad. La fitovolatilización se refiere a la captación de elementos tóxicos del suelo

por parte de la planta y su liberación a la atmósfera en formas volátiles, esto puede ocurrir con compuestos de mercurio, arsénico y selenio (40).

La identificación de plantas capaces de acumular concentraciones extraordinariamente altas de metales, muestra que las plantas poseen un potencial uso para la limpieza de suelos contaminados.

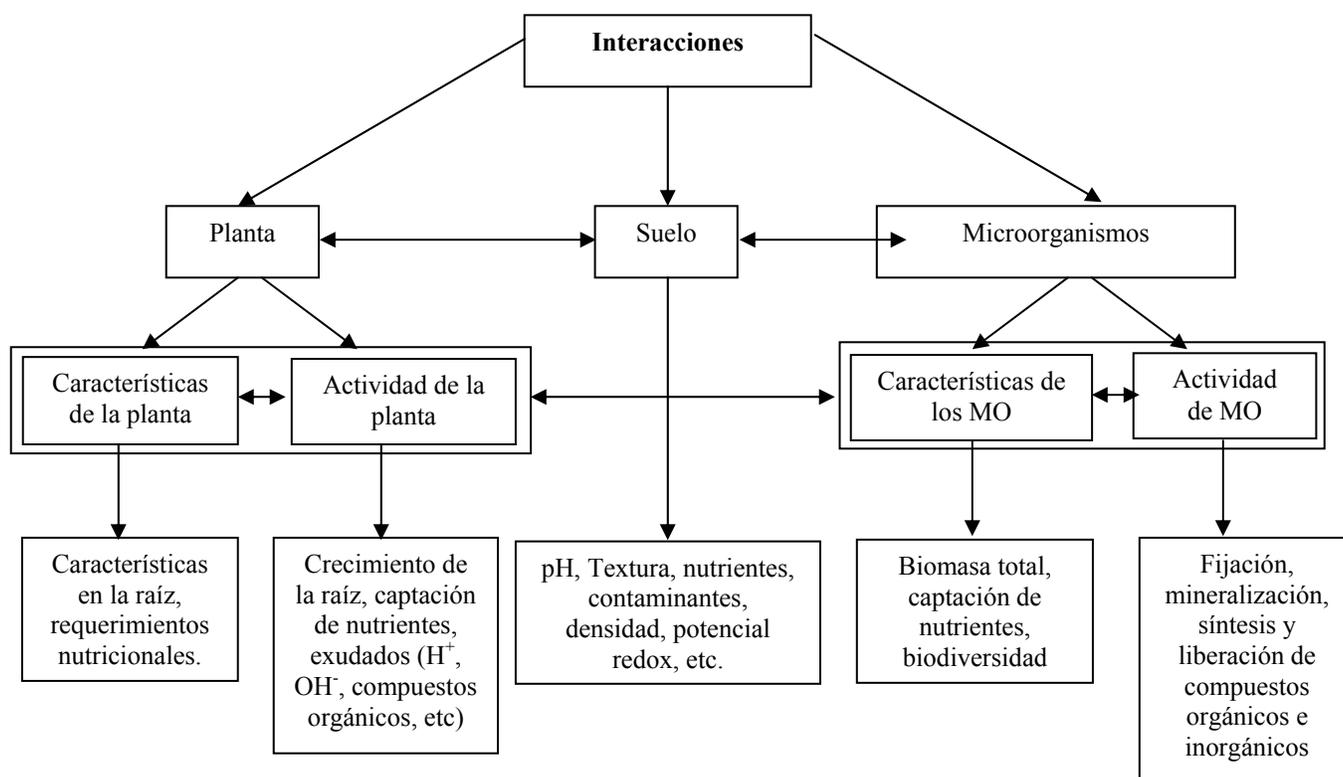
En los suelos, los metales existen como una variedad de especies químicas en un equilibrio dinámico, gobernado por las propiedades físicas, biológicas y químicas de los suelos. La cinética de estas interacciones decide de la biodisponibilidad de los metales, en general sólo una fracción de los metales presentes en el suelo es realmente biodisponible para su captación por las plantas. La mayor parte de los metales contenidos en los suelos está generalmente en forma de compuestos insolubles no viables para su transporte dentro de la raíz (41). Las investigaciones relacionadas con la biodisponibilidad de metales son de vital importancia para los estudios de extracción de metales en suelos. En general las extracciones con disoluciones acuosas en diferentes condiciones (fuerza iónica, pH, temperatura), proveen de una buena estimación de la cantidad de metales biodisponibles en muestras de suelos.

Estas estimaciones son útiles para determinar la concentración biodisponible de cada metal y existe una serie de procedimientos de extracción basados en este principio. Con lo que se logra la especiación operacional de los diferentes grupos de compuestos, que contienen los elementos de interés. El método de extracción secuencial Tessier (127) fue utilizado en el trabajo experimental, y consta de 5 extractos definidos como:

- Fracción intercambiable ( $MgCl_2$ ).
- Fracción unida a carbonatos. ( $CH_3COONa / CH_3COOH$ , 1 M pH 5).
- Fracción unida a óxidos de hierro y manganeso. ( $NH_2OH / HCl$  0.04 M en 25 %  $CH_3COOH$ ).
- Fracción unida a materia orgánica y sulfuros. (30 %  $H_2O_2$  pH 2, posteriormente  $CH_3COO NH_4$  3.2 M en  $HNO_3$  al 20%).
- Fracción residual. ( $HNO_3$ ).

Cada fracción es analizada por una técnica analítica elemental para determinar los contenidos de elementos presentes, y provee de información acerca de la biodisponibilidad de los mismos.

Con excepción del Hg, la captación de los metales hacia la raíz ocurre normalmente a través de la fase acuosa, en los suelos algunos metales como el cadmio existen principalmente como formas solubles o intercambiables fácilmente disponibles para las plantas; otros como el plomo ocurre normalmente como precipitados insolubles (fosfatos, carbonatos, hidróxidos y sulfuros) que son normalmente muy poco biodisponibles para las plantas (128). Existe además en algunos casos un importante efecto de acomplejamiento de las sustancias húmicas (SH) de suelo hacia algunos iones metálicos polivalentes; estos factores pueden disminuir en gran medida la eficacia de la fitorremediación con plantas. En la Figura 5 se resumen las interacciones que se pueden llevar a cabo en la interfase raíz-suelo, y que son de importancia para la captación de elementos por las plantas.



**Figura 5.** Interacciones que se pueden llevar a cabo en la interfase suelo-raíz, en presencia de microorganismos (MO) (40).

La biología molecular es una herramienta muy útil en el mejoramiento de las capacidades hiperacumuladoras de metales en plantas, sin embargo los procesos llevados a cabo en la interfase raíz-suelo siguen siendo el factor decisivo en la biorremediación con plantas (129, 130).

Se han propuesto diversas alternativas para aumentar la eficiencia de la fitoextracción de metales pesados en suelos contaminados. En concreto se ha estudiado el papel que juegan algunos agentes acomplejantes de bajo peso molecular en la biodisponibilidad de los elementos tóxicos hacia las plantas (131-133), se encontró en algunos casos que el formar complejos estables de bajo peso molecular permite la entrada hacia las plantas de los elementos metálicos en formas menos tóxicas. Por otro lado se ha propuesto que la acomplejación con algunos compuestos puede disminuir la movilidad de los metales impidiendo su entrada a las plantas empleadas. Las plantas poseen mecanismos altamente especializados para incrementar la biodisponibilidad de metales en la esfera rizosomal e incrementar la captación hacia las raíces. En algunas especies se ha documentado la exudación de ácidos orgánicos capaces de aumentar la biodisponibilidad de hierro en suelos (134). También la interacción de las sustancias húmicas con los exudados raíz pueden incrementar en algunos casos la biodisponibilidad de metales; la exudación de ligandos como el ácido deoximugénico, malatos y acetatos puede inhibir la capacidad acomplejadora de las sustancias húmicas (134).

También es importante mencionar el posible uso de las plantas como extractantes de metales pesados con intereses comerciales a lo que se ha denominado fitominería (135), para esto se ha llevado a cabo modificaciones genéticas en plantas hiperacumuladora de metales como el oro y la plata. Esta es una alternativa de bajo costo que puede ayudar a disminuir el impacto de los desechos mineros al medio ambiente. Sin embargo estas metodologías no son completamente accesibles debido en gran medida a la falta de conocimiento de los mecanismos moleculares y las rutas metabólicas involucran la hiper-acumulación de metales pesados. También es importante mencionar que no existen reglas establecidas acerca de los parámetros de suelo óptimos para la fitorremediación en cualquier zona, más bien es necesario hacer estudios específicos para cada sitio.

## **I.7. Especiación analítica de elementos.**

En las últimas décadas la comunidad científica ha concluido que, la movilidad de elementos en el medio ambiente, su biodisponibilidad y captación por organismos vivos, su transporte y distribución, así como sus efectos biológicos específicos, se ven gobernados por las especies particulares, o formas actuales de cada elemento en un sistema dado. En este sentido, la determinación total de elementos como el mercurio, arsénico o estaño, es insuficiente para saber acerca de su toxicidad. Como ejemplo el metilmercurio es mucho más biodisponible y tóxico que el mercurio inorgánico y el tributil estaño es mucho más tóxico que el Sn(IV). Por lo tanto la información cuantitativa de la distribución de un elemento en sus formas/especies es indispensable para complementar la información acerca de la toxicidad de algunos elementos tanto en muestras medio ambientales como en muestras biológicas (136).

La diferente toxicidad que presentan diversas formas químicas de un mismo elemento, tiene que ver con propiedades de sus especies tales como son: tamaño molecular, configuración electrónica, polaridad, tipo de enlace químico, estabilidad.

Resulta claro que un cambio en el estado de oxidación, la presencia de potenciales ligandos o la adición de fragmentos orgánicos, son suficientes para modificar la toxicidad de los elementos. Esto hace que la especiación química juegue un papel fundamental en los estudios sobre los efectos biológicos de metales y metaloides (4, 5).

El reto en la especiación química es determinar las especies de interés del elemento de manera selectiva y sensible, evitando posibles interferencias, y sin alterar el estado original de las especies en el sistema estudiado. Estos análisis presentan una serie de problemas en muestras biológicas principalmente por su complejidad. Los procedimientos de preparación de muestras son, como en muchos otros procedimientos analíticos, la parte decisiva al momento de preservar las formas químicas presentes de manera natural en las muestras. Aunque en algunos casos las condiciones de análisis pueden afectar la especiación natural; como ejemplo, las separaciones cromatográficas deben emplear fases móviles que no reaccionen con los analitos estudiados.

## **I.8. Herramientas analíticas empleadas en los estudios de especiación.**

Un esquema de especiación involucra de manera típica dos etapas, en el primer paso se obtiene la separación de los compuestos de interés y en una segunda etapa se lleva a cabo su detección y cuantificación. Las herramientas analíticas que se emplean en este tipo de estudios deben presentar las siguientes características:

- Preservación de las formas químicas presentes en la muestra original, ya que de esto depende la utilidad de la información obtenida de todo el procedimiento analítico.
- Selectividad alta en la etapa de separación, que permita la determinación exacta de los diferentes compuestos.
- Detección específica y multi-elemental de los elementos de interés en las fracciones obtenidas de la etapa de separación, y posibilidad de cuantificar los analitos con el menor número de interferentes posibles
- Sensibilidad alta y límites de detección bajos, ya que por lo general las muestras de interés medio ambiental o biológico, presentan concentraciones traza o ultra traza de metales, como contaminantes o como elementos con funciones biológicas.

Con base en estos requisitos que se acaban de mencionar, los procedimientos actuales emplean técnicas cromatográficas y electroforéticas poderosas en la etapa de separación, y técnicas espectrométricas atómicas en la etapa de detección y cuantificación. En los inicios de la especiación como estudio sistemático, la espectrometría de absorción atómica fue la técnica de detección más utilizada.

### **I.8.1. Espectrometría de absorción atómica.**

La absorción de radiación electromagnética en la región ultravioleta visible (UV-Vis) que experimentan los átomos en estado gaseoso, brinda una herramienta analítica poderosa para los análisis cuantitativos y cualitativos elementales. La espectrometría de absorción atómica (AAS) se basa en el principio de que los átomos libres en estado fundamental de energía pueden absorber radiación UV-Vis a ciertas longitudes de onda determinadas por las reglas de la química

cuántica que rigen las transiciones energéticas permisibles, entre los estados energéticos de los electrones de valencia. Así pues los átomos de un elemento poseen un espectro único en la región UV-Vis, lo que permite su identificación.

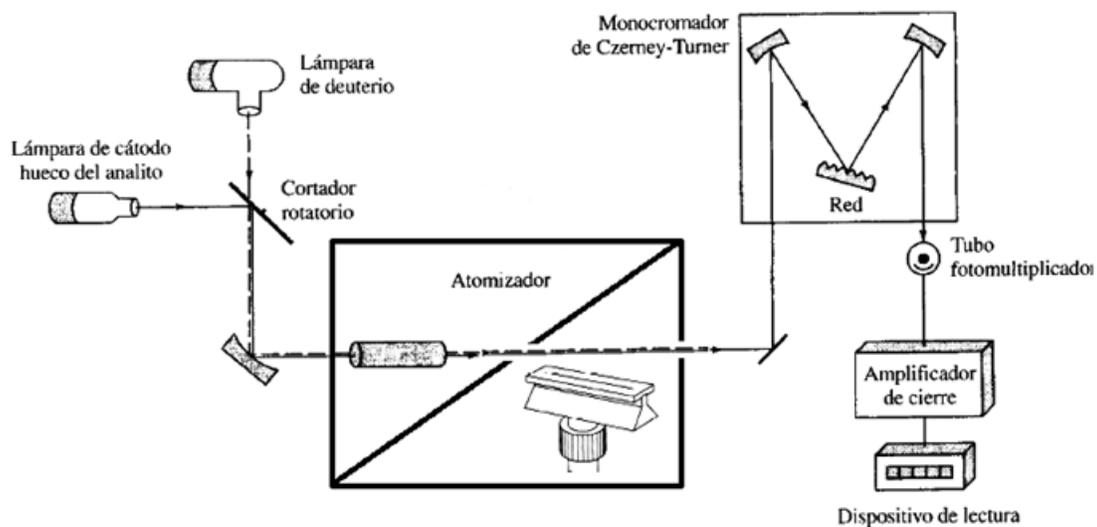
En la Figura 6 se muestra un esquema de un espectrómetro de absorción atómica. El atomizador puede ser de llama o electrotérmico (figuras 7 y 8). En ambos casos la fuente de radiación electromagnética es la lámpara de cátodo hueco, donde el cátodo está compuesto por el elemento a determinar. Esto garantiza que el espectro de emisión utilizado proporciona las porciones de energía que pueden ser absorbidas por el analito.

El atomizador puede ser la llama producida al quemar acetileno, en esta modalidad la muestra en solución es nebulizada y entra como un rocío fino al quemador, donde se llevan a cabo los siguientes procesos:

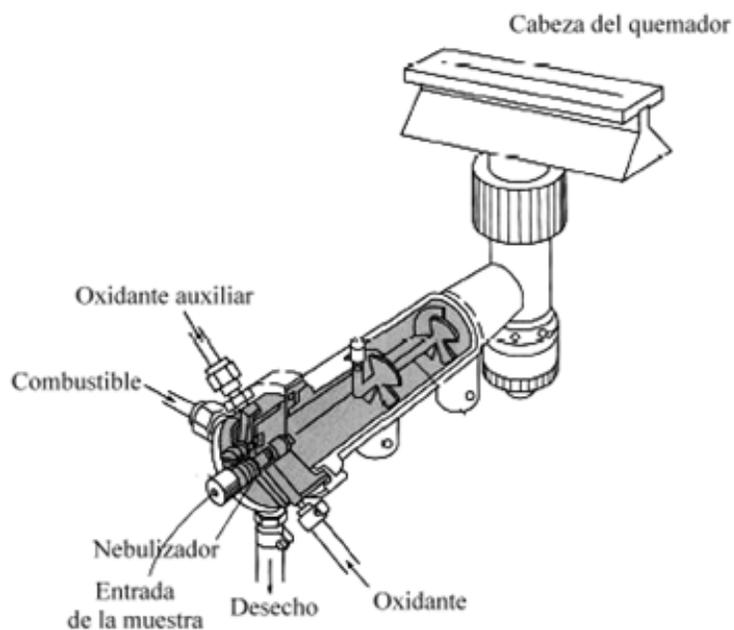
1. Desolvatación
2. Evaporación
3. Pirrolisis
4. Atomización

Una vez en forma elemental, los átomos son irradiados con el haz de radiación producida por la lámpara de cátodo hueco, y los átomos del analito a determinar absorben parte de la energía excitándose. La cantidad de energía absorbida a una longitud de onda específica es proporcional a la concentración del elemento en la disolución. Esta proporcionalidad es de tipo logarítmico, por lo que el logaritmo del cociente intensidad emitida/intensidad registrada, definido como absorbancia, es linealmente proporcional a la concentración del analito.

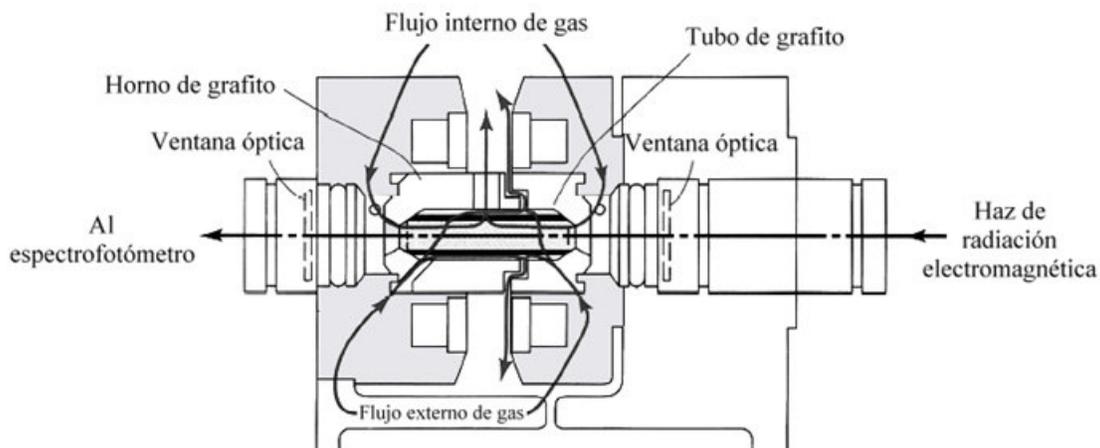
Otra técnica de la espectrometría de absorción atómica es la que emplea un atomizador electrotérmico. En este caso una pequeña cantidad de muestra (de 5 a 100  $\mu\text{l}$ ) es colocada en un tubo de grafito, el cual funciona como resistencia en un circuito eléctrico. El interior del tubo está colocado en el paso óptico del instrumento. En esta modalidad, la muestra es calentada de manera controlada para llevar a cabo los mismos procesos que en la atomización en llama, pero de tal manera que en la etapa de atomización la fase gaseosa contiene principalmente átomos del analito, mientras que los productos de descomposición de la matriz ya hayan sido removidos, esta técnica de atomización permite el análisis directo de muestras con matrices complejas.



**Figura 6.** Esquema de un espectrómetro de absorción atómica, donde se muestran la lámpara de cátodo hueco para la emisión de la radiación de energía apropiada para el elemento a analizar, y la lámpara de deuterio para la corrección de la absorción no específica; las dos fuentes comunes de atomización: electrotérmica y en llama; así como el sistema de detección y registro.



**Figura 7.** Atomizador en llama utilizada en espectrometría de absorción atómica (137).



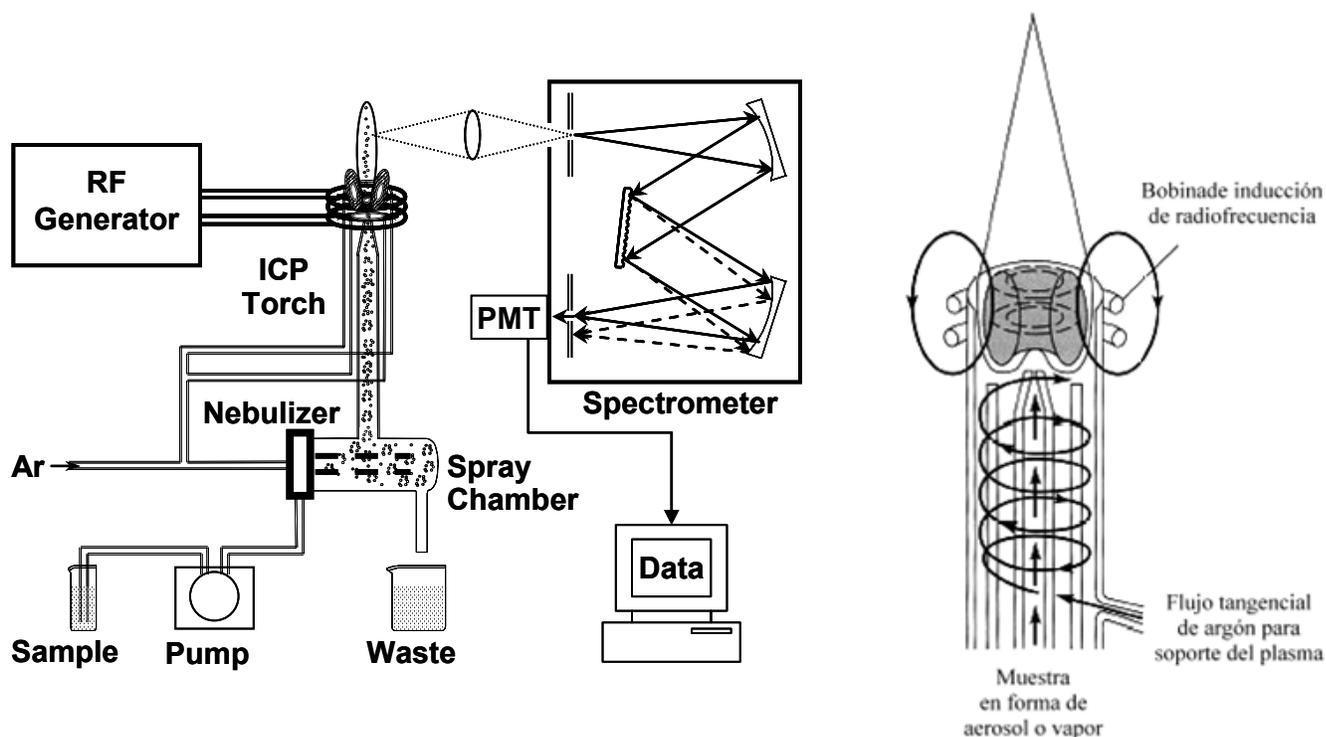
**Figura 8.** Atomizador electrotérmico utilizado en la espectrometría de absorción atómica ETAAS. (137).

En ambas modalidades los sistemas de corrección de fondo son muy importantes, ya que es necesario distinguir entre la absorción específica por los átomos del elemento estudiado, de las pérdidas de intensidad del haz de la fuente, no relacionadas con la presencia del analito. Los rangos de concentración que se pueden medir, se ven limitados por las desviaciones de la linealidad, características de las mediciones de absorbancia, a concentraciones elevadas. Por lo que es necesario en ocasiones hacer determinaciones con diferentes diluciones para elementos específicos en una misma muestra.

### **I.8.2. Espectrometría de Emisión atómica**

Con el avance tecnológico fue posible el surgimiento de nuevas herramientas analíticas para la determinación de elementos y en particular el uso de plasmas de un gas noble como fuente de atomización, excitación, ionización. El uso de plasmas generados a partir de gases nobles incrementó en gran medida la energía que se puede suministrar a las muestras, favoreciendo los procesos de desolvatación y pirrolisis, y permitiendo la excitación atómica en mayor medida, con lo que la espectrometría de emisión atómica se convirtió en otra herramienta analítica a utilizar. Dentro de las características que presenta la espectrometría de emisión atómica se puede mencionar la capacidad multielemental que se obtiene de la medición secuencial de las diferentes líneas de emisión características de cada elemento.

En la Figura 9 se observa el esquema de un espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción como fuente de excitación (ICP-AES). Las partes fundamentales son el sistema de introducción de muestra, que consta de un nebulizador y una cámara de rociado, a la cual se une la antorcha, formada por tres tubos de cuarzo concéntricos, por los cuales fluye el gas que forma el plasma (típicamente argón, en algunas aplicaciones helio). En la Figura 9 se puede apreciar la configuración de una antorcha usada en un espectrómetro ICP-AES. Se puede apreciar el flujo del gas en la antorcha de manera tangencial que ayuda a mantener el plasma de manera estable, y crea una geometría anular que permite el paso de la muestra por el centro del plasma. Esto hace que los tiempos de permanencia de la muestra en el plasma sean largos y permite que la muestra reciba suficiente energía para llevarse a cabo la excitación de los átomos y emisión de la radiación atómica. El sistema de inducción es un generador de campo electromagnético en la región de radiofrecuencia (de 27-41 MHz) que mantiene a los iones de argón y a los electrones, en constante movimiento con trayectorias encontradas, lo que ocasiona la producción de calor por resistencia ohmica. El espectrofotómetro, puede ser conformado por una rejilla de difracción, con lo que el análisis de cada línea de emisión atómica se hace de manera secuencial; o se puede colocar un prisma en el paso óptico después de la rejilla de difracción, lo que genera un espectro en dos dimensiones. El detector puede ser un fotomultiplicador, un arreglo de diodos o un detector por inyección de carga (CID).



**Figura 9.** (a) Esquema de un espectrómetro de emisión atómica con fuente de excitación en plasma acoplado por inducción con detector tipo fotomultiplicador (PMT). (b) Antorcha de un espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción como fuente de excitación (137).

Además de los elevados costos de operación y mantenimiento se puede mencionar que los espectros de emisión obtenidos a partir de muestras con matrices complejas suelen ser complicados de interpretar, ya que cada elemento posee varias líneas de emisión, las cuales pueden encontrarse más cercanas que la capacidad de resolución óptica de los sistemas de difracción, obligando a elegir en ocasiones líneas de menor intensidad para las determinaciones lo que disminuye el poder de detección.

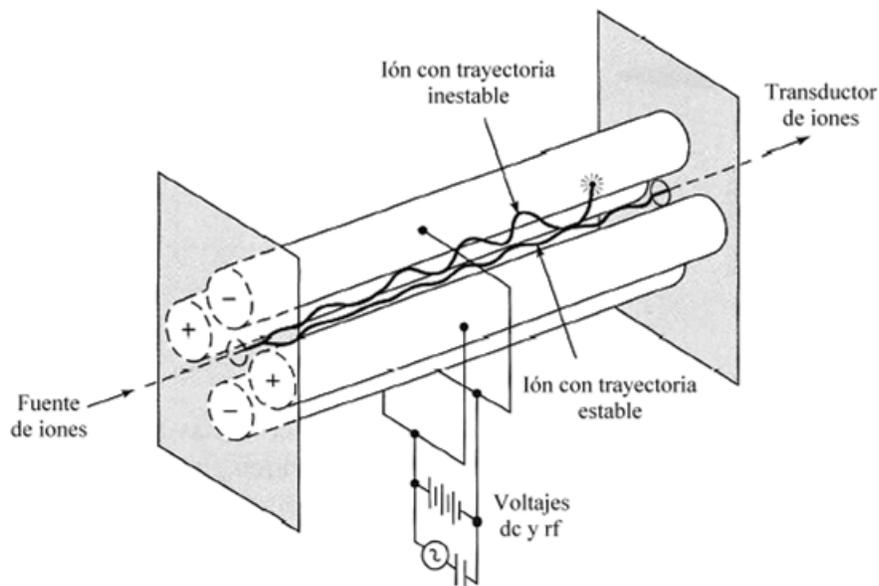
Con esta herramienta analítica es posible llevar a cabo estudios de especiación cuando las concentraciones esperadas son en el orden de microgramos por mililitro de muestra, y al ser una técnica continua, en algunos modelos es posible llevar a cabo el acoplamiento con técnicas de separación cromatográficas o electroforéticas.

### **I.8.3. Espectrometría de masas, ICP-MS como herramienta analítica en estudios de especiación.**

Con el desarrollo de la espectrometría de masas se abrió la posibilidad de identificar y cuantificar las especies químicas en un amplio rango de masas. En estas técnicas la muestra debe ser ionizada para obtener iones moleculares, sus fragmentos o átomos ionizados. Los iones son conducidos por una serie de lentes iónicas hacia la zona de alto vacío donde se introducen a un filtro o analizador de masas, que separa o filtra los iones de acuerdo al valor de su cociente  $m/z$  (masa/carga). Posteriormente son detectados por un transductor electrónico y registrados.

Los analizadores de masas pueden ser de varios tipos, los más frecuentemente utilizados por su bajo costo y versatilidad son los cuadrupolos. En la Figura 10 se muestra la manera de operar de un cuadrupolo. Los iones enfocados en un haz uniforme, son acelerados por un conjunto de lentes iónicas, e introducidos en el espacio entre cuatro barras metálicas paralelas que funcionan como electrodos. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par a la terminal negativa. Adicionalmente se aplica a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia. La interacción de los iones tanto de los potenciales de corriente continua como los de corriente alterna con los iones genera diferentes trayectorias. Un par de barras opuestas con carga positiva o negativa de forma alternada, aleja o atrae los iones hacia el espacio al centro de las barras, los iones de baja masa son movidos con mayor intensidad y en el ciclo negativo de las barras colisionan con las mismas, con lo que pierden su carga y son eliminados, de esta manera este par de barras funcionan como filtro de masas bajas. El otro par de barras con carga negativa atraen de manera continua a los iones positivos presentes, sin embargo en los iones ligeros este movimiento puede ser contrareestado por el ciclo positivo del potencial de corriente alterna, de esta manera los iones pesados son atraídos de manera continua hacia las barras con carga negativa y son eliminados, así este par de barras funciona como filtro de masas altas. Con esto se consigue que solo un intervalo estrecho de relaciones  $m/z$  tengan una trayectoria estable a su paso por el cuadrupolo y lleguen al detector. Variando los potenciales de corriente alterna y continua es posible seleccionar una relación  $m/z$  específica y eliminar las demás. Al realizar los ajustes de manera rápida es posible realizar un barrido de relaciones  $m/z$  de valores típicamente entre 3-300,

con tiempos de detección en el orden de milisegundos (al rededor de 100 ms) en un amplio rango, lo que permite el análisis multielemental prácticamente simultáneo.

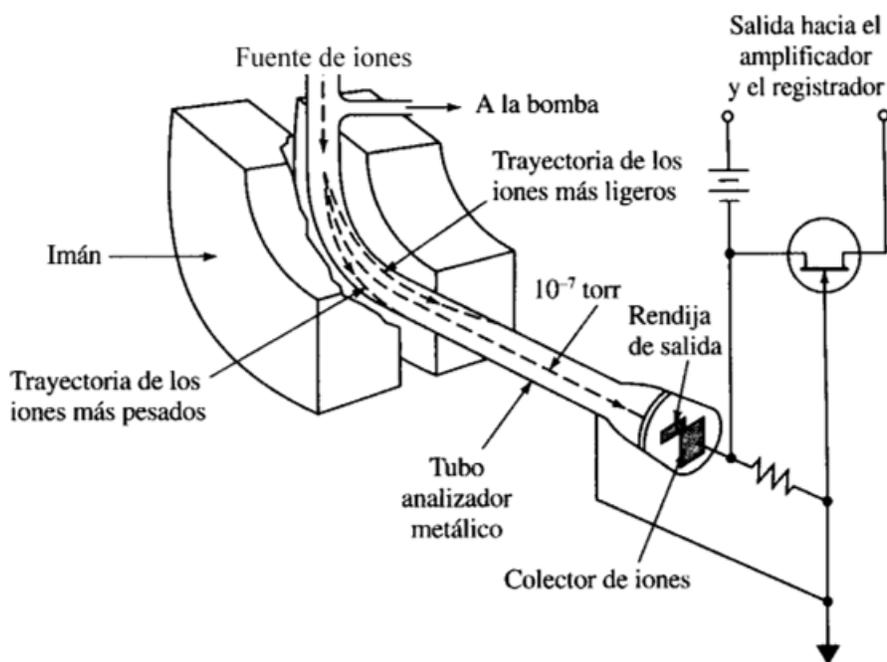


**Figura 10.** Diagrama de operación de un filtro de masas tipo cuadrupolo, se observa el diagrama de las conexiones eléctricas a los generadores de corriente directa (dc) y radio frecuencia (rf), así como las trayectorias de iones de diferente relación  $m/z$  (137).

El analizador de masas de cuadrupolo presenta la desventaja de tener baja resolución, es decir solo puede distinguir entre valores de  $m/z$  que difieren en una unidad. Esto hace que este filtro de masas no pueda distinguir entre iones atómicos  $X^{+1}$ , en los cuales el valor  $m/z$  es igual a la masa atómica, y los iones poliatómicos  $ZY^{+1}$  que pueden presentar valores de  $m/z$  muy similares a  $X^{+1}$ .

Existen también analizadores de masas de alta resolución que permiten separar iones que presentan diferencias entre sus valores  $m/z$  inferiores a una unidad de masa atómica. De esta manera es posible eliminar las interferencias poliatómicas e isobáricas. Un analizador de sector magnético se muestra en la Figura 11. Los iones son acelerados y luego son introducidos en el centro de un campo magnético generado por un electroimán curvo. El campo magnético genera la deflexión de los iones, de manera que los iones pesados colisionan con las paredes del

tubo al vacío que los conduce al no modificar su trayectoria lineal lo suficiente para seguir por el centro, esto es debido a la fuerza centrífuga generada por la masa del ion en la trayectoria curva. Por otro lado los iones muy ligeros desvían su trayectoria lineal demasiado al ser atraídos por el imán, y colisionan con el tubo del analizador. Al variar la intensidad del campo magnético o el potencial de aceleración de entrada, se puede igualar la fuerza centrífuga con la centrípeta de un ion de determinada relación  $m/z$ , y permitir que llegue al detector. También existen equipos que antes de separar los iones por interacción con el campo magnético eliminan las diferencias en sus energías cinéticas y traslacionales por medio de un enfoque electrostático. Este es llevado a cabo al pasar los iones entre dos láminas metálicas lisas curvadas, a través de las que se aplica un potencial de corriente continua. Estos equipos son llamados de doble enfoque. Estos equipos son costosos y al trabajar con condiciones de alta resolución se disminuye de manera drástica su sensibilidad.



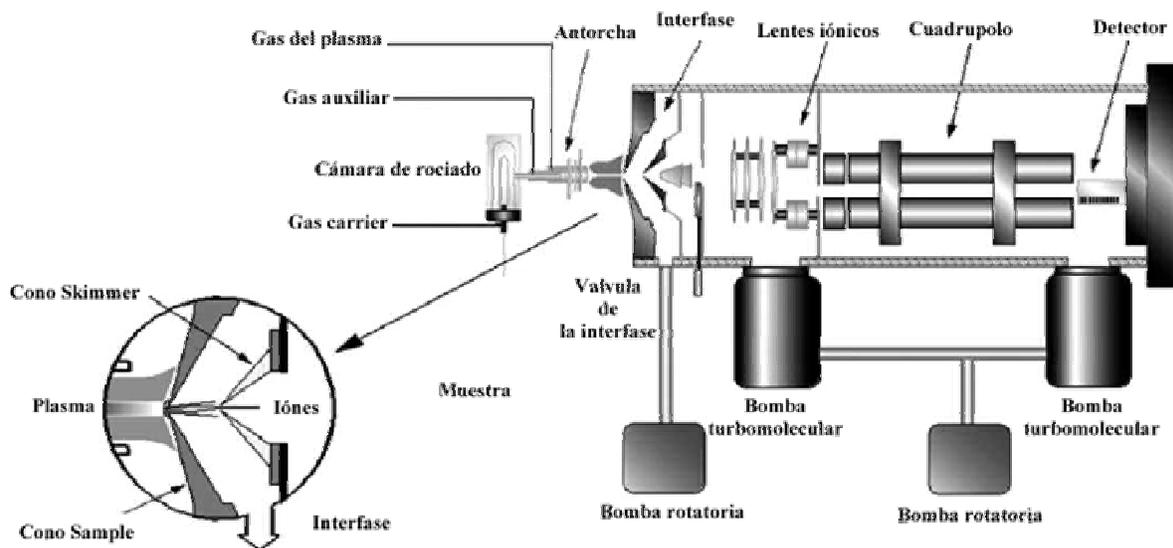
**Figura 11.** Esquema de un analizador de masas de sector magnético de simple enfoque, se indica en la parte superior de la imagen, la entrada de los iones provenientes de la fuente de ionización (química, por impacto electrónico, electrorociado, ablación láser o en plasma), así como la trayectoria de iones de diferente relación  $m/z$ .

Existe también la posibilidad de separar iones por medio de analizadores de masas de tiempo de vuelo, (TOF) en el cual los iones formados son impulsados con la misma energía cinética y después son introducidos a un tubo al vacío. La diferencia en las masas se refleja en la velocidad con que se desplazan en el tubo, por lo que los iones más pesados llegan más tarde al detector, situado al final de un tubo al vacío. Midiendo el tiempo que tardan en llegar los iones es posible calcular su masa hasta con 3 cifras decimales significativas.

Los análisis de especiación química elemental pueden ser llevados a cabo a través de la obtención de iones atómicos a partir de las especies de interés presentes en una muestra. Las fuentes de plasma son una herramienta muy útil para este propósito; por lo que el surgimiento de la espectrometría de masas con fuente de ionización por plasma acoplado por inducción (ICP-MS) se ha convertido en la herramienta más empleada en estudios de especiación química (138).

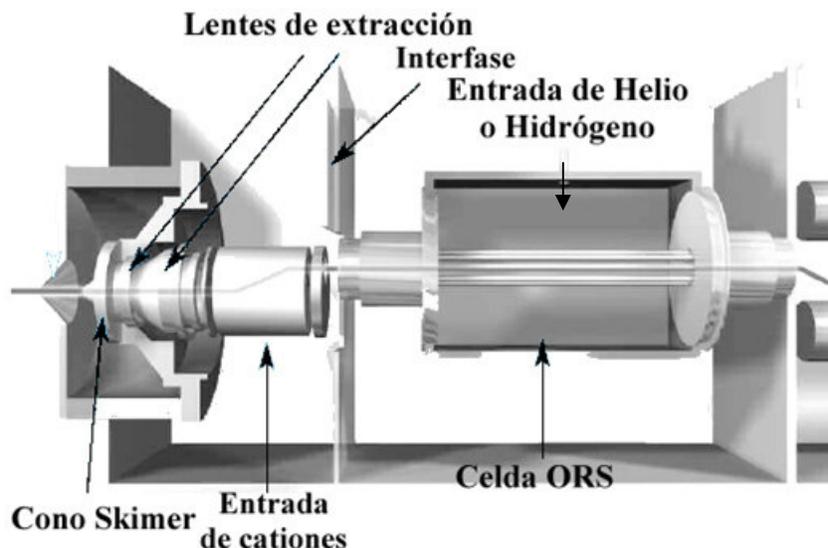
Las capacidades de análisis de la técnica ICP-MS permiten verdadero análisis multielemental e isotópico, límites de cuantificación de orden de nano gramos por litro para la mayoría de los elementos y la posibilidad de análisis continuo, que permiten el acoplamiento sin mayores problemas con técnicas de separación cromatográficas, electroforéticas, así como la introducción directa de vapores o gases.

En la Figura 12 se muestra el esquema de un espectrómetro de masas con plasma acoplado por inducción como fuente de ionización y filtro de masas tipo cuadrupolo, se puede observar que la interfase debe permitir la entrada de iones desde condiciones de presión atmosférica, hacia el alto vacío requerido para la conducción, separación y detección de los iones formados. Esto se logra a través de 2 conos metálicos con aberturas en la punta, llamados “sampling cone” y “skimmer cone”, la abertura del primero es típicamente de 1 mm de diámetro, mientras que en el segundo es de 0.4 mm. Los iones y moléculas provenientes del plasma que atraviesan los conos, entran con una temperatura muy alta, y al enfriarse se contraen ayudando a sostener el vacío. Una vez dentro del espectrómetro de masas los iones son conducidos, filtrados y detectados.



**Figura 12.** Espectrómetro de masas con plasma acoplado por inducción como fuente de ionización con filtro de masas tipo cuadrupolo. Se aprecia un acercamiento a la interfase existente entre las condiciones de presión atmosférica y las condiciones de vacío al interior del instrumento.

Como ya se ha mencionado los analizadores de masas tipo cuadrupolo son lo más empleados, y para eliminar las interferencias causadas por los iones poliatómicos, el modelo 7500ce de Agilent Technologies con el que se realizó este trabajo, cuenta con un sistema de eliminación de interferentes, llamado celda con octápulo de colisiones/reacciones, (ORC) ilustrado en la Figura 13. En este dispositivo, un octápulo concentra el haz de iones y de manera perpendicular se hace pasar un flujo de gas; típicamente helio para colisiones o hidrógeno para reacciones. En la modalidad de colisión, los iones poliatómicos de mayor tamaño sufren colisiones con mayor frecuencia que los iones atómicos más pequeños, perdiendo de esta manera parte de su energía cinética. Al aplicar una barrera de potencial a la salida de la celda, los iones con menor energía cinética son eliminados. Esto permite la eliminación de los iones poliatómicos. En el modo de reacción los iones poliatómicos son disociados, o son modificados en su valor  $m/z$  por adición de un átomo de hidrógeno, al colisionar con este gas en la celda.



**Figura 13.** Diagrama de la celda de colisiones/reacciones del ICP-MS Agilent 7500ce.

#### **I.8.4. Técnicas híbridas o acopladas**

Las metodologías analíticas mencionadas hasta ahora son técnicas de análisis elemental y por lo tanto proveen solamente de información acerca de la variedad y cantidad de elementos en la muestra. Sin embargo, no permiten identificar la estructura de compuestos presentes en la muestra. Es por esto que el procedimiento de especiación requiere de una etapa de separación de especies previa a la detección y cuantificación. En los estudios de especiación química, la combinación de las etapas de separación y detección en línea recibe el nombre de técnicas híbridas o acopladas (coupled o hyphenated). Con este diseño se suman las ventajas de la alta selectividad de las técnicas cromatográficas o electroforéticas, con la excelente sensibilidad y poder de detección de la espectrometría atómica (3, 139).

Dentro de las técnicas de separación más poderosas se encuentran la cromatografía, ya sea de gases (GC) o de líquidos (HPLC). Estas técnicas se definen como métodos físicos de separación, en los cuales los solutos a ser separados se distribuyen entre dos fases: fase estacionaria, que permanece inmóvil; y fase móvil, la cual se mueve en una dirección definida.

Estas técnicas proporcionan una gama muy completa de posibilidades de separación, basadas en diferentes principios fisicoquímicos.

A continuación se describen de manera resumida los tipos de cromatografía de líquidos, ya que esta fue una de las técnicas utilizadas en el desarrollo del proyecto.

*Fase estacionaria.*- Es el medio físico por el cual se hace pasar la muestra, y que interactúa con la misma, reteniéndola o dejándola pasar libremente, de acuerdo a diferentes principios fisicoquímicos explicados a continuación. Puede ser un polvo fino, un gel polimérico o una estructura porosa. Se encuentra normalmente contenida en un cilindro hueco, llamado columna cromatográfica, de diámetro interno reducido y de largo entre unos pocos centímetros hasta 30 centímetros. De acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria y las interacciones fisicoquímicas que se llevan a cabo las técnicas de separación por HPLC son:

- *Cromatografía en fase inversa (RP):* La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Así que, los compuestos lipofílicos son retenidos, y el orden de salida de la columna comienza por los más polares y termina por los más apolares. En cuanto a los grupos funcionales, las fases estacionarias comunes en este tipo de cromatografía son octil ó C8 (Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub>) y octadecil C18 (Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-CH<sub>3</sub>). La fase estacionaria RP-HPLC requiere un tamaño pequeño de partícula (3-10 µm) y un empacamiento de columna más compacto y homogéneo para obtener un alto número de platos teóricos.
- *Cromatografía de afinidad:* Las separaciones por cromatografía de afinidad se basan en las interacciones reversibles entre dos moléculas con cierta actividad biológica. La fase estacionaria esta formada por un soporte el cual contiene un ligando que reconoce de manera específica al compuesto de interés. Una vez retenido en la columna, el compuesto puede ser eluido utilizando una disolución amortiguadora de pH que provoque la descomposición del complejo formado, o una disolución que contenga un sustrato y un ligando competitivo.
- *Cromatografía de Intercambio iónico (IE):* Esta técnica se emplea para la separación de mezclas de cationes o aniones, para lo cual se utilizan fases estacionarias que presentan compuestos disociados con cargas puntuales. El proceso de retención depende de las interacciones electrostáticas entre sitios con carga en la fase estacionaria y los iones de la

muestra. Tanto para la separación de cationes como aniones, se desarrollaron intercambiadores fuertes ( $pK_a \approx 2$ ;  $pK_a \approx 12$  respectivamente) y débiles ( $pK_a \approx 5$ ;  $pK_a \approx 9$ ) que son inmovilizados en diferentes tipos de soporte. Las resinas de intercambio catiónico contienen frecuentemente grupos sulfónicos, o grupos carboxílicos. Mientras que para el intercambio de aniones usan aminas primarias o cuaternarias.

- *Cromatografía de Exclusión por tamaño molecular (SEC)*: En esta técnica se lleva a cabo la separación de compuestos de diferentes tamaños moleculares. La fase estacionaria para este tipo de cromatografía está constituida por pequeñas partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros, en los que pueden penetrar las especies contenidas en la muestra. En los poros, las moléculas son atrapadas por un periodo de tiempo que depende del tamaño molecular, a menor tamaño mayor retención; y posteriormente son eliminadas por el flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos y del tamaño de los poros. Las moléculas más grandes que el tamaño medio de los poros de los rellenos no pueden entrar en las cavidades y pasan por la columna sin retención, mientras que las moléculas más pequeñas entran en las cavidades de manera repetida, con lo que se retienen durante más tiempo. Es importante mencionar que en ésta técnica de separación la fase móvil debe ser la misma durante toda la separación para asegurar que el único factor que afecte los tiempos de retención de los compuestos sea el tamaño molecular. También se debe mencionar que el tipo de columna determinará los rangos de tamaños moleculares relacionados con masas moleculares, que pueden ser separados. La calibración de las masas se debe hacer con estándares de masa conocida, y la función de calibración es logarítmica con respecto a la masa molecular de los compuestos.

*Fase móvil.*- Es el líquido que fluye por el interior de la columna cromatográfica a un caudal controlado. Puede llevarse a cabo una partición de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil, con lo que el proceso de separación se considera una extracción múltiple.

*Sistema de introducción de muestra.*- En las técnicas e HPLC la muestra a analizar debe ser líquida y se introduce al sistema cromatográfico con ayuda de un inyector que controla el volumen introducido al sistema de manera muy precisa.

*Bomba.*- El paso de la fase móvil por el espacio reducido que hay libre en el interior de las columnas cromatográficas, genera presiones altas, por lo que el sistema de bombeo de la fase móvil debe ser capaz de mantener un flujo constante contra presiones de hasta 400 bar o más.

*Detector.*- Una vez separados los compuestos de interés pueden ser detectados al salir de la columna cromatográfica por detectores en flujo no destructivos como los detectores UV-Vis, de arreglo de diodos o fluorescencia. Luego el caudal es dirigido hacia uno de los detectores específicos antes mencionados, para llevar a cabo los estudios de especiación química.

La importancia de las técnicas cromatográficas en estudios de especiación química, radica en la detección elemental específica que se obtiene al conectar el flujo de salida de la columna cromatográfica, con el sistema de introducción de muestra de técnicas de detección específicas como ICP-MS (138, 140-146).

Las separaciones llevadas a cabo por HPLC, en cualquiera de sus modalidades pueden ser acopladas a un ICP-MS como detector específico, siempre que cumplan los siguientes requisitos.

- El flujo de salida de la columna cromatográfica debe ser compatible con el flujo de operación del nebulizador utilizado.
- La fase móvil debe presentar bajo contenido de sólidos disueltos y deben evitarse las altas concentraciones de ácidos o bases que puedan dañar la antorcha.
- Se debe evitar el uso de gradientes en las separaciones cromatográficas, para evitar que el plasma se apague por la dificultad de ajustar los parámetros del plasma ante el cambio de las propiedades químicas de la muestra. Esto asegura que las condiciones de ionización en el plasma sean las mismas durante la separación.
- Se debe evitar el contenido alto de solventes orgánicos en la fase móvil, y cuando se empleen modificadores orgánicos se procurará adicionar oxígeno al plasma para quemar completamente los solventes.
- Se debe asegurar la retención de precipitados o partículas que puedan tapan el nebulizador, esto se puede lograr con conexiones de bajo diámetro entre la columna y el nebulizador; esto al mismo tiempo que impide el paso de partículas, evita la difusión de los compuestos, lo que ayuda a obtener señales cromatográficas angostas y de mayor altura.

El uso de técnicas acopladas facilita los estudios de especiación química, sin embargo es indispensable asegurar que el proceso de separación no altere las formas químicas presentes en la muestra. Para esto es necesario tener conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las especies a analizar.

En el caso particular de la especiación de metales asociados a las PCs, es importante mencionar que a valores de pH ácidos los complejos son inestables. Mientras que a pH neutro los complejos formados son relativamente estables y pueden ser separados en columnas tanto de fase inversa como de exclusión por tamaño molecular, con fases móviles neutras.

En el caso de los complejos formados entre las sustancias húmicas del suelo y algunos iones metálicos, existen metodologías reportadas que aseguran la estabilidad de las asociaciones presentes de manera natural (147-149). Los cuales se basan en extracción alcalina de los complejos y la separación isocrática en columnas SEC.

El uso de estas técnicas permitió llevar a cabo experimentos diseñados para cumplir con los objetivos planteados para este trabajo.

### **I.9. Revisión de las metodologías analíticas utilizadas en el análisis de fitoquelatinas.**

En todo trabajo de investigación es necesario situarse en el contexto de los avances que en la materia han sido reportados, y en el caso del papel que juegan las PCs como mecanismo defensivo contra metales pesados, existen varios trabajos clave que han permitido el avance en los conocimientos del tema. A continuación se resume, en la Tabla 4 algunos de los trabajos realizados describiendo las técnicas analíticas empleadas, así como el tipo de muestras utilizadas.

**Tabla 4.** Resumen de los procedimientos analíticos empleados en los estudios sobre caracterización de fitoquelatinas y sus complejos con algunos elementos.

<b>Material estudiado</b>	<b>Procedimiento analítico</b>	<b>comentarios</b>	<b>Ref.</b>
Compuestos sintéticos: Cd-( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>3</sub> Gly Cd-( $\alpha$ Glu-Cys) <sub>3</sub> Gly Extractos de maíz	Espectrometría de absorción de rayos X		(150)
Compuestos sintéticos: Ag-( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>2</sub> Gly Ag-( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>3</sub> Gly Ag-( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>4</sub> Gly	Espectrofotometría UV/Vis, luminiscencia en 77K, HPLC en fase inversa	Efecto de pH en la capacidad de PCs de acomplejar Ag; a pH 5 Ag/-SH cerca de 1	(151)
Compuestos sintéticos: Pb-( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>2</sub> Gly Pb-( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>3</sub> Gly Pb-( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>4</sub> Gly	Espectrofotometría UV/Vis, espectrometría de dicroísmo circular	Los resultados obtenidos sugirieron mayor capacidad de acomplejación conforme aumenta la cadena peptídica	(110)
Compuestos sintéticos de Cd(II) con péptidos conteniendo cisteína	Métodos espectrales	Se concluye que, los complejos de Cd con estructuras peptídicas se forman mediante los grupos funcionales -SH y -COOH	(109)
Extractos de raíces de maíz y estándares sintetizados in vitro por vía enzimática	Electroforesis capilar – ESI-MS y ESI-MS/MS	Se reporta la estructura de los compuestos extraídos del material de planta	(152)
Extractos de rábanos expuestos in vivo a Cd(II) y GSH	HPLC con derivatización post-columna y detección espectrofluorimétrica ESI-MS	Se identificaron dos PCs: ( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>3</sub> Gly y ( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>4</sub> Gly	(76)
Extractos de cultivo celular expuesto a Cd(II)	Nano-ESI-MS/MS, LC(capilar)-ESI-MS-MS	Separación e identificación de los complejos de Cd con ( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>n</sub> Gly, n = 3, 4 y 5	(153)
Extractos de plantas hiper-acumuladoras de As, cultivados en presencia de As(III)	Detección de As por ICP-MS y la estructura elucidada mediante ESI-MS/MS	El complejo As(III)- ( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>3</sub> Gly reportado como mayoritario en los extractos estudiados	(113)

Extractos biológicos	Derivatización con 5-bromometilfluoresceína (5-BMF) Electroforesis Capilar con detección fluorimétrica	Separación y determinación de aminoácidos y péptidos conteniendo Cys (( $\gamma$ Glu-Cys) <sub>2</sub> Gly	(154)
Extractos de plantas expuestas a As(V) y Cd(II)	Derivatización pre-columna con monobromobimano (mBrB); derivación post-columna con reactivo de Ellmans (ácido 5, 5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), DTNB), HPLC con detección espectrofluorimétrica	Más efectiva derivatización con DTNB, drástica disminución de eficiencia con creciente cadena peptídica de PCs	(87)
Extractos de germen de pepino expuesto a Cd(II)	Derivatización pre-columna con mBBr; HPLC con detección espectrofluorimétrica	Análisis cuantitativo	(155)
Mezcla sintética de aminoácidos, péptidos y proteínas conteniendo Cys	Derivatización fluorescente con mBBr y electroforesis SDS-PAGE	Se demostró la versatilidad del método mediante el análisis de compuestos de diferentes pesos moleculares	(156)
Aguas naturales (fortificadas con PCs)	Extracción en fase sólida, derivatización con TPB/mBBr (TPB- tri-n-butilfosfina), HPLC con detección espectrofluorimétrica	Se reportó buena recuperación de los PCs	(157)
Complejos de Zn(II) y Cd(II) con ( $\gamma$ -Glu-Cys) <sub>3</sub> Gly	Polarografía diferencial de pulsos.	Se propuso un modelo de complejación de Cd(II) y Zn(II) con PC3	(158)
Muestras sintéticas de H-( $\gamma$ -Glu-Cys) <sub>2</sub> -Gly-OH	<sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C NMR para caracterización de PC2	Se asociaron señales a la PC2	(159)
Extractos de <i>Brassica juncea</i>	HPLC-ICP-MS and ESI-Q-TOF	Identificación de compuestos con estructura de fitoquelatinas	(160)
Plantas expuestas in vivo a Cd(II)	SEC HPLC	Se propone identificación rápida de fitoquelatinas acomplejadas	(161)

Cabe mencionar que las metodologías analíticas empleadas en los reportes bibliográficos consultados, se enfocan en la detección de los siguientes analitos:

- Fitoquelatinas, de diferente longitud de cadena, así como sus precursores, cisteína y glutatona. Las metodologías se basan en la detección directa de estos compuestos (técnicas de espectrometría de masas) o en la detección de derivados de los mismos, lo que permite incrementar la selectividad y sensibilidad en gran medida. En el caso de la derivatización se utilizó la detección espectrofotométrica (derivatización con reactivo de Ellmans) o fluorimétrica (derivatización con monobromobimano).
- Concentración total de elementos. La determinación de contenidos totales de elementos pesados se ha reportado a través de diferentes técnicas analíticas, como la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica o polarografía diferencial de impulsos; pero principalmente se ha empleado la técnica ICP-MS como herramienta analítica.
- Los complejos formados por metales y PCs. Para el análisis de estos compuestos se ha reportado el uso de técnicas de separación electroforética y cromatográfica, en condiciones de pH neutro, con detectores de espectrometría de masas, así como detectores atómicos específicos.
- Las asociaciones de iones metálicos con componentes de los suelos o medios de cultivo que potencialmente afectan la captación de metales por las plantas. Los compuestos de interés fueron analizados por técnicas acopladas, que involucran separaciones cromatográficas o electroforéticas, acopladas a detectores específicos elementales.

En el desarrollo del trabajo de investigación se exploró el uso de algunas de estas metodologías, se desarrollaron y optimizaron metodologías necesarias para cuantificar diversos analitos. Siguiendo el diseño experimental fue posible cumplir los objetivos planteados para la investigación.

## **I.10. Control de calidad en los procedimientos analíticos.**

La confiabilidad de los resultados analíticos en cualquier medición depende en gran medida de las estrategias de aseguramiento y control de calidad que se implemente en un laboratorio dado. El control de calidad es la manera que se tiene para asegurar la buena precisión y exactitud de cualquier determinación o procedimiento analítico; y puede ser llevado a cabo de varias maneras.

El uso de materiales y reactivos de calidad es un requisito fundamental en cualquier laboratorio, ya sea de investigación o de análisis rutinarios. Y es necesario no solo adquirir los reactivos y materiales de buena calidad sino hacer uso adecuado de ellos. En el caso de los reactivos es de suma importancia el buen almacenamiento en las condiciones recomendadas por el fabricante; también es importante no contaminar los reactivos con material usado, o devolviendo porciones no utilizadas al envase original. El material de laboratorio debe ser usado únicamente para los propósitos que fue diseñado, debe ser lavado adecuadamente después de ser usado. En el caso del material de medición debe ser calibrado en los casos que sea necesario. Esto incluye material de vidrio, micro pipetas y balanzas analíticas.

Con referencia a los instrumentos de laboratorio es de suma importancia que el usuario esté calificado para su uso, que se lleve un control de mantenimiento así como una bitácora de operación; esto es de gran utilidad para detectar cambios en el funcionamiento o en la respuesta del instrumento en las mediciones. En el caso específico del ICP-MS, es de suma importancia llevar un registro de resultados obtenidos del tuning o ajuste de condiciones instrumentales, así como un registro de los parámetros de calibración obtenidos cada vez que se realizan determinaciones. Asegurando de esta manera la trazabilidad de los resultados en muestras reales.

Dentro de los aspectos importantes a tomar en cuenta durante el proceso mismo de las determinaciones analíticas, es importante establecer condiciones de preparación de muestra que no alteren las formas químicas presentes en las muestras para poder llevar a cabo estudios de especiación.

Al llevar a cabo determinación de contenidos totales de elementos es importante contar con materiales de referencia certificados, que sirvan como muestras problema y nos den un parámetro de referencia en cuanto a la exactitud de las determinaciones; es muy recomendable que los materiales usados tengan una matriz química parecida a las muestras a analizar, y que sean tratados de la misma manera que las demás muestras.

La preparación adecuada de blancos, tanto de reactivos como de reacciones es otro requisito indispensable en muchas determinaciones analíticas, se deben preparar con los mismos reactivos y procedimientos que las muestras a analizar.

Los procedimientos para llevar a cabo las calibraciones deben ser en un rango de concentraciones adecuadas, y de ser posible se debe aplicar el método de adición de estándar por lo menos como una herramienta de control. También resulta de gran utilidad el uso de estandarización interna, lo que corrige errores causados por evaporación del disolvente, pérdida parcial de muestra, así como los errores causados por la variación en la repuesta de los instrumento de medición, debidas al tiempo de operación o a variaciones de voltaje de alimentación.

En la técnica ICP-MS es bien conocido el aumento en la línea base a lo largo de un día de trabajo, así como los cambios en el porcentaje de ionización debidos las diferentes matrices de cada muestra; por lo que en esta técnica el uso de uno o más estándares internos es un requisito indispensable para asegurar la calidad de los resultados.

Estas simples medidas ayudan en gran medida a garantizar la valides y la reproducibilidad de las mediciones analíticas realizadas durante cualquier investigación y permiten avanzar en la obtención de conocimientos en cualquier tema de investigación.

## **I.11. Cuenca del Río Lerma**

El Río Lerma es uno de los principales ríos de la zona central de México, abastece de agua para riego a los estados de México, parte de Querétaro, Guanajuato, parte de Michoacán y Jalisco. Lo que lo hace de vital importancia para las actividades agropecuarias llevadas a cabo en esta zona del país.

El Río Lerma es abastecido por varios ríos de menor tamaño y a su paso por las zonas altamente industrializadas en el estado de México, Querétaro y Guanajuato, son vertidas cantidades importante de desechos industriales y municipales, lo que abre la posibilidad de la contaminación de este importe cuerpo de agua por metales pesados.

Como ya fue mencionado en la sección I.2., existen zonas contaminadas por metales pesados en el estado de Guanajuato, las cuales son atravesadas por ríos y arroyos capaces de transportar cantidades considerables de sedimentos, potencialmente contaminados con metales pesados. Uno de estos ríos desemboca en el cauce del río Lerma alimentando su caudal y vertiendo los desechos municipales e industriales de la zona central del estado de Guanajuato.

La calidad del agua superficial en México se evalúa en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, publicada el 6 de enero de 1997 en el Diario Oficial de la Federación. La Norma establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. La norma aplica también a la actividad agrícola ya que la definición de aguas residuales dice textualmente que se refiere a: "las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas". Enfocándose a la parte de metales pesados, en la Tabla 5 se presentan los límites máximos permisibles de elementos incluidos en la NOM. Debido a que el interés de la investigación está centrado en la cuenca del río Lerma en el Estado de Guanajuato, en Tabla 1 se consideran solamente el agua de ríos y los suelos.

**Tabla 5.** Límites máximos permisibles para metales pesados y fósforo total en aguas superficiales, establecidos por NOM-001-ECOL-1996. Los valores corresponden a promedio diario, calculado en base a los resultados de al menos dos muestras compuestas.

Elemento (mg L <sup>-1</sup> )	Ríos			Suelo (uso de riego agrícola)
	Uso de riego agrícola	Uso público urbano	Protección de la vida acuática	
As	0.4	0.2	0.2	0.4
Cd	0.4	0.2	0.2	0.1
Cu	6.0	6.0	6.0	6.0
Cr	1.5	1.0	1.0	1.0
Hg	0.020	0.010	0.010	0.010
Ni	4	4	4	4
Pb	1.0	0.4	0.4	10
Zn	20	20	20	20
P (total)	30	20	20	NA

NA – no aplica

La posibilidad de encontrar metales pesados en el cauce del río Lerma se tomó en cuenta al momento de buscar una zona de estudio que proporcionara muestras de interés; para llevar a cabo estudios de especiación de metales pesados y su asociación con PCs en plantas.

Por otro lado existen pocos reportes acerca del contenido de metales pesados en las aguas del río Lerma (162, 163), las muestras analizadas ha sido reducido en número y en extensión geográfica. Por lo anterior, las determinaciones de metales y metaloides en aguas del río Lerma, así como en lodos y plantas, recolectadas en diferentes puntos del caudal del río Lerma dentro del estado han tenido dos aplicaciones:

- Avanzar en el conocimiento sobre la inducción de PCs en plantas, dependiendo de los niveles de metales pesados y de otros parámetros del medio ambiente, donde crecen estas plantas.
- Complementar los datos existentes con los resultados de un estudio sistemático de los niveles de 18 metales y metaloides, en el río Lerma a su paso por el estado de Guanajuato, y evaluar su posible impacto sobre los niveles de estos elementos en plantas.

Los resultados obtenidos de este análisis son presentados en este trabajo y se han relacionado con el tema central de la investigación, la especiación química de elementos tóxicos.

# **OBJETIVOS**

## **II. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo principal de este trabajo ha sido desarrollar los procedimientos analíticos para su empleo en el análisis de muestras medio ambientales, con el fin de avanzar en el conocimiento sobre los factores que contribuyen en la producción de fitoquelatinas en plantas silvestres.

### **II.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Desarrollar los procedimientos de especiación que permitan caracterizar la asociación de algunos metales pesados (Ag, Cu, Cd y Pb) con la producción de fitoquelatinas en plantas.
2. Seleccionar las zonas geográficas para el estudio, teniendo como criterio la presencia de variables concentraciones de Ag, Cu, Cd y Pb, en compartimentos del medio ambiente.
3. Caracterizar el estatus actual de las concentraciones de metales/metaloides en el cauce del río Lerma a su paso por el estado de Guanajuato.
4. Llevar a cabo el análisis de fitoquelatinas en diferentes tipos de plantas silvestres, con el fin de seleccionar aquellas que presenten la capacidad de inducir la síntesis de fitoquelatinas.
5. Realizar el estudio analítico y estadístico de parámetros que potencialmente contribuyen a la producción de fitoquelatinas en plantas silvestres, con el fin de entender mejor dicho proceso.

# **PARTE EXPERIMENTAL**

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### III.1. Equipo de Laboratorio

- a) Purificación del agua:
  - Milli Q: Labconco Water PRO PS.
  - Destilada: Martes Flex/ Cole Parmer Instrument Co. Mod. 60648, Illinois.
- b) Liofilización de biomasa:
  - Liofilizadora modelo 10-269, Labconco.
- c) Esterilización:
  - Autoclave.
  - Campana de flujo laminar.
- d) Separaciones Cromatográficas:
  - Cromatógrafo de líquidos modelo 1050 de Hewlett Packard con detector fluorimétrico modelo 1056A de Hewlett Packard; y detector espectrofotométrico de onda múltiple, ambos controlados por el paquete de software ChemStation.  
Columna Gemini C18 150 x 4.60 mm, 5 $\mu$ m de Phenomenex.
  - Cromatógrafo de líquidos modelo HP1100, Agilent Technologies detector de arreglo de diodos controlado por el paquete de software ChemStation.
  - Columna cromatográfica fue Superdex<sup>TM</sup> Peptide HR 10/30 (AmershamBiosciences Inc., Piscataway, NJ, USA)
- e) Determinación de elementos totales:
  - Espectrómetro de masas con fuente de ionización en plasma acoplado por inducción (ICP-MS) modelo 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con celda de reacción/colisión, automuestreador. Análisis por Espectrofotometría UV-Vis:
- f) Análisis por Espectrofotometría UV-Vis:
  - Espectrofotómetro UV/Vis Spectronic 3000 con arreglo de diodos (resolución 0.35 nm, Milton Roy) equipado con el paquete de software User Data, v. 2.01 de Milton Roy, Inst. Co.
  - Celda de cuarzo para espectrofotómetro, volumen de 1000  $\mu$ L.

### III.2. Material de laboratorio.

- Mortero con pistilo.
- Bloque del calentamiento para la digestión de las muestras (Multi-Block, Barnstead/Labline).
- Matraces Aforados (10, 25 y 100 mL).
- Frascos IsoLab con tapa rosca (250 y 500mL).
- Vasos de precipitado (10, 50, 100, 500 y 1000 mL).
- Embudos de vidrio.
- Vortex Genie 2.
- Microcentrífuga Denver Instrument.
- Potenciómetro Corning (313 pH/temperatura).
- Micro espátulas.
- Espátulas.
- Material de plástico (Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL, tubos de Eppendorf 1.5 mL)
- Micropipetas Eppendorf (0.5-10  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L y 200-1000  $\mu$ L).
- Balanza analítica.
- Papel filtro Whatman #5
- Botellas de polipropileno con tapa rosca, volumen 500 mL,
- Marcador permanente para etiquetar los frascos,
- 2 hieleras portátiles grandes con bolsas de hielo,
- Guantes de látex,
- Equipo de toma de muestra de aguas con capacidad para 500 mL (longitud de 3 m)
- Botas largas.

### III.3. Estándares, reactivos y disolventes.

#### a) Estándares.

- Estándares de fitoquelatinas: PC-2, PC-3 y PC-4.
- Environmental calibration estándar Part # 5183-4688. Contenido 1 000 ppm de Fe, K, Ca, Na, Mg; y 10 ppm de Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, Th, U de Agilent Technologies.
- Solución de Indio para ICP-MS ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de Agilent Technologies.
- Estándar de Indio, Agilent  $10 \text{ mg L}^{-1}$
- Material certificado NIST 1643d.
- Material de referencia certificado NIST 1572.

#### b) Reactivos y disolventes.

- Glutaciona.
- Cisteína.
- Mioglobina (17.6 kDa), sustancia P (1.35 kDa) y (Gly)<sub>6</sub> (0.36 kDa).
- Extracto de levadura.
- Peptona de gelatina.
- Dextrosa.
- Agar bacteriológico.
- Cloruro de Cadmio.
- Ácido arsenioso.
- Ácido nítrico.
- Cloruro de magnesio..
- Hidroxilamina.
- Peróxido de hidrógeno.
- Acetato de amonio.
- Nitrógeno líquido.
- Pirofosfato de sodio.
- Ácidos húmicos.
- DTPA (ácido dietilen diamino pentaacético).
- TFA (ácido trifluoroacético).

- Borohidruro de sodio.
- HEPPS (Ácido 3-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil] propanosulfónico)
- mBrB (monobromobimano)
- Ácido heptafluorobutírico.
- Metanol.
- Acetonitrilo.
- Ácido metil sulfónico.

#### **III.4. Software**

- Microsoft Office XP.
- GRAMS/ 386 TM, version 3.01A (Galatic Ind. Co., Salem, MA)
- ChemStation para controlar el cromatógrafo de líquidos modelo 1050 (Hewlet Packard) y el Cromatógrafo de líquidos modelo HP1100, Agilent Technologies.
- Software Milton Roy Inst. Co. para adquisición, almacenamiento y tratamiento de datos espectrales.
- Statistica for Windows (StatSoft Inc. 2000, Tulsa, UK).
- ChemStation para controlar el Espectrómetro de masas con fuente de ionización en plasma acoplado por inducción (ICP-MS) Agilent modelo 7500ce.
- *Unscrambler 7.5*, CAMO, Noruega.

#### **III.5. Manuales para la toma de muestras.**

La calidad de los resultados analíticos depende fuertemente del diseño adecuado de cada una de las etapas del procedimiento, incluyendo toma de muestras. En este caso se pueden formular los siguientes requerimientos:

- Representatividad de muestras para todo el sistema estudiado (en nuestro caso el sitio de muestreo).
- Estabilidad de los analitos entre toma de muestra y su análisis.
- Cuidado de posibles contaminaciones, o pérdidas de los analitos.

### III.5.1. Agua superficial

Al planear la toma de muestras de aguas superficiales, es necesario asegurar que las muestras se tomen de los mismos lugares en sucesivas campañas de muestreo. Para ello, se registraron las coordenadas geográficas de cada uno de los sitios, mismos que se ubicaron en cada uno de los muestreos mediante el sistema de posicionamiento global (GPS).

Por otro lado, es necesario elegir adecuados recipientes, fijar el número de sub-muestras por un sitio y el volumen de cada una, establecer el procedimiento de etiquetado y preservación de muestras, de su transporte hasta laboratorio y las condiciones de almacenamiento antes del análisis. El procedimiento empleado en este estudio, se basa en el procedimiento estándar (SOP – Standard Operating Procedure) de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (US EPA) y en la NOM-014-SSA1-1993. En concreto, se utilizó el procedimiento directo, adecuado para aguas superficiales de ríos y lagos. Los detalles de este procedimiento se presentan a continuación:

#### *1. Material*

- 70 botellas de polipropileno con tapa rosca, volumen 500 mL,
- 70 tubos falcon de polipropileno con tapa rosca, volumen 50 mL
- 5 embudos de plástico y papel filtro (Whatman N°5)
- marcador permanente para etiquetar los frascos,
- micropipeta, 200 – 1000  $\mu$ l,
- ácido nítrico 1:10 (v/v),
- 2 hieleras portátiles grandes con bolsas de hielo,
- guantes de látex,
- equipo de toma de muestra (distancia de 3 m)
- agua desionizada,
- botas largas y batas de laboratorio

#### *2. Limpieza del material de plástico (botellas, tubos falcon, embudos)*

- El material se lava primero con agua y jabón, luego con ácido nítrico al 10 % (v/v) y finalmente se enjuaga varias veces con el agua desionizada (18 M $\Omega$  cm<sup>2</sup>). Para secar, las botellas y los tubos

se dejan boca abajo en el papel filtro (tapas por separado) y se cierran. En el caso de re-uso, se eliminan las marcas de etiquetas anteriores.

### *3. Selección del día de muestreo*

- Se procura que toda la ronda de muestreo se realice en un máximo de tres días consecutivos.
- Por lo menos una semana antes de muestreo y en el día de muestreo no puede llover.
- Es importante también evitar los días con vientos fuertes

### *4. Toma de muestras*

- Tienen que participar por lo menos tres personas.
- La ronda comienza desde la salida del río Lerma de Estado de Guanajuato. Luego, el equipo se traslada contra el caudal del río, acercando se al río en 22 sitios definidos y terminando en la entrada del río a Estado de Guanajuato.
- Hay que llevar: botellas, hieleras con hielo, agua desionizada, guantes, marcados, ácido nítrico, pipeta, herramienta para la botella con alcance de 5 m, botas y batas.
- Al llegar a sitio de muestreo, dos personas (botas, batas, guantes) se colocan a la orilla del río y, con ayuda de la herramienta, toman tres muestras de 500 mL cada una (tercera persona recibe los frascos). Las muestras se toman directamente debajo de la superficie del río y aproximadamente en el centro del caudal (en media distancia entre las orillas). Es importante meter la botella boca abajo algunos 15 cm, voltear suavemente para que la entrada de botella quede contra la corriente del río (si el caudal existe) y operar de tal manera que los sedimentos no entren a la botella.
- Las botellas se limpian y secan por fuera, a cada una se agregan 1000  $\mu$ L del ácido nítrico diluido (1:10) y se cierra con tapa rosca.
- Se pone la etiqueta, indicando la fecha y hora, el sitio de muestreo y distinguiendo tres repeticiones.
- En una computadora portátil, para cada sitio se registran datos adicionales sobre la abundancia de flujo, presencia o no de la corriente, aproximada anchura y profundidad del río, turbidez de agua, abundancia de vegetación en las orillas, etc.
- Las botellas se colocan en hielera, cuidando que queden en posición vertical entre bolsas de hielo, la temperatura adecuada es de 4 °C a 10 °C, evitando que las muestras se congelen.

### *5. Tratamiento en el laboratorio*

- Al llegar a laboratorio, las muestras se colocan en la nevera a 4 °C
- Al día siguiente las muestras se filtran (filtro Whatman N° 5) y se conservan 50 mL (tubos falcon, tapa rosca, etiquetas indicando día, sitio de muestreo y repetición).
- En transcurso de una semana se realiza la determinación de los elementos por ICP-MS.

### **III.5.2. Suelos y lodos**

#### *1. Material:*

-El material se prepara y lava de la misma manera que como para aguas superficiales y las muestras se toman el mismo día en el que se llevó el muestreo de agua. En lugar de botellas de plástico, las muestras sólidas se colectan en los tubos Falcon de 50 mL.

#### *2. Toma de muestras:*

- Puede participar una persona.
- Hay que llevar: frascos Falcon (50 mL), agua desionizada, cucharas de plástico y marcador permanente.
- Para evitar la variabilidad de los parámetros de suelos/lodos, se establece el área de los sitios de muestreo de 9 m<sup>2</sup>. Como máximo. Se mide el pH de suelo (0-30 cm). Cabe mencionar que estos datos no se reportan, ya que la variabilidad de valores pH fue muy baja. En concreto, tanto para los valores medidos en un sitio, como aquellos medidos en varios sitios la desviación estándar de mediciones múltiples (n =5) no sobrepasó 2 % y los valores observados fueron en un estrecho rango de pH 7.7 a pH 8.0.
- En cada uno de los sitios (9 m<sup>2</sup>), se toman seis sub-muestras de suelos (0-30cm) de aproximadamente 250 g cada una. En el caso de lodos, estos se toman a la orilla del río (tres repeticiones por sitio) y del fondo de río (tres repeticiones por sitio)
- Los recipientes se secan por fuera y se cierra con tapa rosca.
- Se pone la etiqueta, indicando la fecha y hora, el sitio de muestreo y distinguiendo tres repeticiones.
- Los recipientes se trasladan al laboratorio y se conservan en la nevera de 4 °C a 10 °C.

### *3. Tratamiento en el laboratorio:*

- Las muestras recolectadas en el mismo sitio de muestreo se secan (80 °C, 48 h o hasta la masa constante), tamizan y mezclan para obtener un “pool” representativo para un sitio y una campaña de muestreo.

## **III.5.3. Plantas**

### *1. Material:*

-El material se prepara y lava de la misma manera que como para aguas superficiales y las muestras se toman el mismo día en el que se llevó el muestreo de agua. En lugar de botellas de plástico, las muestras sólidas se colectan en los tubos Falcon de 50 mL.

### *2. Toma de muestras:*

- Puede participar una persona.
- Hay que llevar: frascos Falcon (50 mL), agua desionizada, cucharas de plástico y marcador permanente.
- Para evitar la variabilidad de los niveles de elementos en plantas, debido a variabilidad de estos en suelo, se establece el área de los sitios de muestreo de 9 m<sup>2</sup> como máximo.
- Las muestras de plantas se toman el mismo día de muestreo, junto con las muestras de suelo. En cada uno de los sitios, se toman tres muestras de raíces y tres muestras de hojas provenientes tratando de escoger las plantas del mismo tamaño y color de hojas.
- Las muestras individuales se colocan en los recipientes, mismos que se limpian por fuera y se cierran con tapa rosca.
- Se pone la etiqueta, indicando la fecha y hora, el sitio de muestreo y distinguiendo tres repeticiones.
- Los recipientes se trasladan al laboratorio y se conservan en la nevera de 4 °C a 10 °C.

### *3. Tratamiento en el laboratorio:*

- para cada tipo de planta las raíces y las hojas recolectadas en un día y en un sitio de muestreo se mezclan para obtener un “pool” representativo para el sitio. Para ello, las hojas y las raíces se lavan por separado con agua desionizada. Para eliminar los residuos de suelo pegados a las raíces,

estos se lavan varias veces con agua y se colocan en el baño de ultrasonido (10 min). Cada material (raíces u hojas) se corta en pequeños pedazos, y se liofiliza. Finalmente, se lleva a cabo la homogeneización mediante trituración en el nitrógeno líquido.

#### **III.5.4. Levaduras**

Para llevar a cabo el desarrollo de la metodología para la determinación de PCs y compuestos relacionados (tioles de baja masa molecular), se trabajó con 5 cepas de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Candida maltosa*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluveromyces marxianus*). Los preinóculos fueron crecidos primero en cajas de petri, se usó el medio de crecimiento YPD que contiene: 0.3 % extracto de levadura, 1 % peptona de gelatina, 2 % dextrosa y 2% de agar bacteriológico. El crecimiento se dio a 30 °C por 5 días.

Una vez observado el crecimiento en placas se hicieron los cultivos en medio líquido YPD sin la adición del agar bacteriológico. Luego de 3 ciclos de crecimiento y resiembra en medio de crecimiento líquido, se adicionaron por separado 5 mg L<sup>-1</sup> de cadmio (CdCl<sub>2</sub>), 5 mg L<sup>-1</sup> de arsénico (H<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub>) y se crecieron cepas control. Luego de 24 horas de crecimiento con exposición a los elementos se filtró la biomasa, se enjuagó 2 veces con agua desionizada y se liofilizó.

## **III.6. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS**

### **III.6.1. Determinación de Ag, Cd, Cu y Pb en suelos y raíces de plantas por ETA-AAS.**

En la primera parte del trabajo las determinaciones de plata, cobre, cadmio y plomo se llevaron a cabo por medio de espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica. Las muestras analizadas fueron raíces y muestras de suelo.

Se analizaron tres sub-muestras de cada material. Para ello, se tomaron 0.5 g de raíz liofilizada, o 0.5 g de suelo (seco y molido) y se llevó el ataque por vía húmeda con 2 mL de ácido nítrico concentrado. Los tubos con muestras fueron calentados en un bloque de calentamiento a 65 °C por 60 minutos y a 120 °C por 60 minutos. Una vez enfriado a temperatura ambiente, a cada tubo se le añadió 0.2 mL de peróxido de hidrógeno y las muestras se dejaron por 30 minutos para completar la digestión. Se llevó el volumen a 25 mL y, después de una dilución apropiada, se realizó la determinación de Ag, Cd, Cu y Pb por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica (ETA-AAS). Se utilizó el espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer con horno de grafito modelo HGA600 y un automuestreador AS 60. Las lámparas de cátodo hueco fueron marca Lumina™. Se empleó plataforma de L'vov y corrección de fondo con lámpara de deuterio. El modificador de matriz utilizado fue nitrato de magnesio (5µg de Mg preparado a partir de una solución patrón de 10000 µg mg/mL, Perkin-Elmer). Las soluciones patrón de plata, cadmio, cobre y plomo de 1000 mg L<sup>-1</sup> fueron diluidas para obtener los estándares de calibración más altos (25 µg L<sup>-1</sup> Ag; 2 µg L<sup>-1</sup> Cd; 50 µg L<sup>-1</sup> Cu; 50 µg L<sup>-1</sup> Pb).

### **III.6.2. Determinación de los niveles de concentración total de elementos por ICP-MS.**

Para realizar los análisis de determinación de elementos totales fue necesario distinguir entre 2 grupos de muestras: Aguas superficiales y muestras sólidas (suelos, biomasa liofilizada de levaduras, raíces y hojas). Para las muestras sólidas fue necesario llevar a cabo la mineralización previa al análisis de contenidos totales por ICP-MS.

*Mineralización de muestras sólidas (levaduras, material de plantas y suelos).* Se mineralizaron las muestras por ataque ácido vía húmeda, con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno. El procedimiento se basó en el método EPA 3050b con algunas modificaciones.

Se pesó en la balanza analítica alrededor de 0.5 g de suelo seco, raíz u hoja liofilizados, la muestra fue colocada en tubos de vidrio para digestión, se agregaron 2 mL de ácido nítrico concentrado y se calentó por 60 minutos a 65°C, luego se incremento la temperatura hasta 120 °C y se mantuvo por 60 minutos. Se dejó enfriar y se agregaron 0.5 mL de peróxido de hidrógeno a cada tubo, y se dejó reaccionar por 30 minutos. Se filtraron las muestras con papel whatman #5 y se transfirió de manera cuantitativa a matraces volumétricos de 25 mL donde se ajustó el volumen final. Para cada mineralización realizada se corrieron blancos de ácido en paralelo.

Para el análisis de aguas el procedimiento analítico propuesto se basa en el método EPA 6020, aplicable para el análisis por ICP-MS de concentraciones bajas ( $\mu\text{g L}^{-1}$  e inferiores) de un alto número de elementos (hasta 60) en muestras de agua. Para obtener información cuantitativa de la fracción disuelta, no es necesario digerir las muestras de aguas naturales, solo es necesario llevar a cabo una filtración para evitar introducir partículas que pudieran obstruir el sistema de introducción de muestra del instrumento. El método recomienda el uso de un estándar interno ( $^6\text{Li}$ ,  $^{45}\text{Sc}$ ,  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{103}\text{Rh}$ ,  $^{115}\text{In}$ ,  $^{158}\text{Tb}$ ,  $^{165}\text{Ho}$  y/o  $^{209}\text{Bi}$ ) así como controlar y, en su caso eliminar, las interferencias isobáricas. La cuantificación se basa en la calibración externa utilizando soluciones estándar multielementales. Todos los reactivos deberían ser de alto grado de pureza y es necesario corregir los resultados con blancos (corridos en paralelo). Se requiere también que las condiciones de tuning permitan minimizar la formación de óxidos y de especies de doble carga, asegurando buena sensibilidad y precisión para cada uno de los elementos. Para control de calidad, se recomienda el análisis de una muestra control, o un material de referencias certificado para los elementos en la matriz de agua. Los requisitos del método 6020 que se acaban de presentar fueron considerados en este trabajo, tal como se describe a continuación.

Todas las operaciones de manejo de muestra y su análisis por ICP-MS se realizaron en el laboratorio preparado para el análisis de trazas (aire clase 1000). Se utilizó agua desionizada (18 M $\Omega$  cm, Labconco, USA) y reactivos de grado analítico de pureza. El ácido nítrico para análisis de trazas fue de Fluka (Trace-select).

La determinación de elementos en las muestras de agua se llevó a cabo utilizando el espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con celda de reacción/colisión, automuestreador y controlado mediante el paquete Chemstation.

Se utilizó el nebulizador concéntrico Meinhard y la cámara de rociado Peltier (2 °C). El procedimiento de tuning se realiza diariamente, ajustando los parámetros hasta obtener la respuesta para óxidos y dobles cargas inferior a 0.8 % y 1.4 % respectivamente (los reportes de tuning se imprimen y guardan en una bitácora). Los parámetros de plasma dependen del proceso de tuning, pero en mayoría de los análisis se utilizaron los siguientes:

- Potencia RF 1500 W
- Flujo de gas carrier 0.9 L min<sup>-1</sup>
- Flujo de gas make-up 0.17 L min<sup>-1</sup>
- Flujo de gas plasma 15 L min<sup>-1</sup>
- Para eliminar las interferencias isobáricas, se utiliza la celda de colisión/reacción (ORS) con el Flujo de helio 4.0 mL min<sup>-1</sup>
- En el modo de análisis cuantitativo, se monitorean los isótopos <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>53</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>59</sup>Co, <sup>60</sup>Ni, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>75</sup>As, <sup>82</sup>Se, <sup>95</sup>Mo, <sup>106</sup>Hg, <sup>107</sup>Ag, <sup>109</sup>Tl, <sup>114</sup>Cd, <sup>121</sup>Sb, <sup>137</sup>Ba, <sup>206</sup>Pb, <sup>208</sup>Pb, <sup>232</sup>Th, <sup>238</sup>U
- El tiempo de integración fue de 300 ms por isótopo.

### **III.6.3. Extracción secuencial de metales en muestras de suelo, Método Tessier.**

En las muestras de suelos se llevó a cabo la extracción secuencial de metales pesados de acuerdo al método Tessier (127). Este procedimiento es un esquema operacional que permite fraccionar las formas de los metales, dependiendo de su solubilidad en diferentes soluciones acuosas. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por ICP-MS para determinar el contenido de cada elemento por fracción. El procedimiento fue el siguiente:

- Fracción intercambiable (**F1**).- A 1 g de suelo seco se añadió 8mL de cloruro de magnesio 1 M pH 7 y se agitó por una hora, la mezcla fue centrifugada (1850 g, 10 minutos) y el sobrenadante fue filtrado y aforado a 100 mL con agua desionizada.
- Fracción unida a carbonatos (**F2**).- Al residuo obtenido se trató con 8 mL de acetato de sodio 1 M pH 5, luego de 5 horas de agitación, la mezcla fue centrifugada (1850 g, 10 minutos) y el sobrenadante fue filtrado y aforado a 100 mL con agua desionizada.
- Fracción unida a óxidos de hierro y manganeso (**F3**).- El residuo se extrajo con 20 mL de hidroxilamina (25% v/v en ácido acético), durante 6 horas a 96 °C, el sobrenadante fue filtrado y aforado a 100 mL con agua desionizada.
- Fracción unida a materia orgánica y sulfuros (**F4**).- Al residuo se agregó 3 mL de peróxido de hidrógeno y 5 mL de ácido nítrico y se calentó a 85 °C por 3 horas. Luego de enfriarse se agregó 5 mL de acetato de amonio 3.5 M, en 20 % de ácido nítrico, se llevó el volumen a 20 mL y se agitó por 30 minutos. el sobrenadante fue filtrado y se llevó a 100 mL con agua desionizada.
- Fracción residual (**F5**).- El residuo obtenido fue digerido con 10 mL de ácido nítrico concentrado a 120 °C por 4 horas, luego se agregó 25 mL de amortiguador de acetatos a pH 4.5, se filtró y el volumen se llevó a 100 mL con agua desionizada.

Para cada fracción se corrió en paralelo un blanco. Una vez obtenidas las 5 fracciones de cada muestra de suelo, se determinó el contenido de Ag, Cd, Cu y Pb en cada fracción, por ICP-MS. En paralelo se llevó a cabo la determinación del contenido total de elementos en las muestras de suelo, de acuerdo a lo descrito en la sección V.1.2. Para llevar a cabo el balance de masa.

#### **III.6.4. Especiación de elementos unidos a fitoquelatinas en tejidos de plantas.**

Para evaluar la asociación de los iones metálicos con la fitoquelatinas en extractos de plantas, se llevó a cabo la separación en una columna de exclusión por tamaño molecular. En la columna las PCs se separan de moléculas de mayor tamaño como proteínas y también de formas libres de baja masa molecular. Una vez separados los complejos se detectó en línea de manera específica la presencia de los elementos metálicos asociados a cada fracción de masa molecular. Los complejos formados entre las PCs y los iones metálicos son estables a pH neutro, mientras

que pH más bajos (aproximadamente pH 4) ocurre su disociación. Por esta razón se llevó a cabo la extracción de los complejos con acetato de amonio a pH 7.4.

A 20 - 50 mg de raíz u hoja liofilizada y homogenizada en nitrógeno líquido, se agregó 1 mL de acetato de amonio 50 mM a pH 7.4, se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente, y se colocó en un baño ultrasónico por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a 1850 g. 100 mL del sobrenadante obtenido fue introducido al sistema cromatográfico.

Se empleó un cromatógrafo de líquidos Series 1100 con detector de arreglo de diodos (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La columna cromatográfica fue Superdex<sup>TM</sup> Peptide HR 10/30 (AmershamBiosciences Inc., Piscataway, NJ, USA). La fase móvil fue una disolución de acetato de amonio 50 mM a pH 7.4, con un flujo de 0.7 mL min<sup>-1</sup>.

Se usó como detector específico de elementos un espectrómetro de masas con fuente de ionización en plasma acoplado por inducción en modo cromatográfico, Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón), con un nebulizador convencional Meinhard. Para eliminar las interferencias isobáricas se empleó la celda de colisiones/reacciones. Los isótopos monitoreados fueron <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, <sup>107</sup>Ag, <sup>109</sup>Ag, <sup>111</sup>Cd, <sup>112</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd, <sup>207</sup>Pb, <sup>208</sup>Pb, con un tiempo de integración de 100 ms por isótopo. Para la calibración de la columna SEC se usó una mezcla de estándares de mioglobina (17.6 kDa), sustancia P (1.35 kDa) y (Gly)<sub>6</sub> (0.36 kDa), con  $r^2 = 0.9964$ .

### **III.6.5. Especiación de elementos unidos a las sustancias húmicas presentes en las muestras de suelos.**

Para evaluar la asociación de elementos unidos con las sustancias húmicas en suelos, se llevó a cabo el procedimiento reportado para la separación cromatográfica de extractos alcalinos de suelos, y detección de elementos por ICP-MS (148). Esta metodología se basa en la separación por cromatografía de exclusión por tamaño molecular en la que las fracciones de diferente tamaño molecular que conforman las sustancias húmicas son eluidas con diferentes tiempos de retención.

A un gramo de suelo seco se agregó 10 mL de pirofosfato de sodio 0.1 M, la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego fue centrifugada por 10 minutos a 1850 g. El sobrenadante fue transferido a un matraz volumétrico y se completó el volumen a 50 mL con agua desionizada. El extracto obtenido se diluyó 1:1 con la fase móvil e introducidos al sistema cromatográfico.

Se empleó un cromatógrafo de líquidos Series 1100 con detector de arreglo de diodos (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La columna cromatográfica fue Superdex<sup>TM</sup> Peptide HR 10/30 (AmershamBiosciences Inc., Piscataway, NJ, USA). La fase móvil fue una disolución de pirofosfato de sodio 10 mM a pH 10.3 con un flujo de 0.8 mL min<sup>-1</sup>.

Se usó como detector elemental específico un espectrómetro de masas con fuente de ionización en plasma acoplado por inducción en modo cromatográfico, Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), con un nebulizador convencional Meinhard. La celda de colisiones/reacciones se empleó para eliminar las interferencias isobáricas. Los isótopos monitoreados fueron <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, <sup>107</sup>Ag, <sup>109</sup>Ag, <sup>111</sup>Cd, <sup>112</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd, <sup>207</sup>Pb, <sup>208</sup>Pb, con un tiempo de integración de 100 ms por isótopo. Para la calibración de la columna SEC se usó una mezcla de estándares de mioglobina (17.6 kDa), sustancia P (1.35 kDa) y (Gly)<sup>6</sup> (0.36 kDa), con  $r^2 = 0.9999$ .

### **III.6.6. Determinación de sustancias húmicas en suelos.**

Para cuantificar el contenido de sustancias húmicas en las muestras de suelos se llevó a cabo una extracción en medio alcalino y se cuantificó el contenido de materia orgánica por el método espectrofotométrico a una longitud de onda de 350 nm.

Se pesó un gramo de suelo seco y se agregó 10 mL de hidróxido de sodio 0.1 M. La mezcla se agitó durante 30 minutos y posteriormente se centrifugo por 10 minutos a 1850g. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 350 nm, contra una solución de hidróxido de sodio 0.1 M. La cuantificación se llevó a cabo por el método de calibración externa con estándares de ácido húmico, en un rango de calibración de 1 a 21 mg g<sup>-1</sup> con  $r^2 = 0.9964$ .

### III.6.7. Determinación de tioles de bajo peso molecular en muestras biológicas.

La determinación de tioles de bajo peso molecular en las muestras biológicas estudiadas se basó en la separación por HPLC en fase inversa, con detección fluorimétrica. Con objeto de aumentar la selectividad hacia los compuestos con grupos tiol, se llevó a cabo una derivatización pre-columna con monobromobimano. Para llevar a cabo la detección y cuantificación de este tipo de compuestos en muestras biológicas el procedimiento consta de 4 etapas:

1. *Extracción de compuestos de tipo tiol de bajo peso molecular* (aminoácidos, fitoquelatinas y otros compuestos con grupos -SH). La extracción se llevó a cabo pesando 50 mg de biomasa de tejido de planta o de levaduras, previamente liofilizada y homogenizada en nitrógeno líquido; en tubos eppendorf de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de 6.3 mM DTPA (ácido dietilendiaminopentaacético) en 0.1% de TFA (ácido trifluoroacético), de esta manera se consiguió acomplejar a los iones metálicos presentes y precipitar las proteínas, al mismo tiempo que los complejos fitoquelatinas-metales fueron disociados. Después de 30 minutos, las muestras fueron colocadas en baño de ultrasonido (10 minutos) y centrifugadas (1850 g, 10 min).
2. *Reducción para garantizar la forma -SH de los tioles* Para la reducción de puentes de disulfuro, se tomaron 500  $\mu$ L del sobrenadante y se trataron con 100  $\mu$ L de borohidruro de sodio (15 mM en NaOH 0.1 M).
3. *Reacción de derivatización con monobromobimano*. Se tomó una alícuota (40  $\mu$ L) y se le agregó 100  $\mu$ L de HEPPS (3-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil] ácido propanosulfónico) a pH 8.6 con el fin de mantener pH estable y asegurar la disociación de los grupos tiol contenidos en las fitoquelatinas ( $pK_a \approx 8.1$ ) sin hidrolizar el mBrB. La reacción de derivatización se llevó a cabo al adicionar 20  $\mu$ L de mBrB (1.9 mM en acetonitrilo). Se dejó la mezcla por 30 minutos en la oscuridad y la reacción fue detenida mediante la adición de 40  $\mu$ L de 1 M ácido metil sulfónico.
4. *Separación cromatográfica con detección espectrofluorimétrica*. La solución obtenida (20  $\mu$ L) fue introducida en la columna cromatográfica. El cromatógrafo de líquidos de alta resolución fue modelo 1050 de Hewlett-Packard (Waldrom, Germany) con un detector fluorimétrico 1046A, controlados por el paquete de software ChemStation. La columna analítica fue

GEMINI C18 (150 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) de Phenomenex. La separación cromatográfica se llevó a cabo con tres fases móviles (A – 0.05 % ácido heptafluorobutírico; B – metanol y C – acetonitrilo) con un gradiente de elución (0 – 0.5 min: 82 %A, 15 % B, 3 % C; 0.5 – 4.0 min: 77 % A, 20 % B, 3 % C; 4.0 – 19.0 min: 69 % A, 30 % B, 3 % C; 19.0 – 19.5 min: 82 % A, 15 % B, 3 % C; 19.5 – 20.0 min: 82 % A, 15 % B, 3 % C) y el flujo total de 0.6 mL min<sup>-1</sup>. Para la detección fluorimétrica se emplearon las longitudes de onda de excitación y emisión de 380 nm y 480 nm, respectivamente. La cuantificación fue en base a la medición de área del pico de glutatona. Se llevó a cabo la calibración externa con estándares de glutatona en el rango de concentraciones de 0.1 - 1.8 mg L<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup> = 0.9999. Se aplicó un factor de corrección de la eficiencia de la derivatización según reportes anteriores (87).

**RESULTADOS  
Y  
DISCUSIONES**

#### **IV.-RESULTADOS Y DISCUSIONES**

El enfoque principal del trabajo ha sido en plantas silvestres crecidas en ambientes naturales en presencia de concentraciones moderadas de metales. Los metales seleccionados para el estudio fueron Cu, Pb, Cd y Ag, mismos que fueron seleccionados por su capacidad para inducir la síntesis de fitoquelatinas en plantas, sí como por la presencia de estos elementos en los suelos de la región (151, 164, 165).

Para llevar a cabo el trabajo de investigación, fue necesario escoger plantas capaces de sintetizar PCs. También fue necesaria la obtención de muestras de los suelos adyacentes a las raíces de cada planta recolectada para su análisis, con el fin de estudiar algunos parámetros que puedan tener importancia en la inducción de PCs por las plantas.

Para ello se definieron dos áreas geográficas para el estudio, ambas dentro del territorio del estado de Guanajuato:

*I.-Cauce del río Lerma a su paso por el estado de Guanajuato.* Como se mencionó en la sección I.1.2, se contempló la posibilidad de la existencia de niveles elevados de metales pesados transportados por las aguas del río. Para el estudio se incluyeron 19 metales y metaloides a determinar en 22 sitios de muestreo a lo largo del cauce del río Lerma a su paso por el estado. Se planeó la toma de muestras de aguas, lodos, plantas y suelos para su análisis.

*II.-Ciudad de Guanajuato Capital.* Debido a la posible presencia de metales en los suelos a causa de las actividades mineras llevadas a cabo en la ciudad, esta se estableció como segunda área de estudio. Se decidió analizar una variedad de plantas silvestres, así como los suelos de crecimiento de las mismas. En muestras de raíz y hoja se llevó a cabo el análisis de PCs.

Los parámetros determinados en el estudio pueden revelar por un lado la acumulación de uno o más elementos en tejidos de plantas, y también puede servir para evaluar posibles correlaciones con los niveles de PCs en plantas. Por otro lado se sabe que las sustancias húmicas pueden alterar la movilidad y/o biodisponibilidad de algunos elementos metálicos hacia las plantas (74, 166-173), por lo que se propuso estudiar si existe relación entre los niveles de sustancias húmicas en suelos y la producción de PCs en plantas.

Los esquemas de especiación empleados en este trabajo fueron los siguientes:

- Para evaluar la asociación de los iones metálicos con las PCs en plantas, se obtuvieron los extractos neutros de tejidos y se utilizó la cromatografía de exclusión por tamaño molecular con detección por ICP-MS. Para determinar la distribución de metales entre las diferentes fracciones de suelos se llevó a cabo una extracción secuencial de acuerdo al método Tessier (127) y las fracciones fueron analizadas por ICP-MS para determinar el contenido de elementos presentes en cada una de las fracciones.
- La asociación de las sustancias húmicas del suelo con los iones metálicos fue estudiada con ayuda de la técnica SEC-ICP-MS. Con esta metodología se obtienen los perfiles de elución de cada elemento, y se pueden observar las fracciones libres y las fracciones unidas a la materia orgánica del suelo.

La información obtenida de los resultados experimentales fue analizada con ayuda de herramientas estadísticas. Se empleó el análisis de correlaciones para poder observar correlación entre algunas variables de interés. En particular, el enfoque fue hacia las posibles correlaciones existentes entre el contenido de PCs encontrados en las muestras de plantas con los contenidos de metales en suelos y raíz, así como el posible efecto de las sustancias húmicas de los suelos en la concentración de PCs presentes en las muestras de plantas. Se analizaron así mismo las posibles correlaciones entre las fracciones de suelo extraídas por el método Tessier, y los contenidos de PCs. Finalmente, la información obtenida en el análisis de las PCs por HPLC-FLD y en el análisis de PC-M por SEC-ICP-MS permitió sugerir cuales de los metales estudiados son importantes en el proceso de síntesis de las PCs, y cuales pueden ser acomplejados por las PCs ya existentes.

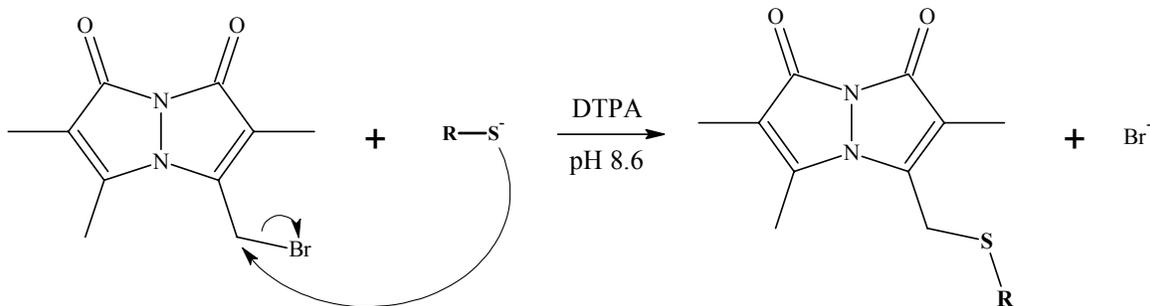
Resumiendo, en el desarrollo del trabajo se buscó la respuesta a las siguientes preguntas:

- ¿Cuales plantas silvestres de las recolectadas en el Estado de Guanajuato son capaces de sintetizar PCs?
- ¿Cuales son los parámetros medioambientales que contribuyen en la captación de elementos por las plantas?
- ¿Cuales son los metales que inducen las PCs en las plantas, y si se puede distinguir entre estos metales y aquellos que se unen a las PCs existentes en las plantas?

#### **IV.1. Desarrollo del procedimiento analítico para la determinación de fitoquelatinas en muestras biológicas: aplicación a levaduras.**

La primera etapa para el desarrollo de la investigación consistió en obtener organismos modelo en los cuales se pudiera llevar a cabo la inducción de fitoquelatinas para desarrollar las metodologías analíticas necesarias en la determinación tanto de las fitoquelatinas como de los factores que intervienen en su síntesis. Con base en reportes anteriores (174, 175) se escogieron las levaduras como organismos modelo, para esto se trabajó con cinco cepas de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Candida maltosa*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluveromyces marxianus*). Las referencias bibliográficas indican la posibilidad de biosíntesis de fitoquelatinas en este tipo de organismos en respuesta a diferentes elementos, entre ellos el cadmio y el arsénico (174-177). La obtención de los cultivos y su preparación para el análisis de PCs se describen en la parte experimental (sección III.5.2).

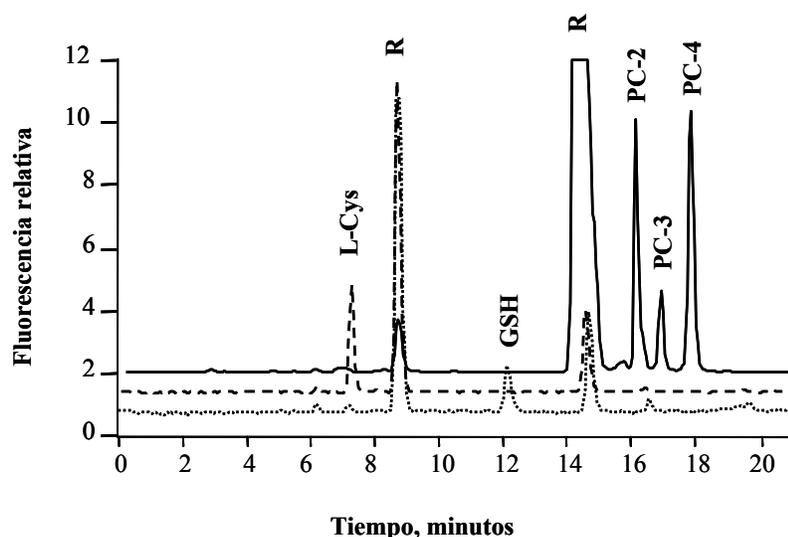
En cuanto al análisis de las PCs, de las metodologías revisadas se seleccionó la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección fluorimétrica. En esta técnica se puede llevar a cabo la derivatización precolumna, con el fin de mejorar el proceso de separación y aumentar la sensibilidad en la etapa de detección. Se optó por emplear el reactivo fluorescente monobromobimano, que reacciona de manera específica con los grupos tiol libres, y tanto el reactivo como los compuestos derivatizados presentan fluorescencia. La reacción de derivatización se muestra en la Figura 14. Se puede observar que la reacción es una sustitución nucleofílica bimolecular, por lo cual el grupo tiol debe estar en su forma nucleofílica (R-S<sup>-</sup>). El primer paso para conseguir esto es reducir los puentes de disulfuro que pudieran estar presentes entre los tioles a derivatizar, esto se logra al agregar borohidruro de sodio en medio ácido que genera un ambiente reductor. Para llevar a cabo la reacción de derivatización es necesario entonces asegurar el pH más alcalino que el pKa del grupo tiol, en el caso de la cisteína el pKa es de alrededor de 8.1, sin embargo a pH mayores de 9 se da la hidrólisis del monobromobimano, por lo que el pH de reacción se fijó en 8.6. Cabe también hacer notar que el reactivo derivatizante es fotosensible y presenta fluorescencia nativa por lo que es muy importante llevar a cabo la reacción en ausencia de luz y asegurar la buena separación cromatográfica de los derivados, del reactivo sin reaccionar y de los productos de degradación del monobromobimano.



**Figura 14.** Esquema de la reacción de monobromobimano con el grupo tiol para formar un compuesto fluorescente.

Partiendo de las condiciones reportadas (Tabla 4) se examinaron diferentes condiciones de elución, variando la composición de las fases móviles, el flujo y las condiciones de gradiente. Como criterio de selección se buscó un tiempo de separación relativamente corto, sin sacrificar la resolución de los solutos. Para definir las condiciones de la detección fluorimétrica, se obtuvieron los espectros de excitación y de emisión de derivados de glutatona, y se determinó el valor más alto de la relación señal/ruido para longitudes de onda de excitación de 380 nm y de emisión de 480 nm. Las condiciones finales se describen en la parte experimental (sección III.6.7.).

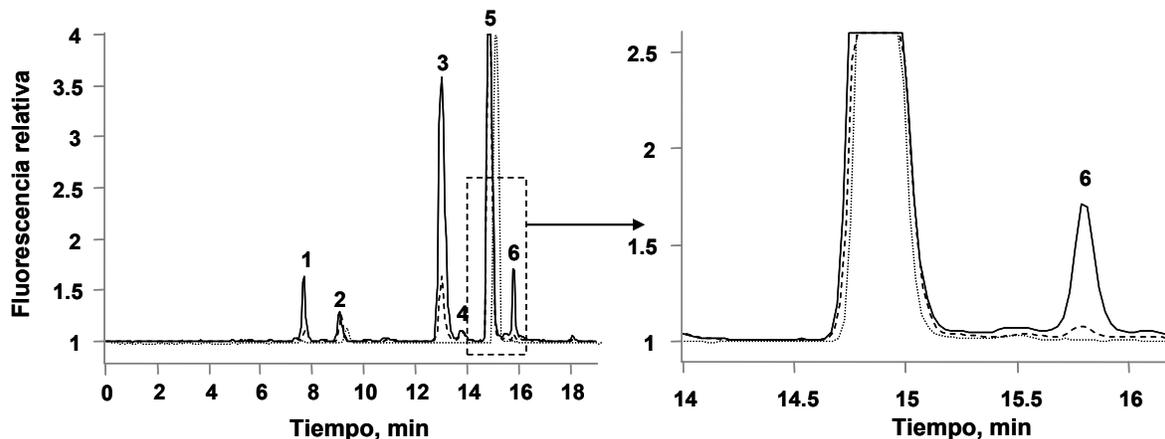
Cabe mencionar que la modificación de las condiciones reportadas (87) contribuyó a acortar el tiempo de análisis de 70 a 20 minutos sin perder la resolución de los compuestos de interés. Debido a la cantidad muy pequeña de los estándares de PCs (PC-2, PC-3 y PC-4), la cuantificación fue en base a la medición de área del pico del derivado de glutatona. Se llevó a cabo la calibración externa con estándares de glutatona en el rango de concentraciones de 0.1 - 1.8  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $R^2 = 0.9999$ . Se aplicó un factor de corrección de la eficiencia de la derivatización según reportes anteriores (87). En la Figura 15 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de los estándares de PC-2, PC-3 y PC-4, así como de cisteína y glutatona, con un tiempo de análisis de 20 minuto.



**Figura 15.-** Cromatogramas de estándares de los tioles derivatizados con mBrB, obtenidos utilizando la cromatografía en fase inversa con detección fluorimétrica. Los compuestos detectados fueron L-Cys, Cisteína; GSH, Glutaciona; PC-2, PC-3 y PC-4; R corresponde a las señales del mBrB sin reaccionar y degradado.

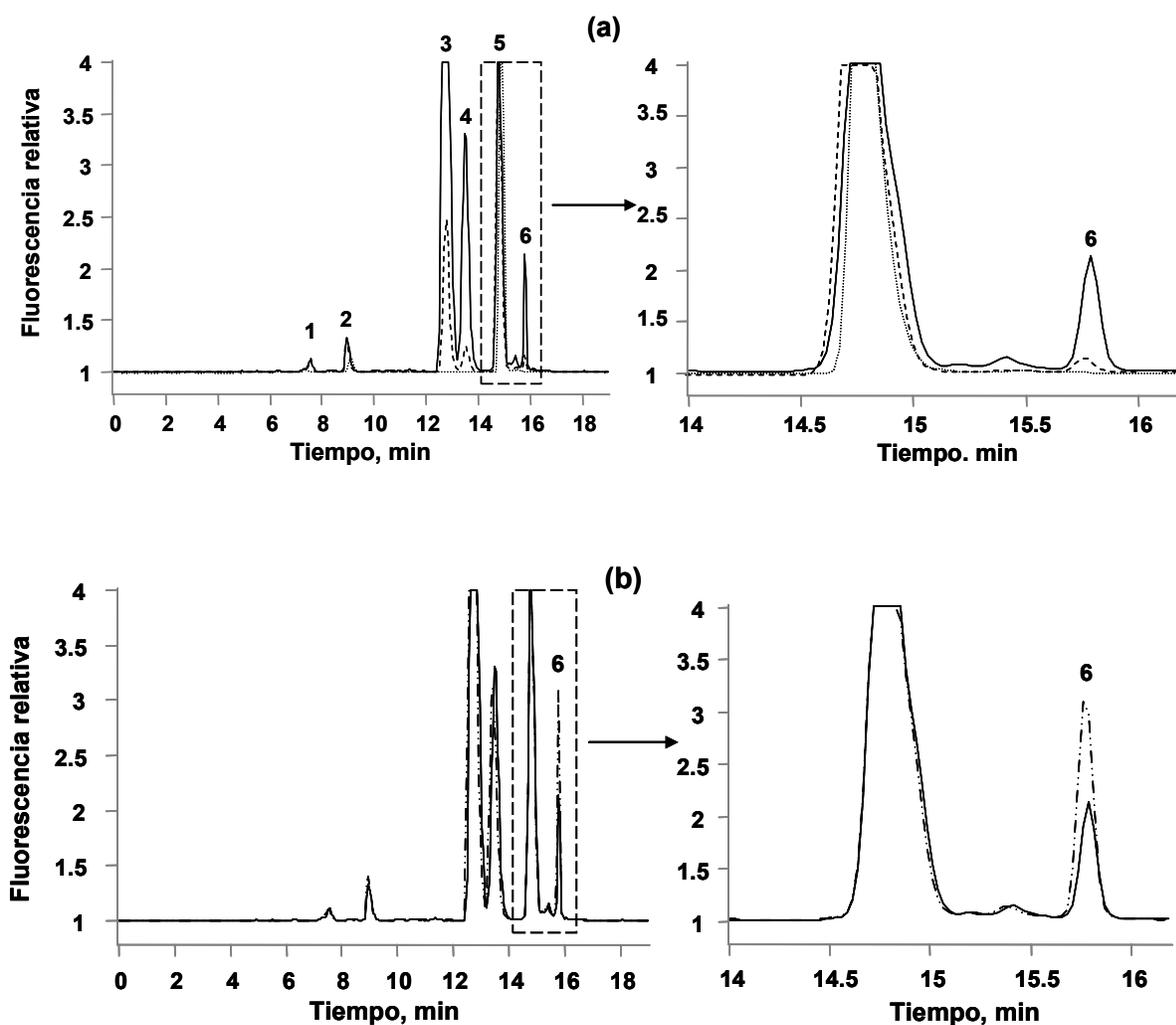
#### IV.1.1 Resultados obtenidos en el análisis de levaduras.

En las Figuras 16 y 17, se presentan cromatogramas obtenidos en el análisis de extractos de *Y. lipolítica* y de *K. marxianus*, controles y expuestos al ion cadmio. En estos cromatogramas se observan una serie de picos, la asignación de los cuales se obtuvo mediante comparación de los tiempos de retención con los estándares disponibles ( $\gamma$ -glutamilcisteína, glutaciona, fitoquelatinas PC-1, PC-2, PC-3 y PC-4) y mediante el método de adición de estándar. El pico marcado con el número 1 corresponde a elución de cisteína, el pico 2 es N-acetil cisteína, el pico 3 fue glutaciona, el pico 4  $\gamma$ -glutamilcisteína, el pico 5 se adscribió al producto de descomposición de monobromobimano (87). y el pico 6 fue identificado como PC-2. Es importante mencionar que, de los cuatro estándares de fitoquelatinas utilizadas en la asignación de los picos (PC-1, PC-2, PC-3, PC-4), solamente se identificó la forma PC-2, cuya presencia fue confirmada mediante el método de adición de estándar (Figura. 17b).



**Figura 16.** Cromatogramas típicos de extractos de *Y. lipolytica*: (.....) blanco de reactivos; (---) cepa control; (—) cepa expuesta a 5 mg L<sup>-1</sup> de Cd (II) en el medio de crecimiento. Los compuestos identificados fueron: (1) cisteína; 2 – N-acetil cisteína; 3 – glutatona; 4 -  $\gamma$ -glutamilcisteína; 5 – producto de descomposición de reactivo; 6 – PC-2.

Es interesante que en los extractos de células de cultivos controles se detectaran bajos niveles de PC-2, lo que sugiere la presencia de iones metálicos inductores en reactivos y soluciones utilizadas para el crecimiento. Por otro lado, al comparar los cromatogramas de cultivos controles con cultivos expuestos al cadmio, se observa claramente mayor concentración de PC-2 en los últimos. Estos resultados sugieren que el ion cadmio contribuye en la inducción de PC-2 en diferentes cepas de levaduras. Los resultados cuantitativos obtenidos en 5 cepas del estudio se presentan en la Tabla 6. Es de notar que las cepas estudiadas presentaron diferente habilidad de inducir las fitoquelatinas: la mayor inducción de PCs se observó en *S. cerevisiae*. y *K. marxianus*, mientras que el incremento de la concentración de PC-2 en *C. maltosa* fue considerablemente menor.



**Figura 17.** Cromatogramas típicos de extractos de *K.marxianus*:

(a) (.....) blanco de reactivos; (---) cepa control; (—) cepa expuesta a 5 mg L<sup>-1</sup> de Cd(II) en el medio de crecimiento;

(b) (—) cepa expuesta a 5 mg L<sup>-1</sup> de Cd(II) en el medio de crecimiento; (---) adición de estándar (PC-2) al extracto de cepa expuesta a Cd(II).

Los compuestos identificados fueron: (1) cisteína; 2 - N-acetil cisteína; 3 - glutatona; 4 -  $\gamma$ -glutamilcisteína; 5 - producto de descomposición de reactivo; 6 - PC-2.

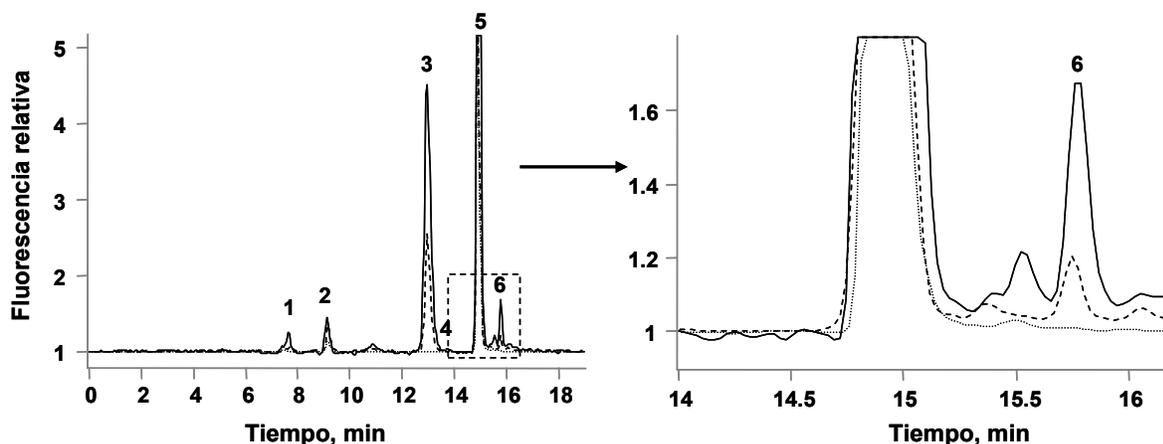
**Tabla 6.** Niveles de fitoquelatinas (PC-2) encontrados en los extractos de levaduras control y expuestas al ion cadmio.

Cepa	PC-2, $\mu\text{g g}^{-1}$		Inducción de PCs*, %
	control	Cd(II)	
<i>S. cerevisiae</i>	33.10	124.4	376
<i>S. bayanus.</i>	37.62	104.9	279
<i>C. maltosa.</i>	41.41	70.20	169
<i>K. marxianus</i>	32.44	114.3	352
<i>Y. lipolítica.</i>	32.44	90.80	280

( $\mu\text{g g}^{-1}$  – microgramos de PC-2 por 1 gramo de biomasa liofilizada). La cuantificación se llevó a cabo indirectamente, en base a la señal de glutatona.

\* - concentración de PC-2 en cultivo expuesto a As(III) dividido por la concentración de PC-2 en cultivo control en por ciento.

Los resultados obtenidos en el análisis de levaduras expuestas a arsénico, se presentan en la Figura 19 y en la Tabla 7. En la Figura 19 se observa claramente la inducción de PC-2 en cultivos expuestos a As(III) durante su crecimiento. Sin embargo, el aumento de niveles de PC-2 en cultivos expuestos, respecto del control, fue menor en comparación con los observados en la exposición a ion cadmio (Tablas 6 y 7).



**Figura 18.** Cromatogramas típicos de extractos de *S. cerevisiae*: (.....) blanco de reactivos; (---) cepa control; (—) cepa expuesta a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de As(III) en el medio de crecimiento. Los compuestos identificados fueron: (1) cisteína; 2 – N-acetil cisteína; 3 – glutatona; 4 -  $\gamma$ -glutamylcisteína; 5 – producto de descomposición de reactivo; 6 – PC-2.

**Tabla 7.** Niveles de fitoquelatinas (PC-2) encontrados en los extractos de levaduras controles y expuestas al ion AS(III).

Cepa	PC-2, $\mu\text{g g}^{-1}$		Inducción de PCs*, %
	control	As(III)	
<i>S. cerevisiae</i>	33.10	85.28	258
<i>S. bayanus.</i>	37.62	86.90	231
<i>C. maltosa.</i>	41.41	86.48	209
<i>K. marxianus</i>	32.44	88.79	271
<i>Y. lipolítica.</i>	32.44	54.43	168

( $\mu\text{g g}^{-1}$  – microgramos de PC-2 por 1 gramo de biomasa liofilizada). La cuantificación se llevó a cabo indirectamente, en base a la señal de glutatona.

\* - concentración de PC-2 en cultivo expuesto a As(III) dividido por la concentración de PC-2 en cultivo control en por ciento.

Para los dos iones metálicos utilizados (Cd(II) y As(III)), las cepas de *S. cerevisiae* presentaron mayor habilidad de inducción de fitoquelatinas. En exposición a cadmio, la cepa que presentó más bajos niveles de PC-2 fue *C. maltosa* y en la exposición a arsénico, fue la cepa *Y. lipolítica*. Los resultados obtenidos sugieren que la inducción de fitoquelatinas presenta diferencias, dependiendo del tipo de cepa y también del tipo de ion metálico y/o metaloide. Se demostró, sin embargo, que cada una de las cepas de levaduras estudiadas es capaz de biosintetizar fitoquelatinas en respuesta a la presencia de Cd(II) y As(III) en el medio de cultivo.

En relevancia al eje central del presente trabajo, los resultados que se acaban de presentar demuestran la utilidad del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de las PCs en extractos biológicos. Por esa razón el procedimiento se empleó en el análisis de las PCs en plantas.

## **IV.2. Resultados de los análisis llevados a cabo en muestras del cauce del río Lerma (Área de estudio I).**

En los reportes consultados se ha estudiado una gran diversidad de organismos capaces de sintetizar fitoquelatinas (9, 56, 57, 115, 178-180), sin embargo en la gran mayoría de los estudios, las fitoquelatinas han sido inducidas de manera controlada en de laboratorio. De esta manera se logró avanzar en el conocimiento de algunos factores responsables en la síntesis fitoquelatinas, así como en algunas de las rutas de síntesis y en particular se demostró que para los diferentes organismos estudiados la respuesta a los elementos tóxicos puede o no generar la inducción de las fitoquelatinas. La desventaja de este tipo de estudios es que el número de variables estudiadas es limitado, por lo que el enfoque de esta investigación fue el de analizar muestras tomadas de un entorno natural y estudiarlas de tal manera que fuera posible además de cuantificar las fitoquelatinas, tratar de entender mejor el papel de los parámetros medio ambientales bióticos y abióticos que juegan un papel importante en su síntesis y avanzar en el conocimiento acerca de la función de las fitoquelatinas como mecanismo defensivo de los organismos vegetales. En concreto los resultados de los estudios de especiación permiten determinar cuales de los elementos presentes en el entorno natural de las plantas están unidos a las fitoquelatinas y si existe una acumulación de elementos que se pudiera atribuir a la síntesis de fitoquelatinas.

Una vez desarrollada y probada la metodología para el análisis de fitoquelatinas en muestras biológicas, el siguiente paso fue enfocarse en la primera área de estudio establecida, el cauce del río Lerma en el estado de Guanajuato. Para ello, en seis campañas de muestreo, realizadas durante 2 años, se tomaron las muestras de aguas, lodos y plantas de acuerdo a lo descrito en la sección III.5. Las seis campañas de muestreo se llevaron a cabo en mayo 2007 (MI), octubre 2007 (MII), marzo 2008 (MIII), junio 2008 (MIV), octubre 2009 (MV) y en marzo 2009 (MVI).

#### IV.2.1. Selección de los sitios de muestreo.

Se definieron 22 sitios a lo largo del río Lerma en el Estado de Guanajuato. La lista de estos sitios se presenta en Tabla 8 y en la Figura 20 se puede observar su ubicación en el mapa del Estado de Guanajuato. Los elementos que se consideraron en la selección de sitios fueron los siguientes:

1. Tomar el agua en la entrada y salida del río Lerma del Estado,
2. Tomar el agua cerca de los municipios, o posibles sitios de descarga,
3. Tener en cuenta los sitios donde siempre hay agua.
4. Tratar de encontrar los sitios de relativamente fácil acceso.

**Tabla 8.** Listado de sitios de muestreo seleccionados para el monitoreo del río Lerma y datos de la ubicación geográfica.

Número asignado	Lugar de muestreo	Coordenadas geográficas	Número asignado	Lugar de muestreo	Coordenadas geográficas
1	Entrada a la Presa Solís	N 20° 0' 30" W 100° 28' 39"	12	Uruetaro	N 20° 31' 15" W 101° 10' 46"
2	San Miguel	N 20° 2' 27" W 100° 39' 28"	13	Pueblo Nuevo	N 20° 31' 23" W 101° 22' 7"
3	Cortina Presa Solís	N 20° 3' 4" W 100° 40' 24"	14	Río Guanajuato	N 20° 31' 10" W 100° 22' 44"
4	Acámbaro	N 20° 2' 21" W 100° 42' 58"	15	Las Estacas	N 20° 23' 24" W 101° 24' 44"
5	Chamácuaro	N 20° 60' 19" W 100° 49' 54"	16	Rodeo San Antonio	N 20° 18' 44" W 101° 30' 0"
6	Salvatierra	N 20° 13' 16" W 100° 53' 12"	17	Pastor Ortiz	N 20° 18' 10" W 101° 36' 0"
7	El Sabino	N 20° 16' 43" W 101° 0' 52"	18	El Mármol	N 20° 12' 49" W 101° 43' 55"
8	Jaral del Progreso	N 20° 20' 10" W 101° 02' 18"	19	Corrales de Rábago	N 20° 12' 46" W 101° 51' 37"
9	Cerrito de Camargo	N 20° 24' 52" W 101° 02' 19"	20	Numarán	N 20° 15' 5" W 101° 56' 23"
10	Salamanca sur	N 20° 33' 45" W 101° 13' 26"	21	Entrada a La Piedad	N 20° 21' 38" W 102° 00' 26"
11	Salamanca norte	N 20° 33' 20" W 101° 10' 20"	22	La Piedad	N 20° 20' 35" W 100° 1' 11"



**Figura 19.** Mapa de la región estudiada, donde se señalan los sitios de toma de muestra seleccionados.

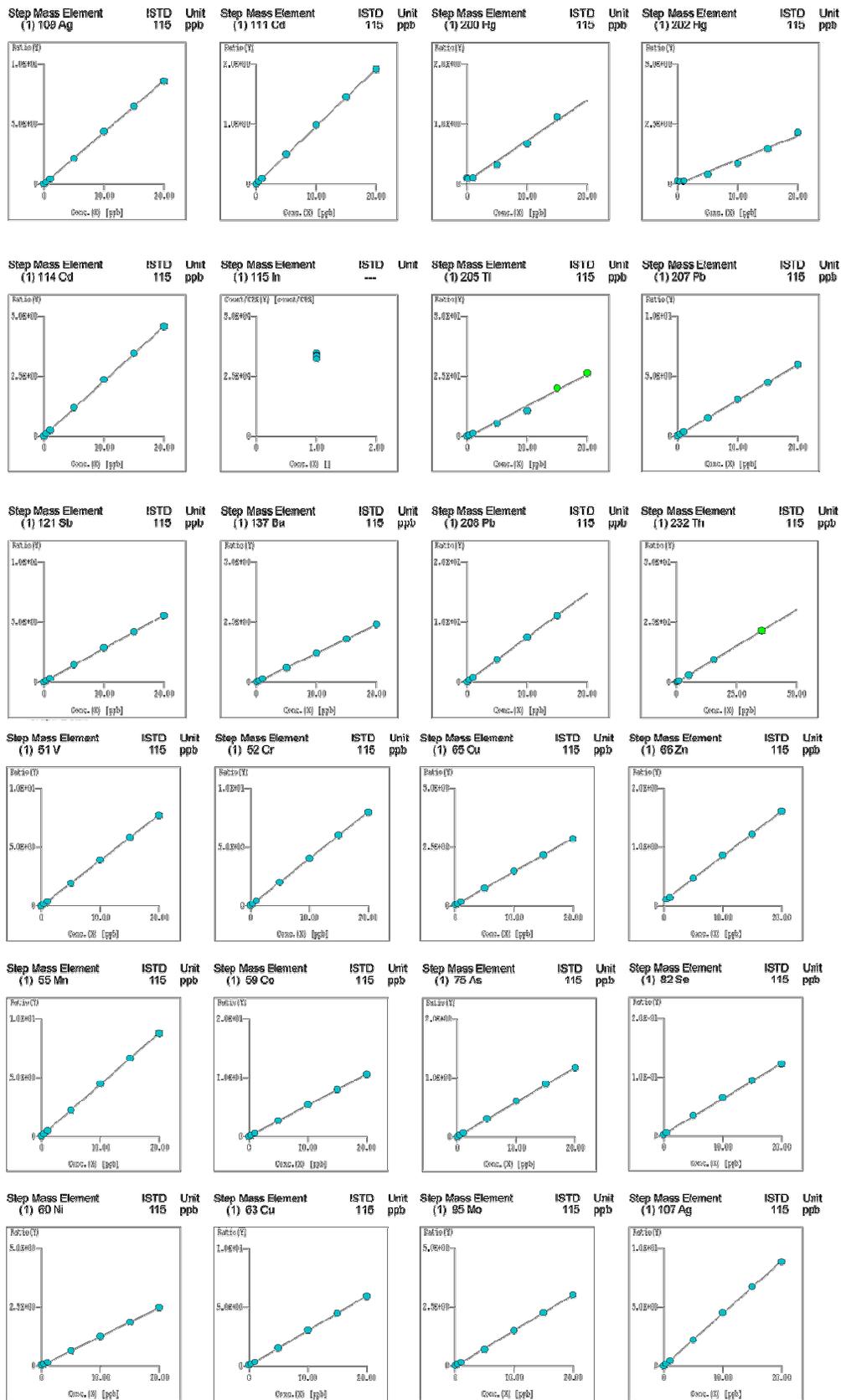
Una vez seleccionados los sitios de muestreo se procedió a realizar los manuales correspondientes para la toma de muestras de aguas, plantas y lodos, así como los protocolos para el análisis de las muestras para los contenidos totales de elementos en las diferentes muestras.

Para la cuantificación de los contenidos totales de elementos presentes en las muestras de agua, plantas, lodos y suelos se llevó a cabo el procedimiento descrito en la sección III.5. Se llevó a cabo el proceso de calibración, utilizando como estándares internos las señales de  $^{74}\text{Ge}$  y  $^{193}\text{Ir}$  (ambos  $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Los dos elementos cumplen con los requisitos de estándar interno para el rango de los valores  $m/z$  monitoreados en este trabajo.

Las soluciones de calibración conteniendo seis niveles de concentración para cada uno de los elementos se obtienen diluyendo el estándar comercial para el análisis de muestras medio ambientales ( $100 \text{ mg L}^{-1}$  Fe, K, Ca, Na, Mg;  $10 \text{ mg L}^{-1}$  Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, U, en 10 %  $\text{HNO}_3$ , Agilent Technologies) con ácido nítrico al 1 % (v/v). El proceso de calibración se realizó diario, partiendo del estándar multielemental. En la Figura 14 se presentan de manera de ejemplo las curvas de calibración de un solo día.

Cabe mencionar que, los valores  $r^2$  fueron siempre  $> 0.999$  y uno de los criterios de control de calidad fue el seguimiento de la sensibilidad, comparando los valores de las pendientes de curvas de calibración para cada uno de los elementos, obtenidos en diferentes días. Se consideraron aceptables diferencias en el rango  $\pm 10\%$  respecto al promedio dentro de una ronda de muestreo (tres días consecutivos) y  $\pm 20\%$  entre las rondas.

Otro parámetro medido fue el blanco (10 %  $\text{HNO}_3$  diluido de la misma manera que el estándar multielemental), obteniéndose los valores calculados automáticamente por el software Chemstation en unidades de concentración (BEC – blank equivalent concentration). Los límites de detección para cada uno de los elementos se evaluaron diario. Como ejemplo, los valores obtenidos en el mismo día que los parámetros de calibración se presentan en la Tabla 9.



**Figura 20.** Ejemplos de las rectas de calibración, obtenidas a partir de diluciones del estándar multielemental, para la determinación de los elementos por ICP-MS.

Los análisis se llevaron a cabo con tres lecturas por muestra en el mismo día y con tres repeticiones en días diferentes. Para su análisis, las muestras de aguas acidificadas y filtradas se diluyeron 1:10 con ácido nítrico al 1 % y se agregó la solución de estándar interno para obtener una concentración final de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  y se introdujeron al sistema ICP-MS. Los resultados fueron corregidos por el valor del blanco, corrido en paralelo (agua desionizada, acidificada, centrifugada y diluida igual que las muestras). Estos valores, medidos en unidades de concentración (BEC – blank equivalent concentration) se reportaron cada día junto los parámetros de calibración. Es importante, que los BEC obtenidos fueron comparables a los límites de cuantificación (aprox.  $3.3 \times \text{LD}$ , de acuerdo con las indicaciones IUPAC).

Para examinar la exactitud de los resultados analíticos obtenidos en muestras reales, cada día se llevó a cabo la determinación de elementos en el material de referencia certificado (NIST 1643d, Trace Elements in Water). En Tabla 10, se presentan los resultados obtenidos en uno de los días (promedios  $\pm$  DE para 3 réplicas) junto con los valores certificados. En todos los análisis se obtuvo muy buena concordancia para todos los elementos, lo que confirma la exactitud del procedimiento en su aplicación al análisis de agua.

**Tabla 9.** Ejemplo de datos de calibración multielemental.

Elemento	LD, $\text{ng L}^{-1}$	BEC**, $\text{ng L}^{-1}$	Soluciones de calibración, $\mu\text{g L}^{-1}$	Función de calibración*	$r^2$
V	3.4	3.7	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.451\text{c} + 0.035$	1.00000
Cr	9.3	10	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.061\text{c} + 0.002$	1.00000
Mn	4.9	11	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.602\text{c} + 0.032$	1.00000
Co	2.6	12	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.622\text{c} + 0.064$	1.00000
Ni	37	39	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.151\text{c} + 0.010$	1.00000
Cu	48	62	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.326\text{c} + 0.021$	1.00000
Zn	156	298	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.162\text{c} + 0.045$	1.00000
As	12	4.6	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.095\text{c} + 0.003$	1.00000
Se	205	90	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.101\text{c} + 0.001$	1.00000
Mo	9.8	18	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.179\text{c} - 0.054$	1.00000
Ag	1.8	15	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.498\text{c} + 0.025$	1.00000
Cd	3.0	13	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.110\text{c} + 0.028$	1.00000
Sb	4.9	19	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.342\text{c} - 0.004$	1.00000
Ba	47	68	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.162\text{c} + 0.004$	1.00000
Hg	69	94	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.118\text{c} + 0.031$	0.99989
Tl	1.1	9.9	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.946\text{c} + 0.016$	1.00000
Pb	54	49	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=0.661\text{c} + 0.044$	1.00000
Th	0.7	4.8	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=1.150\text{c} - 0.017$	0.99996
U	0.8	1.9	0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25	$\text{cps}=1.264\text{c} + 0.031$	1.00000

\* - cps – intensidad de la señal analítica, en cuentas por segundo; c – concentración del analito en  $\mu\text{g L}^{-1}$

\*\* - BEC – ejemplos de los valores de blancos obtenidos en el análisis de aguas

**Tabla 10.-** Isótopos monitoreados, valores certificados y resultados típicos obtenidos de determinación de elementos en material certificado NIST 1643d. No se presentan resultados analíticos para Hg, Th, U, ya que estos no fueron certificados.

Isótopo monitoreado	LD, ng L <sup>-1</sup>	Análisis de material de referencia	
		Valor certificado, µg L <sup>-1</sup>	Encontrado, µg L <sup>-1</sup>
<sup>51</sup> V	3.4	35.1 ± 1.4	34.7 ± 1.2
<sup>52</sup> Cr	8.4	18.5 ± 0.2	18.2 ± 0.3
<sup>55</sup> Mn	4.4	37.7 ± 0.8	38.0 ± 0.9
<sup>59</sup> Co	4.0	25.0 ± 0.6	22.2 ± 1.1
<sup>60</sup> Ni	51	58.1 ± 2.7	60.3 ± 1.9
<sup>63</sup> Cu	51	20.5 ± 3.8	20.2 ± 1.6
<sup>66</sup> Zn	150	72.5 ± 0.7	72.9 ± 0.6
<sup>75</sup> As	12	56.0 ± 0.7	53.9 ± 1.3
<sup>82</sup> Se	220	11.4 ± 0.2	9.94 ± 2.2
<sup>95</sup> Mo	15	113 ± 2	115 ± 3
<sup>109</sup> Ag	1.7	1.27 ± 0.06	1.15 ± 0.07
<sup>114</sup> Cd	3.1	6.47 ± 0.4	6.37 ± 0.2
<sup>121</sup> Sb	6.6	54.1 ± 1.1	55.9 ± 0.9
<sup>137</sup> Ba	41	507 ± 9	503 ± 6
<sup>200</sup> Hg	65	-	-
<sup>205</sup> Tl	0.9	7.28 ± 0.25	7.80 ± 0.70
<sup>208</sup> Pb	44	18.2 ± 0.6	19.3 ± 0.8
<sup>232</sup> Th	0.6	-	-
<sup>238</sup> U	1.2	-	-

LD-Límite de detección, calculado como 3 veces la desviación estándar del blanco, dividido entre la pendiente de la curva de calibración.

#### IV.2.2. Resultados obtenidos del análisis de aguas.

Para seis campañas de muestreo y para cada uno de los elementos, en la Tabla 11 se muestra el valor promedio de las tres independientes determinaciones en todos los sitios de muestreo, el respectivo valor de desviación estándar y el intervalo de concentraciones encontrado en todos los sitios. Se puede observar que, los niveles de concentración de elementos en gran mayoría de los sitios de muestreo fueron generalmente bajos. En concreto, en las campañas MII – MVI, estos niveles fueron más bajos respecto a aquellos marcados por la normatividad mexicana para aguas superficiales (Tabla 12). Tomando en cuenta la normatividad para el agua de consumo humano (Tabla 5), los niveles promedios de los elementos en muestreos MII – MVI fueron más bajos respecto los valores marcados en las normas, excepto Hg. Es importante que no hubieron cambios drásticos de las concentraciones entre diferentes épocas del año. Estos resultados claramente indican que el agua del río Lerma no presenta alarmante contaminación con

metales/metaloideos. Por otro lado, los resultados obtenidos en la primera campaña (MI) fueron muy diferentes respecto a otras campañas, lo que se relacionó con falta de caudal del río en mayo 2007. El muestreo MI se realizó durante época de sequía y fue el único muestreo, cuando no existía un caudal continuo del río. De hecho, las muestras de agua se tomaron de “charcos”. En otras campañas el río presentaba caudal continuo y abundante y el problema de concentraciones altas no se repitió de manera tan notoria.

**Tabla 11.** Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de agua del río Lerma (MI – MVI se refieren a seis muestreos realizados).

Conc, µgL <sup>-1</sup>	MI	M II	M III	M IV	M V	MVI	MI	M II	M III	M IV	M V	MVI	MI	M II	M III	M IV	M V	MVI
	<b>Vanadio</b>						<b>Cromo</b>						<b>Manganeso</b>					
<b>promedio</b>	14.7	16.4	9.12	12.1	17.1	8.84	1.28	0.80	0.42	0.43	0.48	0.09	31.6	6.61	62.0	23.0	32.7	79.4
<b>DE</b>	12.9	8.41	3.23	4.54	29.2	2.92	0.55	0.32	0.19	0.20	0.32	0.08	30.2	7.33	49.4	28.0	53.9	48.2
<b>Mínimo</b>	5.70	5.92	4.91	4.83	1.40	5.12	0.80	0.33	0.11	ne	0.09	ne	0.44	1.90	2.05	2.13	2.73	10.0
<b>Máximo</b>	70.1	32.3	15.3	22.9	128	13.9	3.31	1.60	0.83	1.30	1.35	0.33	100	26.3	217	133	196	206
<b>Cobalto</b>						<b>Níquel</b>						<b>Cobre</b>						
<b>promedio</b>	0.9	0.4	0.4	0.5	0.3	0.3	4.73	5.42	0.49	4.03	6.16	1.82	5.71	3.13	3.22	3.68	9.81	4.63
<b>DE</b>	0.3	0.4	0.2	0.4	0.1	0.2	1.79	2.20	0.82	1.54	5.49	0.72	3.69	2.78	1.65	2.01	0.72	9.31
<b>Mínimo</b>	0.5	ne	0.2	ne	0.1	ne	2.80	2.51	ne	0.79	2.18	0.62	0.59	0.20	1.26	0.82	3.36	0.58
<b>Máximo</b>	2.0	2.0	0.7	1.5	0.6	0.8	8.59	10.3	2.80	6.34	24.4	3.68	15.2	12.6	7.84	8.22	15.8	63.8
<b>Zinc</b>						<b>Arsénico</b>						<b>Selenio</b>						
<b>promedio</b>	24.1	6.89	5.70	4.64	17.8	7.91	10.9	8.30	4.08	5.14	4.92	3.13	1.43	1.23	0.89	0.86	1.22	0.31
<b>DE</b>	22.7	6.31	7.35	2.38	3.16	5.30	23.0	4.39	2.70	2.44	2.58	2.01	1.14	1.07	1.54	0.41	1.80	0.39
<b>Mínimo</b>	Ne	0.8	ne	1.12	7.50	1.62	2.22	3.32	1.00	1.54	1.32	1.31	0.30	ne	ne	0.15	0.38	ne
<b>Máximo</b>	71.1	24.1	31.4	9.47	71.6	22.8	112	20.5	9.88	10.5	13.3	8.52	5.20	5.07	7.43	5.64	8.81	1.35
<b>Molibdeno</b>						<b>Plata</b>						<b>Cadmio</b>						
<b>promedio</b>	5.85	3.01	2.09	2.53	2.05	1.78	0.49	0.05	0.04	1.30	0.17	0.02	0.36	0.07	0.08	0.09	0.01	0.04
<b>DE</b>	9.8	1.44	0.90	1.54	1.04	1.20	0.04	0.02	0.02	0.35	0.06	0.01	0.08	0.04	0.03	0.02	0.01	0.04
<b>Mínimo</b>	2.10	1.71	0.30	1.15	0.91	0.84	0.40	0.03	0.03	1.14	0.14	ne	0.30	0.01	0.05	0.07	ne	ne
<b>Máximo</b>	49.5	7.46	3.61	5.16	5.95	3.87	0.50	0.12	0.14	2.80	0.43	0.02	0.60	0.19	0.16	0.13	0.05	0.21
<b>Antimonio</b>						<b>Bario</b>						<b>Mercurio</b>						
<b>promedio</b>	0.76	0.76	0.38	0.27	0.27	0.12	77.0	196	89.9	103	115	116	5.24	1.43	0.18	1.54	1.19	1.86
<b>DE</b>	0.20	0.21	0.13	0.14	0.05	0.07	25.1	30.9	20.3	13.9	14.8	17.3	1.08	1.75	0.49	1.27	0.82	0.50
<b>Mínimo</b>	0.50	0.47	0.16	ne	0.18	ne	30.8	132	54.9	72.7	81.6	78.6	4.00	ne	ne	ne	0.30	1.43
<b>Máximo</b>	1.10	1.18	0.54	0.88	0.38	0.30	124	259	144	129	153	141	8.20	7.41	2.18	6.00	3.40	3.77
<b>Talio</b>						<b>Plomo</b>						<b>Torio</b>						
<b>promedio</b>	0.31	ne	0.08	0.03	0.02	2.22	0.63	0.24	0.51	0.82	0.32	0.38	-	2.68	0.65	2.30	0.42	0.53
<b>DE</b>	0.04	-	0.03	0.01	0.01	0.07	0.21	0.47	0.38	0.49	0.25	0.31	-	0.88	0.32	0.45	0.23	0.09
<b>Mínimo</b>	0.30	-	0.05	ne	0.01	2.21	0.40	Ne	0.22	0.01	0.04	ne	-	2.16	0.34	1.96	0.30	0.44
<b>Máximo</b>	0.40	-	0.19	0.16	0.05	2.25	1.10	2.13	1.97	2.13	1.30	1.43	-	6.45	1.79	4.02	1.21	0.89
<b>Uranio</b>																		
<b>promedio</b>	2.09	0.44	0.52	0.43	1.34	0.35												
<b>DE</b>	1.40	0.57	0.50	0.46	0.85	0.12												
<b>Mínimo</b>	0.50	ne	0.24	ne	0.89	0.15												
<b>Máximo</b>	5.70	1.66	2.68	2.06	4.57	0.66												

DE- Desviación estándar

**Tabla 12.** Niveles establecidos por Norma Oficial Mexicana para aguas potables, incluidos en la propuesta de nueva NOM y marcados por Agencia de Protección del Medio Ambiente (US EPA, 2006). Todos los valores representados en mg l<sup>-1</sup>.

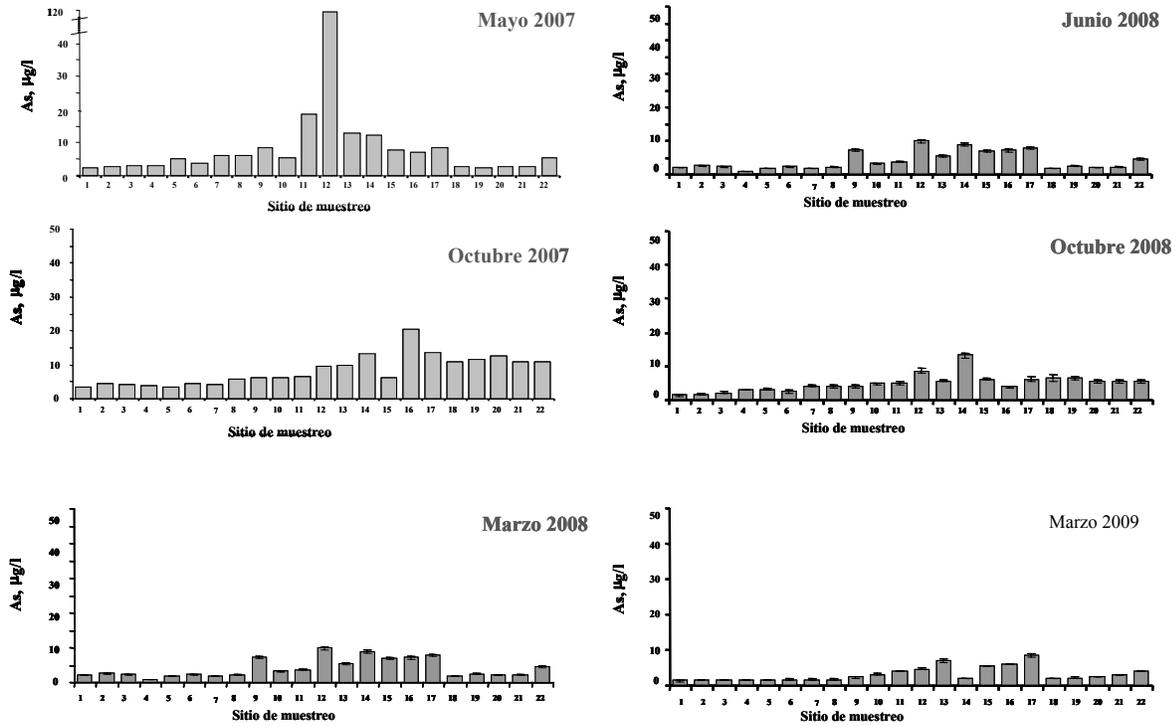
Elemento	NOM <sup>1</sup>	NOM(P) <sup>2</sup>	MCL <sup>3</sup>	SDWR <sup>4</sup>
As	0.05	0.01	0.01	-
Ba	0.7	0.7	2.0	-
Cu	2.0	2.0	1.3	1.0
Cr	0.05	0.05	0.1	-
Hg	0.001	0.001	0.002	-
Mn	0.15	0.15	-	0.05
Mo	-	0.07	0.04	-
Ni	-	0.02	0.1	-
Pb	0.025	0.01	0.015	-
Sb	-	0.02	0.006	-
V	-	-	0.03	-
Zn	5.0	5.0	5.0	5.0

<sup>1</sup> - NOM-127-SSA1-1994 ; <sup>2</sup> - PROY-NOM-SSA1-250-2007 ; <sup>3</sup> - MCL (maximum contaminant level) – máximos niveles permisibles en agua potable por USEPA; <sup>4</sup> - SDWR (secondary drinking water regulation) – valores guía, o niveles que no deberían ser repasados para conservar aceptables características organolépticas (sabor, color, etc.)

Es de notar la presencia de uranio y torio en las muestras analizadas. Ninguno de estos elementos está incluido en la normatividad vigente para aguas en México. En el caso de uranio, la Organización Mundial de la Salud establece como 2 µg L<sup>-1</sup> (<sup>238</sup>U) como valor guía para agua potable. En el análisis de aguas naturales en las regiones no contaminadas se han reportado valores de < 1 hasta 35 µg L<sup>-1</sup>, por lo que los niveles encontrados en este trabajo no indican la contaminación. Como se observa en la Tabla 11, los valores promedios encontrados en seis campañas están en el intervalo 0.35 – 2.09 µg L<sup>-1</sup> y los máximos niveles encontrados en sitios individuales fueron de 0.66 µg L<sup>-1</sup> a 5.70 µg L<sup>-1</sup>.

Con el fin de mostrar la distribución de cada uno de los elementos entre los sitios de muestreo, para elementos más importantes dicha distribución encontrada en seis muestreos se presenta en las Figuras 21 - 24. Parece importante que, para algunos elementos y en algunas campañas se observan “picos” de concentración en Salamanca (11) en el desembocadura del río Guanajuato (14), así como en sitios ubicados río abajo respecto a estos dos lugares, que por su naturaleza parecen ser las fuentes más probables de las descargas.

En concreto, en Salamanca se registraron relativamente altas concentraciones de elementos tales como As, V, Ni, Zn, Hg o Mn, especialmente en mayo 2007 y en octubre 2008 (Figura 25). En la cercanía de desembocadura del río Guanajuato, se notaron mayores (pero siempre bajas) concentraciones de Cr, As, Pb. Por otro lado, las concentraciones de otros elementos tales como Co, Cu, Se, Ag, Cd, Sb y Pb fueron siempre muy bajas y prácticamente sin diferencias entre las rondas de muestreo.



**Figura 21.** Distribución de As en los sitios de muestreo, en seis campañas de muestreo.

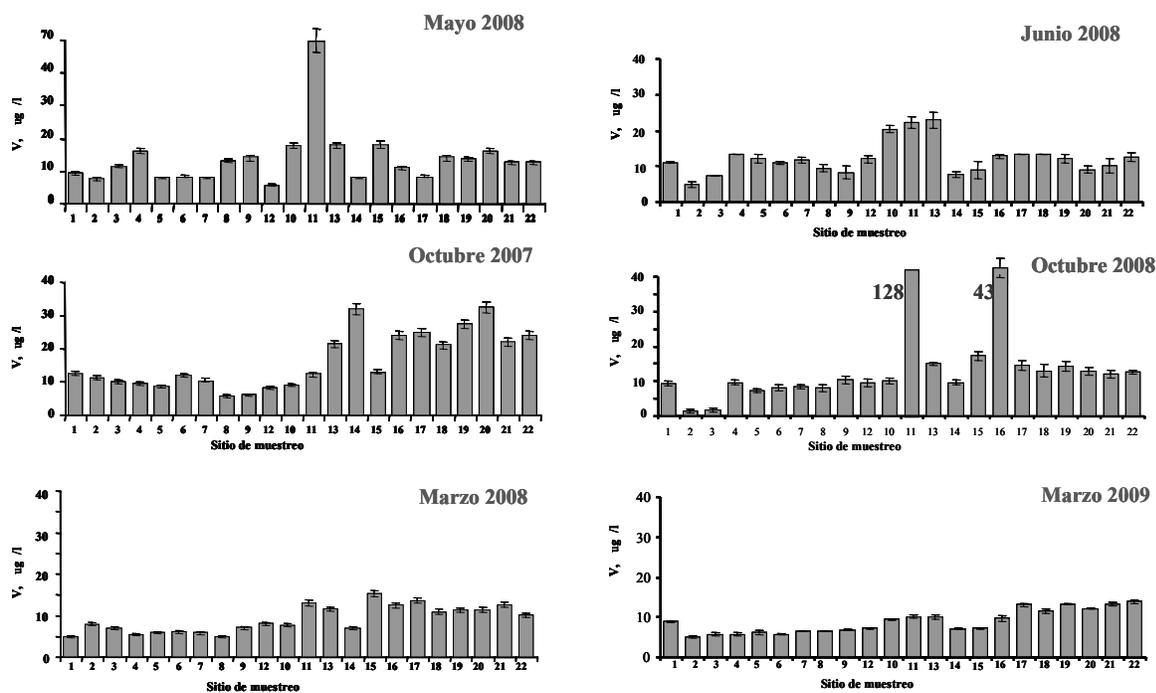


Figura 22. Distribución de V en los sitios de muestreo, en seis campañas de muestreo.

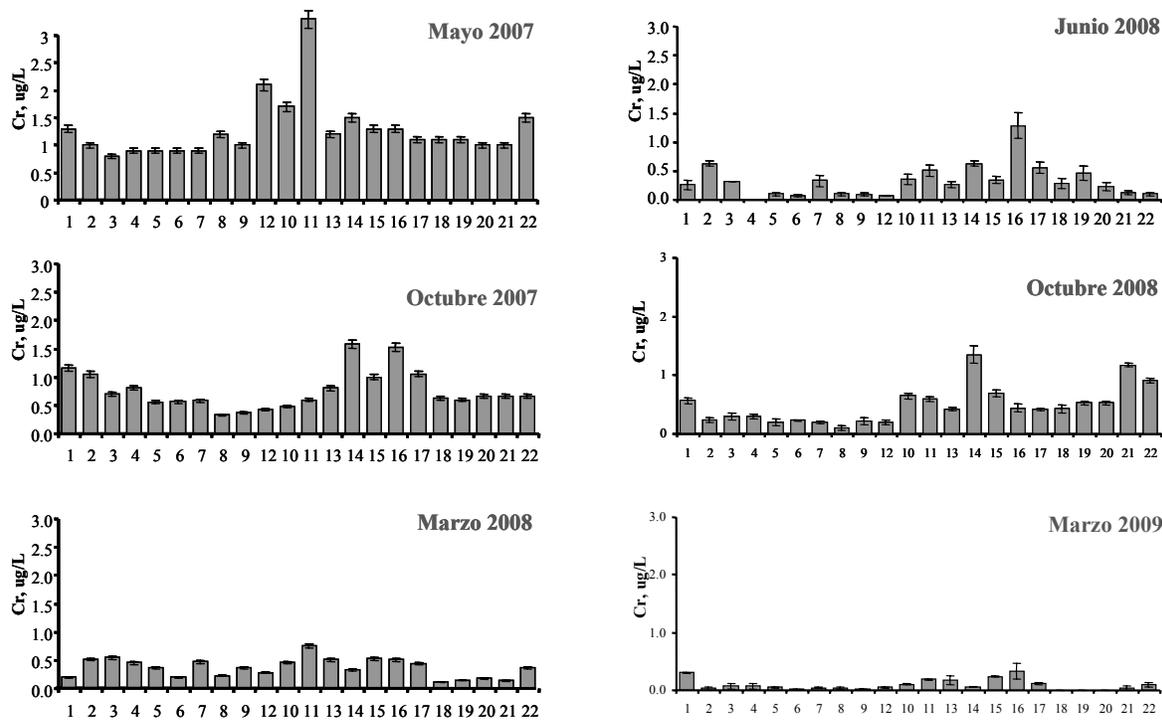
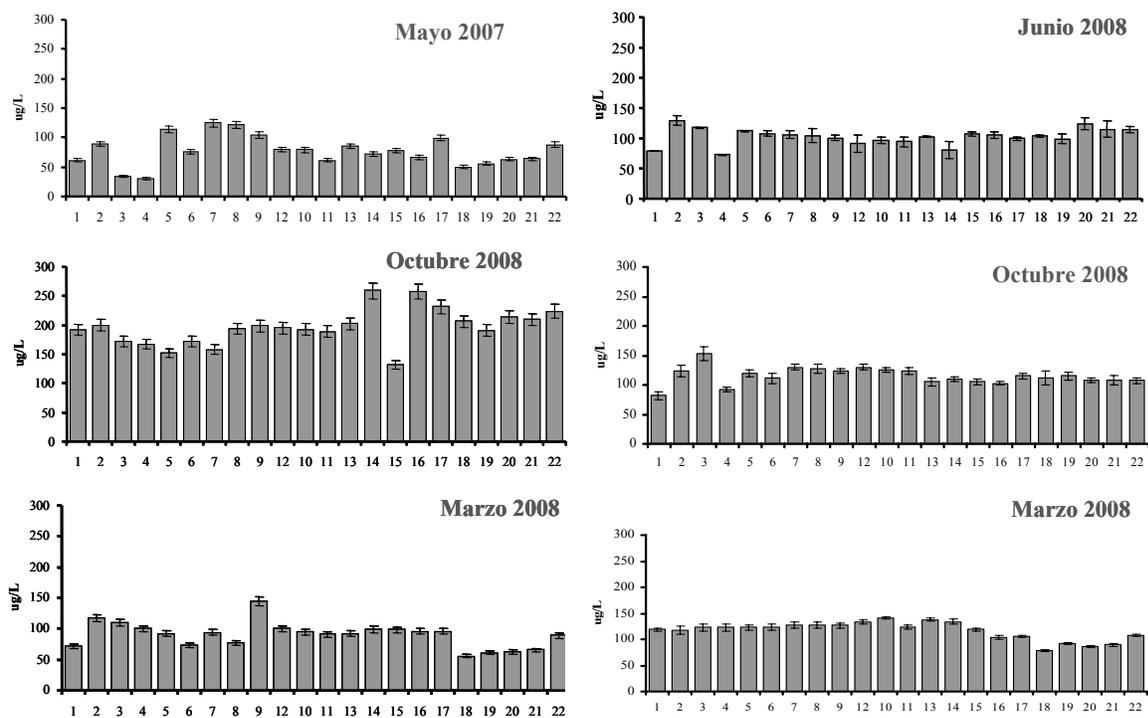


Figura 23. Distribución de Cr en los sitios de muestreo, en seis campañas de muestreo.



**Figura 24.** Distribución de Ba en los sitios de muestreo, en seis campañas de muestreo.

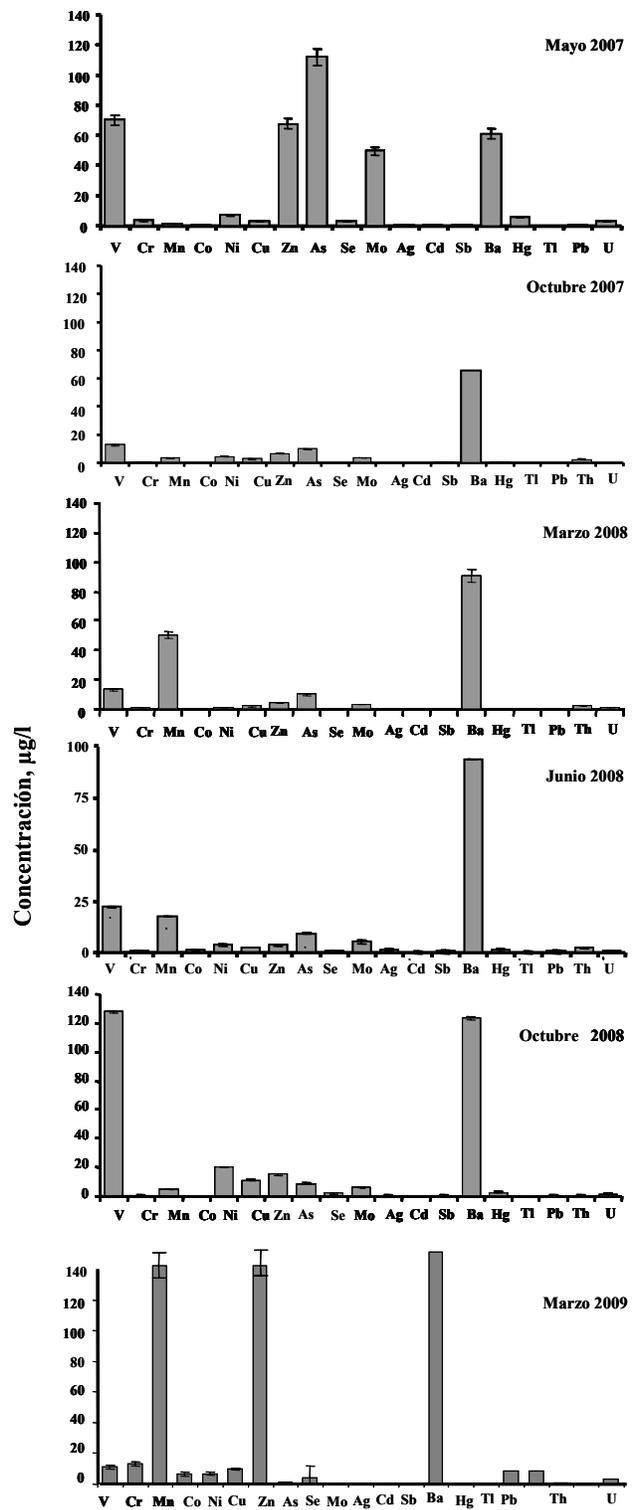


Figura 25. Resultados de determinación de los elementos en Salamanca.

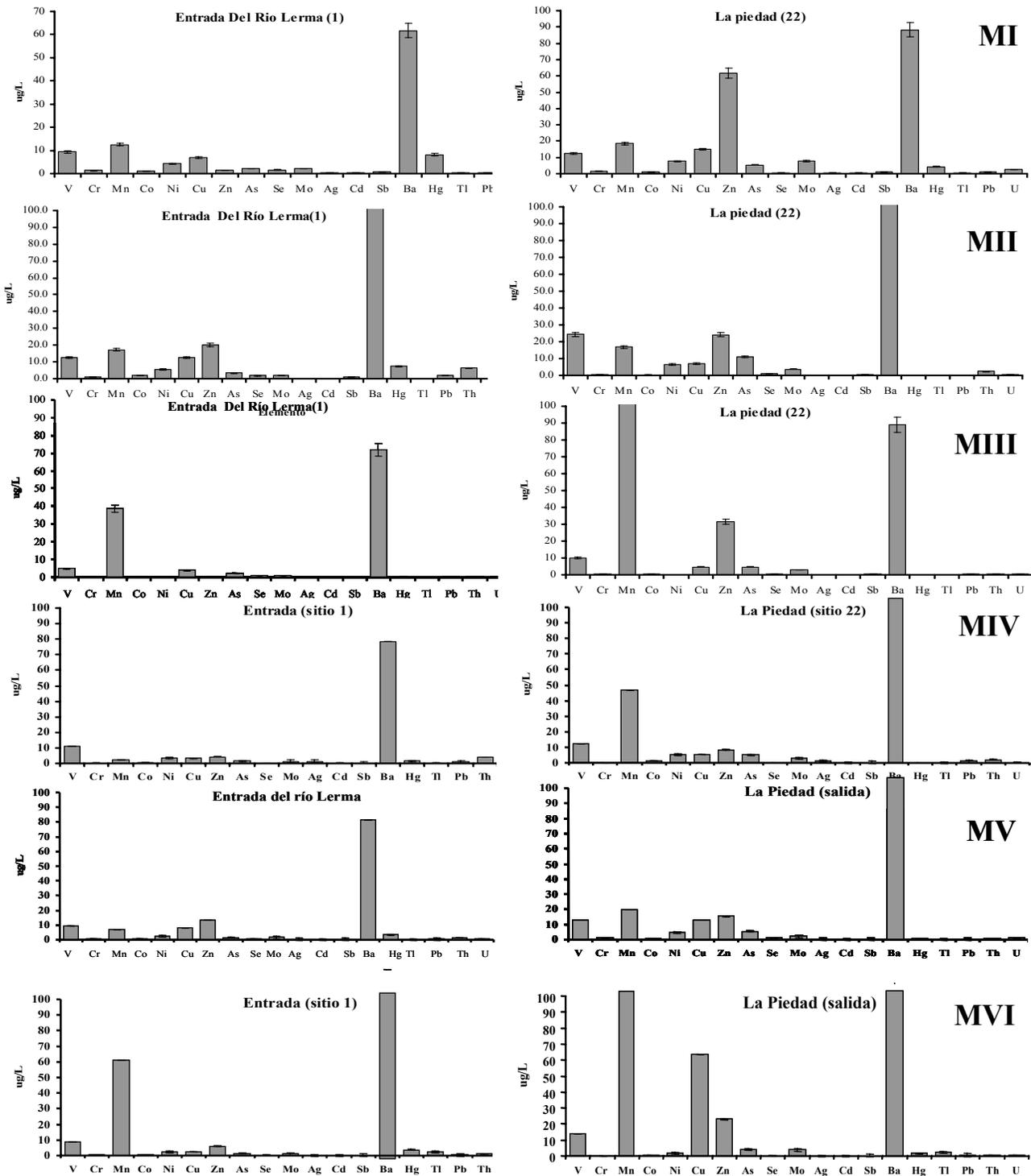
La falta de un padrón constante en la distribución de los elementos que presentan “picos” de concentración, entre sitios en MI - MVI sugiere que los aumentos observados en algunas campañas podrían ser el resultado de las descargas discontinuas, difíciles de detectar. El hecho de que los “picos” más pronunciados de concentración de elementos antes mencionados fueron encontrados en el primer muestreo parece confirmar esta hipótesis. Por otro lado, cuando el caudal del río fue continuo, se ha observado la tendencia hacia mayores concentraciones de elementos en sitios localizados río debajo de Salamanca, lo que también confirma la presencia de algún tipo de foco discontinuo de contaminación en Salamanca. Aparentemente, la corriente del río ayuda en la deslocalización de los contaminantes metálicos río abajo. Como ejemplo, en el caso de As en primer muestreo se detectó la contaminación con As en Salamanca (Figura 21), donde no se presentaba el caudal del río y las muestras se tomaron de un “charco” grande. En segundo muestreo (MII, octubre 2007), el caudal del río en Salamanca fue relativamente abundante y la concentración de As significativamente inferior respecto a la primera ronda ( $112 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $6.3 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente). Sin embargo, los niveles de este elemento en sitios de muestreo río abajo de Salamanca aumentaron en segundo muestreo respecto al primero, formando una “cola” del As proveniente de la cantidad almacenada en Salamanca durante época seca (Figura 21). Una tendencia similar se puede observar para V, Cr (Figura. 22 y 23), Ni, Mo, Mn. Los “picos” de concentración ocurrieron no solamente en el primer muestreo, pero se repitieron en el quinto muestreo (octubre 2008) encontrándose los niveles de V ( $128 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Mn ( $196 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Ni ( $24 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y Zn ( $72 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Estos resultados también confirman las descargas de carácter discontinuo.

Los resultados obtenidos para bario son interesantes. En las seis ocasiones, se encontraron relativamente altos niveles de este elemento en muestras provenientes del río Lerma, pero los niveles correspondientes al segundo muestreo fueron significativamente más altos (Figura 24). Cabe mencionar que en octubre 2007, las muestras se tomaron después de fuertes lluvias, el caudal del río fue abundante, la corriente fuerte y el agua mezclada con lodos. El aumento de la concentración en agua en este muestreo confirma relativamente alta contribución de Ba en diferentes compartimientos del medio ambiente en el Estado de Guanajuato.

El único elemento que, sobrepasaba los niveles permisibles para agua potable ha sido el mercurio. Vale hacer notar que, debido a la toxicidad de este elemento, el nivel permisible es extremadamente bajo ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y la detección de los sitios contaminados requiere de muy sensible

herramienta analítica como es el ICP-MS. Altos niveles de mercurio fueron encontrados solamente en muestras de agua (niveles promedios encontrados en seis muestreos en intervalo  $0.18 - 5.24 \mu\text{g l}^{-1}$  y los valores máximos en sitios individuales en el intervalo  $2.18 - 8.20 \mu\text{g l}^{-1}$ ), pero no en plantas ni en lodos.

Finalmente, es interesante visualizar los niveles de los elementos en la entrada y en la salida del río Lerma del Estado de Guanajuato. En la Figura 26 se presentan las gráficas correspondientes a los resultados obtenidos en muestreos MI – MVI para cada uno de los elementos en estos dos sitios de muestreo. Las diferencias entre los sitios 1 y 22 parecen sugerir que, durante el paso del río por el Estado de Guanajuato los niveles de algunos elementos (V, Mn, Zn, As, Mo) tienden a aumentar, mientras que los niveles de Hg aparentemente disminuyen. En la siguiente sección se presentan los resultados del análisis multivariante, llevado a cabo en búsqueda de las posibles correlaciones entre los sitios de muestreo y las concentraciones de los elementos.



**Figura 26.-** Niveles de concentración de elementos, encontrados en la entrada y en la salida del río Lerma del Estado de Guanajuato, en cada una de las seis campañas de muestreo.

### IV.2.3. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en aguas.

Con el fin de hallar posibles relaciones entre los sitios de muestreo y los niveles de elementos, se utilizó el algoritmo de análisis de componentes principales (PCA – Principal Component Analysis, paquete Unscrambler 7.5, CAMO, Noruega). Este método es una de las herramientas del análisis multivariante que permite visualizar el conjunto de variables del sistema en dimensión reducida. Cada sitio fue caracterizado por 19 variables correspondientes a 19 elementos determinados y, para cada una de las variables se tuvieron 6 valores correspondientes a los niveles del elemento encontrados en seis muestreos. Después de haber realizado algunas pruebas, se decidió eliminar los datos del primer muestreo, ya que las condiciones del río fueron muy diferentes respecto a otros muestreos (no hubo caudal continuo). Por otro lado, fue necesario realizar el análisis de manera separada, para cada una de las campañas de muestreo debido a muy notoria variabilidad de los parámetros del río entre diferentes épocas del año. Finalmente, en algunos casos, se tuvieron que eliminar los sitios de muestreo correspondientes a la Presa Solís y al desemboque del río Guanajuato. Los datos provenientes de la presa provocaban demasiada variabilidad en el modelo, debido a que la presa es un cuerpo del agua que no depende exclusivamente del río Lerma y no presenta el mismo caudal que en otros lugares del río. En el caso del otro sitio eliminado, aparentemente el agua del río Guanajuato tiene totalmente diferentes características y los niveles de los elementos en este río no se ajustan al modelo del río Lerma. Es importante mencionar sin embargo, que el efecto del río Guanajuato puede observarse de los modelos, ya que los sitios “río abajo” fueron incluidos en el análisis PCA. Después de estos ajustes que se acaban de describir, en cada uno de los modelos, los dos primeros factores describieron de 50 % a 70 % de la variabilidad total del sistema. En las Figuras 27 – 31 se presentan los resultados del análisis PCA correspondientes a los muestreos MII - MVI. En estas Figuras, las dos gráficas abajo caracterizan el modelo PCA, mientras que las dos gráficas de arriba permiten observar la agrupación de los parámetros y, en consecuencia hallar las posibles correlaciones entre sitios de muestreo y cambios de niveles de los elementos a lo largo del río Lerma en Estado de Guanajuato.

Es interesante que, en cada una de las campañas, los sitios de muestreo forman tres clusters claramente marcados: (cluster 1) los primeros sitios, después de la entrada del río a nuestro Estado; (cluster 2) los sitios agrupados alrededor de Salamanca y (cluster 3) últimos sitios de muestreo, después de Salamanca y antes de la salida del río. Los resultados de MII, MIII, MV y MVI indican

que los valores relativamente altos de Hg, Th, Cd, Ag (posiblemente también Co, Mn, Tl) se presentan en la entrada del río a Guanajuato (ver Tabla 11 y Figura. 27 – 31). Los sitios cerca de Salamanca se agrupan junto con V, As, Mo, Sb (MIV, MV, , MVI) confirmando que en esta región ocurren descargas de los metales al río. En cuanto a la salida del río del Estado, en MII (octubre 2007, caudal del río reanudado después de sequía) en los sitios debajo de Salamanca presentaros relativamente altos niveles de V, Mo, As, Ni, Co, Zn, Cu, Ba, de acuerdo con la discusión anterior. En otras campañas (MIV, MVI) se observaron similares relaciones.

En resumen, los resultados del análisis PCA sugieren que: (1) la aportación de los metales/metaloides está relacionada con la región geográfica y por lo tanto con las actividades del hombre en estas regiones; (2) el caudal del río lleva cierta aportación de Hg, Th y Ag del Estado de Querétaro; (3) existen aportaciones de carácter discontinuo de V, As, Mo, Ni, Zn, Mo, Co en el Estado de Guanajuato, principalmente en la región de Salamanca, con cierta contribución por el desemboque del río Guanajuato. De manera general, el río Lerma, al salir del Estado de Guanajuato no presenta contaminación con metales/metaloides, aunque nuestro estado aporta algunos elementos.

MII – Octubre 2007 (PC1+PC2 = 60% expl)

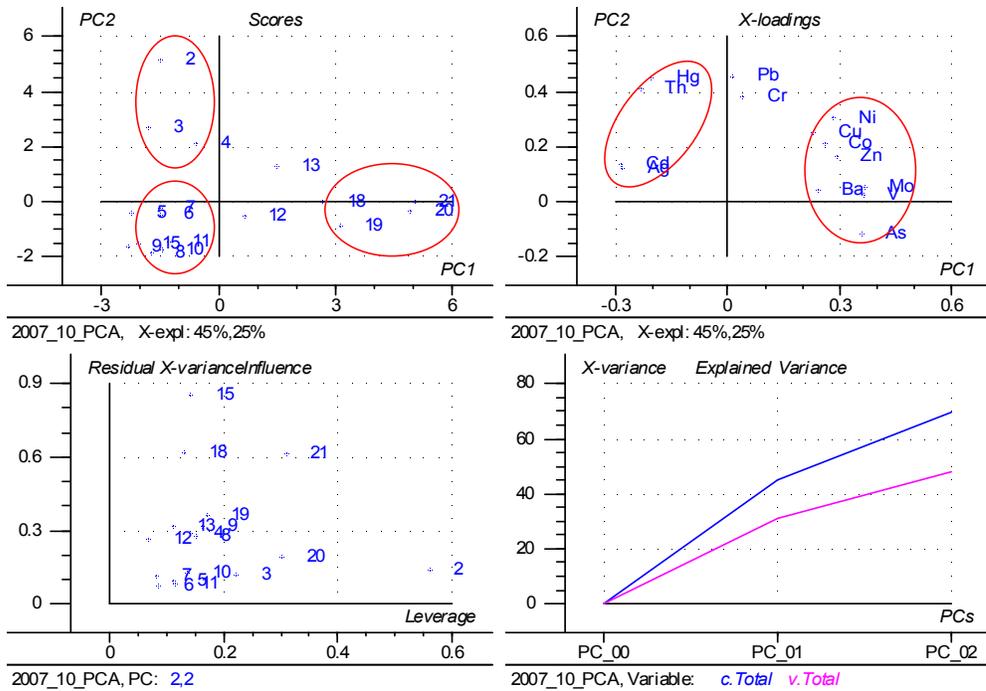


Figura 27. El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo II.

MIII – Marzo 2008 (PC1+PC2 = 71 % expl)

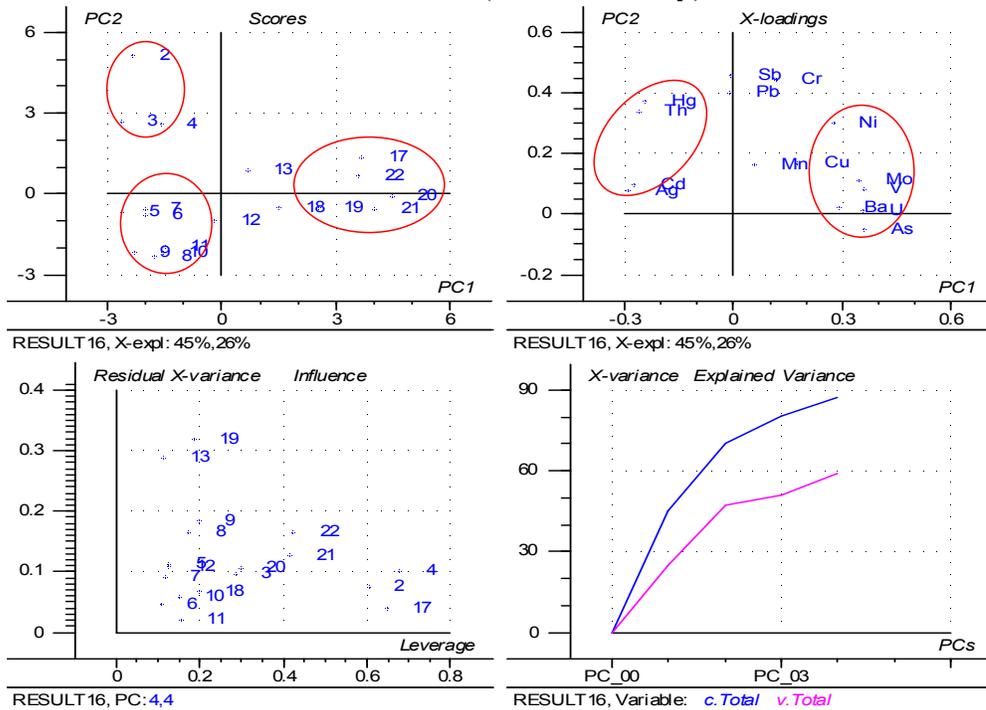
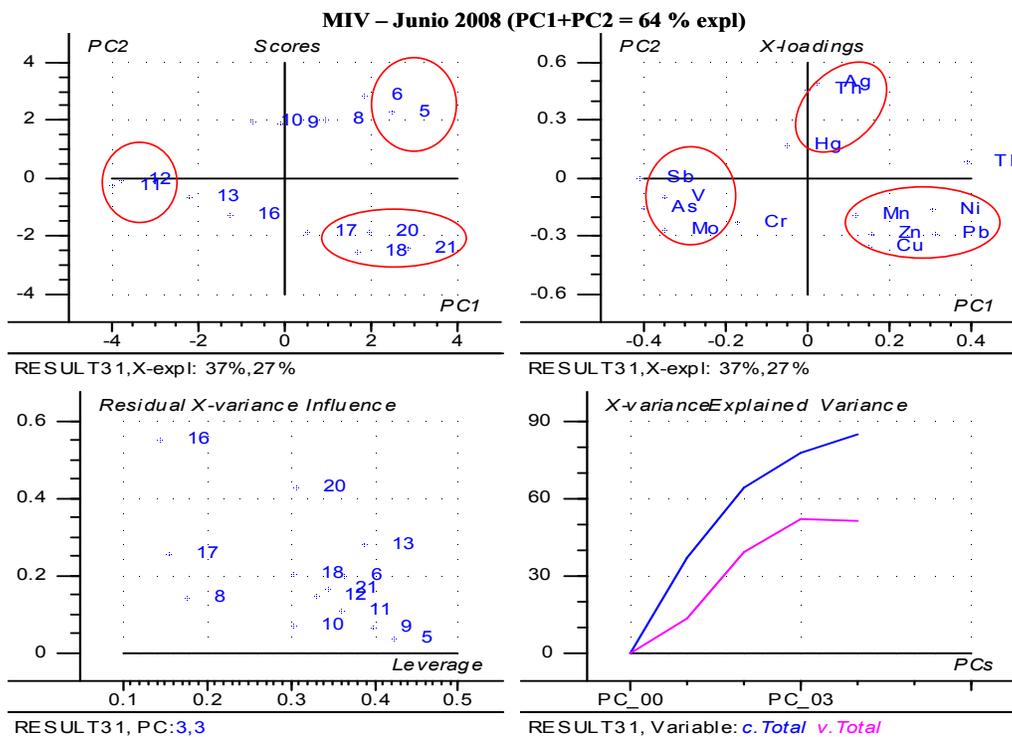
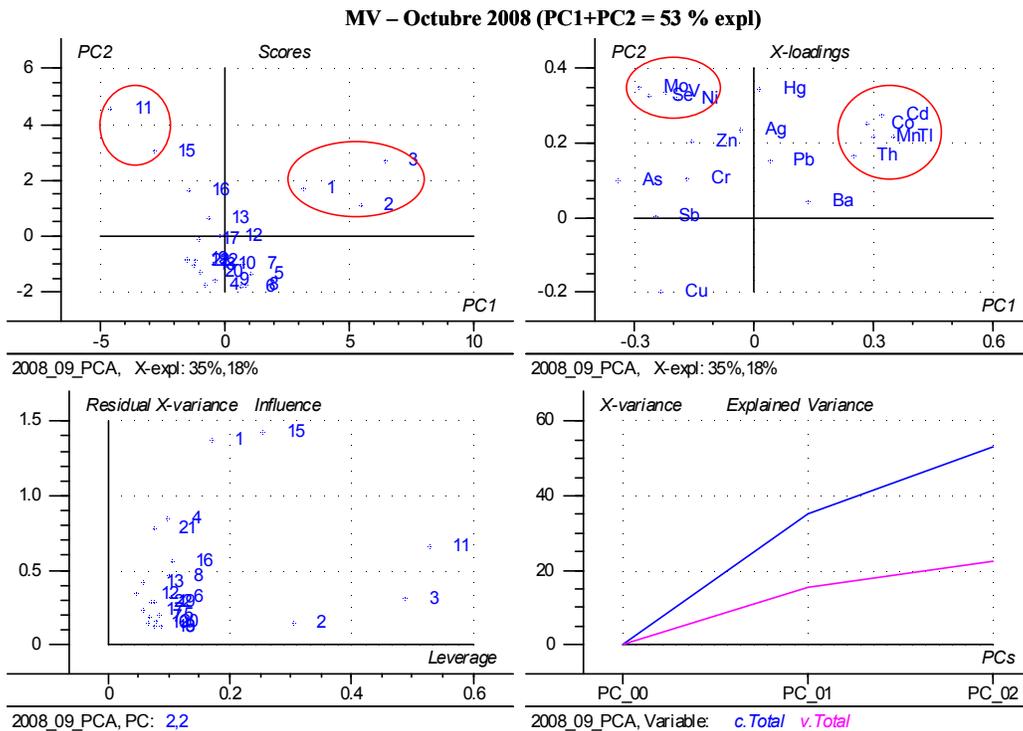


Figura 28. El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo III.

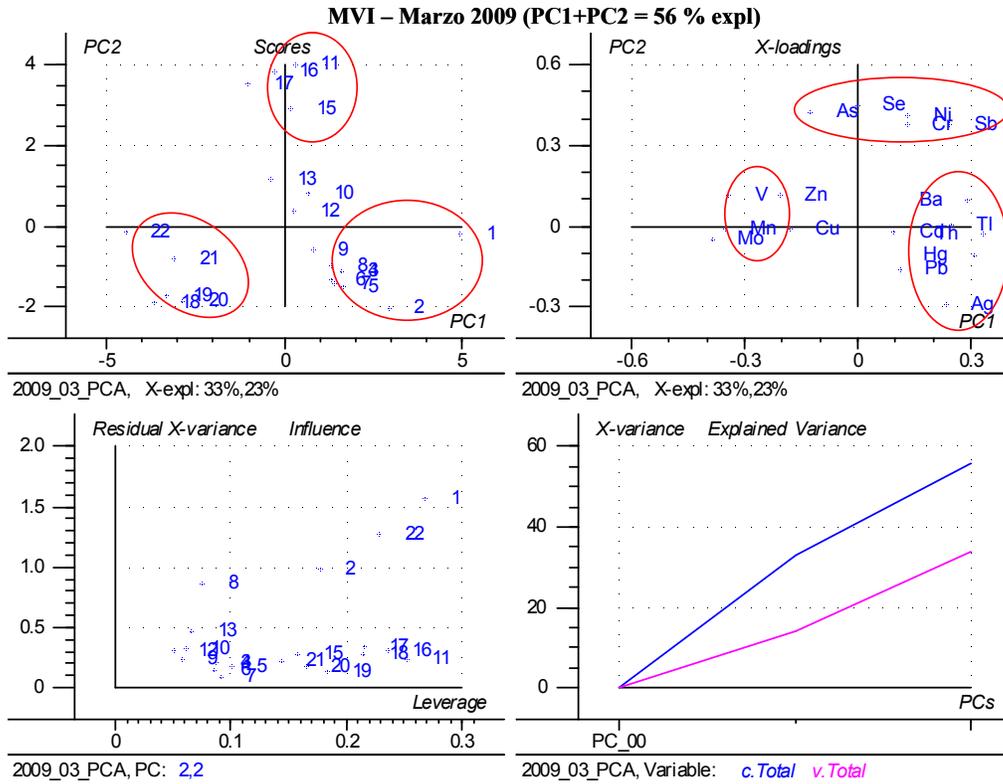


**Figura 29.** El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo

IV.



**Figura. 30** El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo V.



**Figura 31.** El modelo PCA, obtenido en el análisis de variables provenientes del muestreo VI.

#### IV.2.4. Resumen de los resultados obtenidos en lodos.

Las muestras de lodos fueron recolectadas en tres campañas de muestreo: muestreo III (marzo 2008), muestreo IV (junio 2008) y muestreo VI (marzo 2009). La determinación de los 19 elementos se llevó a cabo por ICP-MS, tal como se describe en el manual presentado. En la Tabla 14 se muestra el resumen de los resultados obtenidos. De manera similar que en la Tabla 11, se presenta el valor promedio de las tres determinaciones independientes en todos los sitios de muestreo, el valor de desviación estándar respectivo y el intervalo de concentraciones encontrado en todos los sitios. Estos resultados obtenidos fueron comparados con los valores establecidos por la normatividad vigente para lodos y biosólidos (NOM NOM-004-SEMARNAT-2002) y también con valores guía establecidos en otros países (Tabla 13). Cabe mencionar que la NOM no incluye todos los elementos del estudio (los elementos no incluidos: V, Co, Se, Mo, Ag, Sb, Ba, Tl, Th, U), sin embargo para el resto de elementos, los niveles encontrados en lodos del río Lerma no sobrepasaron en ningún caso los valores considerados en la Norma Mexicana y tampoco sobrepasaron los valores guía recomendados en otros países.

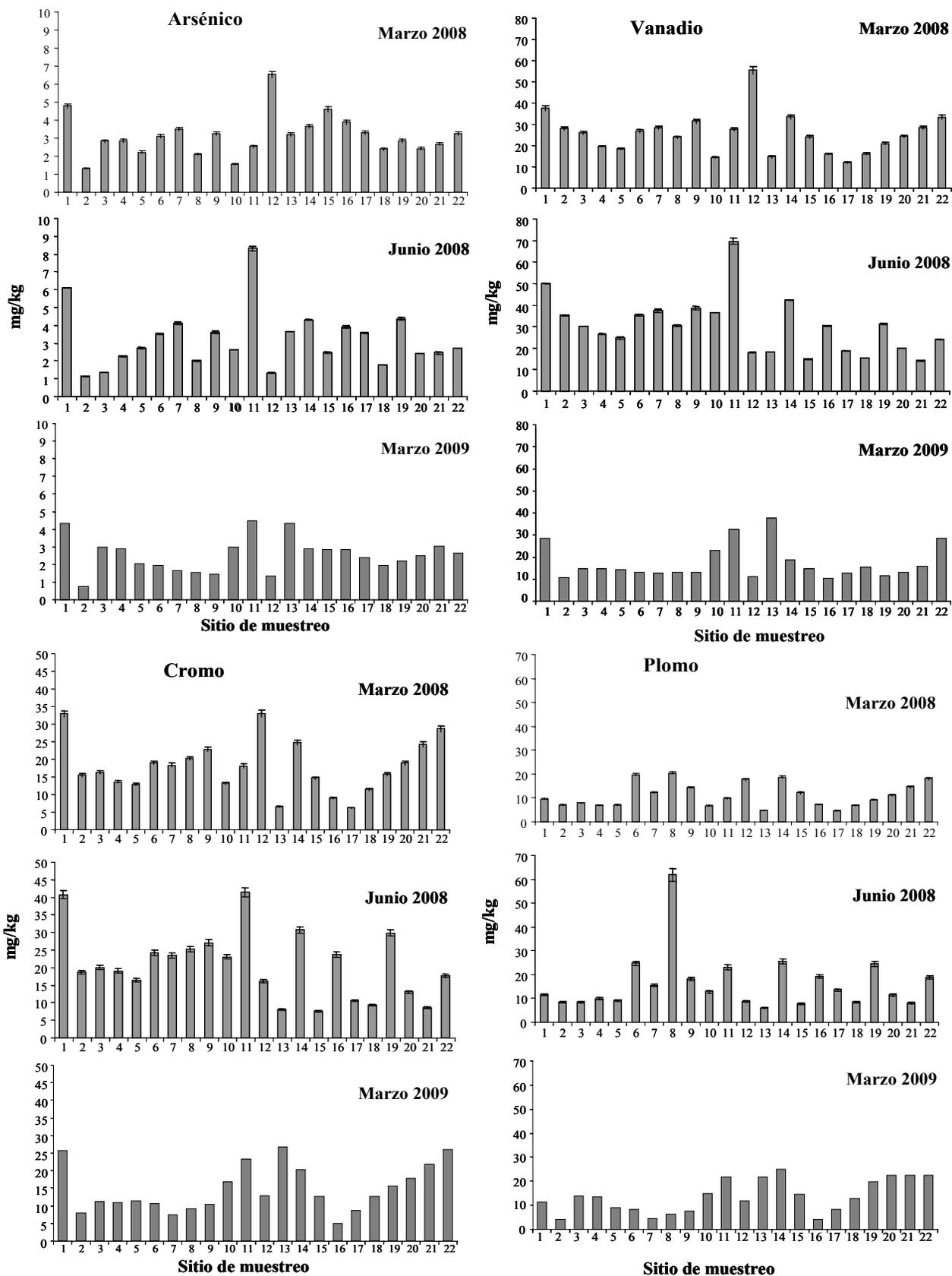
**Tabla 13.** Niveles máximos permisibles de elementos en lodos y biosólidos en la normatividad mexicana y los respectivos valores guía en otros países.

Elemento	NOM-004-SEMARNAT-2002 (lodos, biosólidos) mg kg <sup>-1</sup>		Australia – Nueva Zelanda Sedimentos - valores guía mg kg <sup>-1</sup>	
	Excelente	Bueno	“low”	“severe”
<b>As</b>	41	75	6	33
<b>Cd</b>	39	85	0.6	10
<b>Cr</b>	1200	3000	26	110
<b>Cu</b>	1500	4300	16	110
<b>Hg</b>	17	57	0.2	2
<b>Mn</b>	-	-	460	1110
<b>Ni</b>	420	420	16	75
<b>Pb</b>	300	840	31	250
<b>Zn</b>	2800	7500	120	820

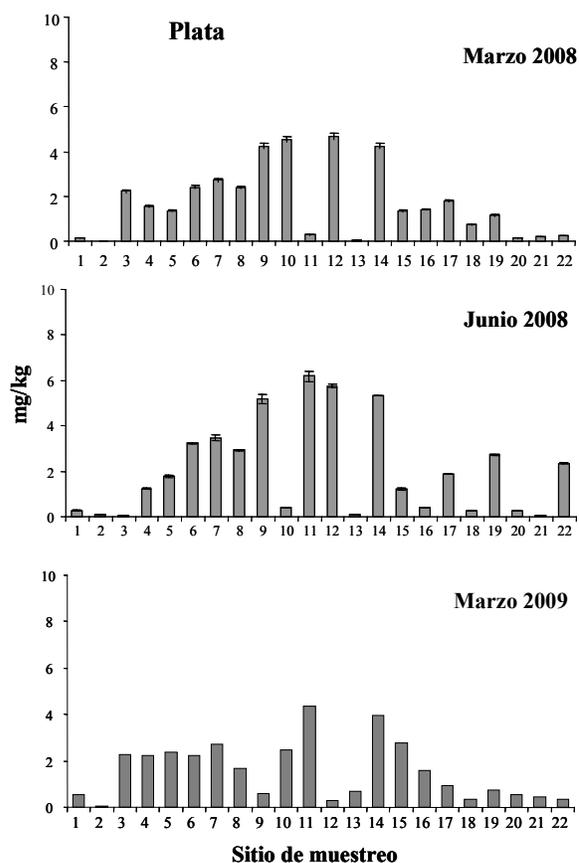
Para observar mejor la distribución de elementos en lodos a lo largo del río Lerma en el Estado de Guanajuato, en las Figuras 32 y 33 se presentan estos datos para As, Cr, V, Pb y Ag. De manera general, los perfiles de distribución de mayoría de metales/metaloides presentan la tendencia hacia mayores concentraciones en los sitios de muestreo cercanos a Salamanca y, por lo tanto coinciden con perfiles de distribución de estos elementos en agua y también en plantas. Es de notar que, no se observaron drásticas diferencias en niveles de elementos entre la entrada y salida del río del Estado de Guanajuato. Esto, aunado a bajas concentraciones de los elementos indica que en la cuenca del río Lerma no se presenta la contaminación con metales/metaloides dentro del estado.

**Tabla 14.** Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de lodos del río Lerma (MIII - marzo 2008; MIV – junio 2008; MVI – marzo 2009).

Conc. mg/kg	M III	M IV	M VI	M III	M IV	M VI	M III	M IV	M VI	M III	M IV	M VI
	Vanadio			Cromo			Manganeso			Cobalto		
<b>Promedio</b>	25.5	30.0	17.3	18.0	20.7	14.8	458	645	329	7.69	8.99	7.22
<b>DE</b>	9.61	13.1	7.65	7.45	9.61	6.58	280	430	214	2.59	3.77	2.09
<b>Mínimo</b>	12.1	14.1	10.4	6.16	7.59	4.85	43.9	54.6	52.8	2.68	3.18	3.57
<b>Máximo</b>	55.4	69.6	37.5	32.9	41.5	26.7	1007	1693	899	14.5	18.1	12.4
	Níquel			Cobre			Zinc			Arsénico		
<b>Promedio</b>	10.1	13.0	8.72	18.3	22.1	19.7	87.6	114	544	3.13	3.22	2.55
<b>DE</b>	5.41	7.37	3.34	14.2	15.5	20.4	70.1	103	411	1.34	1.65	0.98
<b>Mínimo</b>	2.52	3.55	3.38	4.78	6.00	3.47	28.6	32.0	107	1.32	1.14	0.76
<b>Máximo</b>	26.5	35.2	14.8	52.1	54.9	91.5	253	344	1780*	6.53	8.32	4.48
	Selenio			Molibdeno			Plata			Cadmio		
<b>Promedio</b>	3.31	2.48	2.42	0.12	0.17	0.09	1.73	2.04	1.56	0.15	0.08	0.14
<b>DE</b>	1.79	1.68	1.01	0.14	0.13	0.07	1.55	2.12	1.24	0.16	0.14	0.13
<b>Mínimo</b>	1.46	0.86	0.82	0.02	0.02	0.02	Ne	0.02	0.06	0.02	ne	ne
<b>Máximo</b>	9.17	8.75	5.01	0.61	0.54	0.31	4.67	6.23	4.37	0.70	0.50	0.49
	Antimonio			Bario			Mercurio			Talio		
<b>promedio</b>	0.13	0.09	0.01	159	197	183	0.74	0.16	0.64	0.32	0.20	0.15
<b>DE</b>	0.12	0.02	0.01	56.3	75.0	82.5	0.28	0.20	0.81	0.14	0.16	0.05
<b>Mínimo</b>	0.08	0.06	ne	75.0	96.5	44.9	0.46	ne	0.07	0.16	0.04	0.06
<b>Máximo</b>	0.68	0.14	0.02	254	335	311	1.79	0.73	3.68	0.82	0.70	0.27
	Plomo			Torio			Uranio					
<b>promedio</b>	11.2	16.0	13.7	6.82	4.21	9.26	0.87	0.90	0.74			
<b>DE</b>	5.06	11.2	6.82	1.74	1.40	4.78	0.43	0.53	0.42			
<b>Mínimo</b>	4.60	6.09	4.09	3.87	2.54	2.79	0.39	0.32	0.18			
<b>Máximo</b>	20.5	61.1	24.9	11.0	7.83	18.1	2.07	2.68	1.97			



**Figura 32.** Niveles de concentración de As, V, Cr, Pb en lodos, encontrados en MIII, MIV y MVI.



**Figura 33.** Niveles de concentración de Ag en lodos, correspondientes a los muestreos MIII, MIV y MVI.

#### IV.2.5. Resumen de los resultados obtenidos en plantas

Para la determinación de los contenidos totales, se siguió la metodología desarrollada anteriormente y descrita en el manual de toma de muestras. Cada análisis se llevó por triplicado y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 15.

Cabe mencionar que, para el control de exactitud se utilizó el material de referencia certificado NIST 1572 (*Citrus leaves*). Debido a alto costo de este tipo de materiales y la necesidad de contar con la suficiente cantidad, se realizó un estudio enfocado en la elaboración de un posible candidato a muestra de referencia para su uso en el análisis de material de plantas.

En el desarrollo experimental, se obtuvieron cultivos hidropónicos de cebolla agregando al medio de cultivo sales de metales pesados. Después de la cosecha de partes verdes, se realizó su homogeneización, liofilización, caracterización de los niveles de V, Cr, Mn, Ni, Cu, As, Se, Mo, Cd, Hg, Pb, U en el material obtenido así como pruebas de homogeneidad y estabilidad. Los resultados obtenidos permiten el uso de material como muestra control en las pruebas internas de exactitud.

En cuanto a los resultados de los análisis realizados en plantas provenientes de las orillas del río Lerma, en primer lugar es importante que los niveles de elementos encontrados fueron generalmente bajos. Además se observa que las muestras de raíces contenían relativamente más altas concentraciones de elementos respecto las hojas. Los resultados obtenidos fueron comparados con los valores reportados en bibliografía para plantas no-acumuladoras y no-contaminadas (Tabla 16). Como se puede observar en las dos Tablas (Tabla 15 y Tabla 16), en todas muestras analizadas, los niveles de Mn, Co, Cu, As, Se, Cd y Hg fueron más bajos o comparables respecto a los niveles reportados. Por otro lado, prácticamente para todos elementos, sus niveles más altos correspondieron a Salamanca (Figura 34). En estas muestras, los niveles de V, Cr, Ni, Zn, Mo, Ag, Sb, Ba, Pb, Th y U fueron más altos que los reportados en bibliografía.

**Tabla 15.** Resultados de determinación de elementos en raíces y hojas de nopal.

Sitio	Raíz, concentración promedio, mg kg <sup>-1</sup>																	
	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Ag	Cd	Sb	Ba	Hg	Pb	Th	U
1	0.33	0.3	54.3	0.51	0.8	2.35	400	0.01	0.36	0.03	<LD	<LD	<LD	25.3	0.04	0.14	0.09	0.11
2	0.70	1.8	37.7	0.16	0.6	1.98	9.7	0.04	0.07	0.12	<LD	<LD	<LD	22.0	<LD	0.33	0.19	0.12
7	0.11	4.3	8.5	0.08	2.1	4.01	33.0	0.11	0.84	5.97	0.06	0.10	0.08	28.9	0.08	1.76	0.51	0.27
8	0.48	1.6	29.2	0.21	1.4	2.07	114	0.04	0.16	0.10	<LD	<LD	<LD	40.3	<LD	0.22	0.10	0.03
9	0.32	1.8	24.7	0.16	0.9	2.49	113	0.05	0.20	0.23	<LD	<LD	<LD	70.1	<LD	0.27	0.12	0.04
11	<b>0.87</b>	<b>17.6</b>	<b>327</b>	<b>0.82</b>	<b>12.5</b>	<b>3.91</b>	<b>746</b>	<b>0.14</b>	<b>1.11</b>	<b>2.61</b>	<b>0.07</b>	<b>0.13</b>	<b>0.24</b>	<b>144</b>	<b>0.10</b>	<b>2.25</b>	<b>0.65</b>	<b>0.34</b>
15	0.40	3.3	52.9	0.24	2.3	4.81	304	0.01	0.24	0.51	<LD	<LD	<LD	57.8	<LD	0.24	0.08	0.07
21	0.57	1.0	29.7	0.11	0.5	7.92	629	0.03	0.48	0.08	<LD	<LD	<LD	20.2	<LD	0.12	<LD	0.09
22	0.53	10.9	14.9	0.35	7.0	5.45	163	0.04	0.19	1.32	<LD	<LD	<LD	16.4	<LD	0.57	0.08	0.06
Sitio	Hojas, concentración promedio, mg kg <sup>-1</sup>																	
	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Ag	Cd	Sb	Ba	Hg	Pb	Th	U
1	0.30	0.1	41.8	0.13	0.6	3.15	313	0.02	0.21	0.09	<LD	<LD	<LD	51.6	<LD	0.13	<LD	0.08
2	0.16	0.8	8.7	0.12	1.1	2.20	205	0.01	0.24	0.09	<LD	<LD	<LD	50.1	<LD	0.17	0.09	<LD
7	0.30	4.1	27.3	0.68	3.9	3.85	267	0.02	0.19	0.50	<LD	0.10	<LD	25.1	<LD	0.58	<LD	0.06
8	0.63	0.5	51.9	0.34	0.8	1.63	705	0.04	0.48	0.08	<LD	<LD	<LD	15.4	<LD	0.63	0.07	0.10
9	0.09	1.6	119	0.11	1.9	2.57	19.5	0.00	0.00	0.24	<LD	<LD	<LD	20.4	<LD	0.09	<LD	<LD
11	<b>0.41</b>	<b>4.9</b>	<b>156</b>	<b>0.45</b>	<b>5.9</b>	<b>3.92</b>	<b>363</b>	<b>0.06</b>	<b>0.41</b>	<b>1.23</b>	<b>0.03</b>	<b>0.06</b>	<b>0.11</b>	<b>108</b>	<b>0.05</b>	<b>0.18</b>	<LD	<b>0.16</b>
15	0.39	0.4	7.4	0.10	0.5	4.81	33.5	0.03	0.07	0.09	<LD	<LD	<LD	6.6	<LD	0.18	0.06	<LD
21	0.39	11.4	77.3	0.27	7.9	6.99	5.4	0.05	0.01	1.27	<LD	<LD	<LD	12.8	<LD	0.20	<LD	<LD
22	0.29	14.6	101	0.37	10.4	6.54	134	0.05	0.09	2.11	<LD	0.06	0.20	25.2	<LD	0.75	<LD	<LD

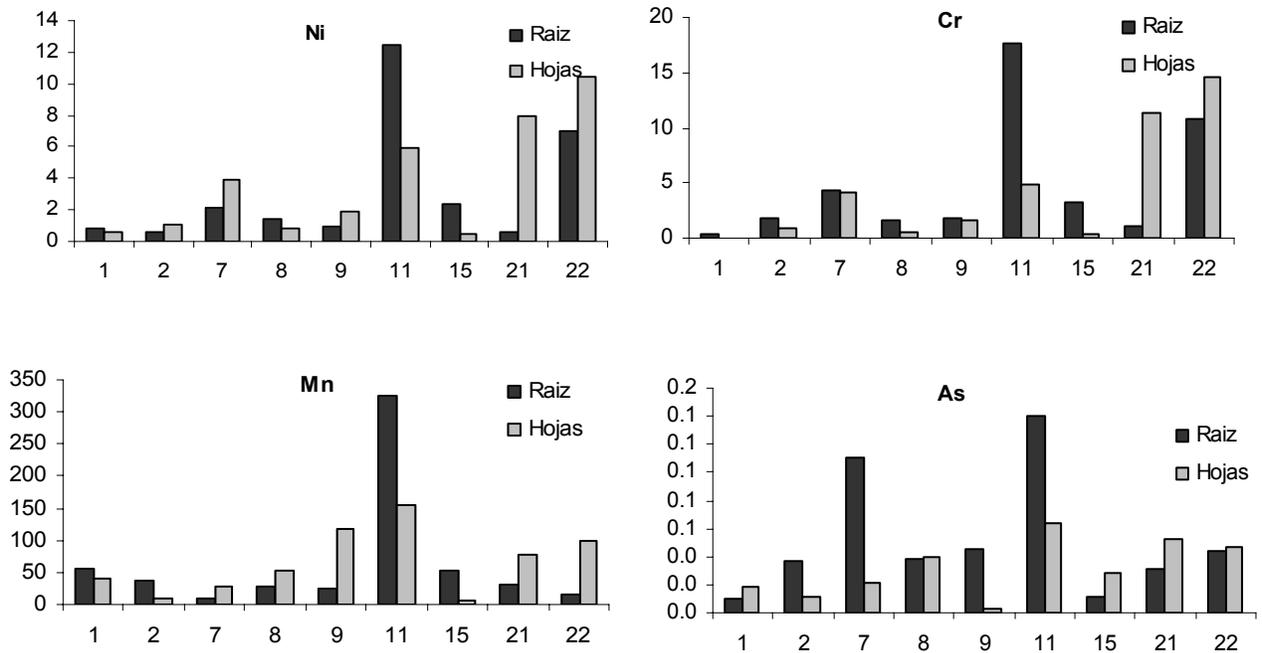
Recolectados en los sitios 1, 2, 7, 8, 9, 11, 15, 21, 22 durante el segundo muestreo (Octubre 2007). Los valores promedios fueron obtenidos en base a análisis de tres sub-muestras.

LD-Límite de detección, calculado como 3 veces la desviación estándar del blanco, dividido entre la pendiente de la curva de calibración.

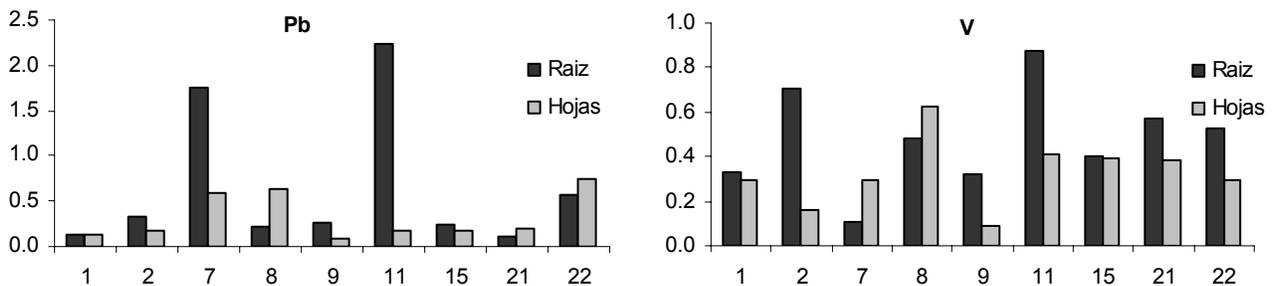
Parece relevante, que los niveles de los mismos elementos en agua de río Lerma fueron también relativamente mayores en Salamanca respecto a otros sitios de muestreo. Para algunos elementos (Cr, Ni, Mo) se encontraron relativamente altos niveles a la salida del río Lerma del Estado (Tabla 15). También es de notar que los niveles de Ba fueron elevados en todas muestras de plantas analizadas. Los resultados obtenidos para U y Th confirman la presencia de estos dos elementos en la región de Guanajuato, aunque sus niveles se distribuyen de manera relativamente uniforme y no son preocupantes.

**Tabla 16.** Niveles de concentración de los elementos del estudio reportados en plantas silvestres (no-acumuladoras) provenientes de los sitios no contaminados.

<b>Elemento</b>	<b>Concentración, mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Referencias</b>
Vanadio	< 0.5	(181, 182)
Cromo	<1	(183-185)
Manganeso	< 2200	(183-185)
Cobalto	< 3	(186)
Níquel	< 5	(183-186)
Cobre	< 30	(183-186)
Zinc	< 500	(183, 185)
Arsénico	< 1	(187)
Selenio	< 1	(186, 188, 189)
Molibdeno	< 0.4	(183)
Plata	< 0.05	(190)
Cadmio	< 0.3	(183, 185, 187, 191)
Antimonio	< 0.03	(183)
Bario	< 32	(183)
Mercurio	< 0.2	(187)
Plomo	<2	(183, 185, 187, 191)
Torio	< 0.1	(190)
Uranio	< 0.15	(190)

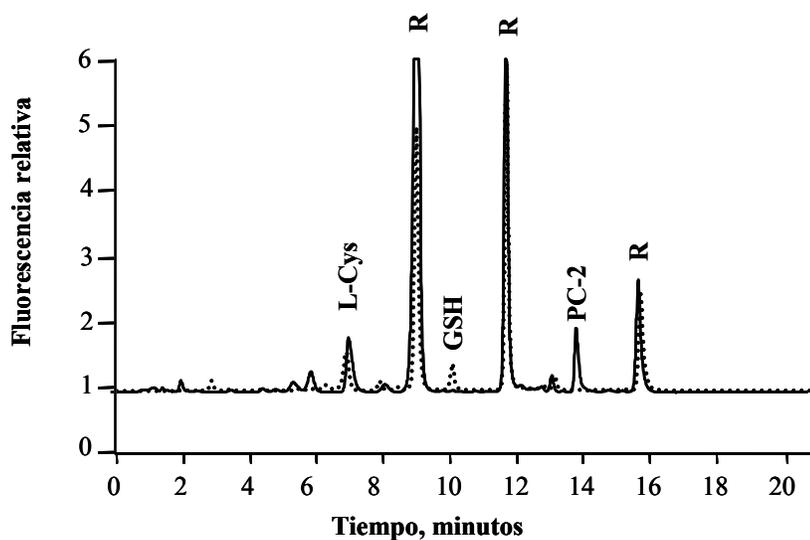


**Figura 34.** Niveles de concentración de algunos elementos en raíces y hojas de nopal recolectados en nueve sitios de muestreo (muestreo II – octubre 2007).



**Figura 35.** Niveles de concentración de algunos elementos en raíces y hojas de nopal recolectados en nueve sitios de muestreo (muestreo II – octubre 2007).

Se llevó a cabo el análisis por HPLC-FLD descrito en la sección V.1.7 para determinar si las plantas recolectadas en los muestreos del río Lerma sintetizaron PCs, sin embargo dadas las bajas concentraciones de los elementos tóxicos no fue posible observar PCs en ninguna muestra, en la Figura 36 se muestra el cromatograma de una planta tomada en el muestreo del río Lerma y como referencia un cromatograma de *S. cerevisiae* (levadura en la que se detectó PC-2 en la sección V.1) para comparación.



**Figura 36.** Análisis de PCs por HPLC-FLD en muestras de levadura (—) y en raíz de una planta colectada en el sitio 11 de muestreo (Salida de salamanca). Los compuestos identificados son: L-Cys, Cisteína; GSH, Glutathiona reducida; PC2; y R corresponde al monobromobimano sin reaccionar e hidrolizado.

Debido a que no se detectó la presencia de PCs en plantas silvestres recolectadas en el área de estudio I, se procedió al análisis de plantas y suelos provenientes de la ciudad de Guanajuato.

### **IV.3. Resultados obtenidos en los análisis realizados en muestras provenientes de la ciudad de Guanajuato, (área de estudio II).**

La ciudad de Guanajuato capital ha sido desde épocas coloniales una importante zona minera en la que se ha extraído plata y oro. La geoquímica de esta región se ha estudiado extensivamente (30-33, 192, 193). Existen reportes de extracción de muchos metales y metaloides en la región. Como consecuencia, las plantas que crecen en este ambiente han sido expuestas de manera crónica a diferentes metales pesados en niveles de moderados a altos.

La síntesis de fitoquelatinas ocurre en algunas plantas como respuesta a las altas concentraciones de algunos metales y metaloides. Dado que en la plantas provenientes del río Lerma, no se detectó la presencia de las PCs, para seguir con investigación y estudiar los parámetros medio ambientales que influyen en la síntesis de las fitoquelatinas, se decidió continuar con los estudios tomando como muestras las plantas comunes en la ciudad de Guanajuato capital, donde es más posible encontrar suelos contaminados con metales pesados, Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo fueron publicados en los artículos: “*Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico*” , “*Analysis of phytochelatin in nopal (Opuntia ficus): a metallomics approach in the soil–plant system*”. Así como en el capítulo titulado “*Phytochelatin in the wild plants from Guanajuato city – an important silver and Gold mining center in Mexico*” que forma parte del libro “*Causes and effects of heavy metal pollution*” que forman parte del anexo I (194-196).

#### **IV.3.1 Estudios preliminares**

Como primera prueba se recolectaron muestras de raíz de dos plantas comunes en la región. Se tomaron raíces de higuera (*Ricinus communis*) y de girasol común o chotol (*Tithonia diversifolia*). Las muestras fueron colectadas en tres diferentes sitios de la ciudad de Guanajuato, estos sitios fueron elegidos para asegurar diferentes niveles de metales pesados en los suelos donde se recolectaron las plantas. Así, el sitio 1 corresponde un lugar donde en el pasado se llevó a cabo el beneficio de plata. El sitio 2 se encuentra en el río Guanajuato cerca de las minas, y el sitio 3 se encuentra en un lugar relativamente lejano a las minas. Las raíces

de las plantas fueron recolectadas en septiembre (época de lluvias) en cada sitio de muestreo las plantas recolectadas fueron de tamaño y coloración similar, así mismo ambas especies fueron tomadas de una superficie menor a nueve metros cuadrados para asegurar las mismas condiciones de crecimiento en ambas plantas. En paralelo fue tomada la tierra adyacente a las raíces de cada planta. La toma de muestras se realizó siguiendo el protocolo de toma de muestras antes descrito en la sección III.5.1.2 y III.5.1.3.

Se determinó el contenido de cobre, cadmio, plata y plomo en las muestras de suelo y raíz de acuerdo al protocolo descrito en la sección anterior y los resultados se muestran en la Tabla 17. Las concentraciones en suelo fueron dentro de los rangos reportados (31) sin embargo se puede observar que el sitio 1 el contenido de Ag, Cu y Pb fue mayor que en los sitios 2 y 3, mientras que el contenido de Cd fue similar en los tres sitios. También es interesante observar que, a pesar de crecer en el mismo suelo, las raíces de *R. communis* acumularon mayor cantidad de elementos que las raíces de *T. diversifolia*, esto ocurrió en todos los sitios de muestreo, por lo que parece que los mecanismos homeostáticos de las dos especies son diferentes y resulta interesante la comparación.

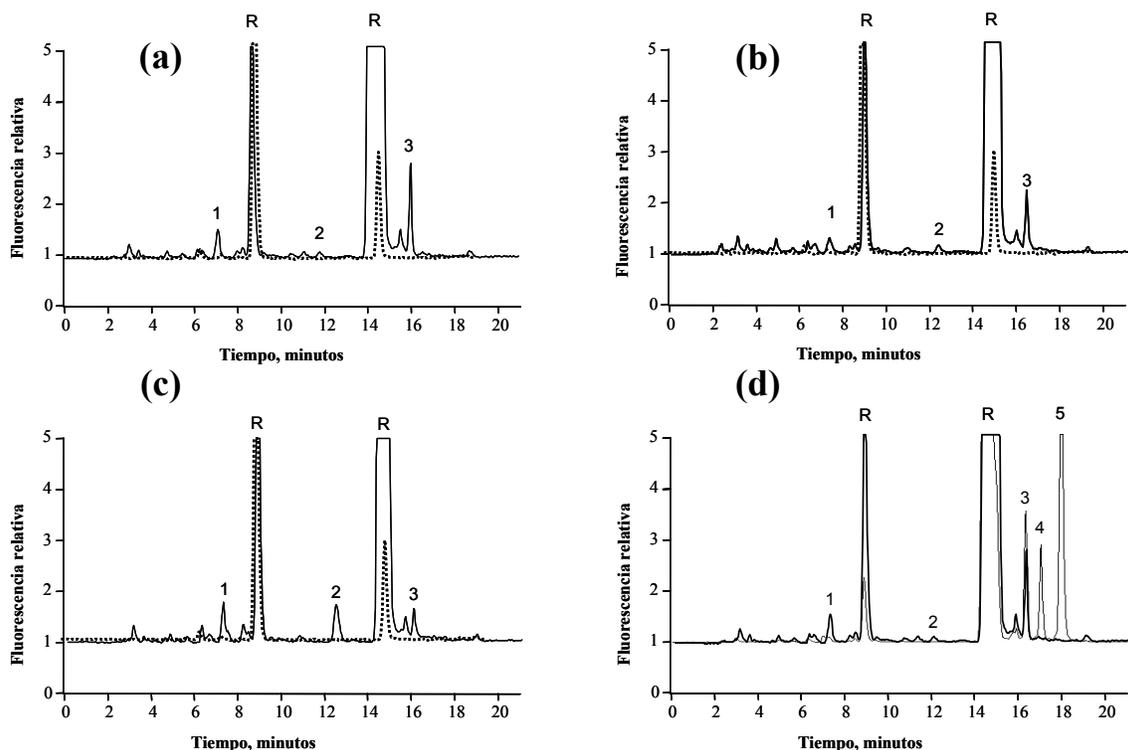
**Tabla 17.** Resultados de las determinaciones de Ag, Cd, Cu y Pb en suelos y raíces de plantas.

Muestra	Sitio de muestreo	Ag	Cd	Cu	Pb
<b>Muestras de suelo <math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>					
Suelos	1	42.20 $\pm$ 0.65	0.373 $\pm$ 0.018	221 $\pm$ 7	362 $\pm$ 8
	2	3.40 $\pm$ 0.07	0.483 $\pm$ 0.010	20.6 $\pm$ 1.0	194 $\pm$ 7
	3	3.20 $\pm$ 0.32	0.296 $\pm$ 0.011	17.0 $\pm$ 0.5	19.4 $\pm$ 0.5
<b>Raíces ng g<sup>-1</sup></b>					
<i>R. communis</i>	1	131 $\pm$ 6	16 $\pm$ 3	2580 $\pm$ 80	2740 $\pm$ 60
	2	141 $\pm$ 9	123 $\pm$ 8	2600 $\pm$ 70	1720 $\pm$ 50
	3	85 $\pm$ 6	12 $\pm$ 2	992 $\pm$ 17	198 $\pm$ 6
<i>T. diversifolia</i>	1	23 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1	530 $\pm$ 16	805 $\pm$ 18
	2	35 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2	592 $\pm$ 20	445 $\pm$ 10
	3	< LD	< LD	187 $\pm$ 7	20.5 $\pm$ 0.6

Se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación estándar (n = 3).

LD-Límite de detección, calculado como 3 veces la desviación estándar del blanco, dividido entre la pendiente de la curva de calibración.

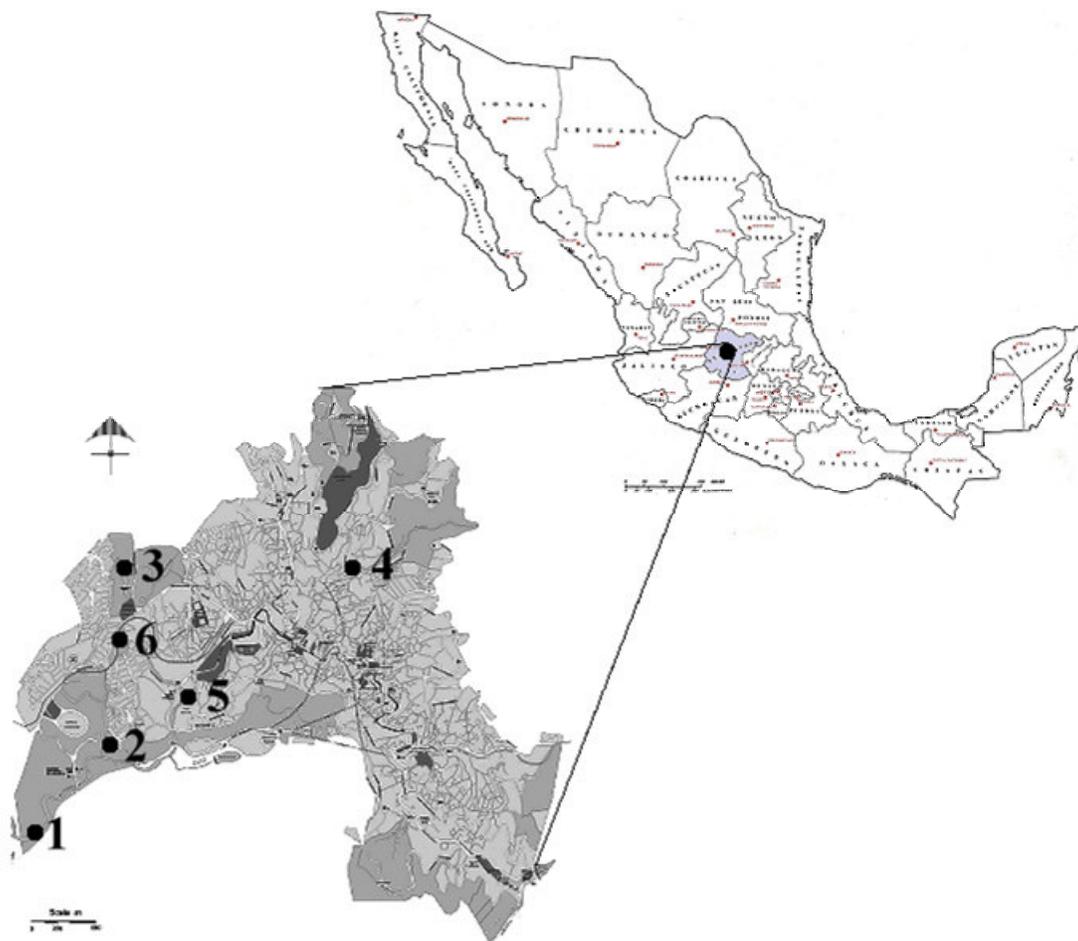
Se obtuvieron extractos de raíces de las dos plantas recolectadas en tres sitios de toma de muestras y se llevó a cabo el análisis de fitoquelatinas según el procedimiento desarrollado (sección III.6.7.). En la Figura 37 se observan los cromatogramas obtenidos para extractos de *R. communis* y *T. diversifolia*, en los tres lugares de muestreo, así como un cromatograma de estándares de PC-1, PC-2 y PC-3 sobreexpuesto a la muestra de *R. communis* del sitio 1. Se puede observar la señal cromatográfica correspondiente a PC-2 en todos los extractos de raíz de *R. communis*. Por otro lado en los extractos de *T. diversifolia* solo se observaron las señales correspondientes a cisteína y glutatona. Es de notar la diferencia en magnitud de la señal de PC-2 en los tres sitios de muestreo, siendo este mayor en el sitio 1. Puesto que el sitio 1 presenta concentraciones mayores de metales en suelos, los resultados obtenidos sugieren que los niveles altos (Tabla 17) favorecen la síntesis de PCs. De manera general, los resultados obtenidos en el análisis de las dos especies de plantas sugieren que los mecanismos defensivos y homeostáticos de diferentes especies vegetales, pueden o no incluir la síntesis de PCs como parte integral de los mecanismos de adaptación a suelos con concentraciones moderadas y altas de metales pesados.



**Figura 37.** (a), (b) y (c).-Cromatogramas de extractos de *R. communis* (—) y *T. diversifolia* (---) en los sitios de muestreo 1, 2 y 3. (d).-Cromatograma de estándares de PC-2, PC-3 y PC-4 (---), sobreexpuesto al cromatograma de *R. communis* del sitio 1 (—). Los compuestos identificados son: **1** Cisteína, **2** Glutaciona, **3** PC-2, **4** PC-3 y **5** PC-4. R, corresponde a la señales del monobromobimano sin reaccionar e hidrolizado.

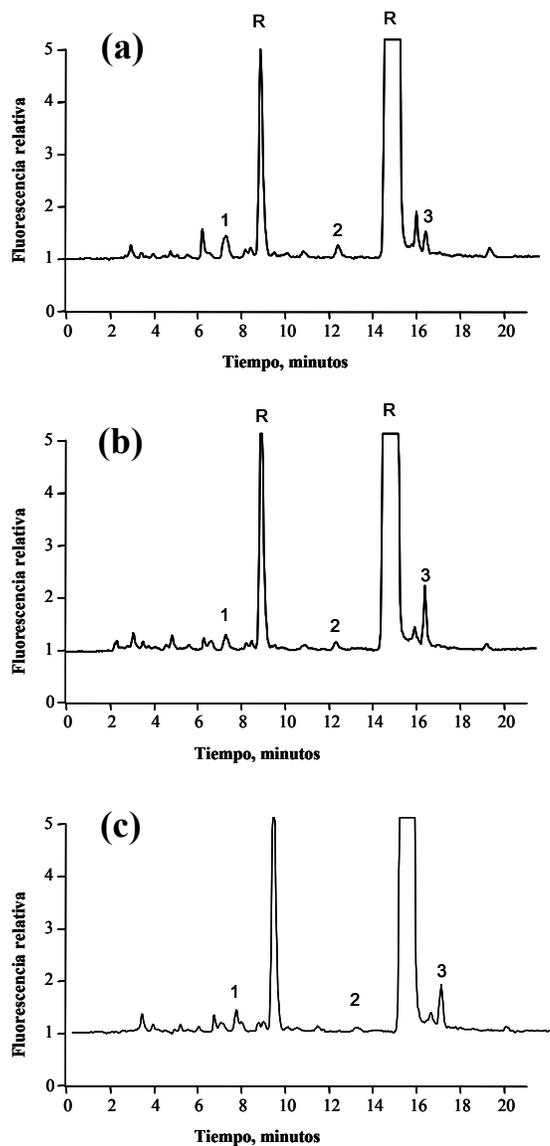
#### IV.3.2. Análisis de PCs en muestras de *R. communis*.

En este momento de la investigación se decidió enfocar el estudio en la planta *R. communis*, debido a que esta planta es capaz de sintetizar las PCs al crecer en ambientes naturales. Se amplió el estudio tomando muestras de *R. communis* en 3 sitios más, en la ciudad de Guanajuato. Los sitios fueron: 4 cerca del centro de la ciudad, 5 área urbana cercana al lugar donde se realizaba beneficio de metales y 6 cerca de el río pero alejado de la zona minera. En la Figura 38 se puede observar la ubicación en un mapa de los lugares de muestreo.



**Figura 38.** Mapa de localización de los lugares de muestreo, para el análisis de *R.communis* en la Ciudad de Guanajuato.

Se analizaron las muestras de raíz provenientes de los lugares de muestreo adicionales y se confirmó la presencia de PCs en todas las muestras. En la Figura 39 se muestran los cromatogramas correspondientes al análisis por HPLC-FLD de las muestras de raíz provenientes de los sitios 4, 5 y 6.



**Figura 39.** (a), (b) y (c).-Cromatogramas de extractos de *R. communis* provenientes de los sitios 4, 5 y 6. Los compuestos identificados son: **1** Cisteína, **2** Glutaciona y **3** PC-2.

Uno de los objetivos del trabajo ha sido investigar el efecto de los parámetros medio ambientales en la producción de las PCs en plantas. La propuesta original en este sentido ha sido investigar el posible efecto de las sustancias húmicas presentes en los suelos con los iones metálicos. La asociación de iones metálicos con las sustancias húmicas ha sido bien

documentada con el siguiente orden de afinidad para los cationes polivalentes:  $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Co(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Cr(III)} \gg (\text{Mn(II)}, \text{Mo(VI)}, \text{Zn(II)})$  (197, 198). Debido a esta asociación se ha propuesto que las sustancias húmicas pueden afectar la biodisponibilidad de metales y de esta manera influir en su captación por las plantas y participar en el proceso de inducción de PCs.

Para tomar en cuenta el posible efecto de las sustancias húmicas en la biodisponibilidad de los elementos estudiados, se llevó a cabo la determinación espectrofotométrica del contenido de sustancias húmicas presentes en las muestras de suelo. Además, los extractos alcalinos fueron analizados mediante la cromatografía de exclusión por tamaño molecular con dos detectores conectados en línea:

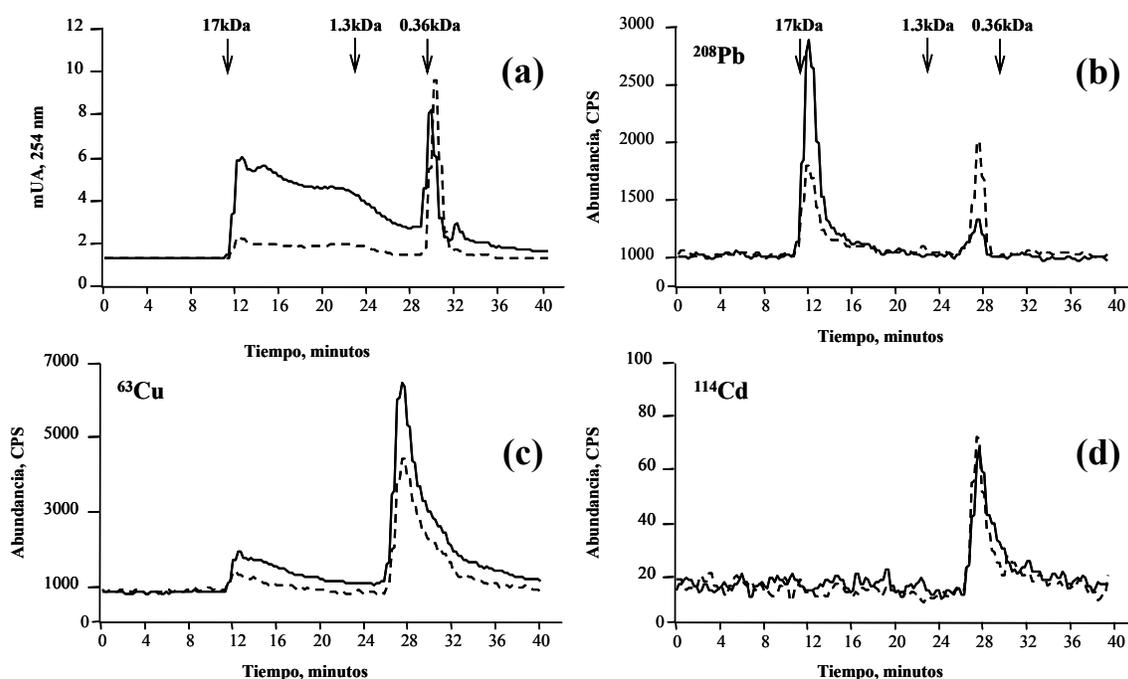
1. UV, para obtener el perfil de elección de las fracciones de masas moleculares correspondientes a la materia orgánica.
2. ICP-MS, con el fin de obtener el perfil de elución de los metales.

Los resultados obtenidos permitieron evaluar semicuantitativamente la asociación de los iones plata, cadmio, cobre y plomo con las sustancias húmicas de los suelos. La determinación de las sustancias húmicas del suelo describe en la sección III.6.6.

En la Figura 40 se presentan cromatogramas SEC de los extractos de suelo provenientes de los sitios 5 y 6, con detección UV a 254 nm (Figura 40 a) y con detección específica de metales por ICP-MS (Figura 40 b). En esta Figura se observa, el perfil de elución típico de los ácidos húmicos en ambos extractos (148). Sin embargo, son notables las diferencias entre las áreas de los picos cromatográficos en la región de las fracciones correspondientes a masas moleculares altas dependiendo del sitio de muestreo. En concreto se observa una menor concentración de sustancias húmicas en la muestra correspondiente al sitio 6 con respecto a las muestra del sitio 5. Estos resultados están en concordancia con los resultados de la Tabla 19, donde se presentan los niveles de sustancias húmicas totales determinados por el procedimiento espectrofotométrico.

Por otro lado, en las figuras 40b y 40c se puede observar la distribución de Pb y Cu en dos fracciones: de alta masa molecular unidas a las sustancias húmicas y de baja masa molecular correspondiente a formas libres o compuestos de baja masa molecular. Independientemente del sitio de muestreo la distribución relativa de Pb en los compuestos de alta masa molecular fue mayor que para Cu. Adicionalmente la distribución relativa del Pb fue afectada por el contenido de sustancias húmicas (Figura 40, a y b). En concreto, a mayor concentración de SH, menor proporción de Pb fue eluido en la región de baja masa molecular, lo confirma el acomplejamiento del Pb por las sustancias húmicas en suelos

El perfil de elución del Cd indica su presencia en compuestos de baja masa molecular, por lo que se considera que este elemento no es enlazado por las sustancias húmicas en el suelo.



**Figura 40.** Cromatogramas típicos de exclusión por tamaño molecular de extractos de suelo: (—) sitio 5 y (---) sitio 6. (a) detección Uv a 254 nm; (b)–(d) detección ICP-MS, isótopos monitoreados:  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  y  $^{114}\text{Cd}$ . Las flechas indican los tiempos de elución correspondientes a los marcadores de masa molecular.

Se evaluó la asociación de cada uno de los iones metálicos con las sustancias húmicas como el porcentaje del área del cromatograma correspondiente a la elución de compuestos de alta masa molecular para cada ion, que de acuerdo a los marcadores de masas molecular corresponden al intervalo de 12 a 20 minutos. Estos resultados, junto con los contenidos de PCs presentes en las raíces y la cantidad de sustancias húmicas presentes en el suelo se resumen en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Fitoquelatinas (PC-2) determinadas en extractos de raíz de *R. communis*; contenido de sustancias húmicas en los suelos y distribución relativa de elementos en la fracción correspondiente a las sustancias húmicas, en cromatografía de exclusión por tamaño molecular

Sitio	PC-2, mg Kg-1	SH mg Kg-1	Asociación de elementos con las SH		
			Cd	Cu	Pb
1	2.3	481	< LD	1.4	14
2	5.1	415	< LD	15	100
3	0.5	1345	< LD	24	72
4	28	372	< LD	7.4	59
5	2.2	553	< LD	17	94
6	35	143	< LD	32	27

Basado en la relación entre el área medida en la región de alto peso molecular contra el área total del cromatograma, para cada ion.

LD-Límite de detección, calculado como 3 veces la desviación estándar del blanco, dividido entre la pendiente de la curva de calibración.

Con los resultados obtenidos se llevó a cabo un análisis estadístico de correlación, usando como variables: el contenido de PCs en raíces, el contenido total de Ag, Cu, Cd y Pb en suelos y en raíces, así como el contenido de sustancias húmicas de los suelos. En la Figura 41 se muestra la matriz de correlación obtenida ( $r$  = coeficiente de correlación y  $p$  = nivel de probabilidad). En primer lugar se observa la correlación positiva de significancia estadística entre el contenido de Cd y Ag en suelos y su contenido en raíces ( $r = 0.8092$ ,  $p = 0.051$  y  $r = 0.9261$ ,  $p = 0.009$ ), mientras que para Pb y Cu la correlación y la probabilidad no son estadísticamente significativas ( $r = 0.5232$ ,  $p = 0.287$  y  $r = 0.5849$ ,  $p = 0.223$ ). Esto sugiere la captación directa del Cd y Ag de los suelos, mientras que para el Cu y el Pb la captación no es simplemente proporcional a la concentración de los elementos en el suelo.

Por otro lado se observó una correlación inversa de significancia estadística entre el contenido de sustancias húmicas del suelo y la concentración de elementos contenidos en las raíces, la significancia estadística de dicha correlación fue en el siguiente orden  $Cu > Pb > Cd > Ag$  ( $r = -0.7457, p = 0.089$ ;  $r = -0.6558, p = 0.157$ ;  $r = -0.5280, p = 0.282$ ;  $r = -0.2084, p = 0.692$ , respectivamente). Es interesante notar que el orden decreciente de la significancia estadística va de acuerdo a lo reportado para la afinidad de las sustancias húmicas hacia los iones metálicos. Estos resultados sugieren que los elementos fuertemente unidos a las sustancias húmica son menos biodisponibles para *R. communis* por lo que la captación de estos elementos se ve disminuida. Esto se confirma al notar que no existe una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de Cu y Pb en suelos (fuertemente unidos a las SH) y el contenido de los mismos elementos en raíces; correlación que sí existe en los elementos unidos en menor grado con las SH (Ag y Cd).

En la revisión bibliográfica se ha visto que hasta la fecha no hay ningún reporte sobre la posible relación entre de los niveles de sustancias húmicas en los suelos y la producción de PCs en plantas. Los resultados obtenidos en este trabajo indican claramente que para la planta *R. communis*, existe una correlación inversa entre estos dos parámetros ( $r = -0.7825, p = 0.066$ ).

De los cuatro metales estudiados, el contenido Cd en suelos y en raíces presentan una fuerte correlación positiva con el contenido de PC-2 ( $r = 0.7857, p = 0.064$  y  $r = 0.9395, p = 0.005$ , respectivamente). Para el plomo solo existió una correlación de de significancia estadística entre su contenido en raíces y el contenido de PC-2 ( $r = 0.9573, p = 0.003$ ). En el caso de Ag y Cu sus niveles en suelo y en planta no fueron correlacionados con los contenidos de PCs. Esto sugiere que el plomo y el cadmio son importantes en la síntesis de PCs. Sin embargo la falta de correlación entre el plomo en suelos y los contenidos de PC-2 confirma la capacidad de las sustancias húmicas para disminuir la captación de este elemento por *R. communis*. En resumen, a pesar de que el Pb aparentemente es uno de los elementos importantes en la síntesis de PCs, su acomplejamiento por las sustancias húmicas en los suelos impide la captación de este elemento por la planta, y es por ello que no existe la correlación directa entre los niveles de Pb en suelo y la producción de PCs en plantas.

Variable	SH	PC-2	Cu Suelo	Ag Suelo	Cd Suelo	Pb Suelo	Cu Planta	Ag Planta	Cd Planta	Pb Planta
SH	1 p = —									
PC-2	<b>-0.783</b> <b>p = .066</b>	1 p = —								
Cu Suelo	-0.433 p = .392	0.2267 p = .666	1 p = —							
Ag Suelo	-0.356 p = .489	0.3502 p = .496	0.4128 p = .416	1 p = —						
Cd Suelo	-0.559 p = .249	<b>0.7857</b> <b>p = .064</b>	0.0711 p = .894	0.4133 p = .415	1 p = —					
Pb Suelo	-0.256 p = .625	0.4261 p = .400	0.4076 p = .422	-0.2804 p = .590	0.4728 p = .344	1 p = —				
Cu Planta	<b>-0.746</b> <b>p = .089</b>	0.3376 p = .513	0.5849 p = .223	0.6787 p = .138	0.1535 p = .772	-0.2427 p = .643	1 p = —			
Ag Planta	-0.208 p = .692	0.0262 p = .961	0.5174 p = .293	<b>0.9216</b> <b>p = .009</b>	0.1752 p = .740	-0.3298 p = .523	0.6976 p = .123	1 p = —		
Cd Planta	-0.528 p = .282	<b>0.9395</b> <b>p = .005</b>	0.0309 p = .954	0.276 p = .597	<b>0.8092</b> <b>p = .051</b>	0.4465 p = .375	0.0398 p = .940	-0.0866 p = .870	1 p = —	
Pb Planta	<b>-0.656</b> <b>p = .100</b>	<b>0.9573</b> <b>p = .003</b>	0.124 p = .815	0.3185 p = .538	0.9115 p = .011	0.5232 p = .287	0.1577 p = .765	-0.0019 p = .997	<b>0.9664</b> <b>p = .002</b>	1 p = —

**Figura 41.-** Matriz de correlación obtenida con los parámetros medidos en las muestras de suelo y raíz de *R. communis*, en los 6 sitios de muestreo en la ciudad de Guanajuato. El nivel de significancia estadística establecido fue de  $p \leq 0.1$ .

### IV.3.3. Análisis de muestras de *Opuntia ficus*.

Tras haber detectado PCs en la higuera y haber establecido la importancia de la especie (genotipo) así como de las sustancias húmicas del suelo, en la síntesis de PCs, se planteó la posibilidad de estudiar más características del suelo importantes en la síntesis de PCs, determinar si las PCs se encuentran solo en las raíces, así como encontrar otras especies capaces de sintetizar PCs en la ciudad de Guanajuato.

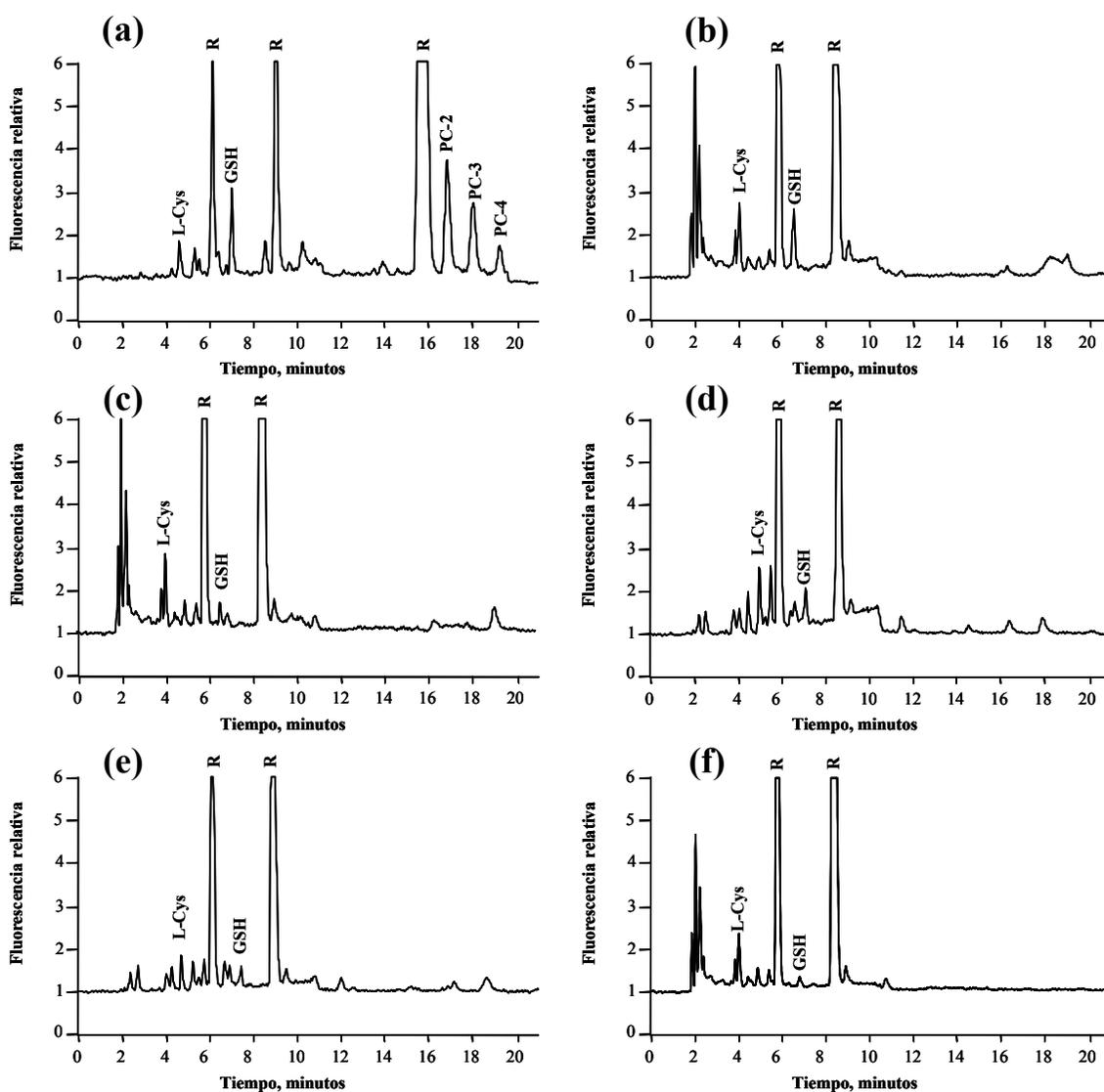
#### IV.3.3.1. Estudios preliminares

Con el fin de encontrar otras especies vegetales capaces de sintetizar las PCs en condiciones naturales se tomaron raíces de acuerdo al protocolo de toma de muestras descrito en la sección V.2.2.3, de las siguientes especies comunes:

- Chicalote.-*Argemone chroleuca*
- Cactus.-*Lophocereus schotti*
- Castillo.-*Leonotis nepetifolia*
- Sábila.-*Aloe vera*
- Nopal.-*Opuntia ficus*
- Maguey.- *Agave potatorum*

Se obtuvieron los extractos de plantas, mismos que analizados por HPLC-FLD, como se describe en la sección III.6.7. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 42, donde se puede apreciar la presencia de PCs en la raíz de nopal, en una concentración mucho mayor a la encontrada anteriormente en la higuera (ver Figura 37 y 39). Mientras que en las demás muestras analizadas se observaron la cisteína y glutatona en diferentes concentraciones. En los cromatogramas correspondientes a *Lophocereus schotti*, *Leonotis nepetifolia* y *Argemone ochroleuca* se observa la elución de compuestos con tiempos de retención correspondientes a los de PCs, sin embargo las señales fueron de baja intensidad, lo que no permitió su cuantificación. Con estos resultados se decidió tomar muestras de raíz y hoja de nopales en lugares cercanos a los sitios de muestreo ya establecidos para la *R. communis*, cabe

mencionar que no fue posible tomar muestras de nopal dentro del perímetro de muestreo de *R. communis*, ya que la higuera crece en suelos húmedos y con materia orgánica visible, mientras que los nopales crecen principalmente en suelos áridos. A pesar de esto se recolectaron las muestras lo más cerca posible de los lugares antes estudiados. Se tomaron muestras en los sitios 1, 2, 3 y 4 del estudio anterior. Con el objeto de tener un punto de comparación entre el ambiente contaminado (Ciudad de Guanajuato) y un ambiente con niveles bajos de metales pesados, se tomaron también muestras de una zona no contaminada, en el estado de Yucatán a 40 Km. de la ciudad de Mérida y se denominó para este estudio como sitio 5.



**Figura42.** Cromatogramas obtenidos a partir de las muestras: (a) Nopal, (b) Sávila, (c) Castillo, (d) Chicalote, (e) Cactus y (f) Maguey. Análisis por HPLC-FLD.

Se realizaron los siguientes análisis para cumplir con los objetivos del estudio:

1. La determinación de PCs totales en cada muestra (hojas y raíces).
2. El fraccionamiento de los extractos neutro de la muestras d plantas mediante la cromatografía de exclusión por tamaño molecular, con detección UV-Vis e ICP-MS.

### VI.3.3.2. Resultados analíticos obtenidos en muestras de *O. ficus*.

Los resultados obtenidos permitieron por un lado tener datos cuantitativos de PCs totales y por otro lado conocer la distribución de Cu, Pb, Ag y Cd en las fracciones de masa molecular en los mismos extractos con el fin de evaluar la asociación con las PCs. Se decidió tomar en cuenta para los estudios a los mismos elementos antes estudiados (Ag, Cu, Cd y Pb) por su capacidad reportada para inducir la síntesis de PCs y por su presencia en los suelos de la ciudad de Guanajuato.

También se decidió llevar a cabo una extracción secuencial de metales en las muestras de suelos, ya que este estudio de especiación operacional es útil para conocer la distribución de los elementos en fracciones de compuestos de diferente solubilidad, y de esta manera estimar su biodisponibilidad para las plantas. Puesto que las sustancias húmicas fueron relacionadas con la síntesis de PCs en *R. communis* en el estudio anterior, se decidió cuantificar su contenido en las nuevas muestras de suelo. Se contempló además la medición del pH como otro factor a estudiar dentro de la caracterización de los suelos.

Los resultados obtenidos en el análisis de extractos de *O. ficus* por HPLC-FLD muestran la presencia de PCs en las muestras de nopal provenientes de la Ciudad de Guanajuato. Las PCs se cuantificaron como la suma total de PC-2, PC-3 y PC-4 y los resultados se muestran en la Tabla 19. Es interesante notar la presencia de PCs en las hojas de nopal, aunque siempre en concentraciones menores respecto a raíz. Las concentraciones de PCs fueron diferentes dependiendo del sitio de muestreo. En la muestra tomada en Yucatán no se detectaron PCs, lo que sugiere que la presencia y, en su caso el nivel de concentración de las PCs en *O. ficus* podría servir como marcador de la contaminación de los suelos por metales pesados.

**Tabla 19.** Resultado del análisis de PCs totales en raíces y hojas de *O. ficus*.

Sitio de muestreo	µg de PCs totales por gramo de planta liofilizada y homogenizada.	
	Raíces	Hojas
1	12.2 ± 0.4	8.4 ± 0.6
2	16.8 ± 0.4	10.0 ± 0.3
3	27.7 ± 0.3	10.4 ± 0.2
4	74.3 ± 0.3	20.3 ± 0.2
5	nd	nd

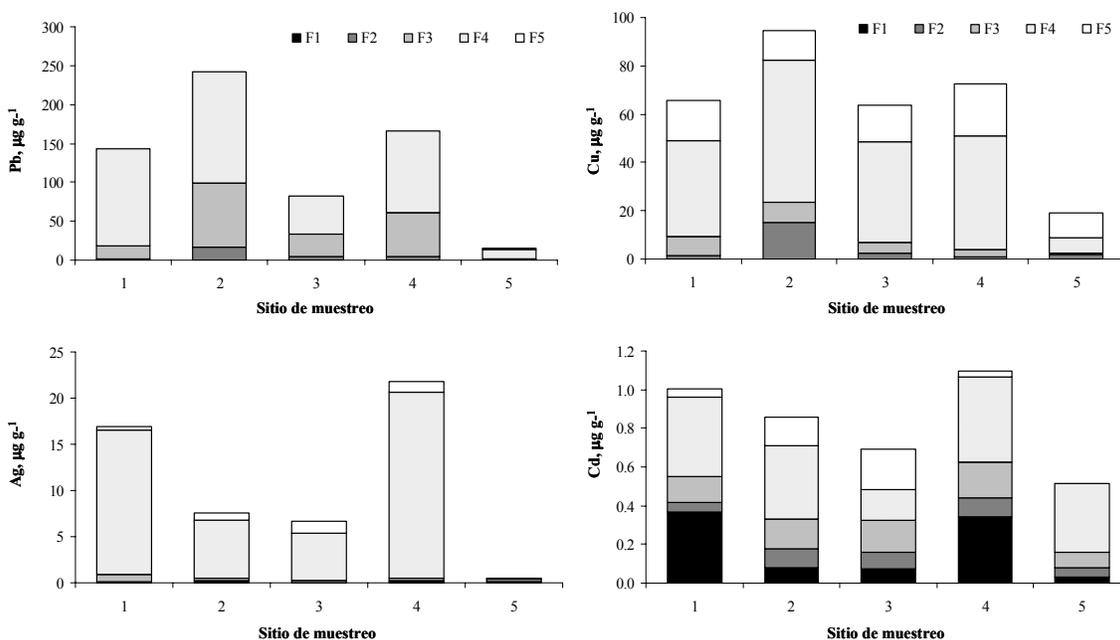
Valor promedio ± desviación estándar, expresados como la suma de PC-2, PC-3 y PC-4. Se usó la calibración externa con GSH y se aplicó un factor de corrección para cada compuesto. nd- No detectadas.

Los valores de pH de los suelos recolectados junto a las raíces de nopal presentaron una variabilidad menor al 2% con valores entre pH 7.7 y pH 8, en las muestras de la ciudad de Guanajuato, mientras que para las muestras tomadas en el estado de Yucatán el pH fue entre 8 y 8.1. En los extractos obtenidos por el método Tessier (127) se llevó a cabo la determinación de Ag, Cd, Pb y Cu, por ICP-MS en cada uno de los casos.

La recuperación obtenida en las extracciones secuenciales, definida como el cociente de la suma de los contenidos en cada una de las fracciones y el resultado obtenido en el análisis del contenido total (digestión convencional) fue del 82 al 104 % para los cuatro elementos. Los resultados obtenidos en el análisis de los extractos para cada sitio se muestran en la Figura 43, donde se puede apreciar que la concentración de elementos fue mayor en las muestras provenientes de la ciudad de Guanajuato con respecto a las concentraciones determinadas en la muestra proveniente de Yucatán. Por otro lado existieron diferencias substanciales entre muestras de diferentes sitios. El Pb fue el elemento más abundante en las muestras de suelo (concentración máxima cerca del río Guanajuato, 248.7 mg g<sup>-1</sup>, sitio 2) los niveles de cobre fueron generalmente menores con el valor máximo también encontrado en el sitio 2 (97.5 mg g<sup>-1</sup>), los niveles de plata fueron entre 4 y 5 veces menores a los encontrados para cubrir (valor máximo 24.3 mg g<sup>-1</sup>, en el sitio cuatro) y el cadmio se encontró en concentraciones menores a 1.2 mg g<sup>-1</sup> en cualquier sitio. La distribución relativa de los elementos en las diferentes fracciones fue diferente. Para cada uno de los cuatro sitios, la mayor contribución relativa de Pb y Cu se observó en la fracción F4, en la cual se extraen las formas de metales asociados a

sulfuros y/o con materia orgánica. Estos dos metales se encontraron en menor cantidad en la fracción F2, unidos a carbonatos. Mientras que su contribución en la F1 correspondiente a la fracción libre intercambiable fue mucho más baja.

En suelos de Guanajuato, se determinó una considerable parte del Pb en la fracción correspondiente a los óxidos de hierro y manganeso, F3. Para la plata prácticamente la totalidad el elemento fue unida a la materia orgánica y sulfuros, F4. La concentración de cadmio en los suelos fue muy baja comparada con otros metales, sin embargo se observó una distribución relativamente uniforme de este elemento entre las fracciones F1-F5, como ejemplo se puede observar en los sitios uno y cuatro que la distribución relativa del cadmio libre fue de 36% y 32% respectivamente.



**Figura 43.** Distribución de los elementos en las 5 fracciones extraídas de las muestras de suelo provenientes de los 5 sitios de muestreo, resultados expresados en µg de elemento por gramo de suelo seco.

Como información indispensable para este estudio se determinó el contenido total de elementos en las muestras de raíz y hojas de nopal de los lugares de muestreo por ICP-MS, de

acuerdo a lo descrito en la sección III.6.2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20. Como era de esperarse las muestras provenientes de Yucatán (sitio 5) presentan concentraciones de elementos más bajas con respecto a las muestras obtenidas en la ciudad de Guanajuato. El contenido de Cd en todos los casos fue menor a  $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ , por lo que no fue tomado en cuenta para el análisis estadístico de resultados.

**Tabla 20.** Resultados de las determinaciones de Cu, Ag, Cd y Pb en las muestras de hoja y raíz de *O. ficus*, obtenidos por ICP-MS.

Tipo de muestra	Sitio de muestreo	$\mu\text{g g}^{-1}$ del elemento en tejido liofilizado y homogenizado			
		Cu	Ag	Cd	Pb
Raíces	1	6.49	8.79	0.73	9.25
	2	5.75	5.32	0.32	7.48
	3	4.05	0.89	0.17	5.81
	4	5.03	27.2	0.22	6.39
	5	2.70	1.23	0.13	2.32
Hojas	1	8.81	0.82	0.48	5.70
	2	4.06	10.8	0.25	1.73
	3	7.85	3.54	0.21	4.90
	4	4.83	4.64	0.19	7.89
	5	1.76	0.23	0.12	0.80

Contenidos totales de elementos encontrados en muestras liofilizadas y homogenizadas; por sitio de muestreo.

Utilizando los valores de concentración total de elementos en material de plantas y los encontrados en las fracciones F1-F5 del suelo, se procedió a buscar correlaciones para determinar cuales son las formas de los elementos en suelos importantes para la captación de elementos por la planta.

No se encontraron correlaciones de significancia estadística entre los niveles de concentración en suelo y en hojas. Los parámetros de correlación (R.-coeficiente de correlación, P.-nivel de probabilidad) obtenidos en el análisis de correlación de los niveles de concentración totales en raíces, suelos y en extractos de suelos se muestran en la Tabla 21. En primer lugar es de notar la falta de correlación de significancia estadística entre niveles de Cu y Pb en suelo y los contenidos en raíz ( $r=0.7321$ ,  $p=0.176$  y  $r=0.8169$ ,  $p=0.091$ , respectivamente).

**Tabla 21.** Análisis de correlación, entre los contenidos de elementos determinados en las fracciones de suelo y los encontrados en las muestras de raíz.

	<b>Pb</b>	<b>Cu</b>	<b>Ag</b>
<b>Suelo Vs Raíz</b>	$r = 0.7321$ $p = 0.176$	$r = 0.8169$ $p = 0.091$	$r = 0.9368$ $p = 0.019$
<b>F1 Vs Raíz</b>	<i>ne</i>	<i>ne</i>	<i>ne</i>
<b>F2 Vs Raíz</b>	<i>ne</i>	<i>ne</i>	<i>ne</i>
<b>F3 Vs Raíz</b>	<i>ne</i>	<i>ne</i>	<i>ne</i>
<b>F4 Vs Raíz</b>	$r = 0.8436$ $p = 0.072$	$r = 0.8648$ $p = 0.058$	$r = 0.8842$ $p = 0.046$

*r*- Coeficiente de correlación.

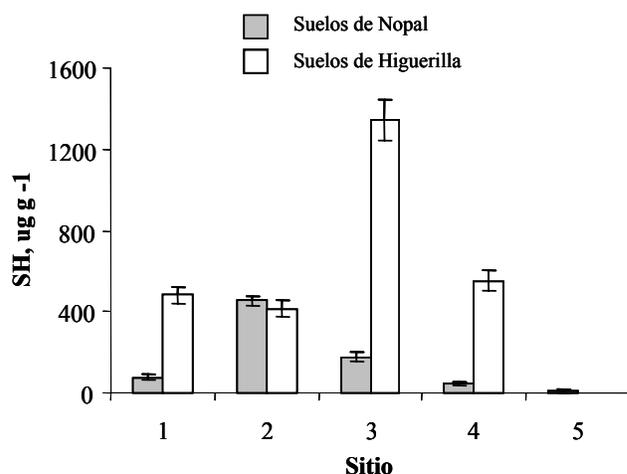
*p*- Nivel de probabilidad

*ne*- Significancia estadística no encontrada.

Más aún, no se encontró correlación con importancia estadística entre ningún metal en las fracciones F1 (intercambiable), F2 (carbonatos) y F3 (óxidos de hierro y manganeso) o F5 (fracción residual) y los metales en raíces, lo que indican que estas fracciones no son importantes para en la captación de cobre, plomo y plata por las plantas.

Por otro lado se encontró una correlación de significancia estadística entre los metales contenidos en las fracciones F4 y los metales en raíces ( $r = 0.8436$ ,  $p = 0.072$  para Pb;  $r = 0.8648$ ,  $p = 0.058$  para Cu y  $r = 0.8842$ ,  $p = 0.046$  para Ag, Tabla 23), lo que sugiere que la fracción unida a la materia orgánica y los sulfuros (F4) es más biodisponible para el nopal.

Para tener información de la cantidad de sustancias húmicas (principal componente orgánico del suelo), se llevó a cabo la determinación del contenido de sustancias húmicas de las muestras de suelo, por el método espectrofotométrico descrito en la sección III.6.6. Los resultados se muestran en la Figura 44, donde son comparados con los resultados obtenidos en los suelos en los que se recolectaron las muestras de *R. communis* y *T. diversifolia*. Como ya se había mencionado los suelos donde crece el nopal suelen ser más áridos que los suelos donde crecen la higuera y el chotol por lo que los contenidos de SH son menores.



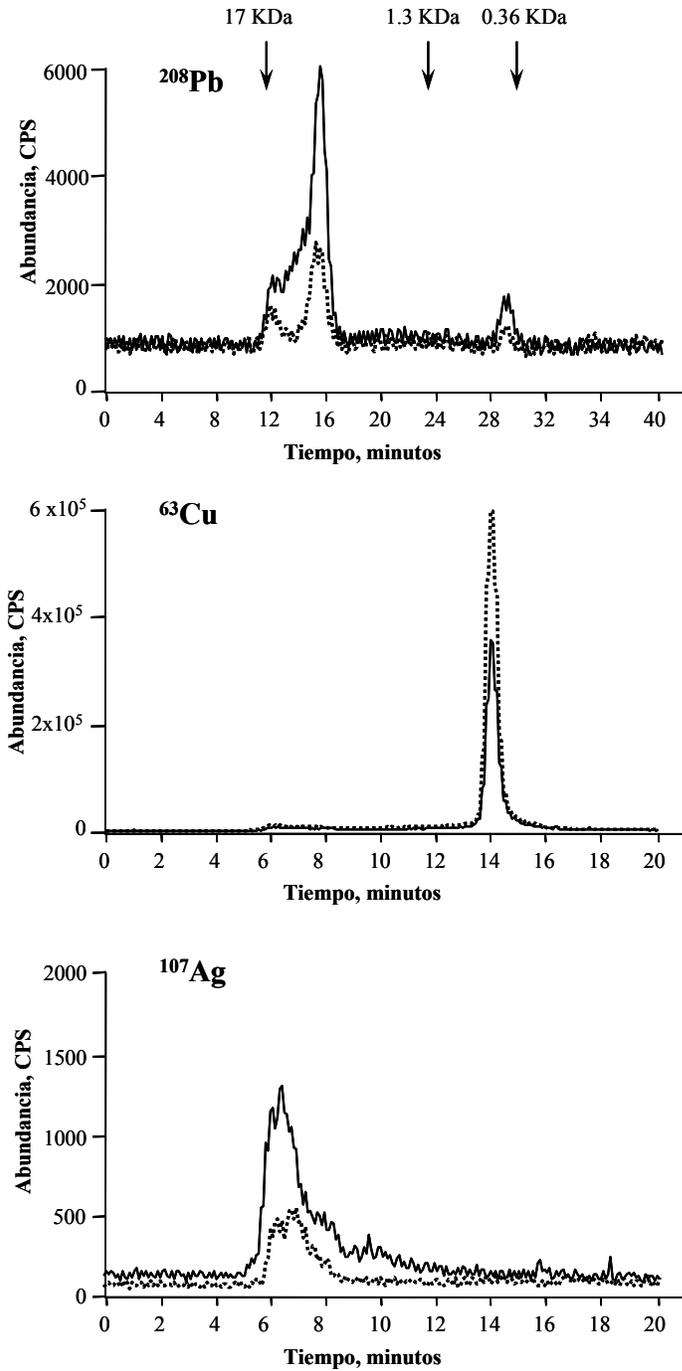
**Figura 44.** Comparación entre los niveles de concentración de sustancias húmicas encontrado en los suelos cercanos a las muestras de *O. ficus* y los encontrados en las muestras de *T. diversifolia*.

Estos resultados sugieren que, al no haber una cantidad apreciable de materia orgánica en los suelos de crecimiento del nopal, la fracción F4 que se correlacionó con los contenidos de elementos en raíces, corresponde en realidad a sulfuros metálicos, abundantes en la región de Guanajuato (30, 31). En concreto aparentemente los sulfuros de plomo, cobre y plata son las fuentes primarias de estos elementos en suelos cercanos a las raíces de los nopales (como máximo 20 cm desde las raíces).

La solubilidad de estos compuestos es en general baja, por lo que los procesos en la esfera rizosomal, en particular la exudación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, pueden contribuir en la movilización de sulfuros metálicos haciéndolos disponibles para raíces de algunas plantas (36). Sin embargo para *O. ficus* no se ha encontrado ningún reporte específico acerca de este tema, publicado hasta la fecha. Por otro lado se ha reportado la contribución de bacterias y hongos en los procesos que se llevan a cabo en la interfase suelo-raíz de algunas plantas, siendo factores que incrementan la biodisponibilidad de metales (36, 40).

Para obtener información acerca de la asociación de los metales con las fitoquelatinas en los extractos de plantas, se realizó una extracción con acetato de amonio (pH 7.4), ya que en estas condiciones los complejos PC-M son estables, y los extractos se separaron por

cromatografía de exclusión por tamaño molecular. El uso de dos detectores en línea (UV e ICP-MS) permitió obtener información sobre la asociación de metales con compuestos de diferentes masas moleculares. Un ejemplo de los cromatogramas obtenidos se presenta en la Figura 45, correspondiente al sitio 3 la ciudad de Guanajuato. Debido a las bajas concentraciones presentes tanto en suelos como en raíces y hojas, el cadmio no fue detectado. Para Pb se encontraron niveles menores en las hojas comparado con las raíces, y su elución fue en dos regiones: la primera, de alto peso molecular (entre 75-95% del Pb total eluido de la columna) y la segunda región correspondiente los compuestos de bajo peso molecular. Para el cobre solamente se observó un pico eluido en la región de bajo peso molecular, y a diferencia del Pb, en muchas muestras la concentración de cobre fue mayor en las hojas que las raíces. El perfil de elución de Ag muestra una asociación con compuestos de alto peso molecular, sin embargo las señales cromatográficas son relativamente anchas e indican una asociación no específica a compuestos de alto peso molecular.



**Figura 45.** Cromatogramas obtenidos por SEC-ICP-MS, de los extractos neutros de raíz (—) y Hoja (---) de nopal del sitio 3, en la ciudad de Guanajuato. Las flechas indican los tiempos de elución correspondientes a los marcadores de masa molecular.

Basado en las mediciones de área obtenidas de los cromatogramas, se estimó la distribución relativa de los tres metales entre las regiones de alta masa molecular (asociados a PCS) y baja masa molecular para cada muestra. Se llevó a cabo el análisis de correlación tomando estos datos y los resultados de la cuantificación de fitoquelatinas totales en raíces y hojas, lo que permitió complementar la información necesaria para determinar la importancia de cada elemento en la síntesis de fitoquelatinas en un ambiente natural.

Es importante resaltar que resulta difícil distinguir entre los elementos importantes en la síntesis de fitoquelatinas de aquellos que son simplemente unidos a las fitoquelatinas existentes. En este trabajo se propuso considerar la correlación entre contenidos totales de fitoquelatinas y el contenido de metales unidos a las fitoquelatinas (eluidos en la región de alto peso molecular) como indicador de su importancia en la inducción de fitoquelatinas. Para el Pb se observó una correlación significativa entre contenido total de fitoquelatinas y las áreas por SEC-ICP-MS, ( $r=0.7026$ ,  $p = 0.088$  para raíces, y  $r = 0.8581$ ,  $p = 0.071$  para hojas). Más aún, la concentración de fitoquelatinas se correlacionó con el Pb eluido en la región de alto peso molecular ( $r = 0.6835$ ,  $p = 0.023$  para raíces y  $r = 0.8818$ ,  $p = 0.048$  para hojas). Estos resultados confirman la asociación del Pb con las fitoquelatinas en nopal y sugieren importancia de este elemento en el proceso de inducción de las fitoquelatinas. Para el cobre sólo se observó una correlación entre contenido total de fitoquelatinas y el área total de los cromatogramas en raíces ( $r = 0.7568$ ,  $p = 0.129$ ) y entre el contenido total de fitoquelatinas y las fracciones de alto peso molecular en raíces ( $r=0.7455$ ,  $p= 0.138$ ). Aparentemente el cobre pudiera estar involucrado en la inducción de fitoquelatinas en raíces sin embargo su transporte dentro de la planta es diferente respecto Pb. No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre la plata y el contenido de fitoquelatinas indicando que este elemento no se asocia con la producción de fitoquelatinas.

# **CONCLUSIONES**

## V. CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo ha sido contribuir en el avance del conocimiento sobre la formación de fitoquelatinas en plantas silvestres, provenientes de ambientes naturales, donde se encuentran expuestas de manera crónica a una variedad de los parámetros medio ambientales tales como variables niveles de concentración de especies metálicas, materia orgánica, condiciones de pH, etc. Se recolectaron diferentes plantas comunes de la región de Guanajuato, tomando las muestras en dos áreas: Área I - correspondiente al cauce del río Lerma por el Estado de Guanajuato (22 sitios) y Área II – cinco sitios en la ciudad de Guanajuato. Adicionalmente, en los mismos sitios se tomaron muestras de suelos y, en el Área I también se tomaron muestras de agua superficial de del río Lerma. La idea original fue aplicar diferentes tipos de procedimientos para el análisis de las muestras recolectadas y, con base en los resultados obtenidos, realizar el análisis estadístico de datos con el fin de encontrar posibles correlaciones entre los parámetros estudiados y de esta manera conocer mejor el proceso de captación de metales por plantas y el proceso de formación de fitoquelatinas en estos organismos. En concreto, se llevaron a cabo los siguientes tipos de análisis:

- determinación de los niveles de concentración totales de metales en suelos, plantas (raíces y hojas) y en agua superficial de río Lerma mediante ICP-MS. En las muestras del Área I, los elementos determinados fueron antimonio, arsénico, bario, cadmio, cobalto, cobre, cromo, manganeso, mercurio, molibdeno, níquel, plata, plomo, selenio, talio, torio, uranio, vanadio y zinc; mientras que en Área II el estudio se enfocó en el análisis de plomo, cobre, cadmio y plata;

- determinación de metales en fracciones de suelo obtenidos mediante el método de lixiviación secuencial de Tessier;

- evaluación de distribución de especies metálicas en diferentes fracciones de masa molecular en extractos alcalinos de suelos (asociación de metales con sustancias húmicas) mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular con dos detectores en línea: UV e ICP-MS;

- determinación de fitoquelatinas totales en extractos de raíces y hojas mediante la cromatografía de líquidos en fase inversa con la detección espectrofluorimétrica;

- evaluación de distribución de especies metálicas en diferentes fracciones de masa molecular en extractos neutros de plantas (asociación de metales con fitoquelatinas) mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular con dos detectores en línea: UV e ICP-MS;
- determinación de sustancias húmicas en el suelo y mediciones de pH del suelo.

En la parte del análisis estadístico se llevaron a cabo los análisis de correlación y el análisis por el método multivariante de componente principal (PCA).

Los resultados obtenidos han permitido formular una serie de conclusiones que se presentan a continuación.

### **V.1. Conclusiones analíticas:**

1. Se desarrolló un nuevo procedimiento para la determinación de fitoquelatinas totales en muestras biológicas, en el que se lleva a cabo liofilización y homogeneización de la muestra, seguidas por la extracción de las PCs y eliminación de iones metálicos potencialmente asociados a estos compuestos, reducción con el fin de tener grupos tiol libres (-SH), derivatización pre-columna con monobromobimano y la separación en fase inversa con detección espectrofluorimétrica. Este procedimiento fue basado en aquellos reportados anteriormente, sin embargo durante el desarrollo de trabajo, se propusieron algunas modificaciones de tal manera que en tan solo 18 min (70 minutos en reportes anteriores) se obtuvo una buena resolución de los compuestos de interés (incluyendo formas PC-2, PC-3 y PC-4).
2. Se adaptaron los procedimientos por SEC – UV/ICP-MS a las condiciones del análisis de suelo y de material de plantas, lo que permitió conocer la distribución relativa de metales entre diferentes fracciones de masa molecular y de esta manera evaluar su asociación con sustancias húmicas en suelos y con fitoquelatinas en plantas.
3. Se implementó el procedimiento de determinación de 19 metales y metaloides en agua superficial, mediante ICP-MS, mismo que fue elaborado con base en el método EPA 6020, aplicable para el análisis por ICP-MS de las concentraciones bajas ( $\mu\text{g L}^{-1}$  e inferiores) de un alto número de elementos (hasta 60) en muestras de agua. En concreto, se seleccionaron

los estándares internos, se establecieron criterios para tuning, para pruebas de precisión y exactitud así como los criterios para asegurar las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad de los resultados. Toda esta información ha sido elaborada en forma de un manual de procedimiento.

4. Es bien establecido que, el uso de los procedimientos que tienen como bases diferentes principios fisicoquímicos y proporcionan información analítica complementaria permite elucidar los mecanismos moleculares responsables por los efectos observados en los organismos vivos. En este sentido, en el presente trabajo se consideró importante determinar fitoquelatinas totales en plantas y, por otro lado evaluar la asociación de cada uno de los metales con las fitoquelatinas. Se consideró que, la correlación estadísticamente significativa entre la cantidad (fracción) de un metal asociado con las PCS y la cantidad de PCs totales en la misma planta indicaría que este metal es importante en el proceso de la síntesis de PCs en esta planta. Los resultados obtenidos indicaron, que en la planta de nopal dos elementos (Pb y Cu) aparentemente son importantes en la inducción de las PCs, mientras que otros elementos pueden ser acomplejados por las PCs ya existentes en la planta.

## **V.2. Conclusiones de relevancia biológica:**

1. Se demostró que algunas plantas silvestres, comunes en el estado de Guanajuato, son capaces de sintetizar las fitoquelatinas, cuando crecen en los suelos con moderadas a altas concentraciones de metales pesados. En concreto, la planta de nopal y la higuera son las que producen fitoquelatinas, mientras que otras plantas de estudio tales como *Thitonia Diversifolia*, *Argemone Ochroleuca*, *Lophocereus schotti*, *Leonotis Nepetifolia* y *Aloe vera* no tienen esta capacidad. Al comparar las concentraciones de Ag, Cd, Cu y Pb en las raíces de *R. communis* con las encontradas en *T. diversifolia* (ambas provenientes de los mismos sitios), se observó una mayor acumulación de los cuatro elementos en la planta que sintetiza las PCs. Estos resultados confirman los reportes anteriores que, la habilidad de planta para sintetizar las PCs está relacionada con el genotipo y además, sugieren que la síntesis de las PCs promueve la acumulación de los metales en el tejido de planta.

2. Las PCs fueron detectadas solamente en muestras provenientes del área II del estudio y no en las plantas recolectadas en área I. Puesto que los niveles de metales encontrados en los suelos de la ciudad de Guanajuato fueron mayores respecto a los suelos en cercanía del río Lerma, queda claro que la síntesis de fitoquelatinas depende de la concentración de elementos metálicos en los suelos.
3. En el caso *R. communis*, que crece en suelos con relativamente altos niveles de materia orgánica, el análisis estadístico de correlación de los datos correspondientes a niveles de elementos en las raíces y en suelos, niveles de sustancias húmicas en suelos y las PCs en planta indicó que las sustancias húmicas, al acomplejar los iones metálicos, pueden disminuir su biodisponibilidad para la planta. En particular, se observó la correlación estadísticamente significativa inversa entre los HS en suelo y las PCs en planta. Además, se ha demostrado mayor efecto de las HS en la disminución de captación de Cu y Pb respecto a Cd y Ag, de acuerdo con la decreciente afinidad de estos iones metálicos a las HS. Dichas diferencias en afinidad de iones metálicos con HS fue corroborada mediante los resultados de los análisis de extractos alcalinos de suelo por SEC-ICP-MS.
4. En el caso de *O. ficus*, mediante el fraccionamiento de suelo adyacente a las raíces por el método Tessier y el análisis de correlación de los datos correspondientes a los niveles de metales en cada una de las fracciones obtenidas y en los tejidos de planta se demostró que, las formas de los cuatro metales extraídas en la fracción F4 (materia orgánica y sulfuros) son las que intervienen en la captación de estos metales por planta. Puesto que el nopal crece en los suelos áridos con bajos niveles de materia orgánica y debido a que sulfuros de Cu, Pb, Ag y Cd son poco solubles, se ha propuesto que deben de existir procesos que ocurren en la interfase entre raíz y suelo (rizoesfera) tales como la exudación de ácidos orgánicos por la misma planta o la participación de microorganismos; que faciliten la movilidad de los sulfuros poco solubles. Es importante resaltar que, nopal es la planta, en la que se encontraron más altas concentraciones de las PCs y se detectaron tres formas: PC-2, PC-3 y PC-4.
5. Con base en los resultados obtenidos en el análisis de las PCs por el procedimiento HPLC – FLD (PCs totales) y por el procedimiento SEC – UV/ICP-MS (asociación de metales con las PCs), se propone que algunos elementos presentes en el ambiente donde crece la planta son importantes en la síntesis de las PCs, tal es el caso de Pb y Cu en *O. ficus*, sin embargo,

otros elementos, después de su captación por planta pueden ser acomplejados por las PCs ya existentes. Este punto es importante para entender mejor la situación que ocurre cuando la planta crece en el ambiente natural, donde se encuentra expuesta a la variedad de los elementos que pueden ser captados mediante diferentes mecanismos.

De manera general, los resultados obtenidos en este trabajo permiten proponer que la síntesis de las PCs plantas que crecen en ambientes naturales depende de:

- Genotipo de la planta;
- La concentración total de elementos importantes para el proceso de inducción de las PCs en los suelos;
- Las formas fisicoquímicas actuales de estos elementos en los suelos, incluyendo la importancia de asociación de los iones metálicos con sustancias húmicas;
- Los procesos que ocurren en la rizosfera.

Cabe también mencionar la parte de trabajo, en la que se utilizaron diferentes cepas de levaduras, mismas que sirvieron para poner a punto el procedimiento de determinación de las PCs totales en muestras biológicas (HPLC-FLD). En este caso se demostró que las diferentes especies de levaduras reaccionan de manera diferente ante la presencia de metales pesados. En el caso particular de iones Cd(II) y As(III), las cepas de *S. cerevisiae* presentaron mayor habilidad de inducción de fitoquelatinas, mientras que en exposición a cadmio, la cepa que presentó más bajos niveles de PC-2 fue *C. maltosa* y en la exposición a arsénico, fue la cepa *Y. lipolítica*.

### **V.3. Conclusiones de relevancia medio ambiental:**

En el área I, se llevó a cabo un estudio sistemático con extensión de dos años, lo que permitió evaluar la calidad del agua superficial en el río Lerma, considerando los niveles de 19 elementos metálicos y algunos metaloides. Con base en los resultados obtenidos en seis campañas de muestreo de aguas, tres campañas de muestreo de lodos y dos de plantas se llegó a la conclusión que, en el cauce del río Lerma dentro del estado de Guanajuato los niveles de elementos son generalmente bajos y no se presentan serios problemas de contaminación. Por

otro lado, se han detectado las aportaciones de carácter discontinuo de algunos metales en la región de Salamanca y del desemboque del río Guanajuato. También se observó que los contaminantes se eliminan del estado por el caudal del río, aunque los niveles de concentración encontrados en la salida del río hacia el estado Jalisco no son altos, ya que no sobrepasan los límites permisibles marcados por la normatividad mexicana vigente para el agua de consumo humano.

Los resultados del análisis PCA sugieren que:

1. La aportación de los metales/metaloideos está relacionada con la región geográfica y por lo tanto con las actividades del hombre en estas regiones;
2. El caudal del río introduce al estado de Guanajuato cierta aportación de Hg, Th y Ag del Estado de Querétaro;
3. Dentro del estado de Guanajuato, existen aportaciones de carácter discontinuo de V, As, Mo, Ni, Zn, Mo, Co, principalmente en la región de Salamanca, con cierta contribución por el desemboque del río Guanajuato.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Apostoli, P. (2002) Elements in environmental and occupational medicine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 778, 63-97.
- (2) Quevauviller, P. (2000) *Certified Reference Material: a tool for quality control for elemental speciation analysis*, Caruso, J.A. ed.
- (3) Szpunar, J., Lobinski, R., and Prange, A. (2003) Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems. *Appl Spectrosc* 57, 102A-112A.
- (4) Kushner, D. J. (1993) Effects of speciation of toxic metals on their biological activity. *Water pollution research journal of Canada* 28, 111-128.
- (5) Sanz-Medel, A. (1998) Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 53, 197-211.
- (6) Grill, E., Winnacker, E. L., and Zenk, M. H. (1985) Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230, 674-676.
- (7) Fenik, S. I., Solodushko, V. G., Kaliniak, T. B., and Blum Ia, B. (2007) [The role of Cd-binding proteins and phytochelatins in the formation of cadmium resistance in *Nicotiana plumbaginifolia* cell lines]. *Tsitol Genet* 41, 9-15.
- (8) Pereira Navaza, A., Montes-Bayon, M., LeDuc, D. L., Terry, N., and Sanz-Medel, A. (2006) Study of phytochelatins and other related thiols as complexing biomolecules of As and Cd in wild type and genetically modified *Brassica juncea* plants. *J Mass Spectrom* 41, 323-331.
- (9) Hirata, K., Tsuji, N., and Miyamoto, K. (2005) Biosynthetic Regulation of Phytochelatins, Heavy Metal-Binding Peptides. *J Biosci Bioeng* 100, 593-599.
- (10) Cobbett, C., and Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53, 159-82.
- (11) Koster, M., Reijnders, L., van Oost, N. R., and Peijnenburg, W. J. (2005) Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zinc accumulation in plants and isopods. *Environ Pollut* 133, 103-16.
- (12) Lucho-Constantino, C. A., Prieto-García, F., Del-Razo, L. M., Rodríguez-Vázquez, R., and Poggi-Varaldo, H. M. (2005) Chemical fractionation of boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 108, 57-71
- (13) Chaney, R. L., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., and Baker, A. J. (1997) Phytoremediation of soil metals. *Curr Opin Biotechnol* 8, 279-84.
- (14) Zhang, X. Y., Lin, F. F., Wong, M. T., Feng, X. L., and Wang, K. (2009) Identification of soil heavy metal sources from anthropogenic activities and pollution assessment of Fuyang County, China. *Environ Monit Assess* 154, 439-49.
- (15) Alloway, E. D. (1995) *Heavy Metals in Soils*.
- (16) Järup, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68, 167-182.
- (17) Li, X., Poon, C., and Liu, S. (2001) Heavy metal contamination of urban soils and street dusts in Hong Kong. *Applied Geochemistry* 16, 1361-1368.
- (18) Dragovic, S., and Mihailovic, N. (2008) Analysis of mosses and topsoils for detecting sources of heavy metal pollution: multivariate and enrichment factor analysis. *Environ Monit Assess*.

- (19) Williams, T. P., Bubb, J. M., and Lester, J. N. (1994) Metal accumulation within salt marsh environments: a review. *Marine pollution bulletin* 28, 277-290.
- (20) Manta, D. S., Angelone, M., Bellanca, A., Neri, R., and Sprovieri, M. (2002) Heavy metals in urban soils: a case study from the city of Palermo (Sicily), Italy. *Sci Total Environ* 300, 229-243.
- (21) Miller, J. R., Hudson-Edwards, K. A., Lechler, P. J., Preston, D., and Macklin, M. G. (2004) Heavy metal contamination of water, soil and produce within riverine communities of the Rio Pilcomayo basin, Bolivia. *Sci Total Environ* 320, 189-209.
- (22) Jung, M. C. (2001) Heavy metal contamination of soils and waters in and around the Imcheon Au-Ag mine, Korea. *Appl Geochem* 16, 1369-1375.
- (23) Linde, M., Bengtsson, H., and Oeborn, I. (2001) Concentrations and pools of heavy metals in urban soils in Stockholm, Sweden. *Water Air Soil Poll* 1, 83-101.
- (24) Russo, P., Catassi, A., Cesario, A., Imperatori, A., Rotolo, N., Fini, M., Granone, P., Dominioni, L. (2005) Molecular Mechanisms of Hexavalent Chromium-Induced Apoptosis in Human Bronchoalveolar Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 589-600.
- (25) Vijay, R., and Sihorwala, T. A. (2003) Identification and leaching characteristics of sludge generated from metal pickling and electroplating industries by Toxicity Characteristics Leaching Procedure (TCLP). *Environ Monit Assess* 84, 193-202.
- (26) Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., and Campos, A. (2006) Heavy metals pollution in soils damaged by mining industry. *Ecología Aplicada* 5, 149-155.
- (27) Cataldo, D. A., and Wildung, R. E. (1978) Soil and plant factors influencing the accumulation of heavy metals by plants. *Environ Health Perspect* 27, 149-59.
- (28) Korte, N. E., Skopp, J., Fuller, W. H., Niebla, E. E., and Alesii, B. A. (1976) Trace Element Movement in Soils: Influence of Soil Physical and Chemical Properties. *Soil Science* 122.
- (29) Bang, J., and Hesterberg, D. (2004) Dissolution of trace element contaminants from two coastal plain soils as affected by pH. *J Environ Qual* 33, 891-901.
- (30) Garcia-Meza, V., Ramos, E., Carrillo-Chavez, A., and Duran-de-Bazua, C. (2004) Mineralogical and chemical characterization of historical mine tailings from the Valenciana mine, Guanajuato, Mexico: Environmental implications. *Bull Environ Contam Toxicol* 72, 170-177.
- (31) Carrillo-Chavez, A., Morton-Bermea, O., Gonzalez-Partida, E., Rivas-Solorzano, H., Oesler, G., Garcia-Meza, V., Hernandez, E., Morales, P., and Cienfuegos, E. (2003) Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico. *Ore Geol. Rev.* 23, 277-297.
- (32) Mendoza Amezquita, E. (1999), Universidad Iberoamericana, Campus León.
- (33) Querol, S. F., Lowther, G. K., and Navarro, E. (1991) Mineral deposits of the Guanajuato Mining District, Guanajuato, in *Econ. Geol. Mex., GSA* (Salas, G. P., Ed.) pp 403-414.
- (34) Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475-86.
- (35) Yang, X., Feng, Y., He, Z., and Stoffella, P. J. (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol* 18, 339-53.
- (36) Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53, 1-11.
- (37) Macnair, M. R. (1993) The genetics of metal tolerance in vascular plants plants. *New Phytologist* 124, 541-559.

- (38) Hartley, J., Cairney, J. W. G., and Meharg, A. A. (1997) Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant and Soil* 189, 303–319.
- (39) Colpaert, J., and Assche, J. (1992) Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant and Soil* 143, 201-211.
- (40) Jing, Y., He, Z., and Yang, X. (2007) Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 8, 192-207.
- (41) Lasat, M. M. (2002) Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31, 109-120.
- (42) Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I., and Neumann, D. (1999) Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 154, 536–546.
- (43) Rauser, W. E. (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 31, 19-48.
- (44) Meharg, A. A. (1993) The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum* 88, 191-198.
- (45) Rauser, W. E. (1990) Phytochelatins. *Annu Rev Biochem* 59, 61-86.
- (46) Grill, E. (1987) Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants: characterization and sequence determination. *Experientia Suppl* 52, 317-22.
- (47) Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., and Rea, P. A. (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7110-5.
- (48) Scarano, G., and Morelli, E. (2002) Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Biometals* 15, 145-51.
- (49) DeFlora, S., Morelli, A., Basso, C., Romano, M., Serra, D., DeFlora, A. (1985) Prominent role of DT-diaphorase as a cellular mechanism reducing chromium(VI) and reverting its mutagenicity. *Cancer Res.* 45, 3188-3196.
- (50) Ahner, B. A., Price, N. M., and Morel, F. M. (1994) Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8433-6.
- (51) Rijstenbil, J. W., Sandee, A., Van Drie, J., and Wijnholds, J. A. (1994) Interaction of toxic trace metals and mechanisms of detoxification in the planktonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. *FEMS Microbiol Rev* 14, 387-96.
- (52) Wei, L., Donat, J. R., Fones, G., and Ahner, B. A. (2003) Interactions between Cd, Cu, and Zn influence particulate phytochelatin concentrations in marine phytoplankton: laboratory results and preliminary field data. *Environ Sci Technol* 37, 3609-18.
- (53) Tsuji, N., Hirayanagi, N., Iwabe, O., Namba, T., Tagawa, M., Miyamoto, S., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K., and Miyamoto, K. (2003) Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* 62, 453-9.
- (54) Morelli, E., and Scarano, G. (2001) Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Environ Res* 52, 383-95.

- (55) Jervis, L., Rees-Naesborg, R., and Brown, M. (1997) Biochemical responses of the marine macroalgae *Ulva lactuca* and *Fucus vesiculosus* to cadmium and copper—from sequestration to oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 25, 63S.
- (56) Morelli, E., and Pratesi, E. (1997) Production of phytochelatins in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* in response to copper and cadmium exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* 59, 657-64.
- (57) Morelli, E., Mascherpa, M. C., and Scarano, G. (2005) Biosynthesis of phytochelatins and arsenic accumulation in the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum* in response to arsenate exposure. *Biometals* 18, 587-93.
- (58) Kawakami, S. K., Gledhill, M., and Achterberg, E. P. (2006) Effects of metal combinations on the production of phytochelatins and glutathione by the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*. *Biometals* 19, 51-60.
- (59) Morelli, E., and Fantozzi, L. (2008) Phytochelatins in the diatom *Phaeodactylum tricoratum* Bohlin: an evaluation of their use as biomarkers of metal exposure in marine waters. *Bull Environ Contam Toxicol* 81, 236-41.
- (60) Morelli, E., Marangi, M. L., and Fantozzi, L. (2008) A phytochelatin-based bioassay in marine diatoms useful for the assessment of bioavailability of heavy metals released by polluted sediments. *Environ Int.*
- (61) Wang, M. J., and Wang, W. X. (2008) Temperature-dependent sensitivity of a marine diatom to cadmium stress explained by subcellular distribution and thiol synthesis. *Environ Sci Technol* 42, 8603-8.
- (62) Nemanic, T. M., Leskovsek, H., Horvat, M., Vrizer, B., and Bolje, A. (2002) Organotin compounds in the marine environment of the Bay of Piran, northern Adriatic Sea. *J Environ Monit* 4, 426-30.
- (63) Morris, C. A., Nicolaus, B., Kille, P., and Harwood, J. L. (1998) Genetic mechanisms involved in the adaptation of marine algae to heavy metal pollution. *Biochem Soc Trans* 26, S153.
- (64) Iyer, A., Mody, K., and Jha, B. (2005) Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Mar Pollut Bull* 50, 340-3.
- (65) Schafer, H. J., Haag-Kerwer, A., and Rausch, T. (1998) cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial gamma-glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Mol Biol* 37, 87-97.
- (66) Stillman, M., Shaw, C., Frank, I., and Suzuki, K. (1992) Metallothioneins: Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins, Phytochelatins and Metal-Thiolate Complexes. 443.
- (67) Yu, W., Santhanagopalan, V., Sewell, A. K., Jensen, L. T., and Winge, D. R. (1994) Dominance of metallothionein in metal ion buffering in yeast capable of synthesis of (gamma EC)nG isopeptides. *J Biol Chem* 269, 21010-5.
- (68) Borrelly, G. P., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Cox, S. G., Robinson, N. J., and Whitehall, S. K. (2002) Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277, 30394-400.
- (69) Jaeckel, P., Krauss, G., Menge, S., Schierhorn, A., Rucknagel, P., and Krauss, G. J. (2005) Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 150-5.

- (70) Schroder, P., Lyubenova, L., and Huber, C. (2009) Do heavy metals and metalloids influence the detoxification of organic xenobiotics in plants? *Environ Sci Pollut Res Int.*
- (71) Cheng, Y., Yan, Y. B., and Liu, J. (2005) Spectroscopic characterization of metal bound phytochelatin analogue (Glu-Cys)(4)-Gly. *J Inorg Biochem.*
- (72) Contreras-Ramos, S. M., Alvarez-Bernal, D., Trujillo-Tapia, N., and Dendooven, L. (2004) Composting of tannery effluent with cow manure and wheat straw. *Bioresour Technol* 94, 223-8.
- (73) Klapheck, S., Schlunz, S., and Bergmann, L. (1995) Synthesis of Phytochelatins and Homo-Phytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol* 107, 515-521.
- (74) Kishimoto, M., Kajimoto, Y., Kubota, M., Watarai, T., Shiba, Y., Kawamorib, R., Inaba, T., Kamada, T., Yamasaki, Y. (1997) Sensitive, selective gas chromatographic-mass spectrometric analysis with trifluoroacetyl derivatives and a stable isotope for studying tissue sorbitol-producing activity. *Journal of Chromatography B*, 688, 1-10.
- (75) Oven, M., Raith, K., Neubert, R. H., Kutchan, T. M., and Zenk, M. H. (2001) Homo-phytochelatins are synthesized in response to cadmium in azuki beans. *Plant Physiol* 126, 1275-80.
- (76) Kubota, H., Sato, K., Yamada, T., and Maitani, T. (2000) Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochemistry* 53, 239-45.
- (77) Winters, R. A., Zukowski, J., Ercal, N., Matthews, R. H., and Spitz, D. R. (1995) Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine, and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by n-(1-pyrenyl)maleimide. *Anal Biochem* 227, 14-21.
- (78) SCHELLER, H. V., HUANG, B., HATCH, E., and GOLDSBROUGH, P. B. (1987) Phytochelatin Synthesis and Glutathione Levels in Response to Heavy Metals in Tomato Cells. *Plant Physiol.* 85, 1031-1035.
- (79) Krotz, R. M., and Evangelou, B. P. (1989) Relationship between cadmium, zinc, Cd-peptides, and organic acid in tobacco suspensions cells. *Plant Physiol* 91, 780-787.
- (80) Imahara, H., Hatayama, T., Kuroda, S., Horie, Y., Inoue, E., Wakatsuki, T., Kitamura, T., Fujimoto, S., Ohara, A., and Hashimoto, K. (1992) Production of phytochelatins in *Polygonum cuspidatum* on exposure to copper but not to zinc. *J Pharmacobiodyn* 15, 667-71.
- (81) Speiser, D. M., Abrahamson, S. L., Banuelos, G., and Ow, D. W. (1992) *Brassica juncea* Produces a Phytochelatin-Cadmium-Sulfide Complex. *Plant Physiol* 99, 817-821.
- (82) Harmens, H., Den Hartog, P. R., Bookum, W., and Verkleij, J. (1993) Increased Zinc Tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke Is Not Due to Increased Production of Phytochelatins. *Plant Physiol* 103, 1305-1309.
- (83) De Knecht, J. A., Van Dillen, M., Koevoets, P., Schat, H., Verkleij, J., and Ernst, W. (1994) Phytochelatins in Cadmium-Sensitive and Cadmium-Tolerant *Silene vulgaris* (Chain Length Distribution and Sulfide Incorporation). *Plant Physiol* 104, 255-261.
- (84) Howden, R., Goldsbrough, P. B., Andersen, C. R., and Cobbett, C. S. (1995) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* 107, 1059-66.
- (85) Panda, K. K., Patra, J., and Panda, B. B. (1997) Persistence of cadmium-induced adaptive response to genotoxicity of maleic hydrazide and methyl mercuric chloride in root meristem cells of *Allium cepa* L.: differential inhibition by cycloheximide and buthionine sulfoximine. *Mutat Res* 389, 129-39.

- (86) Keltjens, W. G., and Van Beusichem, M. L. (1998) Phytochelatins as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays L.*) and wheat (*Triticum aestivum L.*): combined effects of copper and cadmium. *Plant and Soil* 203, 119-126.
- (87) Sneller, F. E., van Heerwaarden, L. M., Koevoets, P. L., Vooijs, R., Schat, H., and Verkleij, J. A. (2000) 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, 4014-9.
- (88) Cazale, A. C., and Clemens, S. (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett* 507, 215-9.
- (89) Clemens, S., Schroeder, J. I., and Degenkolb, T. (2001) *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem* 268, 3640-3.
- (90) Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B., and Kochian, L. (2002) Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). *Planta* 214, 635-40.
- (91) Tsuji, N., Hirayanagi, N., Okada, M., Miyasaka, H., Hirata, K., Zenk, M. H., and Miyamoto, K. (2002) Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 653-9.
- (92) Wei, Z., Wong, J. W., and Chen, D. (2003) Speciation of heavy metal binding non-protein thiols in *Agropyron elongatum* by size-exclusion HPLC-ICP-MS. *Microchemical Journal* 74, 207-213.
- (93) Carginale, V., Sorbo, S., Capasso, C., Trinchella, F., Cafiero, G., and Basile, A. (2004) Accumulation, localisation, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma* 223, 53-61.
- (94) Gupta, D. K., Tohoyama, H., Joho, M., and Inouhe, M. (2004) Changes in the levels of phytochelatins and related metal-binding peptides in chickpea seedlings exposed to arsenic and different heavy metal ions. *J Plant Res* 117, 253-6.
- (95) Le Faucheur, S., Behra, R., and Sigg, L. (2005) Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environ Toxicol Chem* 24, 1731-7.
- (96) Loreti, V., Toncelli, D., Morelli, E., Scarano, G., and Bettmer, J. (2005) 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, 398-403.
- (97) Pomponi, M., Censi, V., Di Girolamo, V., De Paolis, A., di Toppi, L. S., Aromolo, R., Costantino, P., and Cardarelli, M. (2005) Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd(2+) tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta*, 1-11.
- (98) Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Kumar, R., Seth, C. S., and Gupta, D. K. (2006) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum L.*) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65, 1027-39.
- (99) DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., and Furini, A. (2008) How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J Integr Plant Biol* 50, 1268-80.
- (100) Selvam, A., and Wong, J. W. (2008) Phytochelatin synthesis and cadmium uptake of *Brassica napus*. *Environ Technol* 29, 765-73.

- (101) Huang, Z., Li, L., Huang, G., Yan, Q., Shi, B., and Xu, X. (2009) Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. *Aquat Toxicol* 91, 54-61.
- (102) Wang, C., Sun, Q., and Wang, L. (2008) Cadmium toxicity and phytochelatin production in a rooted-submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* exposed to low concentrations of cadmium. *Environ Toxicol*.
- (103) Clemens, S. (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol* 163, 319-32.
- (104) Mukherjee, S., Bhattacharyya, P., and Duttagupta, A. K. (2004) Heavy metal levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed *Lemna minor*: field and laboratory studies. *Environ Int* 30, 811-4.
- (105) Narayanan, N., Roychoudhury, P.K., Srivastava, A. (2004) L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* 7, 167-179.
- (106) Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Ward, J. T., and Rea, P. A. (2001) A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 276, 20817-20.
- (107) Vatamaniuk, O. K., Bucher, E. A., Ward, J. T., and Rea, P. A. (2002) Worms take the 'phyto' out of 'phytochelatins'. *Trends Biotechnol* 20, 61-4.
- (108) Takagi, M., Satofuka, H., Amano, S., Mizuno, H., Eguchi, Y., Hirata, K., Miyamoto, K., Fukui, K., and Imanaka, T. (2002) Cellular Toxicity of Cadmium Ions and Their Detoxification by Heavy Metal-Specific Plant Peptides, Phytochelatins, Expressed in Mammalian Cells. *J. Biochem* 131, 233-239.
- (109) Satofuka, H., Fukui, T., Takagi, M., Atomi, H., and Imanaka, T. (2001) Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides. *J Inorg Biochem* 86, 595-602.
- (110) Mehra, R. K., Kodati, V. R., and Abdullah, R. (1995) Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 730-6.
- (111) Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walker, D. J., Pilar Bernal, M., Serrano, R., and Navarro-Avino, J. (2003) A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 440-5.
- (112) Yin, L., Zhou, Y., Fan, X., and Lu, R. (2002) Induction of phytochelatins in *Lemna aequinoctialis* in response to cadmium exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* 68, 561-8.
- (113) Raab, A., Feldmann, J., and Meharg, A. A. (2004) The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiol* 134, 1113-22.
- (114) Zhang, W., and Cai, Y. (2003) Purification and characterization of thiols in an arsenic hyperaccumulator under arsenic exposure. *Anal Chem* 75, 7030-5.
- (115) Schmoger, M. E., Oven, M., and Grill, E. (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol* 122, 793-801.
- (116) Hirata, K., Tsuji, N., and Miyamoto, K. (2005) Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. *J Biosci Bioeng* 100, 593-9.
- (117) Nali, C., Crocicchi, L., and Lorenzini, G. (2004) Plants as indicators of urban air pollution (ozone and trace elements) in Pisa, Italy. *J Environ Monit* 6, 636-45.
- (118) Gawel, J. E., and Hemond, H. F. (2004) Biomonitoring for metal contamination near two Superfund sites in Woburn, Massachusetts, using phytochelatins. *Environ Pollut* 131, 125-35.

- (119) Nishikawa, K., Onodera, A., and Tominaga, N. (2006) Phytochelatins do not correlate with the level of Cd accumulation in *Chlamydomonas* spp. *Chemosphere* 63, 1553-9.
- (120) Nishikawa, K., Onodera, A., and Tominaga, N. (2005) Phytochelatins do not correlate with the level of Cd accumulation in *Chlamydomonas* spp. *Chemosphere*.
- (121) Leopold, I., Gunther, D., Schmidt, J., and Neumann, D. (1999) Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 50, 1323-1328.
- (122) Yan, S. L., Tsay, C. C., and Chen, Y. R. (2000) Isolation and characterization of phytochelatin synthase in rice seedlings. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 24, 202-7.
- (123) Krishnani, K. K., Meng, X., Christodoulatos, C., and Boddu, V. M. (2008) Biosorption mechanism of nine different heavy metals onto biomatrix from rice husk. *J Hazard Mater* 153, 1222-34.
- (124) Tarley, C. R., and Arruda, M. A. (2004) Biosorption of heavy metals using rice milling by-products. Characterisation and application for removal of metals from aqueous effluents. *Chemosphere* 54, 987-95.
- (125) Gupta, D. K., Rai, U. N., Tripathi, R. D., Sinha, S., Rai, P., and Inouhe, M. (2005) Fly-ash induced synthesis of phytochelatins in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants. *J Environ Biol* 26, 539-46.
- (126) Memon, A. R., and Schroder, P. (2009) Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res Int* 16, 162-75.
- (127) Tessier, A., Campbell, P. G. C., and Bisson, M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51, 844-851.
- (128) Sengar, R. S., Gautam, M., Sengar, R. S., Garg, S. K., Sengar, K., and Chaudhary, R. (2008) Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Rev Environ Contam Toxicol* 196, 73-93.
- (129) Remon, E., Bouchardon, J. L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J. C., and Faure, O. (2005) Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environ Pollut* 137, 316-23.
- (130) Clemente, R., Walker, D. J., and Bernal, M. P. (2005) Uptake of heavy metals and As by *Brassica juncea* grown in a contaminated soil in Aznalcollar (Spain): the effect of soil amendments. *Environ Pollut* 138, 46-58.
- (131) Turgut, C., Pepe, M. K., and Cutright, T. J. (2005) The effect of EDTA on *Helianthus annuus* uptake, selectivity, and translocation of heavy metals when grown in Ohio, New Mexico and Colombia soils. *Chemosphere* 58, 1087-95.
- (132) Sun, Q., Wang, X. R., Ding, S. M., and Yuan, X. F. (2005) Effects of exogenous organic chelators on phytochelatins production and its relationship with cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) under cadmium stress. *Chemosphere* 60, 22-31.
- (133) Chen, H., and Cutright, T. (2001) EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere* 45, 21-8.
- (134) Lasat, M. M. (2002) Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J Environ Qual* 31, 109-20.
- (135) Rufus L. Chaney, R. L., Angle, S., J., Broadhurst, C. L., Peters, C. A., Tappero, R. V., and Sparks, D. L. (2007) Improved Understanding of Hyperaccumulation Yields Commercial Phytoextraction and Phytomining Technologies. *J. Environ. Qual.* 36, 1429-1443.

- (136) Sanz-Medel, A. (1998) Toxic trace metal speciation: importance and tools for environmental and biological analysis. *Pure & Appl. Chem.* 70, 2281-2285.
- (137) Skoog, D. A., Holler, J., and Nieman, T. (1998) *Principles of instrumental analysis*.
- (138) Vanhoe, H. (1993) A review of the capabilities of ICP-MS for trace element analysis in body fluids and tissues. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 7, 131-9.
- (139) Heumann, K. (2002) Hyphenated techniques – the most commonly used method for trace elemental speciation analysis. *Anal Bioanal Chem* 373 323–324.
- (140) Vacchina, V., Polec, K., and Szpunar, J. (1999) Speciation of cadmium in plant tissues by size-exclusion chromatography with ICP-MS detection. *J Anal At Spectrom* 14.
- (141) El Himri, M., Pastor, A., and de la Guardia, M. (2000) Determination of uranium in tap water by ICP-MS. *Fresenius J Anal Chem* 367, 151-6.
- (142) Ammann, A. A. (2002) Speciation of heavy metals in environmental water by ion chromatography coupled to ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 372, 448-52.
- (143) Day, J. A., Montes-Bayón, M., Vonderheide, A. P., and Caruso, J. A. (2002) A study of method robustness for arsenic speciation in drinking water samples by anion exchange HPLC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 373, 664-668.
- (144) Persson, D. P., Hansen, T. H., Holm, P. E., Schjoerring, J. K., Hansen, H. C. B., Nielsen, J., Cakmak, I., and Husted, S. (2006) Multi-element speciation analysis of barley genotypes differing in tolerance to cadmium toxicity using SEC-ICP-MS and ESI-TOF-MS. *J Anal At Spectrom* 21, 996-1005.
- (145) Cairns, W. R., Ranaldo, M., Hennebelle, R., Turetta, C., Capodaglio, G., Ferrari, C. F., Dommergue, A., Cescon, P., and Barbante, C. (2008) Speciation analysis of mercury in seawater from the lagoon of Venice by on-line pre-concentration HPLC-ICP-MS. *Anal Chim Acta* 622, 62-9.
- (146) Sadi, B. B., Vonderheide, A. P., Gong, J. M., Schroeder, J. I., Shann, J. R., and Caruso, J. A. (2008) An HPLC-ICP-MS technique for determination of cadmium-phytochelatins in genetically modified *Arabidopsis thaliana*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 861, 123-9.
- (147) Wrobel, K., Sadi, B. B. M., Wrobel, K., Castillo, J. R., and Caruso, J. A. (2003) Effect of metal ions on the molecular weight distribution of humic substances derived from municipal compost: ultrafiltration and SEC with spectrophotometric and ICP-MS detection. *Anal Chem* 75, 761-767.
- (148) Sadi, B. B. M., Wrobel, K., Wrobel, Z., Kannamkumarath, S. S., Castillo, J. R., and Caruso, J. A. (2002) Size Exclusion Chromatography ICP-MS Studies On Elements Binding to Humic Substances in Compost Obtained From Urban Solid Waste. *J Environ Monit* 4, 1010-1016.
- (149) Piccolo, A. (2001) The Supramolecular Structure of Humic Substances. *Soil Science* 166, 810-832.
- (150) Pickering, I. J., Prince, R. C., George, G. N., Rauser, W. E., Wickramasinghe, W. A., Watson, A. A., Dameron, C. T., Dance, I. G., Fairlie, D. P., and Salt, D. E. (1999) X-ray absorption spectroscopy of cadmium phytochelatin and model systems. *Biochim Biophys Acta* 1429, 351-64.
- (151) Mehra, R. K., Tran, K., Scott, G. W., Mulchandani, P., and Saini, S. S. (1996) Ag(I)-binding to phytochelatins. *J Inorg Biochem* 61, 125-42.
- (152) Chassaingne, H., Vacchina, V., Kutchan, T. M., and Zenk, M. H. (2001) Identification of phytochelatin-related peptides in maize seedlings exposed to cadmium and obtained enzymatically in vitro. *Phytochemistry* 56, 657-68.

- (153) Yen, T. Y., Villa, J. A., and DeWitt, J. G. (1999) 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, 930-41.
- (154) Hart, J. J., Welch, R. M., Norvell, W. A., and Kochian, L. V. (2002) Measurement of thiol-containing amino acids and phytochelatin (PC2) via capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 23, 81-7.
- (155) Doring, S., Korhammer, S., Oetken, M., and Markert, B. (2000) Analysis of phytochelatins in plant matrices by pre-column derivatization, high-performance liquid chromatography and fluorescence-detection. *Fresenius J Anal Chem* 366, 316-8.
- (156) Fan, T. W., Lane, A. N., and Higashi, R. M. (2004) An electrophoretic profiling method for thiol-rich phytochelatins and metallothioneins. *Phytochem Anal* 15, 175-83.
- (157) Tang, D., Shafer, M. M., Vang, K., Karner, D. A., and Armstrong, D. E. (2003) Determination of dissolved thiols using solid-phase extraction and liquid chromatographic determination of fluorescently derivatized thiolic compounds. *J Chromatogr A* 998, 31-40.
- (158) Cruz, B. H., Diaz-Cruz, J. M., Arino, C., and Esteban, M. (2004) Complexation of Heavy Metals by Phytochelatins: Voltammetric Study of the Binding of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> Ions by the Phytochelatin (g-Glu-Cys)<sub>3</sub>Gly Assisted by Multivariate Curve Resolution. *Environmental Science and Technology*.
- (159) Yoshimura, E., Kobayashi, R., Furihata, K., Kajiwar, H., and Yamazaki, S. (2000) <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral assignment of phytochelatin. *Magnetic Resonance in Chemistry* 38, 141-142.
- (160) Montes-Bayon, M., Meija, J., LeDuc, D., Terry, N., Caruso, J. A., and Sanz-Medel, A. (2004) HPLC-ICP-MS and ESI-Q-TOF analysis of biomolecules induced in Brassica juncea during arsenic accumulation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19, 153-158.
- (161) Ding, X., Wang, W., Jiang, J., Ru, B., and Wang, Y. (1999) The purification and rapid identification of heavy metal-binding peptides of water hyacinth. *Chemistry, Life Sciences, & Earth Sciences* 37, 303-9.
- (162) Zarazua, G., Ávila-Pérez, P., Tejeda, S., Barcelo-Quintal, I., and Martínez, T. (2006) Analysis of total and dissolved heavy metals in surface water of a Mexican polluted river by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61, 1180-1184
- (163) Cotler Avalos, H., Mazani Hiriart, M., and de Anda Sanchez, J. (2006) *Atlas de la Cuenca Lerma-Chapala*.
- (164) Rauser, W. E. (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* 109, 1141-9.
- (165) Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R. D., Dwivedi, S., and Gupta, D. K. (2006) Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in Hydrilla verticillata (L.f.) Royle. *Aquat Toxicol* 80, 405-15.
- (166) Nardi, S., Pizzeghello, D., A., M., and A., V. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1527-1536
- (167) Halim, M., Conte, P., and Piccolo, A. (2003) Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere* 52, 265-75.

- (168) Voets, J., Bervoets, L., and Blust, R. (2004) Cadmium bioavailability and accumulation in the presence of humic acid to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Environ Sci Technol* 38, 1003-8.
- (169) Kungolos, A., Samaras, P., Tsiridis, V., Petala, M., and Sakellaropoulos, G. (2006) Bioavailability and toxicity of heavy metals in the presence of natural organic matter. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41, 1509-17.
- (170) Misra, V., and Pandey, S. D. (2005) Immobilization of heavy metals in contaminated soil using nonhumus-humus soil and hydroxyapatite. *Bull Environ Contam Toxicol* 74, 725-731.
- (171) Garcia-Mina, J. M., Antolin, M. C., and Sanchez-Diaz, M. (2004) Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types. *Plant and Soil* 258, 57-68.
- (172) Luider, C. D., Crusius, J., Playle, R. C., and Curtis, P. J. (2004) Influence of natural organic matter source on copper speciation as demonstrated by Cu binding to fish gills, by ion selective electrode, and by DGT gel sampler. *Environ Sci Technol* 38, 2865-72.
- (173) Lamelas, C., Wilkinson, K. J., and Slaveykova, V. I. (2005) Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. *Environ Sci Technol* 39, 6109-16.
- (174) Ha, S. B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O'Connell, M. J., Goldsbrough, P. B., and Cobbett, C. S. (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11, 1153-64.
- (175) Al-Lahham, A., Rohde, V., Heim, P., Leuchter, R., Veeck, J., Wunderlich, C., Wolf, K., and Zimmermann, M. (1999) Biosynthesis of phytochelatin synthase in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 15, 385-96.
- (176) Clemens, S., Kim, E. J., Neumann, D., and Schroeder, J. I. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *Embo J* 18, 3325-33.
- (177) Wunderlich, C., Zhao, Q., Zimmermann, M., and Wolf, K. (1995) Physiological characterization of a cadmium-resistant mutant in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiol Res* 150, 233-7.
- (178) Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., and Bleeker, P. M. (2002) The role of phytochelatin synthase in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J Exp Bot* 53, 2381-92.
- (179) Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Ten Bookum, W., Schat, H., and Meharg, A. A. (2001) Phytochelatin synthase is involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol* 126, 299-306.
- (180) Collin-Hansen, C., Pedersen, S. A., Andersen, R. A., and Steinnes, E. (2007) First report of phytochelatin synthase in a mushroom: induction of phytochelatin synthase by metal exposure in *Boletus edulis*. *Mycologia* 99, 161-74.
- (181) Lide, D. R. E. (1998) *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press.
- (182) (2008) Chemical Information Review Document for Oral Exposure to Tetravalent and Pentavalent Vanadium Compounds. *National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services*.
- (183) Harada, E., von Roepenack-Lahaye, E., and Clemens, S. (2004) A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthase catalyzes the conversion of

- glutathione to gamma-glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry* 65, 3179-85.
- (184) Wrobel, K., Wrobel, K., and Colunga Urbina, E. M. (2000) Determination of Total Al, Cr, Cu, Fe, Mn, and Ni and Their Fractions Leached to the Infusions of Black Tea, Green Tea, Hibiscus Sabdariffa and Ilex Paraguariensis (Mate) by ETA-AAS. *Biol Trace Elem Res* 78, 271-280.
- (185) Abou-Arab, A. A. K., and Abou Donia, M. A. (2000) Heavy Metals in Egyptian Spices and Medicinal Plants and the Effect of Processing on Their Levels. *J Agric Food Chem* 48, 2300-2304.
- (186) Larcher, W. (1995) *Physiological Plant Ecology*, Springer, Berlin.
- (187) *Quality control methods for medicinal plant materials*, World Health Organization, Geneva, 1998.
- (188) Foster, E., Hattori, J., Zhang, P., Labbe, H., Martin-Heller, T., Li-Pook-Than, J., Ouellet, T., Malik, K., and Miki, B. (2003) The new RENT family of repetitive elements in Nicotiana species harbors gene regulatory elements related to the tCUP cryptic promoter. *Genome* 46, 146-55.
- (189) Ihnat, M. (1989) *Occurrence and distribution of selenium*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- (190) Emsley, J. (2002) *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*, Oxford University Press, London.
- (191) Chizzola, R., and Franz, C. (1996) Metallic trace elements in medicinal and aromatic plants from Austria. *Angewandte Botanik* 70, 52-56.
- (192) Morton-Bermea, O., Carrillo-Chavez, A., Hernandez, E., and Gonzalez-Partida, E. (2004) Determination of metals for leaching experiments of mine tailings: Evaluation of potential environmental hazard in the Guanajuato mining district, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 73, 770-776.
- (193) Morton-Bermea, O., Carrillo-Chavez, A., Hernandez, E., and Gonzalez-Partida, E. (2004) Determination of metals for leaching experiments of mine tailings: evaluation of the potential environmental hazard in the Guanajuato mining district, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 73, 770-6.
- (194) Wrobel, K., Landero Figueroa, J. A., and Wrobel, K. (2008) Phytochelatin in the wild plants from Guanajuato city - an important silver and gold mining center in Mexico, in *Causes and effects of heavy metal pollution* (Sanchez, M. L., Ed.), Novapublishers.
- (195) Landero Figueroa, J. A., Wrobel, K., Afton, S., Caruso, J. A., Gutierrez Corona, J. F., and Wrobel, K. (2008) Effect of Some Heavy Metals and Soil Humic Substances on the Phytochelatin Production in Wild Plants from Silver Mine Region in Guanajuato, Mexico. *Chemosphere* 70, 2084-2091.
- (196) Landero Figueroa, J. A., Afton, S., Wrobel, K., Wrobel, K., and Caruso, J. A. (2007) Analysis of phytochelatin in nopal (*Opuntia ficus*): a metallomics approach in the soil-plant system. *J Anal At Spectrom* 22, 897 – 904.
- (197) Pandey, A. K., Pandey, S. D., and Misra, V. (2000) *Ecotoxicol Environ Saf* 47, 195.
- (198) Evangelou, V. P., and Marsi, M. (2001) Composition and metal ion complexation behaviour of humic fractions derived from corn tissue. *Plant and Soil* 229, 13-24.

# **ANEXOS**

## TRABAJOS PUBLICADOS

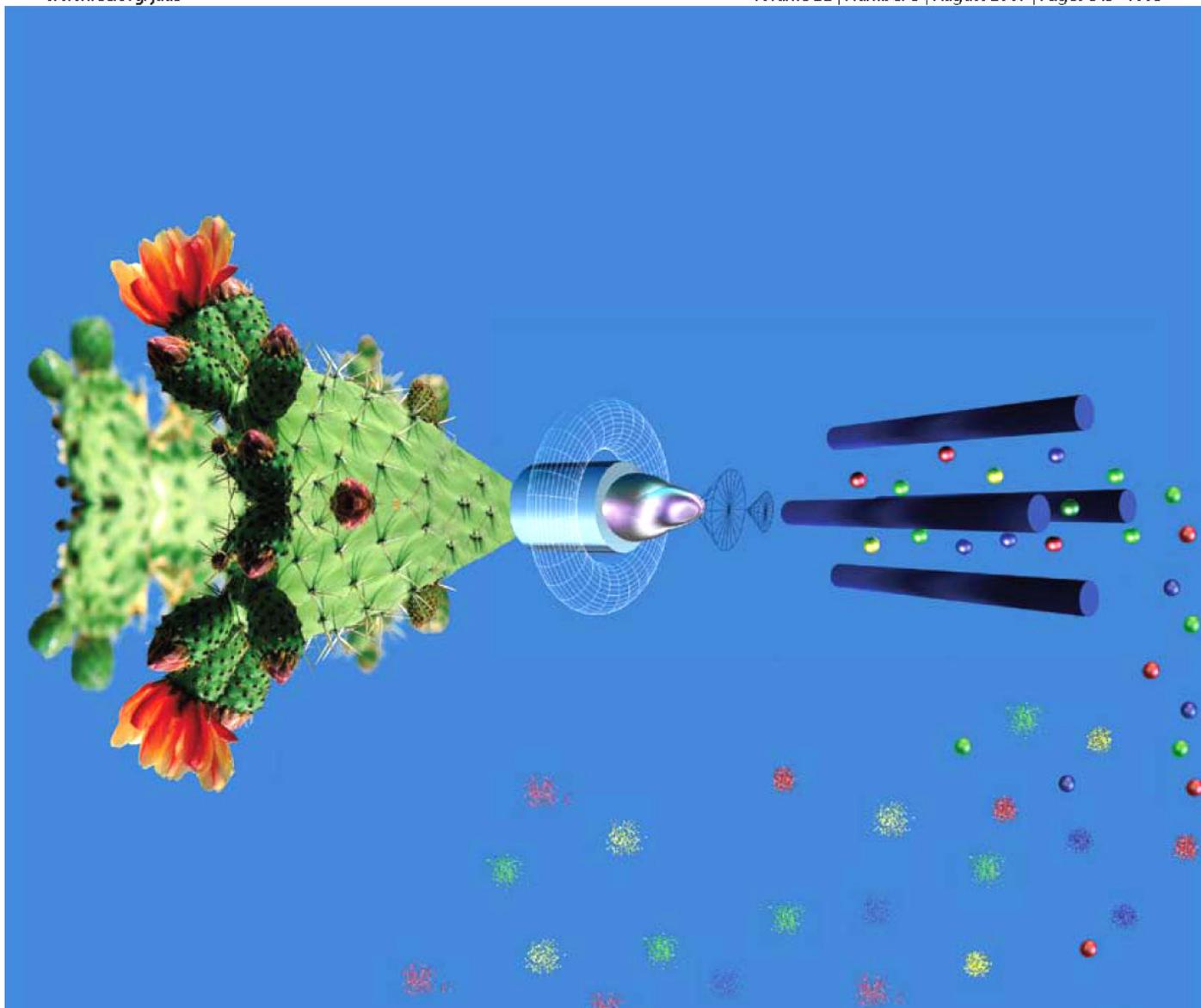
- Analysis of phytochelatin in nopal (*Opuntia ficus*): a metallomics approach in the soil- plant system
- Perfil de Elementos Metálicos y de Algunos Metaloides en Aguas de Grifo de la Ciudad de Guanajuato.
- Effect of Some Heavy Metals and Soil Humic Substances on the Phytochelatin Production in Wild Plants from Silver Mine Region in Guanajuato, Mexico.
- ICP-MS multi-element profiles and hplc determination of furanic compounds in commercial tequila.
- Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry with  $\text{Bi}^{3+}$  as internal standard.
- Effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on the degradation of humic acid associated with Cu, Pb, and Ni: an in vitro study.
- Phytochelatin in the wild plants from Guanajuato city an important silver and gold mining center in Mexico

# J A A S

Journal of Analytical Atomic Spectrometry

www.rsc.org/jaas

Volume 22 | Number 8 | August 2007 | Pages 845–1008



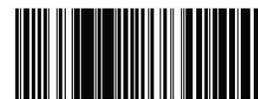
ISSN 0267-9477

RSC Publishing

**Metallomics Special Issue**

Guest Editors David Koppenaal and Gary Hieftje

An issue featuring papers from the emerging field of metallomics which show how atomic spectrometry is contributing to the understanding of biological systems



0267-9477(2007)22:8;1-U

## Analysis of phytochelatins in nopal (*Opuntia ficus*): a metallomics approach in the soil–plant system

Julio Alberto Landero Figueroa,<sup>a</sup> Scott Afton,<sup>b</sup> Kazimierz Wrobel,<sup>ac</sup>  
Katarzyna Wrobel<sup>ac</sup> and Joseph A. Caruso<sup>\*bc</sup>

Received 15th March 2007, Accepted 16th May 2007

First published as an Advance Article on the web 5th June 2007

DOI: 10.1039/b703912c

This work focuses on phytochelatins (PCs) in plants chronically exposed to low or moderate metal concentrations in soil, which commonly occurs in natural environments. The original approach was to evaluate PCs in nopal (*Opuntia ficus*) in relation to the plant and soil levels of Cd, Pb, Cu and Ag. These four metals were selected because of their known capability to induce PCs in plants and also because of their abundance in the region of Guanajuato (Mexico), where the nopal plants were collected. ICP-MS determination of metals in nopal roots, stems and in soil fractions provided information relevant to their bioavailability in soil as well as their uptake by nopal. In search of a possible relationship between the parameters measured, correlation analysis was carried out (Cd was not considered owing to its low levels found in the plant tissues). The results obtained indicate that sequential metal leaching from soil does not always provide direct information on metal bioavailability. The uptake of metals by nopal roots correlated with metals in the organic matter and sulfides fraction. Since low levels of humic substances were found in soil collected at cactus roots and because of the low solubility of Pb, Cu and Ag sulfides, the participation of rizosphere processes was suggested in facilitating metal uptake. Metal distribution in PC molecular mass fractions were studied by SEC-ICP-MS and the results compared with the total phytochelatin pool in plants as determined by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection. The two procedures provide complementary analytical information when the global effect of all metals/metalloids present in soil on PC production is to be studied. Correlation analysis revealed the strong association of Pb with PCs both in roots and in stems, which demonstrates that Pb is important in nopal PCs and suggests that Pb bound to PCs might be transported from roots to stems. For Cu, the correlation between metal-free PCs and metal bound to high molecular mass fraction of plant PC-rich extract was observed only in roots, suggesting differences in the transport of Pb and Cu. In contrast to these metals, no correlation was found for silver, suggesting no association with PCs, even though its elution with a high molecular mass fraction was observed in PC-rich plant extracts. The results obtained from this study indicate the complex role environmental conditions play in the accumulation of heavy metals and in phytochelatin production in the *Opuntia* genus.

### Introduction

The synthesis of metal-binding peptides, known as phytochelatins (PCs), is considered one of the defense mechanisms of higher plants in exposure to non-essential metal/metalloids and/or toxic concentrations of essential elements. These compounds are rich in thiol groups, according to the general structure ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>*n*</sub>-Gly, where *n* varies from 2 to 11.<sup>1</sup> Other families of PCs, differing in the type of C-terminal amino acid have also been characterized.<sup>2</sup> Over the past two decades, studies have been carried out aimed at structural

characterization of PCs and their metal complexes<sup>3,4</sup> as well as the elucidation of induction mechanisms.<sup>5,6</sup> The feasibility of genetic engineering to assure higher rates of PC induction has been explored for phytoremediation purposes.<sup>7–10</sup>

However, the mechanisms responsible for the metal uptake and accumulation in plants in relation to PC production are not fully understood. Even though bioavailability is considered an important factor,<sup>11,12</sup> the role of environmental parameters, possibly affecting metal bioavailability to plants, remains unclear. In particular, metal binding to soil organic matter has been shown to increase or decrease the uptake of Cd, Cu and Pb, depending on the plant, the experimental design and the type of metal.<sup>13–18</sup> In this context, Clemens highlighted a need for more studies on the effects of low-level toxic metal exposure, which commonly occurs in non-contaminated environments.<sup>19</sup> Furthermore, research interests have moved from studies on one specific element toward characterization of a multi-element profile.<sup>20–22</sup> Such a

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de Guanajuato, L. de Retana N° 5, Guanajuato, 36000, Mexico

<sup>b</sup> Department of Chemistry, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio 45221-0172, USA

<sup>c</sup> The University of Cincinnati|Agilent Technologies Metallomics Center of the Americas, University of Cincinnati, Cincinnati, OH 45221, USA. E-mail: joseph.caruso@uc.edu

metallomics approach is closer to actual field situations, where plants are exposed to a variety of metals and metalloids.

Owing to the silver and gold mining activities in Guanajuato (central Mexico), the plants grow in soils containing moderate levels of heavy metals. The environmental geochemistry has been extensively studied<sup>23</sup> and the leaching of several metals and metalloids from the mine tailings to different environmental compartments has been reported.<sup>24,25</sup> Plants of the genus *Opuntia* occur commonly in Mexico and, among them, the edible species called nopal (*Opuntia ficus*) is of special interest.<sup>26</sup> The young stems and fruits are used in Mexican cuisine and their nutritional value comes from the relatively high content of sugars, vitamin C and some minerals (K, Ca, Mn, Cu, Fe).<sup>27</sup> The importance of cactus in folk medicine also should be mentioned, especially in the treatment of gastritis, hyperglycemia, rheumatic disorders, skin infections, etc.<sup>28</sup> Other applications include the production of natural yellow and red food colorants and the production of carminic acid. There is a growing interest in the cultivation of nopal and also other *Opuntia* varieties.<sup>28,29</sup> Curiously, data regarding the uptake and possible accumulation of heavy metals in nopal are scarce.<sup>12,30</sup> Sub-microgram per gram levels of glutathione and cysteine were found in edible pulp,<sup>31</sup> yet no information on possible PC induction in nopal has been found.

This work focuses on phytochelatins in nopal and their relationship with soil and plant levels of Cd, Pb, Cu and Ag. The four metals were selected because of their capability to induce phytochelatins in plants<sup>2,3,10,32-35</sup> and also because of their abundance in the region of Guanajuato.<sup>24,25</sup> The soil and plant materials were collected at five sites and nitric acid digested metal concentrations in soil, soil fractions and plant roots/stems were evaluated to obtain information relevant to the bioavailability of metals in soil as well as their uptake by nopal. On the other hand, metal distribution in molecular mass fractions of the PC-rich plant extracts was studied by SEC-ICP-MS<sup>2,10,36</sup> and the results obtained were compared with the total pool of phytochelatins in plants, quantified by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection (total PCs).<sup>37-39</sup> The application of these two analytical procedures provides complementary analytical information, particularly suitable when the global effect of all metals/metalloids present in soil on PC production is to be studied in the soil-plant system. The results obtained in this study indicate the complex interplay of environmental conditions in the accumulation of heavy metals and phytochelatin production in plants from the *Opuntia* genus.

## Experimental

### Apparatus

Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) Series 1050 high performance liquid chromatograph with a spectrofluorimetric detector 1046A with ChemStation was used for phytochelatin determination. The analytical column was Gemini C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm) from Phenomenex.

Size exclusion chromatography was performed on an Agilent Series 1100 liquid chromatograph equipped with an autosampler, a diode array detector and Chemstation (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA, USA). The chromatographic column was Superdex™ Peptide HR 10/30 (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ, USA).

An Agilent 7500ce inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), equipped with a conventional Meinhard nebulizer, a Peltier-cooled spray chamber (−2 °C), and an octopole collision/reaction cell with hydrogen gas pressurization (purity of 99.999%) was used for specific element detection.

A Spectronic 3000 Diode Array Milton Roy spectrophotometer (resolution 0.35 nm) was used for assessing soil humic substances (Milton Roy Inst. Co.).

A model 3110 PerkinElmer atomic absorption spectrometer with HGA600 graphite furnace and AS 60 auto sampler was used. The hollow cathode lamps for Ag, Cd, Cu and Pb were PerkinElmer Lumina™ lamps.

### Reagents and samples

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18.2 MΩ cm, Labconco, USA) and HPLC grade acetonitrile and methanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) were used throughout. The commercial standard solutions containing 1000 μg ml<sup>−1</sup> Ag, Cd, Cu and Pb were from SPEX CertiPrep, Inc., Metuchen, NJ, USA.

The following Sigma reagents were used: nitric acid, hydrogen peroxide, sodium hydroxide, magnesium chloride, sodium acetate, ammonium acetate, acetic acid, hydroxylamine hydrochloride, diethylenetriaminepentaacetic acid (DPTA), trifluoroacetic acid (TFA), sodium borohydride, monobromobimane (mBrB), 3-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] propanesulfonic acid (HEPPS), methanesulfonic acid, heptafluorobutyric acid and glutathione. The standard of humic acid was from Fluka. The PC-2, PC-3 and PC-4 standards were purchased from New England Peptides, Inc. (Gardner, MA, USA).

The samples of cactus roots and leaves (*Opuntia ficus*) were collected in two geographical regions: in Guanajuato city, which had been selected to cover different soil levels of heavy metals and in Merida, which can be considered a “clean” area. In Guanajuato, the sites were as follows: the area where silver ores had been processed in the past (site 1), the Guanajuato river close to the mine tailings (site 2), the hill—relatively distant from the mines (site 3), the urban area developed on the mine tailing (site 4). In Merida, the samples were collected in the countryside, about 40 km from the city (site 5). The plants were collected in November (just after the wet season), taking at each site three samples of roots and three samples of leaves from plants with similar size and color of leaves. To avoid possible variations of soil parameters, the area of any sampling site did not exceed 9 m<sup>2</sup>. At each sampling site, the pH of topsoil (0–30 cm) was measured. The relative variability of pH values for several measurements at one site did not exceed 2% and the values found at different sites were in the range pH 7.7 to pH 8.0 in Guanajuato and pH 8.0 to pH 8.1 in Merida. The roots and leaves collected at one site were pooled. The roots were carefully separated from the adjacent soil, washed with deionized water, dried, cut into small pieces, homogenized by submerging in liquid nitrogen and mortar grinding and, finally, freeze-dried. Similarly, after washing and

drying, the leaves were also homogenized and freeze-dried. The topsoil samples were collected in these same sites, from which the cactus samples were taken (six samples of about 250 g per 9 m<sup>2</sup> site). For assay of humic substances, 1 g of each fresh soil was taken. For sequential extraction and for determination of Ag, Cd, Cu, Pb, the soil samples collected at one sampling site were pooled and dried.

### Procedures

**Analysis of total phytochelatin.** For total PCs, a reversed phase high performance liquid chromatography method with spectrofluorimetric detection was adopted.<sup>37,38</sup> The homogenized and freeze-dried roots or leaves (0.1 g) were placed in micro tubes (1.5 ml) together with 1 ml of 6.3 mmol l<sup>-1</sup> DTPA in 0.1% of TFA. After 30 min, the samples were ultrasonicated (10 min) and centrifuged (1850 g, 10 min). For reduction, 500 µl of supernatant were treated with 100 µl of sodium borohydride (15 mmol l<sup>-1</sup>). For pre-column derivatization of free thiol groups, 40 µl of the above extract were mixed with 100 µl of 6.5 mol l<sup>-1</sup> DTPA in 0.3 mol l<sup>-1</sup> HEPPS and 20 µl MBrB (1.9 mol l<sup>-1</sup> in acetonitrile). This solution was kept in the dark for 30 min, the reaction was stopped by adding 40 µl of 1 mol l<sup>-1</sup> methanesulfonic acid and 20 µl of this solution was injected onto the column (20 µl). The separation was achieved using three mobile phases (A—0.05% heptafluorobutyric acid; B—methanol; and C—acetonitrile) in the gradient elution (0–0.5 min: 82% A, 15% B, 3% C; 0.5–4.0 min: 77% A, 20% B, 3% C; 4.0–19.0 min: 69% A, 30% B, 3% C; 19.0–19.5 min: 82% A, 15% B, 3% C; 19.5–20.0 min: 82% A, 15% B, 3% C) at a total flow rate 0.8 ml min<sup>-1</sup>. Spectrofluorimetric detection was at  $\lambda_{\text{exc}} = 380$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 480$  nm. The quantification was based on the glutathione peak area measurements.<sup>37,38</sup> External calibration was performed in the concentration range of glutathione (GSH) that corresponded to 0.1–1.8 µg g<sup>-1</sup> (as µg GSH per gram of the freeze-dried root homogenate),  $R^2 = 0.9999$ . The correction factor for the efficiency of derivatization was applied as reported elsewhere.<sup>37</sup>

**Sequential extraction of soils.** The soil samples were fractionated according to the simplified Tessier method.<sup>40</sup> In brief, an exchangeable fraction (F1) was obtained by agitating 1 g of the sample with 8 ml of magnesium chloride (1 mol l<sup>-1</sup>, pH 7.0) for 1 h. The mixture was centrifuged (1850 g, 10 min), the supernatant filtered and the volume was brought to 100 ml with deionized water. For the fraction bound to carbonates (F2), the residue obtained was treated with 8 ml of sodium acetate (1 mol l<sup>-1</sup>, pH 5.0). After agitation (5 h, room temperature), the mixture was centrifuged, the supernatant filtered and its volume completed to 100 ml. The fraction associated with oxides of iron and manganese (F3) was extracted from the residue with 20 ml of hydroxylamine hydrochloride (25% v/v in acetic acid). This extraction was carried out at 96 °C for 6 h, the supernatant was filtered and its volume brought to 100 ml. The fraction bound to organic matter and sulfides (F4) was extracted from the solid residue with 3 ml of hydrogen peroxide and 5 ml of nitric acid (pH 2.0) at 85 °C, for 3 h. After cooling, 5 ml of 3.5 mol l<sup>-1</sup> ammonium acetate in 20% v/v nitric acid were added, the

volume was brought to 20 ml and the mixture was agitated for 30 min. The supernatant obtained was filtered and its volume adjusted to 100 ml. The residual fraction (F5) was obtained by nitric acid (10 ml) digestion of the last pellet. After digestion, 25 ml of acetate buffer were added (pH 4.5) and the volume was brought to 100 ml. For each extraction, a blank was run in parallel.

**ICP-MS determination of Ag, Cd, Cu and Pb.** Three subsamples of each material were analyzed. For acid-digested metal determination, 0.5 g of soil, freeze-dried roots or leaves were placed in a glass tube and 2 ml of concentrated nitric acid were added. The tubes were heated in the stainless steel heating block: at 65 °C, 60 min and then 120 °C, 60 min. Once cooled to room temperature, 0.2 ml of hydrogen peroxide was added to each tube and the mixture was left for 30 min to complete the reaction. The final volume was brought to 25 ml and, after appropriate dilution, the determination of Ag, Cd, Cu and Pb was carried out by ICP-MS (blank run in parallel). These same metals were also determined in soil extracts F1–F5.

The ICP-MS conditions were as follows: forward power, 1500 W; carrier gas flow, 0.91 l min<sup>-1</sup>; make-up gas 0.19 l min<sup>-1</sup>; collision gas, He, 4.0 ml min<sup>-1</sup>; quadrupole bias, -16.0 V; octopole bias, -18.0 V. The isotopes monitored were <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, <sup>107</sup>Ag, <sup>109</sup>Ag, <sup>111</sup>Cd, <sup>112</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd, <sup>207</sup>Pb and <sup>208</sup>Pb with a dwell time of 100 ms per isotope. For analytical signal correction, internal calibration with germanium (10 µg l<sup>-1</sup>) was performed and the quantification was based on five-point external calibration.

For accuracy checking, the analysis of three soil and three plant digest samples (three replicates) was carried out by electrothermal atomic absorption spectrometry. The matrix modifier was magnesium nitrate (5 µg Mg prepared from the stock solution of modifier from Perkin-Elmer). Stock standard solutions containing 1000 mg l<sup>-1</sup> of silver, cadmium, copper and lead were diluted to obtain the highest calibration standard (25 µg l<sup>-1</sup> Ag; 2 µg l<sup>-1</sup> Cd; 50 µg l<sup>-1</sup> Cu; 50 µg l<sup>-1</sup> Pb). No statistically significant difference was found between ETA-AAS and ICP-MS results (ANOVA).

### Size exclusion chromatography of plant extracts (SEC–UV–ICP-MS)

The samples of homogenized and freeze-dried roots or leaves (50 mg) were extracted with 1 ml of 50 mmol l<sup>-1</sup> ammonium acetate (pH 7.4).<sup>10</sup> The mixtures were agitated for 30 min at room temperature, sonicated for 15 min and centrifuged (1850 g, 10 min). The solutions obtained (100 µl) were introduced to the chromatographic system (SEC–UV–ICP-MS). The mobile phase was 50 mmol l<sup>-1</sup> ammonium acetate (pH 7.4) at a flow rate 0.7 ml min<sup>-1</sup>.

UV detection was carried out at 254 nm and 400 nm. The isotopes monitored by ICP-MS were <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, <sup>107</sup>Ag, <sup>109</sup>Ag, <sup>111</sup>Cd, <sup>112</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd, <sup>207</sup>Pb, <sup>208</sup>Pb with a dwell time of 100 ms per isotope.

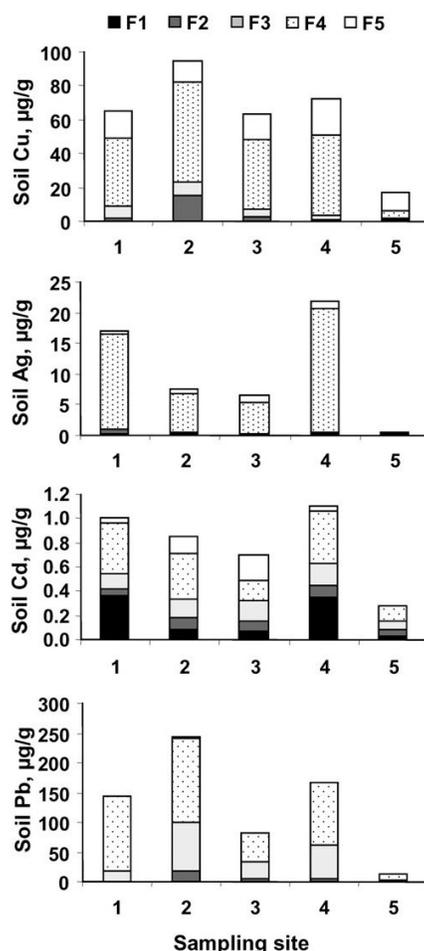
Calibration of the SEC column was performed using a mixture of the following molecular mass standards: myoglobin (17.6 kDa), substance P (1.35 kDa) and (Gly)<sub>6</sub> (0.36 kDa),  $r^2 = 0.9964$ .

**Analysis of soil humic substances (HS).** An aliquot of soil (1 g) was extracted with 10 ml of 0.1 mol l<sup>-1</sup> sodium hydroxide (30 min with agitation). The mixture was centrifuged (1850 g, 10 min) and absorbance of supernatant was measured at 350 nm versus 0.1 mol l<sup>-1</sup> sodium hydroxide as the reference. If necessary, the soil extracts were diluted with 0.1 mol l<sup>-1</sup> NaOH to fit within the calibration range. External calibration was carried out using Fluka humic acid standard.<sup>41</sup> The calibration solutions were prepared to cover HS levels in soils from 1 to 21 mg g<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9964$ ).

## Results and discussion

The goal of this work was to evaluate phytochelatin in nopal (*Opuntia ficus*) relative to the plant and soil levels of some heavy metals. Owing to the multi element capabilities and a wide dynamic range of ICP-MS, this technique was applied for the determination of Cd, Cu, Pb and Ag in soil, soil fractions and plant material. Metal binding to PCs has often been studied by SEC fractionation with atomic spectrometric detection.<sup>2,10,36</sup> On the other hand, quantification of total PCs can be performed by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection. To do so, the metals bound to PCs are eliminated by DPTA complexation and, after reduction, the fluorescent derivatization of the free thiol groups is achieved.<sup>37-39</sup> To enhance analytical information on metal-PCs system in nopal, the two above procedures were applied in this work for the analysis of root and stem extracts.

The results of Ag, Cd, Cu and Pb determination in soil fractions, obtained by the simplified method of Tessier<sup>40</sup> are presented in Fig. 1. For each fraction, the average results (mean) obtained from triplicate extractions are presented (RSD < 7%). The recovery, evaluated by relating the sum of metal level found in each fraction to the acid-digested metal in soil, was in the range 82–104%. As expected, soil samples from Guanajuato contained higher metal concentrations compared to those from Merida. Total metal concentrations found in this work are within the ranges reported previously,<sup>24,25</sup> yet substantial differences can be observed among different sampling sites. Thus, Pb was found to be the most abundant in soil (maximum concentration at the riverside,  $248 \pm 7 \mu\text{g g}^{-1}$ , site 2), copper levels were generally lower with the highest value also at the riverside ( $97 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$ ), Ag levels were about 4 to 5 times lower than those for Cu (highest value  $24 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$  at old mine tailing region, site 4) and cadmium presented concentrations below  $1.2 \mu\text{g g}^{-1}$  at any site. However, the relative distribution of metals in soil fractions was different. At any sampling site, the major fractions of Pb and Cu were bound to F4 (organic matter and sulfides). Significantly lower levels of these two metals were found in carbonate fractions (F2) and only minute amounts corresponded to “free” Pb or Cu (F1). In Guanajuato soils, considerable Pb contribution was also in the manganese and iron oxide fraction (F3). For Ag, practically all the metal was bound to the organic matter and sulfides (F4). As already mentioned, the Cd soil levels were lower as compared to other metals, however, relatively uniform metal distribution among F1–F5 fractions was observed. At sites 1 and 4, the relative distribution of “free” Cd was 36% and 32%, respectively.



**Fig. 1** Distribution of Cu, Ag, Cd and Pb in soil fractions at different sampling sites (1–5, as described in Reagents and samples). F1—exchangeable fraction; F2—fraction bound to carbonates; F3—fraction associated with iron and manganese oxides; F4—fraction bound to organic matter and sulfides; F5—residual fraction.

The determination of acid-digested metals in roots and stems was carried out after acid digestion of biological material. Owing to low cadmium concentration in soils, it was found at low µg per kg concentrations in plant material, so the results were not considered. For other metals, correlation analysis was performed in search of a relationship between their levels in soil fractions F1–F5 and root/stem concentrations. To do so, the results obtained in the determination of three metals in soil fractions and plant material at each sampling site were analyzed using the software package Statistica for Windows (StatSoft Inc. 2000, Tulsa, OK, USA). No statistically important correlation was found between soil and stem metal levels. The correlation parameters ( $r$ —correlation coefficient and  $p$ —probability level) obtained for roots and soil data are presented in Table 1. At first, acid-digested metal in soil did not correlate strongly with Pb and Cd concentration in plant ( $r = 0.7321, p = 0.176$  and  $r = 0.8169, p = 0.091$ , respectively).

**Table 1** Correlation analysis for acid-digested metal determinations in soil fractions F1–F4 and in nopal roots<sup>a</sup>

	Pb	Cu	Ag
Soil vs. root	$r = 0.7321$ , $p = 0.176$	$r = 0.8169$ , $p = 0.091$	$r = 0.9368$ , $p = 0.019$
F1 vs. root	nf	nf	nf
F2 vs. root	nf	nf	nf
F3 vs. root	nf	nf	nf
F4 vs. root	$r = 0.8436$ , $p = 0.072$	$r = 0.8648$ , $p = 0.058$	$r = 0.8842$ , $p = 0.046$
F4 vs. root	nf	nf	nf

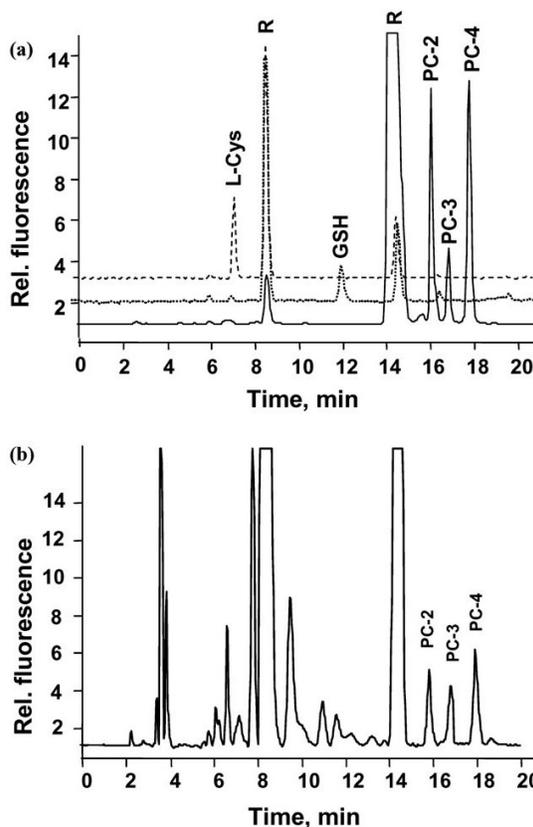
<sup>a</sup> nf—no statistically important correlation was found.

Furthermore, no statistically important correlation was found between any metal in the fractions F1 (exchangeable), F2 (carbonates), F3 (manganese and iron oxides) or F5 (residual) and root metal, indicating that these fractions were not important for the uptake of Cu, Pb and Ag by nopal. On the other hand, statistically significant correlations found between metals in F4 and root metals ( $r = 0.8436$ ,  $p = 0.072$  for Pb;  $r = 0.8648$ ,  $p = 0.058$  for Cu;  $r = 0.8842$ ,  $p = 0.046$  for Ag, Table 1) suggest that organic matter and sulfide bound metals (fraction F4) should be bioavailable to nopal. The results obtained in the spectrophotometric assay revealed low levels of humic substances (primary soil organic matter) in top-soils collected at the roots of nopal (Table 2). For comparative purposes, additional soil samples were taken at these same sampling sites, but close to the roots of castor bean, which is another common plant in this region. As can be observed in Table 2, the HS levels were significantly lower in the samples collected at cactus roots, which is in agreement with literature data.<sup>29,42</sup> Since sulfide minerals are abundant in Guanajuato region,<sup>23</sup> our results suggest that sulfides are primarily Pb, Cu and Cd forms in soil close to the cactus roots (at least 20 cm from the roots). The solubility of these compounds is generally poor, so the rhizosphere processes and, in particular, root exudation of low-molecular weight carboxylic acids should be important in mobilizing sulfide bound metals.<sup>43,44</sup> However, the literature data on these processes in nopal or other cactaceous is scarce. Puente *et al.*<sup>45</sup> proposed the contribution of bacteria and fungi in the rhizoplane of nopal roots (the area at the plant and soil interface) as a factor increasing metal bioavailability.

In order to examine if the nopal plant can produce PCs, the root and stem extracts were obtained and analyzed by reversed

**Table 2** Results of the spectrophotometric assay of humic substances in soils collected at different sampling sites, close to the roots of two plants: nopal and castor bean. (The distance from root was not longer than 20 cm, fresh soil was analyzed and the mean values  $\pm$  SD are presented for each sampling site)

Sampling site	Soil humic substances/mg g <sup>-1</sup>	
	Nopal	Castor bean
1	75 $\pm$ 13	481 $\pm$ 38
2	453 $\pm$ 19	415 $\pm$ 42
3	175 $\pm$ 23	1345 $\pm$ 100
4	43 $\pm$ 8	553 $\pm$ 47
5	10 $\pm$ 6	—



**Fig. 2** Reversed-phase chromatograms: (a) standards derivatized with monobromobimane: (—) phytochelatins PC-2, PC-3, PC-4; (· · ·) glutathione (GSH); (- -) L-cysteine (L-Cys); (b) roots extract from nopal collected at site 1. (R—derivatization agent and/or products of its hydrolysis. For better comparison of the graphs, they have been offset on the y axis.)

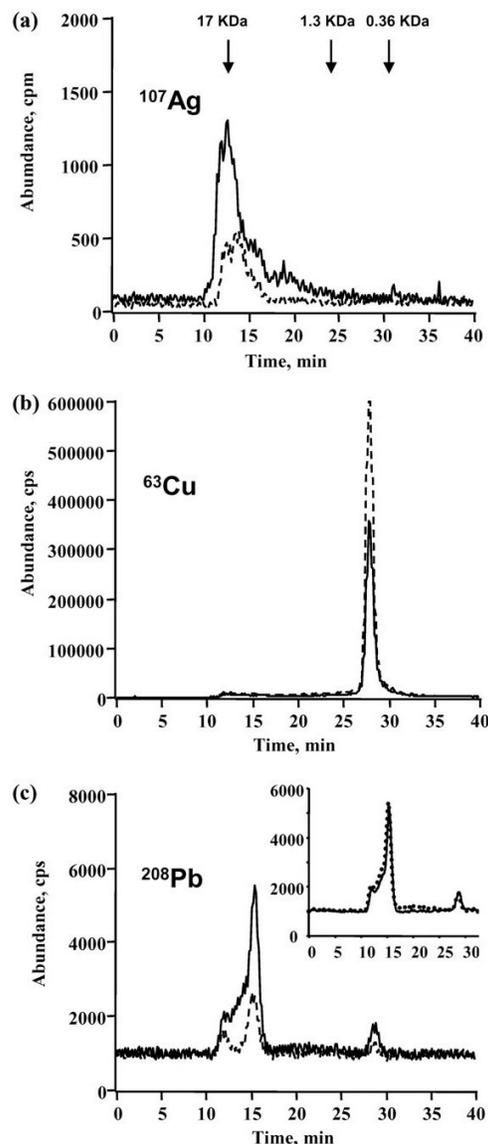
phase chromatography, followed by fluorescence detection after derivatization. In Fig. 2a, typical chromatograms of monobromobimane-derivatized standards are presented. The elution order of cysteine ( $t_{\text{ret}} = 7.3$  min), glutathione ( $t_{\text{ret}} = 12.2$  min) and phytochelatins (PC-2  $t_{\text{ret}} = 15.9$  min; PC-3  $t_{\text{ret}} = 16.7$  min; PC-4  $t_{\text{ret}} = 17.6$  min) as well as the elution of MBrB and its hydrolysis products were in agreement with those observed by others.<sup>37–39</sup> In the analysis of plant extracts, phytochelatins were detected in all samples collected in Guanajuato but not in the plant material from the “clean” area in Merida. Fig. 2b shows the chromatogram of roots extract from nopal collected at site 1 and the elution of PC-2, PC-3 and PC-4 can be observed. The quantification results for phytochelatins (total PCs) in leaves and roots of plants collected in Guanajuato are given in Table 3. It can be observed that roots always contained higher PC levels than the stems.

To get information on metal association with molecular mass fractions of PC-rich plant extracts, root and stem homogenates were extracted with ammonium acetate (pH 7.4) and fractionated by size exclusion chromatography with

**Table 3** Total phytochelatin (PCs) found in the extracts from nopal roots and stems. The mean results presented together with respective standard deviations (triplicate injection) were obtained by reversed phase HPLC with pre-column derivatization of metal-free PCs

Sampling site	$\mu\text{g}$ of total PCs per gram of the freeze-dried plant homogenate	
	Roots	Stems
1	12.2 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 0.6
2	16.8 $\pm$ 0.4	10.0 $\pm$ 0.3
3	27.7 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 0.2
4	74.3 $\pm$ 0.3	20.3 $\pm$ 0.2

ICP-MS detection.<sup>2,36</sup> As an example, the chromatograms obtained for the plant material from site 3 in Guanajuato are presented in Fig. 3 (cadmium could not be detected). The lead elution profile obtained in the re-injection of root extract is presented as the insert in Fig. 3c, showing excellent repeatability of SEC-ICP-MS. For this metal, lower element levels were observed in stems than roots. Furthermore, this element was eluted in two column fractions: first in the region of high molecular mass (between 75–95% of total Pb eluted from the column), and secondly in the region corresponding to low molecular mass fraction. For copper, only one elution peak was observed in the region of low molecular mass (Fig. 3b). Contrary to lead, in many samples the copper abundance in stems was higher than in roots. The elution profile of silver (Fig. 3a) indicates its association with high molecular weight compounds; however, the chromatographic peaks were relatively broad suggesting non-specific binding. Based on peak area measurements, the relative distribution of three metals between high and low molecular mass fractions was estimated for each plant sample. The correlation analysis (Statistica for Windows) was performed taking these data and the results of total PCs in root and stems, in order to get further insight into the metal-PCs system in nopal, especially in the context of metallomics approach. In the natural environment, the plant is exposed to the mixture of different metals/metalloids, which leads to the induction of PCs. However, it is difficult to discriminate among the elements important for PCs induction and those that are simply bound to PCs already existing. We considered that the correlation between total PCs and metal bound to PCs would indicate that this metal is important in the induction of PCs. For lead, significant correlation was found between total PCs and SEC-ICP-MS areas ( $r = 0.7026$ ,  $p = 0.088$  for roots and  $r = 0.8581$ ,  $p = 0.071$  for stems). Furthermore, total PCs correlated with lead eluted in SEC high molecular mass fraction ( $r = 0.6835$ ,  $p = 0.023$  for roots and  $r = 0.8818$ ,  $p = 0.048$  for stems). These results confirm the association of Pb with nopal phytochelatin and suggest its possible role in PCs induction. For copper, correlation was observed between total PCs and the entire SEC-ICP-MS area in roots ( $r = 0.7568$ ,  $p = 0.129$ ) and between total PCs and high molecular mass fraction of SEC in roots ( $r = 0.7455$ ,  $p = 0.138$ ). Apparently, copper could be involved in the PCs induction in roots, however the translocation of lead and copper through the plant is apparently different. No statistically important correlation was found for silver indicating that it is not associated with PCs production.



**Fig. 3** SEC-ICP-MS chromatograms of the (---) nopal stem extract; (—) nopal root extract: (a)  $^{107}\text{Ag}$ ; (b)  $^{63}\text{Cu}$ ; (c)  $^{208}\text{Pb}$  (inset: the elution profiles obtained for the re-injection of this same root extract).

## Conclusions

In this work, phytochelatin were found in nopal (*Opuntia ficus*). Considering the importance of the environmental conditions in PC biosynthesis, four metals known to be abundant in the Guanajuato region were determined in soil, soil fractions and plant material. Total PCs and the distribution of metals in molecular mass fractions of PC-rich plant extracts were evaluated. In search of a possible relationship between the parameters measured, the statistical correlation analysis was done. The results obtained indicate that sequential metal leaching from soil does not always provide direct information

on metal bioavailability. Metal uptake by nopal roots correlated with metals in soil fraction F4 (organic matter and sulfides). Since low levels of humic substances were found in soil collected at the roots of cacti, and because of the low solubility of Pb, Cu and Ag sulfides, the participation of rizosphere processes was suggested to facilitate metal uptake. The application of reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection and the SEC-ICP-MS procedure allowed us to obtain complementary data for phytochelatin in nopal. The results of correlation analysis revealed the strong association of lead bound to PCs in root and stem extracts with total PCs both in roots and in stems, which demonstrates that this metal is important in the induction of PCs in nopal and suggests that, Pb, as bound to PCs, might be transported from roots to stems. For copper, the correlation between total PCs and metal bound to high molecular mass fraction of PCs-rich plant extract was observed only in the root, suggesting differences in the translocation of lead and copper through the plant. In contrast to the above two metals, no correlation was found for silver, so it apparently is not associated with PCs, even though its elution with the high molecular mass fraction was observed in PC-rich plant extracts.

The assessment of metal uptake, its association with PCs, or its possible role in PC induction needs careful experimental design that considers different environmental parameters and is based on the application of complementary analytical techniques. Finally, while these studies are performed in plants growing in natural environment, the metallomics approach is required to understand the global effect of all metals and metalloids, which may access plants.

## Acknowledgements

The grants from CONACYT, Mexico (project 49405) and from CONCYTEG, Mexico (project 23681) are kindly acknowledged. We are grateful to NIEHS grant # ES04908 for partial support.

## References

- 1 M. H. Zenk, Heavy metal detoxification in higher plants—a review, *Gene*, 1996, **179**, 21–30.
- 2 D. P. Persson, T. H. Hansen, P. E. Holm, J. K. Schjoerring, H. C. B. Hansen, J. Nielsen, I. Cakmak and S. Husted, Multi-element speciation analysis of barley genotypes differing in tolerance to cadmium toxicity using SEC-ICP-MS and ESI-TOF-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 996–1005.
- 3 G. Scarano and E. Morelli, Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure, *Biometals*, 2002, **15**, 145–151.
- 4 S. M. Spain and D. L. Rabenstein, Characterization of the acid/base and redox chemistry of phytochelatin analogue peptides, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 3712–3719.
- 5 C. S. Cobbett, Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2000, **3**, 211–216.
- 6 S. Clemens, Evolution and function of phytochelatin synthases, *J. Plant Physiol.*, 2006, **163**, 319–332.
- 7 L. Bovet, U. Feller and E. Martinoia, Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach, *Environ. Int.*, 2005, **31**, 263–267.
- 8 X. Yang, Y. Feng, Z. He and P. J. Stoffella, Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2005, **18**, 339–353.
- 9 S. Clemens, Developing tools for phytoremediation: towards a molecular understanding of plant metal tolerance and accumulation, *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 2001, **14**, 235–239.
- 10 A. P. Navaza, M. Montes-Bayon, D. L. Leduc, N. Terry and A. Sanz-Medel, Study of phytochelatin and other related thiols as complexing biomolecules of As and Cd in wild type and genetically modified *Brassica juncea* plants, *J. Mass Spectrom.*, 2006.
- 11 M. Koster, L. Reijnders, N. R. van Oost and W. J. Peijnenburg, Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zinc accumulation in plants and isopods, *Environ. Pollut.*, 2005, **133**, 103–116.
- 12 C. A. Lucho Constantino, F. Prieto García, L. M. del Razo, R. Rodríguez Vazquez and H. M. Poggi Varaldo, Chemical fractionation of boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico, *Agric., Ecosyst. Environ.*, 2005, **108**, 57–71.
- 13 J. I. Lorenzo, R. Beiras, V. K. Mubiana and R. Blust, Copper uptake by *Mytilus edulis* in the presence of humic acids, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2005, **24**, 973–980.
- 14 J. Voets, L. Bervoets and R. Blust, Cadmium bioavailability and accumulation in the presence of humic acid to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, *Environ. Sci. Technol.*, 2004, **38**, 1003–1008.
- 15 J. M. Garcia-Mina, M. C. Antolin and M. Sanchez-Diaz, Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types, *Plant Soil*, 2004, **258**, 57–68.
- 16 V. Misra and S. D. Pandey, Immobilization of heavy metals in contaminated soil using nonhumus-humic soil and hydroxyapatite, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2005, **74**, 725–731.
- 17 S. Inaba and C. Takenaka, Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts, *Environ. Int.*, 2005, **31**, 603–608.
- 18 A. Kungolos, P. Samaras, V. Tsiridis, M. Petala and G. Sakellariopoulos, Bioavailability and toxicity of heavy metals in the presence of natural organic matter, *J. Environ. Sci. Health, Part A*, 2006, **41**, 1509–1517.
- 19 S. Clemens, Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants, *Biochimie*, 2006, **88**, 1707–1719.
- 20 J. L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, V. Bernal, M. J. Villegas and V. Olivera, Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **524**, 15–22.
- 21 J. Szpunar, Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics, *Analyst*, 2005, **130**, 442–465.
- 22 B. Lahner, J. Gong, M. Mahmoudian, E. L. Smith, K. B. Abid, E. E. Rogers, M. L. Gueriot, J. F. Harper, J. M. Ward, L. McIntyre, J. I. Schroeder and D. E. Salt, Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 1215–1221.
- 23 A. Carrillo-Chavez, O. Morton-Bermea, E. Gonzalez-Partida, H. Rivas-Solorzano, G. Oesler, V. Garcia-Meza, E. Hernandez, P. Morales and E. Cienfuegos, Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico, *Ore Geol. Rev.*, 2003, **23**, 277–297.
- 24 V. Garcia-Meza, E. Ramos, A. Carrillo-Chavez and C. Duran-de-Bazua, Mineralogical and chemical characterization of historical mine tailings from the Valencianna mine, Guanajuato, Mexico: Environmental implications, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2004, **72**, 170–177.
- 25 O. Morton-Bermea, A. Carrillo-Chavez, E. Hernandez and E. Gonzalez-Partida, Determination of metals for leaching experiments of mine tailings: Evaluation of potential environmental hazard in the Guanajuato mining district, Mexico, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2004, **73**, 770–776.
- 26 E. M. Galati, M. R. Mondello, D. Guffrida, G. Dugo, N. Miceli, S. Pergolizzi and M. F. Taviano, Chemical Characterization and Biological Effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit Juice antioxidant and Antitumorogenic Activity, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 4903–4908.
- 27 E. M. Diaz Medina, E. M. Rodriguez-Rodriguez and C. Diaz Romero, Chemical characterization of *Opuntia dilenii* and *Opuntia ficus indica* fruits, *Food Chem.*, 2007, **103**, 38–45.

- 28 F. C. Stintzing and R. Carle, Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology and uses, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2005, **49**, 175–194.
- 29 F. A. Galizzi, P. Felker, C. Gonzalez and D. Gardiner, Correlations between soil and cladode nutrient concentrations and fruit yield and quality in cactus pears, *Opuntia ficus indica* in a traditional farm setting in Argentina, *J. Arid Environ.*, 2004, **59**, 115–132.
- 30 R. K. Maiti, D. Lopez Santiago, A. Nunez Gonzalez, P. Wesche Ebeling, J. A. Gonzalez and G. Garcia Diaz, Mineral contents and Pb and Cd contamination in several vegetable species sold in the vegetable markets of Puebla, Mexico, *Phyton (Buenos Aires, Argent.)*, 2002, **2**, 193–198.
- 31 L. Tesoriere, M. Fazzari, M. Allegra and M. A. Livrea, Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of Sicilian cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 7851–7855.
- 32 E. Morelli and G. Scarano, Synthesis and stability of phytochelatin induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*, *Mar. Environ. Res.*, 2001, **52**, 383–395.
- 33 W. G. Keltjens and M. L. Van Beusichem, Phytochelatin as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) combined effects of copper and cadmium, *Plant Soil*, 1998, **203**, 119–126.
- 34 T. Maitani, H. Kubota, K. Sato and T. Yamada, The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*, *Plant Physiol.*, 1996, **110**, 1145–1150.
- 35 R. K. Mehra, K. Tran, G. W. Scott, P. Mulchandani and S. S. Saini, Ag(I)-binding to phytochelatin, *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **61**, 125–142.
- 36 M. Montes-Bayon, J. Meija, D. LeDuc, N. Terry, J. A. Caruso and A. Sanz-Medel, HPLC-ICP-MS and ESI-Q-TOF analysis of biomolecules induced in *Brassica juncea* during arsenic accumulation, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 153–158.
- 37 F. E. Sneller, L. M. van Heerwaarden, P. L. Koevoets, R. Vooijs, H. Schat and J. A. Verkleij, Derivatization, of phytochelatin from *Silene vulgaris* induced upon exposure to arsenate and cadmium comparison of derivatization, with Ellman's reagent and monobromobimane, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 4014–4019.
- 38 S. Doring, S. Korhammer, M. Oetken and B. Markert, Analysis of phytochelatin in plant matrices by pre-column derivatization, high-performance liquid chromatography and fluorescence-detection, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2000, **366**, 316–318.
- 39 D. Tang, M. M. Shafer, K. Vang, D. A. Karner and D. E. Armstrong, Determination of dissolved thiols using solid-phase extraction and liquid chromatographic determination of fluorescently derivatized thiolic compounds, *J. Chromatogr., A*, 2003, **998**, 31–40.
- 40 A. Tessier, P. G. C. Campbell and N. J. Bisson, *Anal. Chem.*, 1979, **51**, 844.
- 41 K. Wrobel, B. B. M. Sadi, K. Wrobel, J. R. Castillo and J. A. Caruso, Effect of metal ions on the molecular weight distribution of humic substances derived from municipal: compost ultrafiltration and SEC with spectrophotometric and ICP-MS detection, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 761–767.
- 42 I. C. Burke, W. K. Lauenroth, R. Riggle, P. Brannen, B. Madigan and S. Beard, Spatial variability of soil properties in the shortgrass steppe: the relative importance of topography, grazing, microsite and plant species in controlling spatial patterns, *Ecosystems*, 1999, **2**, 422–438.
- 43 W. W. Wenzel, E. Lombi and D. C. Adriano, "Root and rhizosphere processes in metal hyperaccumulation and phytoremediation technology", in *Heavy Metal Stress in Plants*, 2004, ed. M. N. V. Prasad, Springer-Verlag, Berlin Germany, 2nd edn., pp. 313–344.
- 44 D. L. Jones, A. Hodge and Y. Kuzyakov, Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition, *New Phytol.*, 2004, **163**, 459–480.
- 45 M. E. Puente, Y. Bashan, C. Y. Li and V. K. Lebsky, Microbial populations and activities in the rhizosphere of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks, *Plant Biol. (Stuttgart, Ger.)*, 2004, **6**, 629–642.

## Perfil de Elementos Metálicos y de Algunos Metaloides en Aguas de Grifo de la Ciudad de Guanajuato

Julio Alberto Landero Figueroa\*, Armando Gómez Ojeda\*, Kazimierz Wrobel\*, Katarzyna Wrobel\*

### RESUMEN

En este trabajo se reportan los niveles de concentración de elementos metálicos y algunos metaloides en agua de grifo de la ciudad de Guanajuato. La técnica del estudio fue espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente como fuente de ionización (ICP-MS). En el análisis de 31 muestras de agua, los valores promedio de concentraciones encontradas fueron:  $< 0,2 \mu\text{g l}^{-1}$  para Ag, Cd, Co, Se, Th, Tl, U; en el intervalo  $0,2 \mu\text{g l}^{-1} - 1,5 \mu\text{g l}^{-1}$  para Cr, Hg, Mo, Pb, Sb; en el intervalo  $1,5 - 6,0 \mu\text{g l}^{-1}$  para As, Mn, Ni, V; en el intervalo  $15 \mu\text{g l}^{-1} - 71 \mu\text{g l}^{-1}$  para Ba, Cu y Zn. En base a la normatividad vigente (NOM-127 SSA1-1994, USEPA 2006), los resultados obtenidos indican que agua de grifo en Guanajuato no está contaminada por metales y metaloides. Sin embargo, en seis sitios de muestreo, las concentraciones de mercurio sobrepasaron el máximo nivel permisible por la Norma Oficial Mexicana ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

### ABSTRACT

In this paper, the concentration levels of metals and metalloids found in tap water in the city of Guanajuato are reported. The quantification was carried out by inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS). The results obtained in the analysis of tap water from 31 sampling sites showed the mean values  $< 0,2 \mu\text{g l}^{-1}$  for Ag, Cd, Co, Se, Th, Tl, U; in the range  $0,2 \mu\text{g l}^{-1} - 1,5 \mu\text{g l}^{-1}$  for Cr, Hg, Mo, Pb, Sb; in the range  $1,5 - 6,0 \mu\text{g l}^{-1}$  for As, Mn, Ni, V; in the range  $15 \mu\text{g l}^{-1} - 71 \mu\text{g l}^{-1}$  for Ba, Cu y Zn. Based on current Mexican and US regulations (NOM-127 SSA1-1994, USEPA-2006), the results obtained indicate that the tap water in the city of Guanajuato is not contaminated by metals and metalloids. However, in samples from six sites, the concentration levels of mercury were higher than the maximum permissible level regulated by NOM ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

Recibido: 21 de Noviembre de 2007  
Aceptado: 15 de Enero de 2008

### INTRODUCCIÓN

Debido a la composición natural de la corteza terrestre que se presenta en el estado de Guanajuato y relacionada con ello, la actividad minera, se ha estudiado extensivamente la distribución de metales y metaloides en diferentes compartimientos del medio ambiente (Mendoza Amézquita, 1999, p. 2; Carrillo-Chavez, 2003, p. 277; García-Meza, 2004, p. 170; Morton-Bermea, 2004, p. 770; Landero Figueroa, 2007, p. 897; Ramos Arroyo, 2007, p. 497). Los resultados reportados indican la posible lixiviación de elementos presentes en jales y suelos hacia los sistemas acuáticos (Carrillo-Chavez, 2003, p. 277; Morton-Bermea, 2004, p. 770). En los últimos años, la Comisión Estatal del Agua de Guanajuato (CEAG) y algunos grupos de investigación han realizado diferentes proyectos, obteniendo interesantes datos sobre la calidad del agua y, en particular sobre niveles de metales pesados y metaloides (Wrobel, 1997, p. 1; Mendoza Amézquita, 1999, p. 2; INEGI, 1998, p. 7; Wrobel, 2001, p. 209; Cotler-Avalos, 2006, p. 1). A pesar del extenso trabajo realizado, hasta la fecha, no existe la información sólida y uniforme sobre los niveles de elementos considerados en la Norma Oficial Mexicana para el agua de consumo humano (NOM-127 SSA1-1994).

#### Palabras clave:

Metales y metaloides; Agua de grifo; Guanajuato; ICP-MS.

#### Keywords:

Metals; Metalloids; Tap water; Guanajuato; ICP-MS.

En este contexto, el presente trabajo ha sido enfocado en el estudio de la calidad del agua de consumo en la ciudad de Guanajuato, teniendo como objetivo la determinación de elementos metálicos y algunos metaloides en

\* Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de Guanajuato, Cerro de la Venada S/N, Guanajuato, Gto., 36040, México. Teléfono: (+52) 473 7327555. Fax: (+52) 473 7326252. Correo electrónico: katarzyn@quijote.ugto.mx.

agua de grifo, tomada en diferentes sitios de la ciudad. La herramienta analítica del estudio ha sido la espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). La selección de la técnica fue en base a sus siguientes características: alto poder de detección (los límites de detección para la mayoría de los elementos en la región de partes por trillón,  $\text{ng l}^{-1}$ ), capacidad del análisis multielemental e isotópico, amplio rango dinámico (típicamente del orden de 8 órdenes de magnitud), muy pocas interferencias y, en consecuencia, alta precisión y exactitud de los resultados analíticos (Montaser, 1998, p. 25; Wrobel, 2004, p. 231).

## METODOLOGÍA

### Instrumentación

El espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente fue modelo 7500ce de Agilent Technology, Tokio, Japón, equipado con celda de colisión/reacción, automuestreador y controlado mediante el paquete Chemstation. Se utilizó el nebulizador concéntrico Meinhard y la cámara de niebla tipo Peltier ( $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### Reactivos y muestras

Los reactivos fueron de grado analítico de pureza y se utilizó agua desionizada ( $18\text{ M}\Omega\text{ cm}$ , Labconco, USA) para la preparación de las soluciones. Las calibraciones se realizaron empleando la solución estándar para el análisis medio ambiental de Agilent Technologies ( $10\text{ mg l}^{-1}$  Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, U;  $100\text{ mg l}^{-1}$  Fe, K, Ca, Na, Mg en  $10\%$   $\text{HNO}_3$ ) y la solución de estándares internos ( $^{74}\text{Ge}$  y  $^{193}\text{Ir}$ , ambos  $1,0\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ ). El ácido nítrico para análisis de trazas fue de Fluka (Trace-select) el material de referencia certificado fue NIST 1643d (Trace Elements in Water).

Se analizaron las muestras de agua de grifo recolectadas en 31 sitios de muestreo en la ciudad de Guanajuato (Figura 1). La toma de muestra se realizó de acuerdo con la norma (NOM-014-SSA1-1993). Para ello se utilizaron botellas de polipropileno de 500 ml, previamente descontaminadas con  $10\%$  ácido nítrico y agua desionizada. En el sitio de muestreo, se dejó correr el agua por lo menos 3 min, la botella se enjuagó con 3 porciones de agua y finalmente se llenó. Se tomaron tres muestras en cada sitio, en intervalos de tiempo de 30 min. El agua fue acidificada ( $1000\text{ }\mu\text{l}$  de ácido nítrico (1:10) a cada muestra de 500 ml), al llegar a laboratorio centrifugada y, 50 ml de sobre-

nadante se almacenó por máximo 4 días antes de su análisis ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### Procedimiento analítico

Las condiciones de operación del ICP-MS fueron seleccionadas diario ("tuning"), ajustando los parámetros hasta obtener la respuesta para óxidos y dobles cargas inferior a  $0,8\%$  y  $1,4\%$  respectivamente. Los parámetros de plasma fueron: potencia RF  $1500\text{ W}$ , flujo de gas carrier  $0,9\text{ l min}^{-1}$ , flujo de gas make-up  $0,17\text{ l min}^{-1}$ , flujo de gas plasma  $15\text{ l min}^{-1}$ . Para eliminar las interferencias isobáricas, se utilizó la celda de colisión con el flujo de helio  $4,0\text{ ml min}^{-1}$ . En el modo de análisis cuantitativo, se monitorearon los isótopos  $^{51}\text{V}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{53}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{75}\text{As}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{95}\text{Mo}$ ,  $^{106}\text{Hg}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Tl}$ ,  $^{114}\text{Cd}$ ,  $^{121}\text{Sb}$ ,  $^{137}\text{Ba}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{238}\text{U}$ , con el tiempo de integración de  $300\text{ ms}$  por isótopo.

Con las condiciones instrumentales establecidas, se llevó a cabo el proceso de calibración, utilizando como estándares internos  $^{74}\text{Ge}$  y  $^{193}\text{Ir}$  (ambos  $1,0\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ ). Las soluciones de calibración conteniendo cinco niveles de concentración para cada uno de los elementos (0; 0,2; 1,0; 5,0; 10;  $25\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ ) fueron obtenidas diluyendo el estándar medio ambiental (Agilent Technologies). En la calibración multielemental, se obtuvieron los valores de coeficientes de regresión lineal  $r^2 > 0,9993$  para cada uno de los elementos.



Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo en la ciudad de Guanajuato.

El análisis de agua de grifo se realizó por triplicado; las muestras fueron diluidas 1:10 con agua desionizada e introducidas al sistema ICP-MS. En paralelo, se obtuvieron lecturas del blanco (agua desionizada, acidificada, centrifugada y diluida igual que las muestras) y del material de referencia (NIST 1643d). Los valores de blanco, medidos en unidades de concentración (BEC - blank equivalent concentration) fueron en el rango de 0 ng l<sup>-1</sup> a 80 ng l<sup>-1</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Calidad de los resultados analíticos

Para asegurar una buena calidad de los resultados analíticos en términos de precisión y exactitud, el procedimiento analítico fue basado en el método EPA 6020 (EPA - Agencia de Protección de Medio Ambiente, USA), aplicable para el análisis por ICP-MS de las concentraciones bajas (µg l<sup>-1</sup> e inferiores) de un alto número de elementos (hasta 60) en muestras de agua (ICP-MS method 6020, USEPA). Se optó por la determinación de la fracción disuelta de los elementos, omitiendo la etapa de digestión de las muestras. De acuerdo con el método 6020, la cuantificación fue en base a las soluciones estándar multielementales y estandarización interna. Las posibles interferencias isobáricas fueron eliminadas mediante el uso de tecnología de celda de colisión/reacción. En la Tabla 1 se presentan los Límites de Detección (LD) evaluados para cada uno de los elementos (tiempo de integración 300 ms, 5 lecturas), cuyos valores fueron suficientemente bajos para llevar a cabo la cuantificación de elementos en agua de grifo, donde se esperan niveles de ultratrazas. Como prueba de exactitud, se llevó a cabo la determinación de elementos en el material de referencia certificado. En la Tabla 1, se presentan los resultados obtenidos (promedios ± DE para 3 réplicas) junto con los valores certificados. Se obtuvo muy buena concordancia para todos los elementos, lo que confirma la exactitud del procedimiento en el análisis de agua.

### Análisis de agua de grifo

Con el fin de obtener la información sobre contenidos de elementos metálicos y metaloides en agua de consumo, utilizada directamente por los habitantes de la ciudad de Guanajuato, en este trabajo se optó por analizar agua de grifo. En la Figura 1 se presenta la ubicación de 31 sitios de muestreo en el mapa de la ciudad. De acuerdo con la numeración de los sitios, las muestras 1, 2, 3 fueron tomadas en cercanía de la Presa de la Olla; las muestras 4, 5 en la Panorá-

mica (Pastita); las muestras 6 - 13 en el centro; las muestras 14 - 16 en Panorámica (Cerro del Cuarto - Mina de Cata); las muestras 17 - 19 en San Javier; las muestras 20, 21, 22 y 23 en las colonias Carrizo, Pueblito de Rocha, Noria Alta y en Pastita respectivamente. En el tramo Municipio Libre - Pozuelos - Bulevar Guanajuato se tomaron las muestras 24, 25 y 26, las muestras 27 y 28 corresponden a Marfil y las muestras 29, 30 y 31 fueron tomadas en la colonia Burócratas.

Los resultados obtenidos, permitieron descartar a Ag, Cd, Co, Se, Th, Tl y U como posibles contaminantes, ya que estos elementos presentaban concentraciones inferiores a 0.2 µg l<sup>-1</sup>. Los resultados cuantitativos, obtenidos para el resto de los elementos se resumen en la Figura 2 (Zn, Cu, Hg, Mn) y en la Fig. 3 (V, As, Ba, Pb). Para cada sitio de muestreo se presenta el valor promedio junto con la desviación estándar respectiva, evaluados en el análisis de tres muestras.

El agua de consumo humano debería cumplir con la Norma Oficial Mexicana que establece los máximos niveles permisibles para As, Cr, Cd, Pb, Ba y Hg como

Tabla 1.

Los isótopos monitoreados, límites de detección (LD), valores certificados y resultados de determinación de elementos en material certificado NIST 1643d. (No se presentan resultados analíticos para Hg, Th, U, ya que estos elementos no fueron certificados en el material de referencia).

Isótopo monitoreado	LD, ng l <sup>-1</sup>	Análisis de material de referencia	
		Valor certificado, µg l <sup>-1</sup>	Encontrado, µg l <sup>-1</sup>
<sup>51</sup> V	3,4	35,1 ± 1,4	34,7 ± 1,2
<sup>52</sup> Cr	8,4	18,5 ± 0,2	18,2 ± 0,3
<sup>55</sup> Mn	4,4	37,7 ± 0,8	38,0 ± 0,9
<sup>59</sup> Co	4,0	25,0 ± 0,6	22,2 ± 1,1
<sup>60</sup> Ni	51	58,1 ± 2,7	60,3 ± 1,9
<sup>63</sup> Cu	51	20,5 ± 3,8	20,2 ± 1,6
<sup>66</sup> Zn	150	72,5 ± 0,7	72,9 ± 0,6
<sup>75</sup> As	12	56,0 ± 0,7	53,9 ± 1,3
<sup>82</sup> Se	220	11,4 ± 0,2	9,94 ± 2,2
<sup>95</sup> Mo	15	113 ± 2	115 ± 3
<sup>109</sup> Ag	1,7	1,27 ± 0,06	1,15 ± 0,07
<sup>114</sup> Cd	3,1	6,47 ± 0,4	6,37 ± 0,2
<sup>121</sup> Sb	6,6	54,1 ± 1,1	55,9 ± 0,9
<sup>137</sup> Ba	41	507 ± 9	503 ± 6
<sup>200</sup> Hg	65	-	-
<sup>205</sup> Tl	0,9	7,28 ± 0,25	7,80 ± 0,70
<sup>208</sup> Pb	44	18,2 ± 0,6	19,3 ± 0,8
<sup>232</sup> Th	0,6	-	-
<sup>238</sup> U	1,2	-	-

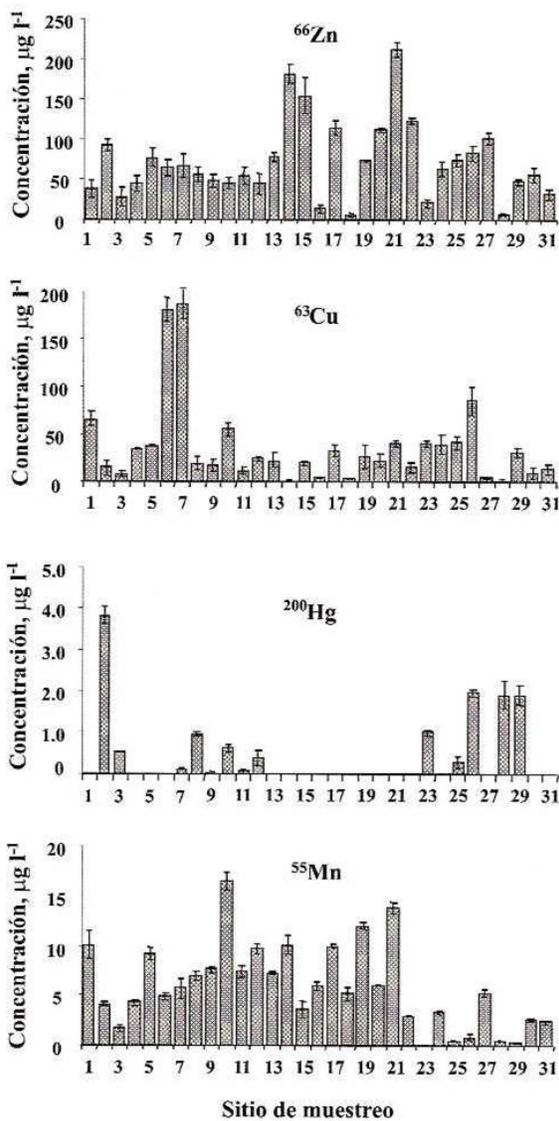


Figura 2. Resultados de determinación de Zn, Cu, Hg y Mn en agua de grifo en 31 sitios de muestreo. (En cada uno de los casos se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).

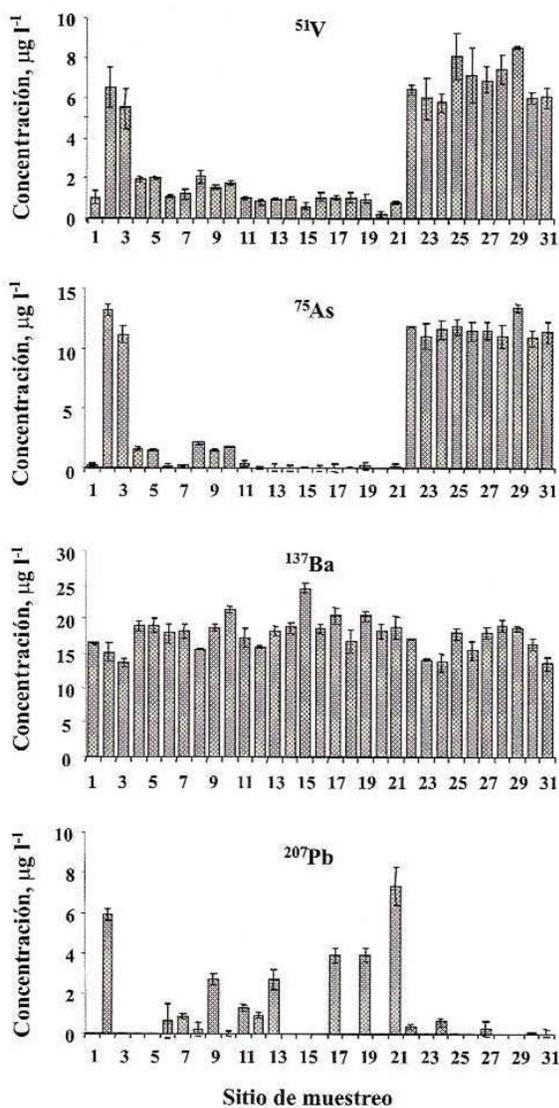


Figura 3. Resultados de determinación de V, As, Zn y Pb en agua de grifo en 31 sitios de muestreo. (En cada uno de los casos se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).

constituyentes inorgánicos importantes para la salud (NOM-127 SSA1-1994). Para fines comparativos, en este trabajo se consideraron también estándares para agua potable, actualizados por USEPA en el año 2006 (USEPA, 2006, p. 1). En la Tabla 2 se presentan los resultados de este trabajo y su comparación con valores establecidos por la normatividad mexicana y estadounidense. Cabe señalar que, existen ciertas diferencias entre valores de los dos sistemas normativos, debido a que cada país aplica diferentes criterios en evaluación de riesgo para salud derivado del consumo de agua "contaminada" (Shelton, 2004, p.4). En la Tabla 2 se presentan también los valores SDRW (Secondary Drinking Water Regulation), que establece USEPA como valores guía, o niveles que no deberían ser repasados para conservar buenas propiedades organolépticas del agua. Parece importante que los niveles de elementos determinados en este trabajo fueron muy inferiores respecto a los niveles permisibles NOM y USEPA, excepto mercurio. Para este elemento, las concentraciones encontradas en seis pozos fueron mayores que el máximo nivel permisible marcado por la NOM-127 SSA1-1994 (Tabla 2, Fig. 2). Hay que recordar que, el proceso de beneficio de plata en Guanajuato involucraba la etapa de amalgamación, en el cual la mezcla de mercurio con el mineral molido se depositaba por unos dos meses en grandes patios. Posteriormente, una parte de mercurio fue recuperada en el proceso de fundido de la amalgama, pero inevitablemente este proceso formaba un peligroso foco de contaminación. Los antecedentes de actividad minera y de beneficio de metales, así como los resultados de este estudio indican claramente la necesidad de estudios más profundos que permitan

**Tabla 2.**

Resumen de los resultados obtenidos del análisis de agua de grifo y los niveles establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994) y por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (USEPA, 2006).

Elemento	Normas para agua potable, mg l-1			Resultados obtenidos, µg l-1		
	NOM	MCL <sup>1</sup>	SDWR <sup>2</sup>	Promedio ± DE	Valor mínimo	Valor máximo
As	0,05	0,01	-	4,9 ± 5,6	0	13,4
Ba	0,7	2,0	-	17 ± 2	13,5	24,6
Cu	2,0	1,3	1,0	36 ± 44	1,20	187
Cr	0,05	0,1	-	1,2 ± 2,1	0	10,6
Hg	0,001	0,002	-	0,4 ± 0,9	0	3,82
Mn	0,15	-	0,05	5,8 ± 4,2	0	16,5
Mo	-	0,04	-	0,9 ± 0,2	0,64	1,31
Ni	-	0,1	-	2,4 ± 2,5	0	9,30
Pb	0,025	0,015	-	1,0 ± 1,9	0	7,41
Sb	-	0,006	-	0,3 ± 0,2	0,14	0,93
V	-	0,03	-	3,3 ± 2,8	0,29	8,50
Zn	5,0	5,0	5,0	71 ± 48	5,04	213

1 - MCL (maximum contaminant level) – máximos niveles permisibles en agua potable por USEPA;

2 - SDWR (secondary drinking water regulation) – valores guía, o niveles que no deberían ser repasados para conservar aceptables características organolépticas (sabor, color, etc.)

conocer la distribución de especies de mercurio en medio ambiente, su posible implicación en la salud de la población y también proponer las estrategias de remediación.

## CONCLUSIONES

En este trabajo, se llevó a cabo la determinación de diecinueve metales y metaloides en agua de grifo de la ciudad de Guanajuato. El uso de la técnica ICP-MS ha permitido obtener la información cuantitativa para los elementos presentes en concentraciones  $> 0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ , en una sola corrida de muestra y prácticamente sin tratamiento previo. La exactitud de los resultados fue demostrada mediante la cuantificación de elementos en el material de referencia certificado para este tipo de análisis. Los resultados obtenidos indican que el agua de grifo en Guanajuato no presenta problemas de contaminación por metales y metaloides, excepto mercurio.

## REFERENCIAS

- Carrillo-Chavez, A.; Morton-Bermea, O.; Gonzalez-Partida, E.; Rivas-Solorzano, H.; Oesler, G.; Garcia-Meza, V.; Hernández, E.; Morales, P. and Cienfuegos, E. (2003). *Ore Geology Reviews*. 23, 277
- Cotler Avalos, H.; Mazani Hiriart, M. and de Anda Sánchez, J. (2006). *Atlas de la Cuenca Lerma-Chapala*, Instituto Nacional de Ecología
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) (1998). *Estudio Hidrológico del Estado de Guanajuato*
- García-Meza, V.; Ramos, E.; Carrillo-Chavez, A.; Duran-de-Bazua, C. (2004). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 72, 170

- ICP-MS method 6020, USEPA, <http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/6020.pdf>
- Landero Figueroa, J. A.; Afton, S.; Wrobel, K.; Wrobel, K. and Caruso, J. A. (2007). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22, 897
- Mendoza Amezcuita, E. (1999). *Diagnóstico de la calidad del agua potable en las zonas urbanas del Estado de Guanajuato*. Tesis de maestría, Universidad Iberoamericana, Campus León
- Montaser, A. (1998). *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*; Wiley-VCH, Weinheim
- Morton-Bermea, O.; Carrillo-Chavez, A.; Hernandez, E. and Gonzalez-Partida, E. (2004). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73, 770
- Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA1-1993 (1993). Procedimientos Sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 (1994). Salud ambiental, agua para uso y consumo humano - límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Ramos Arroyo, Y.R. and Siebe, C. (2007). *Catena* 71, 497
- Shelton, T. B. (2004). *Interpreting Drinking Water Quality Analysis: What do the numbers mean?*. Rutgers Cooperative Extension, Cook College-Rutgers University: New Brunswick NJ.
- USEPA (2006). *Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories*, [www.epa.gov/waterscience/drinking/standards/dwstandards.pdf](http://www.epa.gov/waterscience/drinking/standards/dwstandards.pdf)
- Wrobel, K.; deNicola, K.; Wrobel, K. and Caruso, J.A. (2004). ICP-MS: Metals and Much More. En A.E. Ashcroft, G. Brenton, J.J. Monaghan (Eds), *Advances in Mass Spectrometry*, (p. 231-275). Elsevier Science, The Netherlands.
- Wrobel, K.; Lopez de Alba, P. L.; Wrobel, K.; Lopez Martinez, L. and Pantoja Villagomez, L. E. (2001). *Aquatic Ecosystem Health & Management* 4, 209
- Wrobel, K.; Wrobel, K. and Lopez-de-Alba, P. L. (1997). *Diagnóstico de contenidos de metales pesados en fuentes de abastecimiento de agua para consumo en Estado de Guanajuato*. Reporte final, convenio CEAS/UG70D797-001

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONCYTEG por el apoyo otorgado para realización del proyecto 236814 (Convenio N° 06-16-A-048).



## Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico

Julio Alberto Landero Figueroa<sup>a</sup>, Katarzyna Wrobel<sup>a,d</sup>, Scott Afton<sup>b</sup>, Joseph A. Caruso<sup>b,d</sup>,  
J. Felix Gutierrez Corona<sup>c</sup>, Kazimierz Wrobel<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Cientificas, Universidad de Guanajuato, L. de Retana No. 5, 36000 Guanajuato, Mexico

<sup>b</sup> Department of Chemistry, University of Cincinnati, Cincinnati, OH 45221-0172, USA

<sup>c</sup> Instituto de Investigacion en Biologia Experimental, Facultad de Quimica, Universidad de Guanajuato, L. de Retana No. 5, 36000 Guanajuato, Mexico

<sup>d</sup> The University of Cincinnati/Agilent Technologies Metallomics Center of the Americas, University of Cincinnati, Cincinnati, OH 45221-0172, USA

Received 16 March 2007; received in revised form 29 August 2007; accepted 30 August 2007

Available online 10 October 2007

### Abstract

Phytochelatin (PCs) were determined in the wild plants, focusing on their relationship with the levels of heavy metals and humic substances (HS) in soil. *Ricinus communis* and *Tithonia diversifolia* were collected from several sites in Guanajuato city (Mexico), which had long been the silver and gold mining center. The analysis of PCs in root extracts was carried out by liquid chromatography (derivatization with monobromobimane). Total Ag, Cd, Cu and Pb in plant roots and in soil samples, as well as soil HS were determined. The association of metals with HS in soils was evaluated by size exclusion chromatography (SEC) with UV and ICP-MS detection. The results obtained revealed the induction of PCs in *R. communis* but not in *T. diversifolia*. The levels of Cd and Pb in plant roots presented strong positive correlation with PC-2 ( $r = 0.9395$ ,  $p = 0.005$ ;  $r = 0.9573$ ,  $p = 0.003$ , respectively), indicating that these two metals promote PCs induction in *R. communis*. On the other hand, the inverse correlation was found between soil HS and metal levels in roots of *R. communis* ( $\text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{Ag}$ ), in agreement with the decreasing affinity of these metals to HS. Importantly, the inverse correlation between soil HS and plant PC-2 was observed ( $r = -0.7825$ ,  $p = 0.066$ ). These results suggest that metals strongly bound to HS could be less bioavailable to plants, which in turn would limit their role in the induction of PCs. Indeed, the SEC elution profiles showed Pb but not Cd association with HS and the correlation between metal in soil and PC-2 in plant was statistically significant only for Cd ( $r = 0.7857$ ,  $p = 0.064$ ). Based on these results it is proposed that the role of heavy metals in PCs induction would depend on their uptake by *R. communis*, which apparently is controlled by the association of metals with soil HS. This work provides further evidence on the role of environmental conditions in the accumulation of heavy metals and phytochelatin production in plants.  
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Heavy metals; Humic substances; Phytochelatin; *Ricinus communis*; *Tithonia diversifolia*

### 1. Introduction

Phytochelatin (PCs) are a group of small, metal-binding peptides, which are biosynthesized by higher plants, some

fungi and algae in the response to heavy metal exposure. These compounds are rich in thiol groups, according to their general structure  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , where  $n$  varies from 2 to 11 (Zenk, 1996). Over the past two decades, the extensive studies have been carried out aiming the structural characterization of PCs and their metal complexes (Scarano and Morelli, 2002; Spain and Rabenstein, 2003) as well as the elucidation of induction mechanisms (Cobbett, 2000; Clemens, 2006). The feasibility of plant engineering

\* Corresponding author. Address: Instituto de Investigaciones Cientificas, Universidad de Guanajuato, L. de Retana No. 5, 36000 Guanajuato, Mexico. Tel.: +52 473 7327555; fax: +52 473 7326252.

E-mail address: [katarzyn@quijote.ugto.mx](mailto:katarzyn@quijote.ugto.mx) (K. Wrobel).

to assure higher rates of PCs induction has been explored for phytoremediation purposes (Clemens, 2001; Bovet et al., 2005; Yang et al., 2005). Within this context, the role of metal bioavailability to plants has been highlighted. Thus, the increased production of phytochelatin has been observed in the presence of various organic chelators (ethylene diamine tetraacetate, ethylene diamine disuccinate, citric acid, etc.) as added to nutrient solution and/or soil (Piechalak et al., 2003; Turgut et al., 2004; Meers et al., 2005; Sun et al., 2005). On the other hand, metal-binding by humic matter in soils has been shown to affect the mobility of metals in the environment. Depending on the experimental design and the type of metal, the increased or decreased uptake of Cd, Cu, Pb have been observed (Garcia-Mina et al., 2004; Voets et al., 2004; Inaba and Takenaka, 2005; Lorenzo et al., 2005; Misra and Pandey, 2005; Kungolos et al., 2006). Importantly, the data relating soil humic substances with phytochelatin production in plants exposed to heavy metals are lacking.

Guanajuato city has long been an important silver and gold mining center. The environmental geochemistry of this region has been extensively studied (Carrillo-Chavez et al., 2003). In particular, the leaching of several metals and metalloids from the mine tailings to different environmental compartments has been reported (Garcia-Meza et al., 2004; Morton-Bermea et al., 2004). Consequently, the plants growing in this area are chronically exposed to moderate levels of several heavy metals in soil.

In this work, two species of wild plants have been collected from different sites in Guanajuato and the relationship between Ag, Cd, Cu and Pb in soils and roots, soil humic sub-

stances and plant phytochelatin have been evaluated. The results obtained provide further evidence on the role of environmental conditions in the accumulation of heavy metals in plants and subsequent phytochelatin production.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plants and soils

The samples of two common wild plants (*Ricinus communis* and *Tithonia diversifolia*) were collected from three different sites in Guanajuato, which had been selected to cover different soil levels of heavy metals. Thus, the site 1 corresponds to the place where the silver ores had been processed in the past, the site 2 is at the Guanajuato river close to the mine tailing and the site 3 is a hill, relatively distant from the mines. The plants were collected in September 2005 (wet season), taking at each site three plants of similar size and leaf color. Additionally, *R. communis* samples were collected from the other three sites in Guanajuato. Site 4 is at the city center, relatively far from the mines; site 5 is in the urban area developed on the mine tailing and site 6 is located at the riverside, but at a larger distance from mine tailing than site 2. In Fig. 1, the localization of sites 1–6 in Guanajuato city is presented. To avoid possible variations of soil parameters, the area of any sampling site did not exceed 9 m<sup>2</sup>. At each sampling site, the soil pH was measured. The relative variability of pH values for several measurements at one site did not exceed 2% and the values found at different sites were in the range pH 7.7 to pH 8.0. For each plant species collected

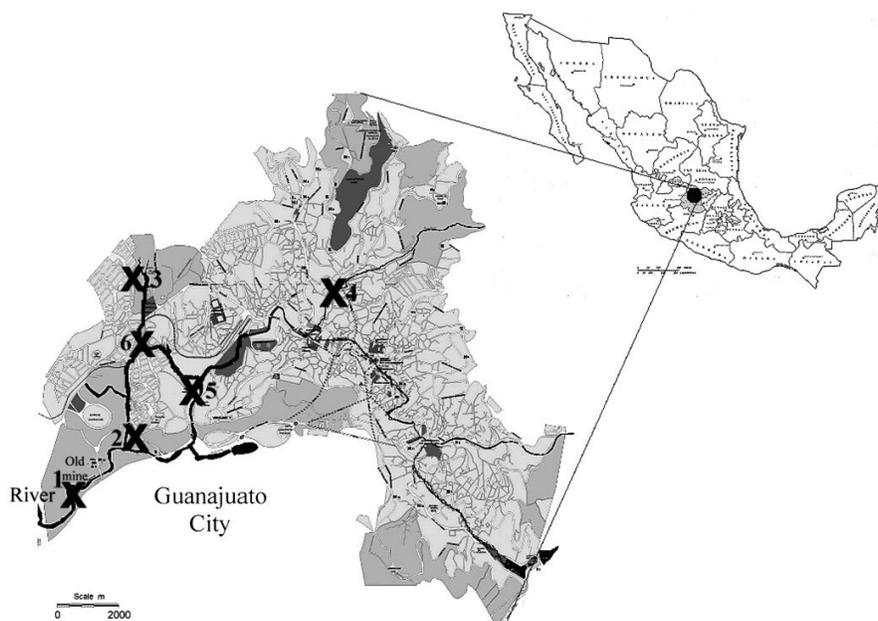


Fig. 1. The localization of sampling sites in Guanajuato city.

at a given site, roots were carefully separated from the adjacent soil and pooled. Three washing agents were tested, namely deionized water, 0.05 M CaCl<sub>2</sub> and 0.05 M EDTA (with and without ultrasonication). Since the washing procedure had no significant effect on the results, the roots were washed with deionized water in ultrasonic bath (10 min), dried, cut into small pieces and freeze-dried. The soil samples were collected in these same sites, from which the plants were taken. (six samples of about 250 g per 9 m<sup>2</sup> site). For each sampling site, the soil samples were pooled for the determination of Ag, Cd, Cu, Pb and humic substances. Before analysis, the pooled samples were dried.

## 2.2. Determination of Ag, Cd, Cu and Pb

All chemicals were of analytical reagent grade (Sigma), and deionized water was used throughout (Labconco).

Three sub-samples of each material were analyzed. For acid digestion, 0.5 g of soil or freeze-dried roots were placed in a glass tube and 0.2 ml of concentrated nitric acid was added. The tubes were heated in the stainless steel heating block: at 65 °C, 60 min and then 120 °C, 60 min. Once cooled to room temperature, 0.2 ml of hydrogen peroxide was added to each tube and the mixture was left for 30 min to complete reaction. The final volume was brought to 25 ml and, after appropriate dilution, the determination of Ag, Cd, Cu and Pb was carried out by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETA-AAS). A model 3110 Perkin–Elmer atomic absorption spectrometer with HGA600 graphite furnace and AS 60 auto sampler was used. The hollow cathode lamps for Ag, Cd, Cu and Pb were Perkin–Elmer Lumina™ lamps. Platform atomization and deuterium background correction were used. The matrix modifier was magnesium nitrate (5 µg Mg prepared from the stock solution of modifier from Perkin–Elmer). Stock standard solutions containing 1000 mg l<sup>-1</sup> of silver, cadmium, copper and lead were diluted to obtain the highest calibration standard (25 µg l<sup>-1</sup> Ag; 2 µg l<sup>-1</sup> Cd; 50 µg l<sup>-1</sup> Cu; 50 µg l<sup>-1</sup> Pb).

For accuracy checking, the analysis of three soil and three plant samples (three replicates) was carried out by inductively coupled plasma mass spectrometry (instrumental condition described below), using internal calibration with germanium (10 µg l<sup>-1</sup>) for analytical signal correction and the two-point standard addition technique. No statistically significant difference was found between ETA-AAS and ICP-MS results (ANOVA).

## 2.3. Analysis of phytochelatins

The analysis was performed by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with spectrofluorimetric detection (Doring et al., 2000). The freeze-dried roots were placed in liquid nitrogen and cell homogenization was performed by mortar grinding. For the elimination of proteins and for the complexation of metal ions, plant material aliquots (0.1 g) were placed in micro tubes

(1.5 ml) together with 1 ml of 6.3 mM DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) in 0.1% of trifluoroacetic acid. After 30 min, the samples were ultrasonicated (10 min) and centrifuged (1850 g, 10 min). For reduction, 500 µl of supernatant were treated with 100 µl of sodium borohydride (15 mM). Monobromobimane (mBrB) was used for pre-column derivatization of free thiol groups as proposed by Sneller et al. (Sneller et al., 2000). In brief, 40 µl of the above extract were mixed with 100 µl of 6.5 M DTPA in 0.3 M HEPPS (3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propanesulfonic acid) and 20 µl MBrB (1.9 M in acetonitrile) were added. This solution was kept in dark for 30 min, the reaction was stopped by adding 40 µl of 1 M methanesulfonic acid and 20 µl of this solution was injected onto the column. A Hewlett-Packard (Waldrom, Germany) Series 1050 high performance liquid chromatograph with a 1046A spectrofluorimetric detector and ChemStation was used. The analytical column was Gemini Twin™ Technology column (silica-based composite with C18-organic shell, pore size 100 Å, 150 × 4.6 mm, 5 µm) from Phenomenex. The separation was achieved using three mobile phases (A–0.05% heptafluorobutyric acid; B–methanol and C–acetonitrile) in the gradient elution (0–0.5 min: 82% A, 15% B, 3% C; 0.5–4.0 min: 77% A, 20% B, 3% C; 4.0–19.0 min: 69% A, 30% B, 3% C; 19.0–19.5 min: 82% A, 15% B, 3% C; 19.5–20.0 min: 82% A, 15% B, 3% C) at a total flow rate 0.6 ml min<sup>-1</sup>. After each run, the column was regenerated with 40% A, 60% C (2 min, 0.6 ml min<sup>-1</sup>) and conditioned with 82% A, 15% B, 3% C (3 min, 0.6 ml min<sup>-1</sup>). Spectrofluorimetric detection was at λ<sub>exc</sub> = 380 nm and λ<sub>em</sub> = 480 nm. The PC-2, PC-3 and PC-4 standards were kindly provided by the University of Cincinnati. The quantification was based on the glutathione peak area measurements (Doring et al., 2000; Sneller et al., 2000). The external calibration was performed in the concentration range of glutathione (GSH) that corresponded to 0.1–1.8 µg g<sup>-1</sup> (as µg GSH per gram of the freeze-dried root homogenate), r<sup>2</sup> = 0.9999. The correction factor for the efficiency of derivatization was applied. This parameter was defined as the ratio of the estimated thiol concentration as determined by monobromobimane derivatization to the cysteine concentration as determined by amino acid analysis. The value determined in the repetitive analyses was 70% (RSD 0.5%) (Sneller et al., 2000).

## 2.4. Analysis of soil humic substances

UV/Vis spectrophotometric measurements were performed on a Spectronic 3000 Diode Array Milton Roy spectrophotometer (resolution 0.35 nm). The aliquot of soil (1 g) was extracted with 10 ml of sodium hydroxide 1 M (30 min with agitation). The mixture was centrifuged (1850g, 10 min) and absorbance of supernatant was measured at 350 nm vs. 0.1 M sodium hydroxide as the reference. If necessary, the soil extracts were diluted with 0.1 M NaOH to fit within the calibration range. External calibration was carried out using Fluka humic acid

standard (Wrobel et al., 2003). The calibration solutions were prepared to cover HS levels in soils from 1 to 21 mg g<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9954$ ).

### 2.5. Size exclusion chromatography of the soil extracts

For HS extraction, 10 ml of 0.1 M sodium pyrophosphate was added to the dry soil sample (1 g), the mixtures were stirred for 30 min at room temperature, centrifuged and the supernatant was transferred to a volumetric flask. The extraction was repeated four times and the final volume was brought to 50 ml with deionized water. The extract obtained was diluted (1:1 v/v) with the mobile phase and 100  $\mu$ l were introduced to the chromatographic system with spectrophotometric (254 nm, 400 nm) and ICP-MS detection (Wrobel et al., 2003). The high performance liquid chromatograph was an Agilent Series 1100 equipped with an autosampler, a diode array detector and Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The chromatographic column was Superdex<sup>TM</sup> Peptide HR 10/30 (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ). The separation was performed with 10 mM sodium pyrophosphate, pH 10.3, at a flow rate 0.8 ml min<sup>-1</sup>. Calibration of the SEC column was performed using a mixture of the following molecular mass standards: myoglobin (17.6 kDa), substance P (1.35 kDa) and (Gly)<sub>6</sub> (0.36 kDa),  $r^2 = 0.9999$ .

An Agilent 7500ce inductively coupled plasma mass spectrometer was used to obtain the elution profiles of metals. The solution eluting from the column was introduced to the ICP-MS through the concentric nebulizer. The ICP-MS conditions were as follows: forward power, 1300 W; plasma gas flow, 15.0 l min<sup>-1</sup>; nebulizer carrier gas flow 0.89 l min<sup>-1</sup>; make-up gas flow 0.24 l min<sup>-1</sup>. The isotopes monitored were <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, <sup>107</sup>Ag, <sup>109</sup>Ag, <sup>111</sup>Cd, <sup>112</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd, <sup>207</sup>Pb, <sup>208</sup>Pb with a dwell time of 100 ms per isotope.

### 3. Results and discussion

This work has been focused on the evaluation of phytochelatin in wild plants, chronically exposed to heavy met-

als, and their relationship with heavy metals and humic substances in soil. As mentioned in the Introduction, silver and gold mining activities in Guanajuato city date from the sixteenth century. Several reports are available on the actual status of certain metals and metalloids in different environmental compartments (Garcia-Meza et al., 2004; Morton-Bermea et al., 2004). Among these elements, lead, cadmium, copper and silver were selected in this study, because of their capability to induce phytochelatin in plants (Maitani et al., 1996; Keltjens and Van Beusichem, 1998; Morelli and Scarano, 2001; Scarano and Morelli, 2002). *R. communis* (castor bean) and *Tithonia diversifolia* (Mexican sunflower) are common plants in Guanajuato area. The accumulation of metals in castor bean has already been reported (Khan et al., 1998; Giordani et al., 2005). Its possible application in phytoremediation has been explored (Giordani et al., 2005; Gupta and Sinha, 2007), yet data available for the second plant are scarce (Olivares et al., 2002). Quite importantly, no information on possible induction of PCs in these two biological species has been found.

The cadmium, copper, silver and lead results in the pooled soils and plant roots are summarized in Table 1. As indicated in the Section 2, each analysis was performed in triplicate and the values given are mean results with respective standard deviations. The results obtained in soils are within the ranges reported previously (Garcia-Meza et al., 2004; Morton-Bermea et al., 2004), yet the highest metal concentrations were found at site 1, located close to the mine tailing (362  $\pm$  8  $\mu$ g g<sup>-1</sup> Pb; 221  $\pm$  7  $\mu$ g g<sup>-1</sup> Cu; 42.20  $\pm$  0.65  $\mu$ g g<sup>-1</sup> Ag and 0.373  $\pm$  0.018 ng g<sup>-1</sup> Cd). Even though the two plant species were collected simultaneously from these same sites, higher metal concentrations were found in *R. communis* as compared to *T. diversifolia* (Table 1). As could be expected, the concentrations of metals in roots were higher in plants collected from more contaminated sites (site 1 and 2 vs. site 3).

The HPLC procedure reported elsewhere (Doring et al., 2000; Sneller et al., 2000; Tang et al., 2003) was adopted in this work for the evaluation of phytochelatin in plant root extracts. In this procedure, metals are eliminated and PCs

Table 1

Total cadmium, copper, lead and silver levels in soils and plant roots collected from three different sites in Guanajuato (1 Hacienda when the silver ores had been processed in the past, 2 Riverside close to the mine tailing, 3 Site relatively distant from the mines)

Sample	Site	Ag	Cd	Cu	Pb
<i>Mean concentration of heavy metal <math>\pm</math> SD, <math>\mu</math>g g<sup>-1</sup> (dried weight)</i>					
Soil	1	42.20 $\pm$ 0.65	0.373 $\pm$ 0.018	221 $\pm$ 7	362 $\pm$ 8
	2	3.40 $\pm$ 0.07	0.483 $\pm$ 0.010	20.6 $\pm$ 1.0	194 $\pm$ 7
	3	3.20 $\pm$ 0.32	0.296 $\pm$ 0.011	17.0 $\pm$ 0.5	19.4 $\pm$ 0.5
<i>Mean concentration of heavy metal <math>\pm</math> SD, ng g<sup>-1</sup> (freeze-dried roots)</i>					
<i>R. communis</i>	1	131 $\pm$ 6	16 $\pm$ 3	2580 $\pm$ 80	2740 $\pm$ 60
	2	141 $\pm$ 9	123 $\pm$ 8	2600 $\pm$ 70	1720 $\pm$ 50
	3	85 $\pm$ 6	12 $\pm$ 2	992 $\pm$ 17	198 $\pm$ 6
<i>T. diversifolia</i>	1	23 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1	530 $\pm$ 16	805 $\pm$ 18
	2	35 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2	592 $\pm$ 20	445 $\pm$ 10
	3	< 5 (DL)	< 0.5 (DL)	187 $\pm$ 7	20.5 $\pm$ 0.6

nf not found.

are reduced to yield free thiol groups for fluorochrome-tagging. It should be stressed that total pool of PCs is quantified, while information on specific metal-PCs complexes is lost. Such approach is well suited for real field situations, where plants grow in natural environment and are exposed to different metals and metalloids. In Fig. 2a, typical chromatograms of monobromobimane-derivatized standards are presented. The elution order of cysteine ( $t_{\text{ret}} = 7.3$  min), glutathione ( $t_{\text{ret}} = 12.2$  min) and phytochelatin (PC-2  $t_{\text{ret}} = 15.9$  min; PC-3  $t_{\text{ret}} = 16.7$  min; PC-4  $t_{\text{ret}} = 17.6$  min) as well as the elution of MBrB and its hydrolysis products were in agreement with those observed by other authors (Doring et al., 2000; Sneller et al., 2000; Tang et al., 2003). It should be clarified that the formation of MBrB degradation products increased with time, which caused different magnitude of their chromatographic peaks as can be observed in Fig. 2 and as reported by Sneller et al. (Sneller et al., 2000). Typical chromatograms obtained in the analysis of plant extracts are presented in Fig. 2b. It should be stressed that PC-2, PC-3, PC-4 had not been detected in *T. diversifolia*, with no regard to the soil metal profile. On the contrary, the elution of PC-2

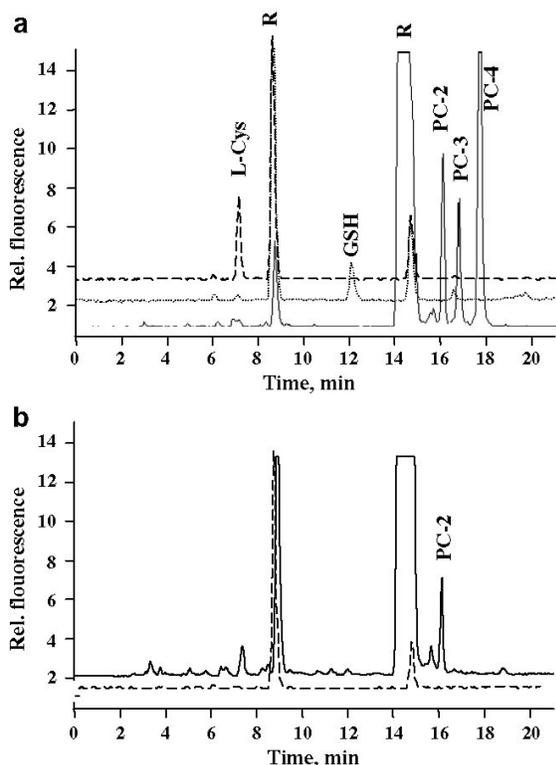


Fig. 2. Typical reversed-phase chromatograms: (a) standards derivatized with monobromobimane: (—) phytochelatin PC-2, PC-3, PC-4; (···) glutathione (GSH); (---) L-cysteine (L-Cys); (b) roots extracts: (—) *R. communis* and (---) *T. diversifolia*, both collected in the site 2, close to the main tailing. (R) derivatization agent and/or products of its hydrolysis. For better comparison of the graphs, they have been offset on y axis.

Table 2

Phytochelatin (PC-2) found in the root extracts of *Ricinus communis*; humic substances in soils and a fraction of metal co-eluted with HS in size exclusion chromatography (based on the peak area measurement vs. total area of chromatogram)

Site	PC-2, $\mu\text{g g}^{-1\text{a}}$	HS, $\mu\text{g g}^{-1\text{b}}$	Metal association with soil HS <sup>c</sup>		
			Cd	Cu	Pb
1	2.3	481	0	1.4	14
2	5.1	415	0	15	100
3	0.5	1345	0	24	72
4	28	372	0	7.4	59
5	2.2	553	0	17	94
6	35	143	0	32	27

<sup>a</sup>  $\mu\text{g}$  PC-2 per g of the freeze-dried cell homogenate.

<sup>b</sup>  $\mu\text{g}$  of humic substances per g of the fresh soil.

<sup>c</sup> % of metal in soil extract, which co-eluted with HS in size exclusion chromatography.

was observed in all extracts from *R. communis*. This plant was further collected from the sites marked as 4, 5 and 6. The quantification results are presented in Table 2. The detection of PC-2 in the extracts of *R. communis* roots suggests that, in this plant, the induction of phytochelatin might be the integral part of its molecular defense against heavy metals. Quite importantly, no elution of fluorescent species was observed during column regeneration and conditioning, indicating that PCs with longer peptide chains ( $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ ,  $n > 4$ ) had not been present in the samples. Furthermore, the formation of PC-5, PC-6 has been reported only in transgenic plants (Takagi et al., 2002), in cell cultures (Yen et al., 1999) and freshwater green alga (Le Faucheur et al., 2005). Since no phytochelatin were found in *T. diversifolia*, our results seem to confirm the genotype - dependent induction of phytochelatin (Clemens, 2001; Hall, 2002).

Binding of polyvalent cations to humic substances derived from different environmental compartments has often been reported and the following order of decreasing affinity has been proposed:  $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Co(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Cr(III)} \gg (\text{Mn(II)}, \text{Mo(VI)}, \text{Zn(II)})$  (Pandey et al., 2000; Evangelou and Marsi, 2001; Sadi et al., 2002). Several authors observed that humus matter is capable to reduce the bioavailability of certain metals in soils (Lamelas et al., 2005; Lorenzo et al., 2005; Remon et al., 2005; Kungolos et al., 2006). In Table 2, the levels of soil HS found at each site are presented. To explore in more detail possible relationships between soil levels of heavy metals, humic substances (HS) and PCs induction, correlation analysis was performed, using all data obtained for Ag, Cd, Cu, Pb in soils and *R. communis* roots, PC-2 in plant extracts and HS in soils, using a software package Statistica for Windows (StatSoft Inc. 2000, Tulsa, OK). The correlation matrix obtained is presented in Table 3 ( $r$  – correlation coefficient and  $p$  – probability level). For Cd and Ag, the statistically important positive correlation between metal concentration in soils and in plants can be observed ( $r = 0.8092$ ,  $p = 0.051$ ;  $r = 0.9261$ ,  $p = 0.009$ ), while for lead and copper this relation presented low

Table 3

Correlation matrix, obtained analyzing the results of all parameters determined in soils and plants (*R. communis*) collected from six different sites in Guanajuato city

Variable	HS	PC-2	GSH	Soil Cu	Soil Ag	Soil Cd	Soil Pb	Plant Cu	Plant Ag	Plant Cd	Plant Pb
HS	1.0000										
PC-2	$p = -.7825$	1.0000									
GSH	$p = .066$	$p =$	1.0000								
Soil Cu	.6618	-.4523	.1099	1.0000							
Soil Ag	$p = .152$	$p = .368$	$p =$	$p =$	1.0000						
Soil Cd	-.4325	.2267	.1099	.4128	.4133	1.0000					
Soil Pb	$p = .392$	$p = .666$	$p = .836$	$p =$	$p =$	$p =$	1.0000				
Plant Cu	-.3558	.3502	.4233	.4128	.4133	.4133	.4728	1.0000			
Plant Ag	$p = .489$	$p = .496$	$p = .403$	$p = .416$	$p =$	$p =$	$p =$	$p =$	1.0000		
Plant Cd	-.5591	.7857	-.2703	.0711	.4133	1.0000				1.0000	
Plant Pb	$p = .249$	$p = .064$	$p = .604$	$p = .894$	$p = .415$	$p =$	1.0000				
Plant Cu	-.2558	.4261	-.3262	.4076	-.2804	.4728	1.0000				
Plant Ag	$p = .625$	$p = .400$	$p = .528$	$p = .422$	$p = .590$	$p = .344$	$p =$	$p =$	$p =$	$p =$	$p =$
Plant Cd	-.7457	.3376	-.1646	.5849	.6787	.1535	-.2427	1.0000			
Plant Pb	$p = .089$	$p = .513$	$p = .755$	$p = .223$	$p = .138$	$p = .772$	$p = .643$	$p =$	1.0000		
Plant Cu	-.2084	.0262	.5208	.5174	.9216	.1752	-.3298	.6976	$p =$	1.0000	
Plant Ag	$p = .692$	$p = .961$	$p = .289$	$p = .293$	$p = .009$	$p = .740$	$p = .523$	$p = .123$	$p =$	$p =$	1.0000
Plant Cd	-.5280	.9395	-.2841	.0309	.2760	.8092	.4465	.0398	-.0866	1.0000	
Plant Pb	$p = .282$	$p = .005$	$p = .585$	$p = .954$	$p = .597$	$p = .051$	$p = .375$	$p = .940$	$p = .870$	$p =$	1.0000
Plant Cu	-.6558	.9573	-.3820	.1240	.3185	.9115	.5232	.1577	-.0019	.9664	1.0000
Plant Ag	$p = .157$	$p = .003$	$p = .455$	$p = .815$	$p = .538$	$p = .011$	$p = .287$	$p = .765$	$p = .997$	$p = .002$	$p =$

Significance level was set at  $p < 0.1$ .

statistical significance ( $r = 0.5232$ ,  $p = 0.287$  and  $r = 0.5849$ ,  $p = 0.223$ , respectively). Strong positive correlation

can also be observed between cadmium and lead levels in plant ( $r = 0.9664$ ,  $p = 0.002$ ). On the other hand, the

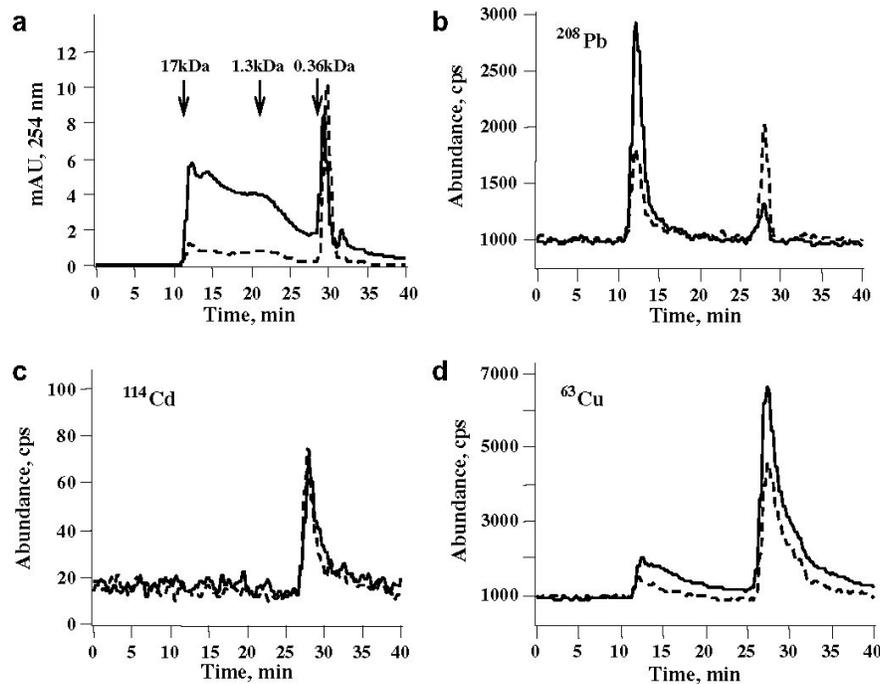


Fig. 3. Typical size exclusion chromatograms of the soil extracts: (—) site 5 and (---) site 6. (a) UV detection, 254 nm; (b)–(d) ICP-MS detection, monitoring  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{114}\text{Cd}$  and  $^{63}\text{Cu}$  isotopes.

inverse correlation of metal in plants and soil humic substances was found. The statistical significance of such relation decreased in the following order: Cu > Pb > Cd > Ag ( $r = -0.7457$ ,  $p = 0.089$ ;  $r = -0.6558$ ,  $p = 0.157$ ;  $r = -0.5280$ ,  $p = 0.282$ ;  $r = -0.2084$ ,  $p = 0.692$ , respectively). It should be stressed that the decreasing order of the statistical significance observed in this work is in agreement with the order of heavy metals affinity to humic substances, cited above (Pandey et al., 2000; Evangelou and Marsi, 2001; Sadi et al., 2002). In the view of our results, the binding of metals to soil humic substances contributes in lowering their uptake by *R. communis*. Apparently, the metals presenting strong affinity to HS have lower bioavailability to this plant. Indeed, there was no important relationship between soil and plant levels for Cu and Pb, but statistically important correlation between these parameters was found for other two elements, presenting lower affinity to HS (Ag and Cd).

To the best of our knowledge, soil humic substances have not been related with the production of PCs in plants so far. The statistical analysis of the results obtained in this work revealed the inverse correlation between soil HS and plant PC-2 ( $r = -0.7825$ ,  $p = 0.066$ , Fig. 3). Among four metals studied, cadmium levels in soil and in plant presented strong positive correlation with PC-2 ( $r = 0.7857$ ,  $p = 0.064$ ;  $r = 0.9395$ ,  $p = 0.005$ , respectively). For lead, the correlation was significant only between PC-2 and metal in plants ( $r = 0.9573$ ,  $p = 0.003$ ) and other two metals (Cu, Ag) did not correlate with PC-2 in plants. These results suggest that both, cadmium and lead promote phytochelatin induction in *R. communis*. The lack of correlation between soil Pb and plant PC-2 ( $r = 0.4261$ ,  $p = 0.400$ ) suggest that soil humic substances contribute in lowering the metal uptake by *R. communis*.

The association of metals with soil humic substances at each sampling site was estimated by size exclusion chromatography. In Fig. 3a, SEC–UV chromatograms of the soil extracts from sites 5 and 6 are presented. Typical elution patterns of humic substances were obtained in the two extracts (Wrobel et al., 2003), yet site 5 contained significantly higher concentrations (in agreement with the results of HS determination, Table 2). In Fig. 3b and d these same chromatograms are presented, which were obtained while monitoring  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{114}\text{Cd}$  and  $^{63}\text{Cu}$  isotopes. The relative distribution of metals in molecular mass fraction corresponding to HS was estimated at each sampling site, by calculating the fraction of metal co-eluted with HS in size exclusion chromatography (peak area between 10 and 18 min of chromatogram with respect to total area of ICP-MS chromatogram) and the results obtained are presented in Table 2. It can be observed that, independent of the HS level in the sample, cadmium co-eluted with low molecular mass fraction, so this metal apparently is not bound to HS (Fig. 3c, Table 2). For copper and lead, their elution occurred in different molecular mass fractions of the soil extracts (Fig. 3b and d). As shown in Table 2, higher relative contributions of lead with respect to copper

were always observed in the elution region of high molecular mass. Furthermore, the relative distribution of lead was clearly affected by the concentration of HS (Fig. 3b). In particular, for higher HS concentrations in soil extract, relatively lower contributions of metal in low molecular mass fractions was observed. These results provide further evidence that the soil humic substances contribute in lower bioavailability of those metals that present high affinity to HS.

#### 4. Conclusions

The original approach of this work was to evaluate possible relationships between the levels of heavy metals and humic substances in soils and the induction of phytochelatin in the wild plants chronically exposed to low or moderate levels of heavy metals in soil. The detection of PC-2 in the extracts of *R. communis* roots suggests that, in this plant, the induction of phytochelatin might be the integral part of molecular defense against heavy metals. The results obtained in the analysis of two different plants, collected simultaneously from these same sites confirm that the induction of PCs is genotype-dependent. Among four metals studied, cadmium and lead promote PC production in *R. communis*. It is proposed that the role of these metals in PCs induction would depend on their uptake by *R. communis*, which apparently is controlled by the association of metals with soil HS. This work provides further evidence on the role of environmental conditions in the accumulation of heavy metals and phytochelatin production in plants.

#### Acknowledgements

The work was financially supported by CONACYT (Mexico), project 49405 and by CONCYTEG (Mexico), project 23681. The authors are grateful to NIEHS-SBRP 04908 for partial support of this work and to Agilent Technologies for continuing instrumentation support.

#### References

- Bovet, L., Feller, U., Martinoia, E., 2005. Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. *Environ. Int.* 31, 263–267.
- Carrillo-Chavez, A., Morton-Bermea, O., Gonzalez-Partida, E., Rivas-Solorzano, H., Oesler, G., Garcia-Meza, V., Hernandez, E., Morales, P., Cienfuegos, E., 2003. Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico. *Ore. Geol. Rev.* 23, 277–297.
- Clemens, S., 2001. Developing tools for phytoremediation: towards a molecular understanding of plant metal tolerance and accumulation. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 14, 235–239.
- Clemens, S., 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant Physiol.* 163, 319–332.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 211–216.
- Doring, S., Korhammer, S., Oetken, M., Markert, B., 2000. Analysis of phytochelatin in plant matrices by pre-column derivatization,

- high-performance liquid chromatography and fluorescence-detection. Fresen. J. Anal. Chem. 366, 316–318.
- Evangelou, V.P., Marsi, M., 2001. Composition and metal ion complexation behaviour of humic fractions derived from corn tissue. Plant Soil 229, 13–24.
- García-Meza, V., Ramos, E., Carrillo-Chavez, A., Duran-de-Bazua, C., 2004. Mineralogical and chemical characterization of historical mine tailings from the Valenciana mine, Guanajuato, Mexico: Environmental implications. B. Environ. Contam. Toxicol. 72, 170–177.
- García-Mina, J.M., Antolin, M.C., Sánchez-Díaz, M., 2004. Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types. Plant Soil 258, 57–68.
- Giordani, C., Cecchi, S., Zanchi, C., 2005. Phytoremediation of soil polluted by nickel using agricultural crops. Environ. Manage. 36, 675–681.
- Gupta, A.K., Sinha, S., 2007. Phytoextraction capacity of the plants growing on tannery sludge dumping sites. Bioresource Technol. 98, 1788–1794.
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot. 53, 1–11.
- Inaba, S., Takenaka, C., 2005. Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts. Environ. Int. 31, 603–608.
- Keltjens, W.G., Van Beusichem, M.L., 1998. Phytochelatin as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): combined effects of copper and cadmium. Plant Soil 203, 119–126.
- Khan, A.G., Chaudhry, W.J., Hayes, W.J., Khoo, C.S., Hill, L., Fernández, R., Gallardo, P., 1998. Physical, chemical and biological characterization of a steelwork waste site at Port Kembla, NSW, Australia. Water Air Soil Pollut. 104, 389–402.
- Kungolos, A., Samaras, P., Tsiroidis, V., Petala, M., Sakellariopoulos, G., 2006. Bioavailability and toxicity of heavy metals in the presence of natural organic matter. J. Environ. Sci. Heal. A 41, 1509–1517.
- Lamelas, C., Wilkinson, K.J., Slaveykova, V.I., 2005. Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. Environ. Sci. Technol. 39, 6109–6116.
- Le Faucheur, S., Behra, R., Sigg, L., 2005. Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. Environ. Toxicol. Chem. 24, 1731–1737.
- Lorenzo, J.I., Beiras, R., Mubiana, V.K., Blust, R., 2005. Copper uptake by *Mytilus edulis* in the presence of humic acids. Environ. Toxicol. Chem. 24, 973–980.
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Yamada, T., 1996. The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. Plant Physiol. 110, 1145–1150.
- Meers, E., Ruttens, A., Hoggood, M.J., Samson, D., Tack, F.M., 2005. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. Chemosphere 58, 1011–1022.
- Misra, V., Pandey, S.D., 2005. Immobilization of heavy metals in contaminated soil using nonhumus humus soil and hydroxyapatite. B. Environ. Contam. Toxicol. 74, 725–731.
- Morelli, E., Scarano, G., 2001. Synthesis and stability of phytochelatin induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. Mar. Environ. Res. 52, 383–395.
- Morton-Bermea, O., Carrillo-Chavez, A., Hernandez, E., Gonzalez-Partida, E., 2004. Determination of metals for leaching experiments of mine tailings: Evaluation of potential environmental hazard in the Guanajuato mining district, Mexico. B. Environ. Contam. Toxicol. 73, 770–776.
- Olivares, E., Peña, E., Aguiar, G., 2002. Metals and oxalate in *Tithonia diversifolia* (Asteraceae): concentrations in plants growing in contrasting soils, and Al induction of oxalate exudation by roots. J. Plant Physiol. 59, 743–749.
- Pandey, A.K., Pandey, S.D., Misra, V., 2000. Ecotoxicol. Environ. Safe. 47, 195–203.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., 2003. Enhancing phyto-remediation ability of *Pisum sativum* by EDTA application. Phytochemistry 64, 1239–1251.
- Remon, E., Bouchardon, J.L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J.C., Faure, O., 2005. Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. Environ. Pollut. 137, 316–323.
- Sadi, B.B.M., Wrobel, K., Wrobel, Z., Kannamkumarath, S.S., Castillo, J.R., Caruso, J.A., 2002. Size exclusion chromatography ICP-MS studies on elements binding to humic substances in compost obtained from urban solid waste. J. Environ. Monitor. 4, 1010–1016.
- Scarano, G., Morelli, E., 2002. Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. Biometals 15, 145–151.
- Sneller, F.E., van Heerwaarden, L.M., Koevoets, P.L., Vooijs, R., Schat, H., Verkleij, J.A., 2000. Derivatization of phytochelatin from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. J. Agr. Food Chem. 48, 4014–4019.
- Spain, S.M., Rabenstein, D.L., 2003. Characterization of the acid/base and redox chemistry of phytochelatin analogue peptides. Anal. Chem. 75, 3712–3719.
- Sun, Q., Wang, X.R., Ding, S.M., Yuan, X.F., 2005. Effects of exogenous organic chelators on phytochelatin production and its relationship with cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) under cadmium stress. Chemosphere 60, 22–31.
- Takagi, M., Satofuka, H., Amano, S., Mizuno, H., Eguchi, Y., Hirata, K., Miyamoto, K., Fukui, K., Imanaka, T., 2002. Cellular toxicity of cadmium ions and their detoxification by heavy metal-specific plant peptides, phytochelatin, expressed in Mammalian cells. J. Biochem. (Tokyo) 131, 233–239.
- Tang, D., Shafer, M.M., Vang, K., Karner, D.A., Armstrong, D.E., 2003. Determination of dissolved thiols using solid-phase extraction and liquid chromatographic determination of fluorescently derivatized thiolic compounds. J. Chromatogr. A 998, 31–40.
- Turgut, C., Katie Pepe, M., Cutright, T.J., 2004. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. Environ. Pollut. 131, 147–154.
- Voets, J., Bervoets, L., Blust, R., 2004. Cadmium bioavailability and accumulation in the presence of humic acid to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. Environ. Sci. Technol. 38, 1003–1008.
- Wrobel, K., Sadi, B.B.M., Wrobel, K., Castillo, J.R., Caruso, J.A., 2003. Effect of metal ions on the molecular weight distribution of humic substances derived from municipal compost: ultrafiltration and SEC with spectrophotometric and ICP-MS detection. Anal. Chem. 75, 761–767.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. J. Trace Elem. Med. Bio. 18, 339–353.
- Yen, T.Y., Villa, J.A., DeWitt, J.G., 1999. 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, 930–941.
- Zenk, M.H., 1996. Heavy metal detoxification in higher plants—a review. Gene 179, 21–30.

## ICP-MS multi-element profiles and HPLC determination of furanic compounds in commercial tequila

Crescencio Rodríguez Flores · Julio Alberto Landero Figueroa · Kazimierz Wrobel · Katarzyna Wrobel

Received: 24 November 2008 / Revised: 22 December 2008 / Accepted: 7 January 2009 / Published online: 3 February 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** In this work, inductively coupled plasma mass spectrometry determination of Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, Th and U in commercial tequila has been accomplished. The samples were tenfold diluted (1% HNO<sub>3</sub>), ethanol (4% v/v) was added to multi-element calibration solutions and possible spectral interferences were controlled by the use of collision/reaction cell technology. The results obtained in the analysis of 40 brands showed low concentration levels of the elements, in agreement with actual Mexican regulations, except for copper. Statistically significant differences were found between the concentration levels of copper, molybdenum, mercury and thorium in 100% agave and mixed tequila brands. In search of parameters useful for discrimination between 100% and mixed tequila categories, 5-hydroxymethylfuraldehyde, 2-furoic acid (2-FAC), 2-furaldehyde (2-FAL), 2-furylmethylketone (2-FMC), 5-methylfuraldehyde (5-MFA), syringaldehyde (SIR) were also determined, using simple and fast reversed phase chromatographic procedure. Principal component analysis was used as the variable reduction procedure. In the multivariate model obtained, a natural separation of 100%, mixed and aged tequilas has been observed in the space defined by the first three principal components that accounted for 94% of total system variability. The analysis of correlation revealed statistically significant direct relationship between 100% tequila and 2-FAL, 5-MFA, Cu ( $\beta = 0.781$ ,  $p = 0.028$ ;  $\beta = 0.688$ ,  $p = 0.042$ ;  $\beta = 0.664$ ,  $p = 0.046$ , respectively), between mixed tequila and Hg, Th, Mo ( $\beta = 0.948$ ,

$p = 0.000$ ;  $\beta = 0.905$ ,  $p = 0.002$ ;  $\beta = 0.867$ ,  $p = 0.012$ , respectively) and between aged tequila and SIR, 2-FAC ( $\beta = 0.937$ ,  $p = 0.000$ ;  $\beta = 0.889$ ,  $p = 0.000$ , respectively). In conclusion, among 25 parameters initially selected, the above 8 (2-FAL, 5-MFA, Cu, Hg, Th, Mo, SIR, 2-FAC) could be useful in the multivariate discrimination between tequila categories.

**Keywords** Tequila · Trace elements · Furanic compounds · ICP-MS · HPLC

### Introduction

Analytical data obtained in the characterization of food and food-related products are useful to evaluate the quality of raw materials as well as to get an insight on the processes occurring during the elaboration, storage and undesired decomposition of these products. Furthermore, chemical analyses have been employed for assessing the authenticity and/or aging conditions of alcoholic beverages. Within this context, there has been considerable number of analytical studies approaching the quality and authentication of tequila [1–6]. The compounds contributing to the sensory properties have been identified/quantified, namely volatile organic compounds, alcohols, aldehydes, phenols, fructans, inorganic anions, etc. The feasibility of stable isotopes ratio (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O) has also been explored [7, 8].

On the other hand, information on metal/metalloid levels in tequila is scarce [9, 10], even though such analyses have been extensively used in characterization of other spirits and wines in terms of their geographical origin and details of elaboration procedures [9, 11–14]. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has often been employed as analytical tool, because of its

C. R. Flores · J. A. L. Figueroa · K. Wrobel · K. Wrobel (✉)  
Instituto de Investigaciones Científicas,  
Universidad de Guanajuato, L. de Retana No. 5,  
36000 Guanajuato, Mexico  
e-mail: katarzyn@quijote.ugto.mx

exceptional detection power (low part-per-billion to even sub-per-trillion range), multi-elemental and isotopic capabilities, wide dynamic range (up to 11 orders of magnitude), high sample throughput and relatively few chemical interferences [9, 15]. Both, sample pretreatment procedures and ICP-MS instrumental conditions for multi-elemental determination in alcoholic beverages have been discussed by several authors [15–19].

According to the Mexican law, there are two basic categories of tequila; 100% agave tequila and mixed tequila. The latter category is produced by adding cane or corn sugar to agave juice prior to fermentation, or by adding ethanol obtained from these sugars to tequila spirit (up to 49% w/v) [15]. Since 100% tequila is of higher quality and it is preferred by the consumers worldwide [1], there is a need for analytical procedures enabling to distinguish between these two categories. It is relevant that hydrolysis of inulin contained in *Agave tequilana* Weber (“blue agave”) to fructose require heating [14], which results in higher contribution of Maillard products (furanic compounds) in tequila with respect to other alcoholic beverages produced from saccharose [16, 17]. In the previous study, the determination of aldehydes in tequila was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine [5]. The results obtained confirmed that the profile of furanic aldehydes depends on the type of fructans contained in the raw material, as well as on the heating treatment applied or not prior to fermentation. It was also proposed that the concentration levels of 2-furaldehyde (2-FAL) and 5-methylfuraldehyde (5-MFA) might be useful in the discrimination between 100% and mixed tequilas. However, for routine applications, the procedure based on pre-column derivatization does not seem to be attractive.

In this work, the determination of metal/metalloid profile in different brands of commercial tequila has been undertaken for the first time. The results obtained for different categories of tequila were compared in search of parameters that might be useful for discrimination between 100% and mixed tequila. Based on our previous results pointing to the importance of furanic compounds in such discrimination, five furanic compounds and syringaldehyde (indicator of spirit aging in wooden barrels) were also determined. The simplified reversed phased HPLC procedure was proposed, avoiding derivatization step.

## Materials and methods

### Instrumentation

A model 7500ce inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) with a

Meinhard nebulizer and Peltier-cooled spray chamber (2 °C) was used for element determinations. Instrumental operating conditions were as followed: forward power 1,500 W, plasma gas flow rate 15 l min<sup>-1</sup>, carrier gas flow rate 0.89 l min<sup>-1</sup>, make-up gas flow rate 0.15 l min<sup>-1</sup>, sampling depth 10 mm, nickel sampling and skimmer cones, dwell time 100 ms per isotope (1 s for mercury), cell gas He, 4 ml min<sup>-1</sup>, isotopes monitored: <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>59</sup>Co, <sup>60</sup>Ni, <sup>65</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>75</sup>As, <sup>82</sup>Se, <sup>95</sup>Mo, <sup>107</sup>Ag, <sup>114</sup>Cd, <sup>115</sup>In, <sup>121</sup>Sb, <sup>137</sup>Ba, <sup>202</sup>Hg, <sup>205</sup>Tl, <sup>208</sup>Pb, <sup>232</sup>Th and <sup>238</sup>U.

Agilent series 1200 liquid chromatograph with a diode array detector and Chemstation for taking data was employed for the analysis of furanic compounds (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The chromatographic column was Zorbax Eclipse C18 (150 × 3 mm, 3.5 μm).

### Reagents

All chemical were of analytical reagent grade. HPLC grade ethanol and acetonitrile were from Fisher Scientific (Pittsburg, USA). Deionized water was used throughout (18 MΩ cm, Labconco, USA). The following Agilent commercial solutions were used: (1) calibration standard containing 10 mg l<sup>-1</sup> Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, Th, U, (2) internal standard (In, 10 mg l<sup>-1</sup>) and (3) multi-element tuning solution (10 mg l<sup>-1</sup> of Li, Y, Tl, Ce). Working solutions were prepared by appropriate dilution. Stock standard solutions of 2-furaldehyde (2-FAL), 5-hydroxymethylfuraldehyde (5-HMF), 5-methylfuraldehyde (5-MFA), syringaldehyde (SIR), 2-furoic acid (2-FAC) and 2-furylmethylketone (2-FMC), 500 mg l<sup>-1</sup> each, were prepared, respectively, from Sigma and Fluka reagents. Other Sigma reagents were concentrated nitric and acetic acids.

### Samples

Different brands of commercial tequila from the companies renowned in Mexico (all of them localized in Jalisco and Guanajuato states) were purchased in the local stores. In total, 40 tequilas were analyzed and these included 27 100% tequilas and 13 mixed brands. Among these brands, 20 tequilas were “reposado” (aged in oak barrels for 2 months), 9 were “añejo” (aged for at least 1 year) and 11 were “blanco” (without aging).

### Procedures

#### ICP-MS analysis

Tuning procedure was performed daily (Li, Y, Tl, Ce, 1 μg l<sup>-1</sup> each); the response for oxides (<sup>140</sup>Ce<sup>16</sup>O<sup>+</sup>/<sup>140</sup>Ce<sup>+</sup>) and double charged ions (<sup>140</sup>Ce<sup>2+</sup>/<sup>140</sup>Ce<sup>+</sup>) did not exceed

0.8 and 1.4%, respectively. The optimization of collision/reaction cell was carried out as described elsewhere [17, 20]. External calibration was performed using multi-element standard solution [1% nitric acid or 4% ethanol, 1% nitric acid (v/v)] at element concentration levels: 0; 0.2; 0.4; 1.0; 2.0; 5.0 and  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  with addition of the internal standard ( $1.0 \mu\text{g l}^{-1}$  In). The analysis of tequila samples was carried out in triplicate: 500  $\mu\text{l}$  of the sample were mixed with equal volume of nitric acid (10%), 100  $\mu\text{l}$  of internal standard ( $50 \mu\text{g l}^{-1}$  In) were added and the volume was brought to 5 ml. For the method of standard addition, the samples were spiked with multi-element standard solution to obtain their concentrations 0; 0.4; 2.0; 5.0 and  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  as referred to undiluted tequila.

#### HPLC analysis

Chromatographic separation of five furanic compounds (5-hydroxy-methylfuraldehyde (5-HMF), 2-furoic acid (2-FAC); 2-furaldehyde (2-FAL), 2-furylmethylketone (2-FMC), 5-methylfuraldehyde (5-MFA) and syringaldehyde (SIR) was achieved on the Zorbax Eclipse C18 ( $150 \times 3 \text{ mm}$ ,  $3.5 \mu\text{m}$ ) reversed phase column using 0.02% acetic acid and acetonitrile as mobile phases A and B. The gradient elution was as follows: 0–2 min 15% B; 2–5 min 23% B; 5–6 min 25% B; 6–6.5 min, 15% B) with the total flow rate in the column  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$ , injection volume 10  $\mu\text{l}$ . Spectrophotometric detection was carried out at 249 nm for 2-FAC, 285 nm for 5-HMF, 2-FAL, 2-FMC, and at 292 nm for SIR, 5-MFA. External calibration was performed using the mixed standard solutions containing 0; 0.05; 0.10; 0.25; 0.50; 1.00 and  $5.00 \text{ mg l}^{-1}$  of each compound. Tequila samples were ten times diluted with mobile phase A and introduced to the chromatographic system. Each analysis was carried out in triplicate.

#### Statistics

Principal component analysis was performed using Unscrambler 7.5 (Camo, Norway) software package and correlation between tequila variables was evaluated with Statistica program (Statsoft Inc., Tulsa OK).

## Results and discussion

The concentration levels of metals/metalloids in food-related products have to be regulated and controlled in order to avoid possible health risk for consumers. On the other hand, such analytical information is useful for the identification of geographical origin of dairy products or specific details of their elaboration. Despite extensive studies carried out in different alcoholic beverages

[9, 11, 12, 15, 21], specific information of trace elements in tequila is scarce [10]. In this work, the determination of 19 metal/metalloids in 40 tequila brands elaborated by renowned Mexican companies has been undertaken by ICP-MS.

#### Determination of multi-element profiles by ICP-MS

It is well documented that high ethanol loads to ICP cause carbon deposition on the sample introduction system, alter considerably the plasma stability and may originate troublesome spectral interferences ( $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$  on  $^{52}\text{Cr}^+$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$  on  $^{27}\text{Al}^+$ , etc.). Several strategies are available to control/eliminate the above effects, among them the use of desolvating devices, optimization of plasma operating conditions, high resolution instruments and collision/reaction cell technology [22]. In the present work, tequila samples were diluted 1:10 (1% nitric acid) in order to keep ethanol concentration not higher than 4% (v/v), the Peltier-cooled spray chamber and octopole collision/reaction cell were employed [17]. Both, hydrogen and helium were examined as cell gases. For the selection of gas flow rate, different flows ( $0\text{--}8 \text{ ml min}^{-1}$ ) were applied and the signals at  $m/z$  52, 55, 75, 82, 137, 202 were examined in the blank solution (1% nitric acid, 4% ethanol) and in the analyte standard solutions (Cr, Mn, As, Se, Hg, respectively,  $5 \mu\text{g l}^{-1}$  each). In each case, the background equivalent concentration (BEC) was evaluated [17, 20]. The selection criterion was to assure as low as possible background signal without sacrificing the sensitivity. Using He at  $4 \text{ l min}^{-1}$ , the interferences on  $^{52}\text{Cr}^+$  were eliminated and for other isotopes monitored, no interferences were observed. To confirm the interference-free element determination, the calibration was carried out using two sets of analyte solutions: in the presence and in the absence of ethanol, both using indium as internal standard. As can be observed in Table 1, no important differences were found between the values of detection limits, BEC and regression coefficients for the two calibration systems. For accuracy checking, the determination of elements was accomplished in one brand of tequila by external calibration in the presence and in the absence of ethanol and also by the method of standard addition (three replicates in each case). From the results obtained (Table 2) it was decided to perform quantification by external calibration using multi-element solutions containing 1% nitric acid and 4% ethanol.

Using the selected instrumental and experimental conditions, multi-element determination was carried out in 40 brands of tequila. In Table 3, the mean result (with respective standard deviation) and the concentration range found for each element in 100% and mixed tequilas are presented (selenium was not detected in any sample). It

**Table 1** Analytical parameters, evaluated for 19 elements in two calibration procedures

Ion monitored	DL (ng l <sup>-1</sup> )		BEC (ng l <sup>-1</sup> )		R <sup>2</sup>	
	A	B	A	B	A	B
<sup>51</sup> V	5.4	4.5	4.8	7.1	1.0000	0.9990
<sup>52</sup> Cr	12.7	13.1	37.0	38.4	1.0000	0.9990
<sup>55</sup> Mn	6.4	6.9	6.8	14.1	1.0000	0.9988
<sup>59</sup> Co	3.3	2.4	11.6	15.2	1.0000	0.9990
<sup>60</sup> Ni	28.1	25.9	59.2	62.5	1.0000	0.9990
<sup>65</sup> Cu	41.7	40.6	68.0	70.4	1.0000	0.9988
<sup>66</sup> Zn	43.2	40.8	80.0	78.9	0.9997	0.9983
<sup>75</sup> As	19.3	20.1	55.8	60.7	1.0000	0.9990
<sup>82</sup> Se	88.1	75.6	174	145	1.0000	0.9990
<sup>95</sup> Mo	8.5	10.0	9.5	13.1	0.9999	0.9981
<sup>107</sup> Ag	5.6	7.2	45.3	56.2	1.0000	0.9968
<sup>114</sup> Cd	4.9	5.8	12.0	18.4	1.0000	0.9990
<sup>121</sup> Sb	2.9	3.6	12.1	19.6	1.0000	0.9990
<sup>137</sup> Ba	4.8	4.5	9.5	10.1	1.0000	0.9990
<sup>202</sup> Hg	2.1	2.0	5.6	5.0	0.9997	0.9983
<sup>205</sup> Tl	1.8	1.4	14.2	19.1	1.0000	0.9989
<sup>208</sup> Pb	14.7	16.1	60.7	41.7	1.0000	0.9991
<sup>232</sup> Th	1.3	1.1	8.5	14.6	0.9991	0.9972
<sup>238</sup> U	0.9	0.8	1.4	1.3	0.9999	0.9991

A without ethanol (1% nitric acid), B in the presence of ethanol (4% ethanol, 1% nitric acid), DL detection limit, BEC background equivalent concentration

should be mentioned that Mexican Official Norm regulates the concentrations of four metals/metalloids in alcoholic beverages, namely copper (2.0 mg l<sup>-1</sup>), lead (0.5 mg l<sup>-1</sup>), arsenic (0.5 mg l<sup>-1</sup>) and zinc (1.5 mg l<sup>-1</sup>) [23]. The results obtained in this work indicate relatively high copper levels in 100% agave brands (mean 2.58 ± 2.81 mg l<sup>-1</sup>, range 0.011–11.6 mg l<sup>-1</sup>), in agreement with the stripping voltammetry results [10]. Other elements were found in significantly lower concentrations: Co, Mo, Ag, Cd, Sb, Hg, Tl, U below 1 µg l<sup>-1</sup>; As, Ba, Cr, Pb below 38 µg l<sup>-1</sup>; Mn below 48 µg l<sup>-1</sup> and Zn below 200 µg l<sup>-1</sup> (Table 3). Quite importantly, the concentration levels of elements included in Official Mexican Norm for drinking water were lower than maximum permissible levels, except copper (maximum permissible levels: 150 µg l<sup>-1</sup> Mn; 5 mg l<sup>-1</sup> Zn; 50 µg l<sup>-1</sup> As; 50 µg l<sup>-1</sup> Cr; 5 µg l<sup>-1</sup> Cd; 25 µg l<sup>-1</sup> Pb; 700 µg l<sup>-1</sup> Ba; 1 µg l<sup>-1</sup> Hg; 2 mg l<sup>-1</sup> Cu [24]). On the other hand, statistically significant differences were found between the concentration levels of copper, molybdenum, mercury and thorium in 100% agave and mixed tequila brands (Table 3), which suggest potential utility of these data for tequila characterization.

**Table 2** ICP-MS results obtained for metals/metalloids in tequila sample (three replicates), obtained using three different calibration modes

Isotope monitored	Element concentration in tequila ± SD, µg l <sup>-1</sup> (Cu, mg l <sup>-1</sup> )		
	1	2	3
<sup>51</sup> V	0.325 ± 0.009	0.378 ± 0.035	0.332 ± 0.016
<sup>52</sup> Cr	14.9 ± 0.6	16.2 ± 2.4	15.5 ± 2.1
<sup>55</sup> Mn	2.98 ± 0.036	3.12 ± 0.08	3.42 ± 0.07
<sup>59</sup> Co	0.141 ± 0.009	0.163 ± 0.017	0.171 ± 0.024
<sup>60</sup> Ni	1.42 ± 0.07	1.75 ± 0.13	1.85 ± 0.12
<sup>65</sup> Cu	1.85 ± 0.08	1.82 ± 0.09	1.84 ± 0.14
<sup>66</sup> Zn	39.5 ± 0.7	41.2 ± 1.2	40.4 ± 1.5
<sup>75</sup> As	1.59 ± 0.12	1.81 ± 0.44	1.74 ± 0.67
<sup>95</sup> Mo	0.80 ± 0.06	0.85 ± 0.09	0.87 ± 0.22
<sup>107</sup> Ag	1.19 ± 0.08	1.24 ± 0.11	1.28 ± 0.13
<sup>114</sup> Cd	0.073 ± 0.008	0.098 ± 0.012	0.078 ± 0.014
<sup>121</sup> Sb	0.294 ± 0.012	0.275 ± 0.014	0.268 ± 0.021
<sup>137</sup> Ba	2.14 ± 0.01	3.40 ± 0.10	3.00 ± 0.09
<sup>202</sup> Hg	0.62 ± 0.09	0.43 ± 0.11	0.59 ± 0.12
<sup>205</sup> Tl	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.02
<sup>208</sup> Pb	2.02 ± 0.09	2.13 ± 0.18	2.22 ± 0.26
<sup>232</sup> Th	1.45 ± 0.08	1.36 ± 0.07	1.39 ± 0.10
<sup>238</sup> U	0.035 ± 0.002	0.041 ± 0.004	0.039 ± 0.005

1 External calibration in the absence of ethanol, 2 external calibrations in the presence of ethanol, 3 the method of standard addition

#### Determination of furanic compounds and syringaldehyde by HPLC

Based on the results from earlier studies focused on the quality evaluation of spirit brands [4, 5, 25], 5-hydroxymethylfurfuraldehyde (5-HMF), 2-furoic acid (2-FAC), 2-furaldehyde (2-FAL), 2-furylmethylketone (2-FMC), 5-methylfurfuraldehyde (5-MFA) and syringaldehyde (SIR) were selected in this work. In order to improve and simplify our previous procedure [5] in terms of better resolution, reduced analysis time and lower solvent consumption, the column with stationary phase of particle diameter 3.5 µm and internal diameter (3 mm) was used. Furthermore, the separation was carried out without pre-column derivatization. Diode array spectrophotometric detector was set at three different wavelengths (249, 285, 292 nm) to assure similar sensitivity for each compound. The chromatographic conditions such as mobile phase composition, gradient program, column temperature and the total flow rate, were systematically examined and the parameters finally selected are listed in the Procedures. In Fig. 1a, typical chromatogram of mixed standard solution is presented (2.5 µg ml<sup>-1</sup> of each compound) and the short

**Table 3** ICP-MS results obtained in the analysis on 100% agave and mixed commercial tequilas: for each element, the average value and the concentration range are given

Isotope monitored	Element concentration, $\mu\text{g l}^{-1}$ (for Cu, $\text{mg l}^{-1}$ )				ANOVA	
	100% agave		Mixed tequila		F	p
	Mean $\pm$ SD	Range	Mean $\pm$ SD	Range		
$^{51}\text{V}$	1.62 $\pm$ 1.46	0.30–5.64	1.56 $\pm$ 1.32	0.39–4.20	0.01	0.922
$^{52}\text{Cr}$	13.3 $\pm$ 2.2	8.86–17.6	13.8 $\pm$ 1.4	10.5–15.4	0.47	0.498
$^{55}\text{Mn}$	16.2 $\pm$ 11.6	2.30–47.8	12.5 $\pm$ 11.9	1.27–32.1	0.72	0.403
$^{59}\text{Co}$	0.29 $\pm$ 0.28	0.10 $\pm$ 1.26	0.41 $\pm$ 0.49	0.09–1.73	0.94	0.339
$^{60}\text{Ni}$	4.57 $\pm$ 6.12	>DL–25.6	2.51 $\pm$ 2.69	>DL–8.34	1.04	0.315
$^{65}\text{Cu}$	2.58 $\pm$ 2.81	0.011–11.6	0.724 $\pm$ 0.831	0.004–2.36	<b>4.17</b>	<b>0.049</b>
$^{66}\text{Zn}$	151 $\pm$ 199	11.9–951	74.91 $\pm$ 93.71	7.28–312	1.31	0.261
$^{75}\text{As}$	5.17 $\pm$ 7.81	0.17–37.4	8.97 $\pm$ 10.3	0.85–20.1	1.46	0.235
$^{82}\text{Se}$	Nf	–	Nf	–	–	–
$^{95}\text{Mo}$	0.88 $\pm$ 0.34	0.65–2.37	2.01 $\pm$ 1.91	0.79–6.59	<b>9.38</b>	<b>0.004</b>
$^{107}\text{Ag}$	0.56 $\pm$ 0.37	0.23–1.88	0.70 $\pm$ 0.14	0.42–0.90	1.20	0.282
$^{114}\text{Cd}$	0.07 $\pm$ 0.19	>DL–0.90	0.05 $\pm$ 0.14	>DL–0.45	0.16	0.689
$^{121}\text{Sb}$	0.20 $\pm$ 0.16	0.04–0.68	0.32 $\pm$ 0.26	0.10–0.94	2.50	0.123
$^{137}\text{Ba}$	5.34 $\pm$ 4.77	1.29–23.7	9.48 $\pm$ 10.5	1.20–31.4	2.71	0.109
$^{202}\text{Hg}$	0.02 $\pm$ 0.08	>DL–0.32	0.96 $\pm$ 1.57	<DL–1.37	<b>25.7</b>	<b>0.000</b>
$^{205}\text{Tl}$	0.08 $\pm$ 0.01	0.07–0.12	0.08 $\pm$ 0.01	0.08–0.11	1.02	0.320
$^{208}\text{Pb}$	6.38 $\pm$ 5.82	0.94–18.3	8.33 $\pm$ 6.85	2.23–23.6	0.72	0.402
$^{232}\text{Th}$	1.78 $\pm$ 0.73	0.91–3.30	2.88 $\pm$ 0.52	2.32–3.77	<b>3.17</b>	<b>0.084</b>
$^{238}\text{U}$	0.01 $\pm$ 0.03	>DL–0.14	0.06 $\pm$ 0.13	>DL–0.39	1.86	0.181

In the *last two columns* the ANOVA results are presented  
Nf not found

separation time of 7 min can be observed. The analytical parameters of the procedure are presented in Table 4.

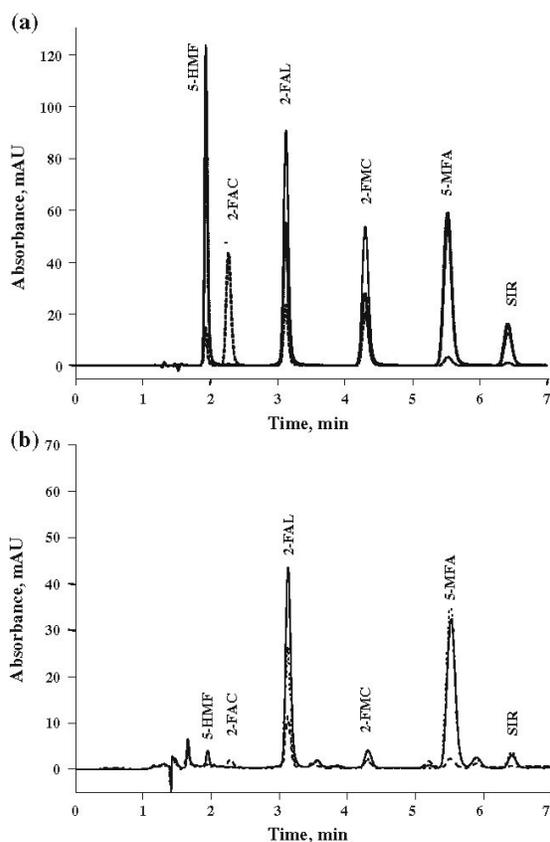
The analysis of six selected compounds was carried out in these same tequila samples in which multi-elemental profile had been assessed by ICP-MS. In Fig. 1b, the chromatogram of one 100% tequila sample is shown. The elution of six compounds can be observed with retention times matching those obtained for authentic standards (Fig. 1a). In Table 5, the results obtained for 100% and mixed tequilas are resumed.

The important source of furanic compounds in alcoholic beverages is the Maillard reaction, which occurs when sugars are heated above their melting point [26, 27]. Since the hydrolysis of inulin present in agave requires heating, higher levels of these compounds can be expected in tequila as compared to other spirits. Indeed, the concentrations of 2-furaldehyde in tequila found in this work (10.64  $\pm$  5.61  $\text{mg l}^{-1}$  in 100%, 6.57  $\pm$  4.91  $\text{mg l}^{-1}$  in mixed tequila) were higher than those reported for sugar cane spirits (0.77  $\pm$  0.04  $\text{mg l}^{-1}$  in export products) [28], brandies (1.66  $\text{mg l}^{-1}$ ) [5] and fortified wines supplemented with distilled spirit of grape origin (0.8–8.7  $\text{mg l}^{-1}$ ) [29]. Furthermore, 100% tequila brands contained significantly higher levels than the mixed brands (Table 5), in agreement with our earlier findings [5]. It should be stressed that in the brands of mixed tequila the

inulin hydrolyzate is diluted (sugar cane spirit, water), which results in different profile of Maillard products as compared to 100% tequila.

The results obtained for 5-methylfuraldehyde in 100% tequila (4.50  $\pm$  3.87  $\text{mg l}^{-1}$ ) were also significantly higher as compared to the mixed brands (3.31  $\pm$  2.59  $\text{mg l}^{-1}$ ), yet the levels of other compounds in these two types of brands did not present significant differences (Table 5). The 100% and mixed tequilas analyzed were of three different types: “tequila blanco” (without aging), “tequila reposado” and “tequila añejo” (aged in wooden barrels). Thus, the distribution of target compounds should depend on both, Maillard reaction and aging procedure. It is well established that, during storage in wooden barrels, the degradation products of cellulose and hemicelluloses such as phenolic aldehydes (syngaldehyde among others) and furanic compounds (2-furaldehyde, 5-methylfuraldehyde, 5-hydroxy-methylfuraldehyde) are formed and extracted to liquor. On the other hand, oxidation processes may occur, yielding different aldehydes, ketones and acids (for example 2-furoic acid) [4, 28, 30, 31].

In resume, the results obtained suggest possible utility of 2-FAL and 5-MFA levels in discriminating 100% and mixed tequilas, while the concentration of other four parameters seem to be dependent on the global effect of Maillard reactions and tequila aging.



**Fig. 1** Reversed phase chromatograms of (a) standard solution containing 5-HMF, 2-FAC, 2-FAL, 2-FMC, 5-MFA, SIR ( $2.5 \text{ mg l}^{-1}$  each) and (b) 100% tequila, obtained at three different detection wavelengths: 249 nm (dashed line), 285 nm (continuous line) and 292 nm (dotted line)

#### Feasibility of ICP-MS and HPLC results for the discrimination between 100% and mixed tequila

The utility of a wide range of analytical data has been explored for the evaluation of quality and authenticity of different alcoholic beverages. In search of methods enabling characterization of tequila brands, GC-MS profiles of volatile compounds, UV/Vis and FTIR spectra, HPLC determination of aldehydes as well as ion chromatographic determination of inorganic anions have been considered [2, 5, 8]. The result of any of the above analytical approach is a multidimensional set of variables, which is difficult to interpret without further statistical treatment. Principal component analysis (PCA) has often been used for such purpose, since this method reduces a number of variables observed to a smaller set of artificial variables (called principal components) that would account for most of the variance in the raw data. As a result, partial visualization of the data structure in a reduced dimension is obtained [2, 5].

The variables considered in this work were: the concentration levels of 6 compounds determined by HPLC, the concentrations of 18 elements (Se not detected) determined by ICP-MS, the descriptive variable distinguishing between 100% agave and mixed tequilas and the descriptive variable distinguishing between aged tequilas (“reposado”, “añejo”) and “tequila blanco” brands. Since all tequilas analyzed in this work were elaborated by renowned companies, the obtained results would not be valid in detecting spirit adulteration.

In the PCA model obtained, the first three components accounted for 94% of total system variability. In the three-dimensional plot of the sample scores in the space defined by the first three principal components, a natural separation

**Table 4** Analytical parameters evaluated for 5-hydroxy-methylfuraldehyde (5-HMF), 2-furoic acid (2-FAC), 2-furaldehyde (2-FAL), 2-furylmethylketone (2-FMC), 5-methylfuraldehyde (5-MFA), syringaldehyde (SIR), while using HPLC procedure

Parameter	Analyte					
	5-HMF	2-FAC	2-FAL	2-FMC	5-MFA	SIR
$\lambda$ , nm	285	249	285	285	292	292
$t_{\text{ret}} \pm \text{SD}$ , min	$1.95 \pm 0.09$	$2.28 \pm 0.11$	$3.13 \pm 0.13$	$4.30 \pm 0.16$	$5.53 \pm 0.21$	$6.56 \pm 0.20$
$R^2$	0.9997	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
Linear regression	$178.6x - 4.27$	$92.38x + 1.59$	$192.1x + 1.73$	$146.8x + 2.13$	$202.9x + 2.08$	$51.88x + 0.64$
SE, intercept	0.9	0.5	0.4	1.2	1.5	1.1
SE, slope	3.4	3.7	4.7	3.3	5.8	1.6
DL, $\mu\text{g l}^{-1}$	0.8	0.9	0.6	0.9	0.5	1.2
CV <sub>0.1mg l<sup>-1</sup></sub> , %	1.5	1.3	1.0	1.4	1.5	1.4
CV <sub>0.1mg l<sup>-1</sup></sub> , %	0.4	0.3	0.3	0.5	0.5	0.6

DL-detection limit based on signal-to-noise ratio 6:1, referred to as the concentration of the solution injected on the column; SE-standard error of intercept and slope, respectively, CV-relative standard deviation for 10 non-succeeding injections of this same solution ( $0.1$  or  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ )

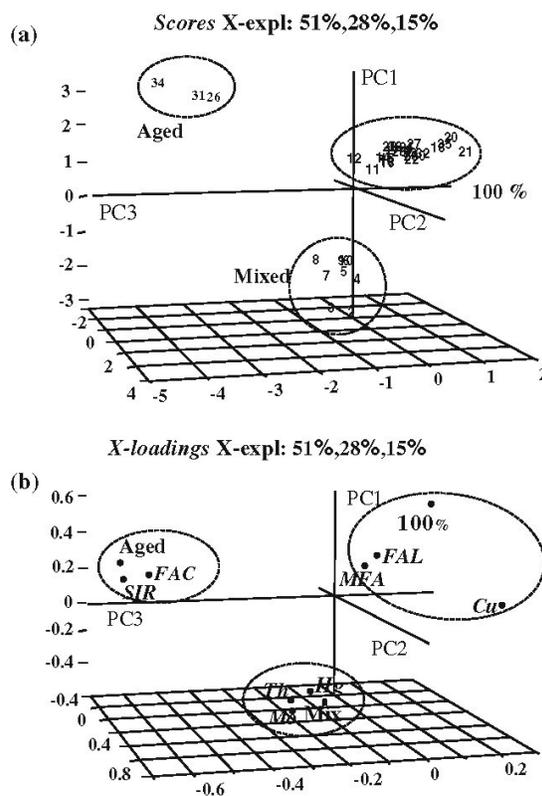
**Table 5** HPLC results obtained in the analysis of 100% agave and mixed commercial tequilas: for each compound, the average value and the concentration range are given

Analyte	Analyte concentration (mg l <sup>-1</sup> )				ANOVA	
	100% agave		Mixed tequila		F	p
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range		
5-HMF	0.50 ± 0.83	<DL–3.31	1.01 ± 1.00	<DL–3.28	3.20	0.083
2-FAC	0.07 ± 0.19	<DL–0.57	0.03 ± 0.08	<DL–0.12	0.90	0.352
2-FAL	10.64 ± 5.61	2.91–23.87	6.57 ± 4.91	1.41–10.81	<b>4.76</b>	<b>0.038</b>
2-FMC	0.81 ± 0.67	0.16–1.53	1.02 ± 0.62	0.36–1.89	2.28	0.140
5-MFA	4.50 ± 3.87	0.75–12.87	3.31 ± 2.59	0.35–6.61	<b>4.26</b>	<b>0.049</b>
SIR	1.20 ± 1.43	<DL–4.42	0.59 ± 0.76	<DL–2.13	2.84	0.103

In the last two columns the ANOVA results are presented

of 100%, mixed and aged tequilas can be observed (Fig. 2a). The three-dimensional plot of variable loadings is presented in Fig. 2b. In this figure, 8 analytical variables are shown (2-FAL, 5-MFA, Cu, Hg, Th, Mo, SIR, 2-FAC), because the other 16 variables did not present any association with tequila categories (data confirmed by statistical analysis of correlation). The variables corresponding to 2-FAL, 5-MFA and Cu levels were grouped together with 100% tequila. Similar results were reported for 2-FAL and 5-MFA in our previous work [5]. Copper presents catalytic activity in conversion of complex sulfur-containing malodorous molecules, thus contributing to better sensorial properties of distilled liquors [32]. This metal or its alloys are commonly used to construct pot stills used in the distillation, which could explain relatively high Cu levels in tequila and the association of this variable with 100% tequilas. The analysis of correlation revealed statistically significant correlation between 100% tequila and 2-FAL (correlation coefficient  $\beta = 0.781$ ,  $p = 0.028$ ); 100% tequila and 5-MFA ( $\beta = 0.688$ ,  $p = 0.042$ ); 100% tequila and copper ( $\beta = 0.664$ ,  $p = 0.046$ ), which clearly indicates the importance of these three parameters for discrimination between 100% tequilas and other brands.

The three variables associated with mixed tequila were mercury, thorium and molybdenum levels (Fig. 2b). As already mentioned, this category of tequila is obtained by mixing 100% tequila with cane or corn spirit diluted with drinking water, though 100% tequila itself is not diluted after distillation. Since a distillation of fermented mash eliminates a good part of metal species, the mixed tequila could be characterized by metal distribution in drinking water used in its production. The tequila brands analyzed were produced in the geographical region corresponding to neighbour states in Lerma river basin (Jalisco and Guanajuato). In different occasions, we had determined trace elements in superficial water, in municipal wells and in tap water (unpublished data). Relatively low concentrations were always observed, yet considerable differences in element levels were detected, depending on specific element, sample type, sampling site and the period of



**Fig. 2** Principal component analysis (PCA) of data obtained in commercial tequila: **a** three-dimensional plot of the sample scores and **b** three-dimensional plot of variable loadings in the space defined by the first three principal components

sampling. However, the concentrations of some elements (among them Hg, U, Th, Mo, Ba, Mn) were relatively stable and comparable between different sampling sites, which seems to confirm their potential utility as a markers of water addition to tequila. Indeed, the results of correlation analysis indicated statistically significant direct relationship between mixed tequila and Hg, Th, Mo ( $\beta = 0.948$ ,  $p = 0.000$ ;  $\beta = 0.905$ ,  $p = 0.002$ ;  $\beta = 0.867$ ,

$p = 0.012$ , respectively). Similar approach to characterization of mixed tequila was based on the determination of inorganic anions [6].

Concerning aged tequilas, in Fig. 2b this parameter was grouped with syringaldehyde and furoic acid variables. The correlation coefficients evaluated were  $\beta = 0.937$  ( $p = 0.000$ ) and  $\beta = 0.889$  ( $p = 0.000$ ), respectively. Similar relationships were also observed by other authors [28, 30].

## Conclusions

Multi-element ICP-MS determination in commercial tequila has been carried out for the first time. Possible spectral interferences were controlled with the use of collision/cell technology. The results obtained in the analysis of 40 brands showed low concentration levels of Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Tl, V, Zn, Th and U, in agreement with actual Mexican regulations for alcoholic beverages and also for drinking water. For copper, the concentration levels found in 100% tequila were higher than maximum permissible value ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ). In search of parameters useful for discrimination between 100% and mixed tequila categories, 5-hydroxy-methylfuraldehyde (5-HMF), 2-furoic acid (2-FAC), 2-furaldehyde (2-FAL), 2-furylmethylketone (2-FMC), 5-methylfuraldehyde (5-MFA), syringaldehyde (SIR) have also been determined, using simple and fast reversed phase chromatographic procedure. Multivariate analysis of the data set obtained has been carried out by the method of principal component analysis. The feasibility of 2-FAL, 5-MFA, Cu, Hg, Mo, Th, SIR and 2-FAC concentration levels to characterize 100%, mixed and aged tequila has been suggested.

**Acknowledgments** The financial support from CONACYT (Mexico), project 49405 and from CONCYTEG (Mexico), project 23681 is gratefully acknowledged.

## References

- Lachenmeier DW (2006) *Deut Lebensm-Rundsch* 102:400–404
- Lachenmeier DW, Richling E, Lopez MG, Frank W, Schreier P (2005) *J Agric Food Chem* 53:2151–2157
- Lopez MG, Mancilla-Margalli NA, Mendoza-Diaz G (2003) *J Agric Food Chem* 51:7835–7840
- Mancilla-Margalli NA, Lopez MG (2002) *J Agric Food Chem* 50:806–812
- Muñoz Rodríguez D, Wrobel K, Wrobel K (2005) *Eur Food Res Technol* 221:798–802
- Lachenmeier DW, Sohnius EM, Atting R, Lopez-Mercedes G (2006) *J Agric Food Chem* 54:3911–3915
- Aguilar-Cisneros BO, Lopez MG, Richling E, Heckel F, Schreier P (2002) *J Agric Food Chem* 50:7520–7523
- Bauer-Christoph C, Christoph N, Aguilar-Cisneros BO, Lopez MG, Richling E, Rossmann A, Schreier P (2003) *Eur Food Res Technol* 217:438–443
- Flamini R, Panighel A (2006) *Mass Spectrom Rev* 25:741–774
- Carreon-Alvarez A, Casillas N, Ibanez JG, Hernandez F, Prado-Ramirez R, Barcena-Soto M, Gomez-Salazar S (2008) *Anal Lett* 41:469–477
- Adam T, Duthie E, Feldmann J (2002) *J Inst Brewing* 108:459–464
- Kokkinofra R, Petrakis Panos V, Mavromoustakos T, Theocharis CR (2003) *J Agric Food Chem* 51:6233–6239
- Serapinas P, Venskutonis PR, Aninkevicius V, Ezerinskas Z, Galdikas A, Juzikiene V (2007) *Food Chem* 107:1652–1660
- Rossano EC, Szilagyi Z, Malorni A, Pocsfalvi G (2007) *J Agric Food Chem* 55:311–317
- Catarino S, Curvelo-Garcia AS, Bruno de Sousa R (2006) *Talanta* 70:1073–1080
- Stefanova V, Kmetov V, Futekov L, Georgieva D (1997) *Anal Lab* 6:31–42
- Woods G (2007) Application note, Agilent
- Bianchi F, Careri M, Maffini M, Mangia A, Mucchino C (2003) *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:251–256
- Gonzalez A, Armenta S, Pastor A, de la Guardia M (2008) *J Agric Food Chem* 4943–4954
- Vonderheide AP, Meija J, Tepperman K, Puga A, Pinhas AR, States JC, Caruso JA (2004) *J Chromatogr A* 1024:129–137
- Bettin SM, Isique WD, Franco DW, Andersen ML, Knudsen S, Skibsted LH (2002) *Eur Food Res Technol* 215:169–175
- Wrobel K, Wrobel K, Caruso JA (2007) In: Scott RE, Lukehart CM (eds) *Applications of physical methods to inorganic and bioinorganic chemistry. Encyclopedia of inorganic chemistry*, vol 11. Wiley, London, pp 205–225
- NOM-006-SCFI-1994 (1997) Norma Oficial Mexicana, Bebidas alcohólicas, Tequila, Especificaciones. Diario Oficial
- NOM-127-SSA1-1994 (1994) Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano—límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial
- Nascimento RF, Marques JC, Lima Neto BS, De Keukeleire D, Franco DW (1997) *J Chromatogr* 782:13–23
- Canas S, Belchior AP, Spranger MI, Bruno-de-Sousa R (2003) *J Sep Sci* 26:496–502
- Quesada-Granados J, Villalon-Mir M, Lopez Serrana H, Lopez Martinez MC (1996) *Food Chem* 56:415–419
- Batista Wendel, de Aquino F, Rodrigues S, Ferreira do Nascimento R, Soares Casimiro AR (2006) *Food Chem* 98:569–574
- Ho P, Hogg TA, Silva MCM (1999) *Food Chem* 64:115–122
- Savchuk SA, Vlasov vN, Appolonova SA, Arzubov VN, Vedenin AN, Mezinov AB, Grigoryan BR (2001) *J Anal Chem* 56:214–231
- Panossian A, Mamikonyan G, Torosyan M, Gabrielyan E, Mkhitarian S (2001) *Anal Chem* 73:4379–4383
- Prado-Ramirez R, Gonzales-Alvarez V, Pelayo-Ortiz C, Casillas N, Estarron M, Gomez-Hernandez H (2005) *Int J Food Sci Technol* 40:701–708



## Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry with $\text{Bi}^{3+}$ as internal standard

María Maldonado Santoyo, Julio Alberto Landero Figueroa, Kazimierz Wrobel, Katarzyna Wrobel\*

Department of Chemistry, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000 Guanajuato, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 March 2009  
Received in revised form 24 April 2009  
Accepted 27 April 2009  
Available online 3 May 2009

#### Keywords:

Mercury speciation  
Extraction  
Internal standard  
HPLC–ICP–MS

### ABSTRACT

In this work, the quantification of two mercury species ( $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) in fish tissues has been revisited. The originality of our approach relies on the use of  $\text{Bi}^{3+}$  as internal standard (IS) and on the modification of typical extraction conditions. The IS ( $125 \mu\text{l}$ ,  $1000 \mu\text{g l}^{-1} \text{Bi}^{3+}$ ) was added to the aliquot of fresh fish tissue (400–500 mg). A high-speed blender and ultrasound-assisted homogenization/extraction was carried out in the presence of perchloric acid ( $1.5 \text{ ml}$ ,  $0.6 \text{ mol l}^{-1}$ ), L-cysteine ( $500 \mu\text{l}$ ,  $0.75 \text{ mol l}^{-1}$ ) and  $500 \mu\text{l}$  toluene:methanol (1:1). Perchloric acid was used for protein denaturation and precipitation, toluene helped to destroy lipid structures potentially sequestering  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , L-cysteine was used to form water-soluble complexes with  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . The excess of perchloric acid was eliminated by addition of potassium hydroxide (pH 5 with acetic acid). The obtained extract, was diluted with the mobile phase (1:1) and introduced ( $20 \mu\text{l}$ ) to the reversed phase HPLC–ICP–MS system. The separation was achieved by isocratic elution ( $2.5 \text{ mmol l}^{-1}$  cysteine,  $12.5 \text{ mmol l}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.05% triethylamine, pH 7.0:methanol (96:4)) at a flow rate  $0.6 \text{ ml min}^{-1}$ . Column effluent was on-line introduced to ICP–MS for specific detection of  $^{202}\text{Hg}$ ,  $^{200}\text{Hg}$  and  $^{209}\text{Bi}$ . Analytical signal was defined as the ratio between  $^{202}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$  peak areas. The detection limits evaluated for  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  were  $0.8$  and  $0.7 \mu\text{g l}^{-1}$ . Recovery of the procedure, calculated as the sum of species concentrations found in the sample with respect to total ICP–MS-determined Hg was 91.9% for king mackerel muscle and 89.5% for red snapper liver. In the standard addition experiments, the recovery results were 98.9% for  $\text{Hg}^{2+}$  and 100.6% for  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . It should be stressed that the use of  $\text{Bi}^{3+}$  as IS enabled to improve analytical performance by compensating for incomplete extraction and for imprecision of sample handling during relatively non-rigorous protocol.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Inorganic mercury ( $\text{Hg}^{2+}$ ) and methylmercury ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) are the primary species of this element found in marine organisms and fish consumption is the main source of methylmercury for humans. Once the related environmental and toxicological risks had been recognized, different governmental agencies established acceptable mercury concentrations in food-related products [1]. In particular, U.S. Food and Drug Administration (FDA) has a regulatory action level of  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  in fish at  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  wet mass (wm) [2]. Accordingly, there is a strong demand for robust analytical procedures providing reliable data on both, total mercury and its chemical species in these complex biological matrices.

In the actual state-of-the-art in speciation analysis, a preference can be noted for using liquid chromatography separation coupled to element specific detector [3–6]. In particular, the hyphenation of

high performance liquid chromatography (HPLC) with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP–MS) offers the following advantages: (i) no need for derivatization of mercury species, (ii) different mechanisms of separation available and separation accomplished at room temperature, (iii) easy coupling between HPLC and ICP–MS, (iv) exceptional features of ICP–MS in terms of interference-free and sensitive detection as well as its capability for isotopic analysis [7–9].

While separation/quantification part of analytical protocol is not problematic nowadays, the quantitative extraction of inorganic and organic mercury without affecting natural distribution of species is still a challenge. Several procedures have been studied under acidic or alkaline conditions and the addition of complexing agents such as L-cysteine, 2-mercaptoethanol, thiourea, ammonium pyrrolidine dithiocarbamate, sodium diethyldithiocarbamate or dithizone has been considered [8–12]. More recently, ultrasound- and microwave-assisted extractions have gained strength, since they offer enhanced sample throughput and require lower amounts of the reagents [4,7,8,12,13]. However it has often been commented that the accuracy of final results is compromised by possible losses

\* Corresponding author. Tel.: +52 473 7327555; fax: +52 473 7326252.  
E-mail address: [katarzynn@quijote.ugto.mx](mailto:katarzynn@quijote.ugto.mx) (K. Wrobel).

of volatile species during digestion at high temperature and elevated pressure, species inter-conversion, or sample contamination [14,15]. Different strategies have been explored to overcome the above limitations, including the use of mild extraction conditions [10,11,16] or the addition of a mercury species as internal standard ( $\text{Hg}^{2+}$ , ethylmercury or methylpropylmercury) [17–19]. It should be stressed however that the method of internal standard has been explored exclusively in gas chromatography separations. On the other hand, speciated isotope dilution mass spectrometry (SIDMS) has been recommended as a definitive quantification technique and also a diagnostic tool, which enables to evaluate/correct for species transformations and non-quantitative recovery [15,20–22]. Even though SIDMS for mercury speciation has been accepted as a standardized US EPA method (method 6800) [4,23], uncertainties due to measured isotope amount ratios and those associated with the natural isotopic abundance of Hg [24], as well as the availability of stable isotope enriched standards and high cost of the analysis are still the limiting factors.

Worth mentioning is that, for easier sample handling and for analytical reliability purposes, the quantification results are usually referred to the mass of dried or freeze-dried sample [12]. However, the regulatory levels are always expressed as the concentration levels in wet mass in order to facilitate the evaluation of edible portions [1]. In this work, the novel procedure is proposed for mercury speciation in fresh fish tissues, in which bismuth ion is added to the sample as internal standard thus correcting for imprecisions committed during the entire procedure. The extraction conditions reported previously have been modified and the requirement for rigorous protocol has been eliminated. The proposed procedure may be useful for fast quantitative evaluation of mercury species in fish samples providing data that could be directly compared to the values established by different governmental regulations (as Hg concentration in wet mass).

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

An Agilent series 1200 liquid chromatographic system was used and the column effluent was introduced to inductively coupled plasma-mass spectrometry system via the short-length Teflon tubing.

A model 7500ce ICP-MS (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) was used with a Meinhard nebulizer for total mercury determination and with a MiraMist Teflon® nebulizer for speciation analysis. A Peltier-cooled chamber was operated at 2 °C. Tuning procedure was performed daily using diluted Agilent solution (Li, Y, Tl, Ce, 1  $\mu\text{g l}^{-1}$  each). The chromatographic and ICP-MS instrumental operating conditions are given in Table 1.

A high-speed blender Ultra-Turrax® T25 was used for sample homogenization.

### 2.2. Reagents and samples

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18.2 M $\Omega$  cm, Labconco, USA), HPLC-grade methanol and analytical reagent-grade toluene (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) were used throughout.

The standard solutions of mercury species (1000 mg l<sup>-1</sup> Hg) were prepared by dissolving mercury chloride in 1% nitric acid and methylmercury iodide in methanol (Sigma reagents) and were kept in amber glass vials, at 4 °C. Stock solution of the internal standard was prepared by dissolving bismuth nitrate (Sigma) in 1% nitric acid (1000 mg l<sup>-1</sup> Bi). Working solutions were prepared daily by appropriate dilution.

**Table 1**  
HPLC-ICP-MS instrument operating conditions.

ICP-MS—total mercury determination	
Forward power	1500 W
Nebulizer gas flow	0.9 ml min <sup>-1</sup>
Make-up gas	0.12 ml min <sup>-1</sup>
Sample introduction	Meinhard nebulizer
Sample and skimmer cones	Nickel
Sample depth	10 mm
Channels monitored	<sup>202</sup> Hg, <sup>200</sup> Hg, <sup>209</sup> Bi
Acquisition mode	Spectrum analysis
Dwell time	100 ms
HPLC-ICP-MS—speciation analysis	
Column	Gemini C18 (150 mm × 3 mm, 5 $\mu\text{m}$ )
Mobile phase	2.5 mmol l <sup>-1</sup> L-cysteine, 12.5 mmol l <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.05% triethylamine, pH 7.0:methanol (96:4)
Temperature	Ambient
Flow	0.6 ml min <sup>-1</sup>
Injection volume	20 $\mu\text{l}$
Forward power	1500 W
Nebulizer gas flow	0.9 ml min <sup>-1</sup>
Make-up gas	0.12 ml min <sup>-1</sup>
Sample introduction	MiraMist Teflon® nebulizer
Sample and skimmer cones	Nickel
Sample depth	10 mm
Channels monitored	<sup>202</sup> Hg, <sup>200</sup> Hg, <sup>209</sup> Bi
Acquisition mode	Time-resolved analysis
Dwell time	60 ms

The following Sigma reagents were used: nitric acid, perchloric acid, phosphoric acid, acetic acid, ammonium phosphate dibasic, L-cysteine, triethylamine, potassium hydroxide, hydride peroxide.

The king mackerel and red snapper fishes were self-caught in Gulf of Mexico, Tabasco, Mexico.

### 2.3. Determination of total mercury

The digestion procedure reported elsewhere was slightly modified [12]. In brief, five aliquots of fresh tissue (0.4–0.5 g) were precisely weighed in 8 ml digestion vials, 100  $\mu\text{l}$  of IS solution (1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  Bi), 3 ml of nitric acid (1:1) were added and the vials were closed. The samples were heated in a water bath (60 °C during 12 h), cooled down, 1 ml of hydrogen peroxide was added and the samples were again heated (60 °C, 1 h). Afterwards, the samples were cooled down, diluted to 20 ml with deionized water, centrifuged (10,000 × g, 10 min) and the supernatants introduced to ICP-MS. Alternatively, a portion of fresh tissue (10 g) was dried (40 °C, 48 h) [12] and homogenized. Five aliquots (0.2 g) were precisely weighed and total mercury was determined as described above. Moisture content was derived from the mass of fresh and dried samples (five replicates of 1 g fresh tissue, these samples were not used for mercury analysis). External calibration solutions contained 0, 0.2, 1.0, 5.0, 10, 25  $\mu\text{g l}^{-1}$  Hg (inorganic mercury standard) and 5.0  $\mu\text{g l}^{-1}$  Bi.

### 2.4. Analytical speciation procedure

Five aliquots of fresh tissue (0.4–0.5 g) were precisely weighed in 15 ml Falcon tubes, 125  $\mu\text{l}$  of IS (1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  Bi) was added and the polythron homogenization was carried out in the presence of perchloric acid (1.5 ml, 0.6 mol l<sup>-1</sup>), L-cysteine (500  $\mu\text{l}$ , 0.75 mol l<sup>-1</sup>) and 500  $\mu\text{l}$  toluene:methanol (1:1) (0.5–2 min). The mixtures were sonicated (room temperature, 1 h), centrifuged (10,000 × g, 10 min) and 1000  $\mu\text{l}$  of supernatant withdrawn. The excess of perchloric acid was precipitated with 70  $\mu\text{l}$  of potassium hydroxide, 9 mol l<sup>-1</sup> and 10  $\mu\text{l}$  of acetic acid was added to adjust pH 5. Then, the samples were again centrifuged (10,000 × g, 10 min); the supernatant

diluted 1:1 with the mobile phase and introduced to the HPLC–ICP–MS system (Table 1). The dried tissues (0.2 g) were analyzed using this same procedure. External calibration was performed with a series of standard solutions containing  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  (0, 5.0, 10, 25, 50  $\mu\text{g l}^{-1}$  Hg each) and IS (10  $\mu\text{g l}^{-1}$  Bi). For recovery experiments, one mercury species ( $\text{Hg}^{2+}$  or  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) was added to the fresh tissue (100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  Hg) together with IS. These same concentrations were used for the method of standard addition, however in this case both mercury species ( $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) were added to the sample. Blank was always run in parallel.

### 3. Results and discussion

The intent of this work was to develop relatively non-rigorous and reliable procedure for the determination of  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  in fish tissues. To do so, the use of bismuth ion as an internal standard (IS) had been proposed and the extraction conditions have been studied. To the best of our knowledge, this is the first application of IS to analytical speciation of mercury based on liquid chromatography separation.

#### 3.1. Bismuth ion as internal standard

The aliquot of bismuth nitrate was added to the fresh tissue in order to compensate for possible imprecisions committed during the entire procedure. Bismuth was selected because of its similar affinity to sulfhydryl group as compared to mercury species [25–27]. In particular, it was anticipated that bismuth would match the behavior of inorganic mercury during extraction and HPLC separation. The concentration levels of  $\text{Hg}^{2+}$  in marine organisms are significantly lower than those of methylmercury and the majority of available reference materials are certified for total mercury and/or  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , but not for  $\text{Hg}^{2+}$ . The use of  $\text{Bi}^{3+}$  should improve relatively poor reliability of the results for  $\text{Hg}^{2+}$  that had been observed in different studies and attributed to low concentrations, noncertified values and high uncertainties of the analytical results [8,9,11]. Furthermore,  $^{209}\text{Bi}$  is one of the high mass IS recommended in the US EPA method 6020A and also in other applications [28]. With regard to the general requirements,  $^{209}\text{Bi}$  is close to Hg isotopes in mass, however its ionization potential (7.3 eV) is lower than that for mercury (10.4 eV) [29]. Platinum had been proposed as the better match for mercury [28], but it was not used in this study, due to lower affinity of metal ion to thiols. Finally, it was experimentally verified that natural concentration levels of Bi in fish tissues were below the detection limit (<0.05  $\mu\text{g l}^{-1}$  in the sample digest).

#### 3.2. Liquid chromatography separation with ICP–MS detection

Several liquid chromatographic conditions have been reported for the separation of organic and inorganic mercury species [7–9,26,30–32]. In particular, Percy et al. studied separation of inorganic mercury and methylmercury considering their different coordination chemistry towards thiols [26]. Since in the present work L-cysteine is used for the extraction of  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  from fish tissues, the mobile phase composition was adopted from the above study and the final conditions are given in Table 1. In Fig. 1, a chromatogram obtained under the finally selected conditions is presented. It can be observed that bismuth and inorganic mercury species presented almost identical chromatographic behavior, which confirms the formation of L-cysteine complexes and, hence the feasibility of  $\text{Bi}^{3+}$  as IS in HPLC–ICP–MS speciation of mercury. Total separation time (3 min) was comparable to the results reported by other authors [8,26]. The external calibration was

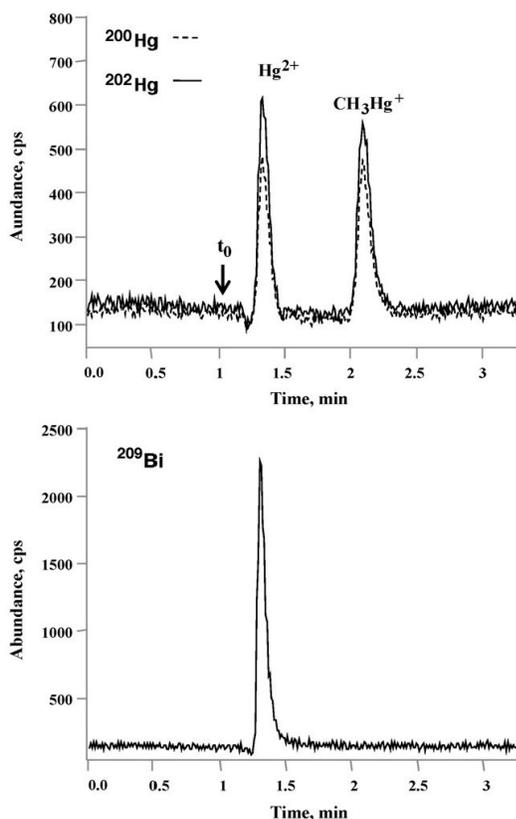


Fig. 1. High performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry chromatogram of standard solution containing  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  (10  $\mu\text{g l}^{-1}$  Hg) and  $\text{Bi}^{3+}$  (10  $\mu\text{g l}^{-1}$  Bi).

accomplished and the analytical figures of merit for the two mercurial species are presented in Table 2. As can be observed, using the method of IS, better linearity, enhanced precision and slightly lower detection limits were obtained.

#### 3.3. Extraction procedure

The experimental conditions proposed in this work for mercury extraction from fish tissues involve the use of perchloric acid,

Table 2 Analytical figures of merit evaluated for the speciation procedure proposed.

Parameter	$\text{Hg}^{2+}$		$\text{CH}_3\text{Hg}^+$	
	With IS	Without IS	With IS	Without IS
Retention time, min	1.31 ± 0.02		2.06 ± 0.03	
Retention factor	0.25		0.96	
Calibration range, $\mu\text{g l}^{-1}$ Hg	0–50		0–50	
Signal mode	Peak area		Peak area	
Analytical signal	$^{202}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$	$^{202}\text{Hg}$	$^{202}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$	$^{202}\text{Hg}$
$R^2$	0.9986	0.9896	0.9999	0.9998
Std. error for slope, %	5.1	5.5	3.4	4.2
Std. error for intercept, %	7.0	7.8	5.8	7.7
DL, $\mu\text{g l}^{-1}$	0.8	0.9	0.7	0.9
CV, % (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ Hg, n = 5)	3.6	5.4	3.3	5.1
CV, % (50 $\mu\text{g l}^{-1}$ Hg, n = 5)	2.8	5.9	3.0	4.8

DL: detection limit calculated as three standard deviations of the baseline noise versus calibration slope.

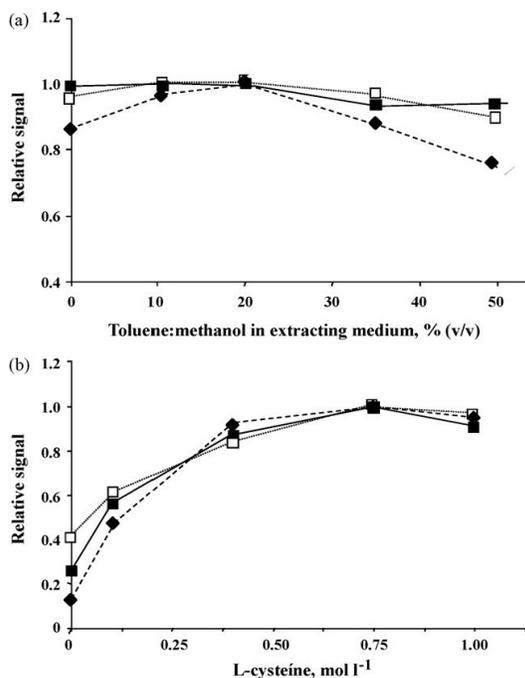


Fig. 2. Effect of toluene:methanol (1:1) percentage (a) and L-cysteine concentration (b) in the extracting medium on the relative analytical signals of inorganic mercury (—■—), methylmercury (—◆—) and bismuth (…□…), obtained by HPLC-ICP-MS. Chromatographic and detection conditions given in Section 2.

L-cysteine, toluene:methanol mixture, IS, homogenization/ extraction aided by a high-speed blender and sonication. The original approach relies on the use of perchloric acid (final concentration 0.4 mol l<sup>-1</sup>) for denaturation and precipitation of proteins [33]. The excess of acid was eliminated by precipitation of potassium perchlorate (addition of potassium hydroxide). Final pH 5 was adjusted with acetic acid and the precipitate was removed by centrifugation. On the other hand, the use of L-cysteine, toluene and methanol was adopted from earlier studies. In particular, toluene helped to destroy lipid structures potentially sequestering CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> [10], L-cysteine was employed to form water-soluble complexes with Bi<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> [5,8,25,26]. The effects of L-cysteine concentration and toluene:methanol percentage were studied in fresh muscle tissue of king mackerel. In Fig. 2, relative analytical signals obtained for Hg<sup>2+</sup>, CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> and Bi<sup>3+</sup> are presented as the function of percentage of toluene:methanol (1:1) in the extraction medium and molar concentration of L-cysteine. These results were obtained using final extraction, chromatographic and ICP-MS conditions, while changing one variable (see Section 2.4). It can be observed that the highest relative responses for the two mercury species and for bismuth were obtained for 0.75 mol l<sup>-1</sup> L-cysteine and for 20% (v/v) of toluene:methanol in the extracting medium. Finally, it was experimentally verified that, blender parameters (time 0.5–2 min) and sonication time (40–80 min) had no significant effect on Hg<sup>2+</sup> and CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> results obtained in fresh tissue using IS method. A chromatogram of the respective tissue extract is presented in Fig. 3 together with a blank chromatogram. The retention times of Hg<sup>2+</sup>, CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> and Bi<sup>3+</sup> corresponded to those obtained in the analysis of standard solution.

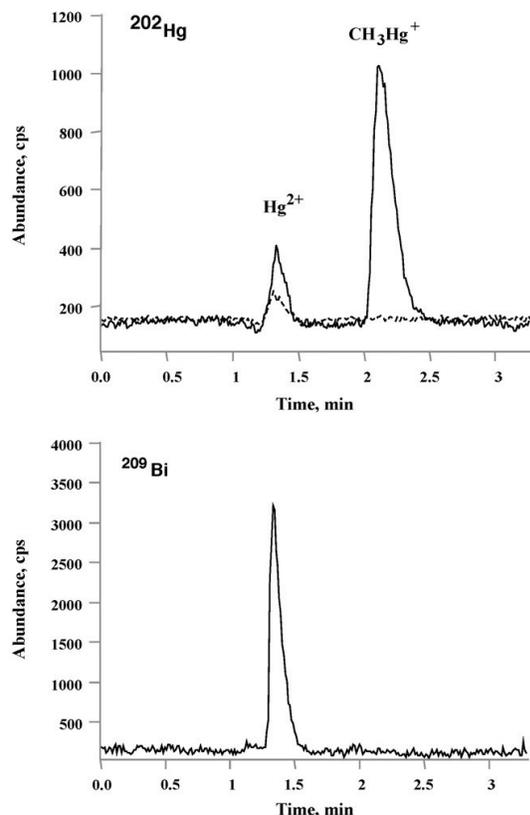


Fig. 3. HPLC-ICP-MS chromatogram of (—) king mackerel tissue extract and (---) blank.

### 3.4. Analysis of fish tissues

The proposed procedure was evaluated using two types of fish tissue. In the first approach, total mercury was determined in fresh and dried samples, using the internal standard method, as described in Section 2. The results obtained for king mackerel muscle were 227.1 ± 9.3 μg kg<sup>-1</sup> wm, 958.4 ± 35.4 μg kg<sup>-1</sup> dm and those obtained for red snapper liver were 126.2 ± 10.8 μg kg<sup>-1</sup> wm, 450.3 ± 30.9 μg kg<sup>-1</sup> dm, respectively. The moisture content was 76.8 ± 0.4% in the muscle and 73.1 ± 0.5% in the liver material. Accordingly, no statistically significant differences were found between the results obtained in dried and fresh material (ANOVA, *p* < 0.05). Furthermore, these results were within the concentration range of total mercury reported in FDA monitoring program (1999–2004): 230–1670 μg kg<sup>-1</sup> wm for king mackerel from Gulf of Mexico and from the levels below the detection limit up to 1366 μg kg<sup>-1</sup> wm for snapper [34].

In further development, the speciation analysis in fresh tissues was carried out. For quantification, the peak area for <sup>202</sup>Hg (without IS), or the ratio between peak areas <sup>202</sup>Hg/<sup>209</sup>Bi (with IS) were used. The results obtained by external calibration and by the method of standard addition are presented in Table 3. With the use of IS, a good agreement can be observed between the results obtained by external calibration and by the method of standard addition. If the IS had not been considered, the precision was clearly poorer (standard deviation values obtained for five sample replicates) and the

**Table 3**  
Quantitative results obtained for mercury species in two different fish tissues,  $\mu\text{g kg}^{-1}$  wet mass (wm).

Internal standard	Hg <sup>2+</sup>		CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>	
	Ext. calibration	Std. addition	Ext. calibration	Std. addition
King mackerel muscle, 227.1 ± 9.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ wm				
With IS	28.4 ± 1.3	27.5 ± 2.2	178.9 ± 3.5	181.2 ± 4.7
Without IS	13.1 ± 2.5	26.8 ± 3.6	113.8 ± 4.3	176.6 ± 5.6
Red snapper liver, 126.2 ± 10.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ wm				
With IS	35.7 ± 1.4	36.3 ± 2.6	75.7 ± 5.0	76.5 ± 5.5
Without IS	30.8 ± 2.6	35.9 ± 4.1	54.8 ± 6.2	77.2 ± 7.2

**Table 4**  
Recovery results obtained in the analysis of the king mackerel muscle.

Species determined	Species concentration ± SD, $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n = 3)				Recovery, %	
	Species added		Found		With IS	Without IS
	Hg <sup>2+</sup>	CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>	With IS	Without IS		
Hg <sup>2+</sup>	0	0	27.5 ± 2.2	26.8 ± 3.6	–	–
	100	0	126.4 ± 6.7	100.6 ± 7.1	98.9	73.8
CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>	0	0	181.2 ± 4.7	176.6 ± 5.6	–	–
	0	200	382.4 ± 28.2	338.6 ± 33.1	100.6	81.0
Bi <sup>3+</sup>	250	–	–	188.7 ± 12.1	–	75.5

results obtained by external calibration were significantly lower with respect to those from the method of standard addition. The procedure recovery was evaluated as a ratio between the sum of Hg<sup>2+</sup> and CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> concentrations obtained in speciation analysis (standard addition with IS) and total Hg determined by ICP-MS. The recovery values were 91.9% and 89.5% for king mackerel muscle and for red snapper liver, respectively. Speciation analysis was repeated using dried fish tissues and quantification of mercury species was accomplished by the method of standard addition with IS. The concentrations of Hg<sup>2+</sup> and CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> found in mackerel muscle were 133.9 ± 8.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dm and 703.7 ± 45.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dm and, in

snapper liver 154.2 ± 11.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dm and 231.3 ± 16.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dm, respectively. Using dried material, the procedure recovery was 87.4% for muscle and 85.6% for liver. These results indicate that the extraction from fresh tissue was more efficient as compared to the dried material. The relative distribution of CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> in the dried muscle was slightly lower with respect to the fresh tissue; 83.0% versus 86.8% (total Hg eluted from the column considered as 100%). Similar tendency was observed in the results obtained for snapper liver; methylmercury accounted for 60.0% while analyzing dried material and in the fresh tissue it accounted for 67.8% of Hg eluted from the column.

**Table 5**  
Comparison of different extraction and HPLC-ICP-MS procedures for mercury speciation in fish tissues.

Analytical procedure	HPLC	DL, $\mu\text{g l}^{-1}$ (Hg)		Species recovery, %		Ref
		CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	
2-Mercaptoethanol in 2% MeOH, MW: 65°C, 5 min	C18, 150 mm × 1 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; 2-mercaptoethanol 0.2%, MeOH 2%, EDTA 1 mg/L, pH 2.8; separation time: 17 min	0.2	0.2	95 ± 5	96 ± 8	[7]
2-Mercaptoethanol 0.1%, KCl 0.15%, HCl 0.1%, shaking: room temp., 12 h	C18, 150 mm × 3.9 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; 2-mercaptoethanol 0.1%, MeOH 5%, CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 60 mM, pH 2.8; separation time: 13 min	0.2	0.2	Complete recovery of total Hg in reference materials		[16]
25% TMAH; MW: 40 W, 4 min; neutralization with CH <sub>3</sub> COOH	C18, 150 mm × 3.2 mm, 3 $\mu\text{m}$ ; 2-mercaptoethanol 0.01%, MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1); sep. time: 4 min	0.5 <sup>a</sup>	–	83–100	–	[9]
25% KOH or TMAH in MeOH, water bath 70°C, 30 min, sonication 30 min, adjustment to pH 4	C18, 150 mm × 4.6 mm, 2 $\mu\text{m}$ ; 50 mM pyridine, 0.5% L-cysteine, 5% MeOH, pH 3; separation time: 4 min	0.78	0.46	99 ± 4	–	[8]
5 M HCl, 0.25 M NaCl MW: 60°C, 10 min	C18, 150 mm × 4.6 mm, 2 $\mu\text{m}$ ; 50 mM pyridine, 0.5% L-cysteine, 5% MeOH, pH 3; separation time: 4 min	0.78	0.46	100%	–	[4]
5 M HCl; sonication: room temp., 30 min; cloud point extraction of DDTC mercurial chelates	C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; MeOH:acetonitrile:H <sub>2</sub> O (35:40:25); separation time: 14 min	0.013	0.006	82–115% in water samples, in fish not reported		[11]
<i>Procedure proposed in this study</i>		0.7	0.8	100.6	98.9	

MW: microwave assisted extraction.

<sup>a</sup> Detection limit as  $\mu\text{g/g}$  (Hg).

The concentration and relative distribution of mercury species in different organs would depend on the environmental conditions, food regimes, age and size of the fish. In spite of important discrepancies among different studies, our results seem to be consistent with previous data reporting about 80% of  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  with respect to total Hg in muscle [35] and relatively lower percentage of this species in liver than in muscle [36,37].

The spike recoveries for individual species were determined in fresh tissues enriched by adding the appropriate amount of  $\text{Hg}^{2+}$  or  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  standard. Bismuth recovery was also examined. The results obtained are presented in Table 4. For quantification performed without IS, the recoveries of mercury species were 73.8% for  $\text{Hg}^{2+}$  and 81.0% for  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , similar to the recovery value evaluated for internal standard (75.5%). However, taking the analytical signal as a ratio  $^{202}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$ , the recoveries for the two mercurial species were close to 100%. These results confirm the feasibility of  $\text{Bi}^{3+}$  as IS in the extraction and HPLC-ICP-MS determination of mercury species in fish tissues.

Finally, in Table 5 the proposed procedure is compared with respect to several methods reported previously. As can be observed, the chromatographic separation time, limits of detection and species recoveries obtained in this work are similar to those obtained under other extraction and separation conditions. The important advantage of the procedure devised in this study is non-rigorous protocol that can be applied directly to fresh fish tissues. In this protocol, only the amount of sample and of IS added must be accurately and precisely measured.

#### 4. Conclusions

In this work, bismuth inorganic ion was proposed as internal standard for the quantification of  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  in fish. A high-speed blender and ultrasound-assisted homogenization/extraction was carried out in fresh tissues, in the presence of IS, perchloric acid, L-cysteine and toluene:methanol (1:1). Speciation analysis was performed by reversed phase liquid chromatography separation of respective L-cysteine complexes with on-line ICP-MS detection of Hg and Bi. Due to similar polarity and size of inorganic mercury and bismuth complexes both, their extraction and chromatographic behavior were almost identical, complying with the general requirements for IS. Furthermore, ICP-MS multielemental features enabled to quantify Hg and Bi co-eluting from the chromatographic column. Quite importantly, the recovery of the procedure was better while using fresh tissues than dried material. In summary, the feasibility of  $\text{Bi}^{3+}$  as IS relies on the compensation for incomplete extraction of mercury species and the enhanced precision of the results obtained using relatively non-rigorous protocol. The proposed procedure could be of interest for fast evaluation of mercury species in fish samples, providing data that can be directly compared to the values established by different governmental regulations (as Hg concentration in wet mass).

#### Acknowledgments

The financial support from CONACYT (Mexico), project 49405 and from CONCYTEG (Mexico), project 23681 is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] J. Burger, M. Gochfeld, Environ. Res. 99 (2005) 403.
- [2] [www.cfsan.fda.gov/~comm/haccp4.html](http://www.cfsan.fda.gov/~comm/haccp4.html), Fish and fisheries products hazards and controls guidance, U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2001.
- [3] T. Hasegawa, M. Asano, K. Takatani, H. Matsuura, T. Umemura, H. Haraguchi, Talanta 68 (2005) 465.
- [4] L. Hinojosa Reyes, G.M. Rahman, G.M. Mizanur, H.M.S. Kingston, Anal. Chim. Acta 631 (2009) 121.
- [5] P. Houserova, D. Matejcek, V. Kuban, J. Pavlickova, J. Komarek, J. Sep. Sci. 29 (2006) 248.
- [6] Y. Li, X.-P. Yan, L.-M. Dong, S.-W. Wang, Y. Jiang, D.-Q. Jiang, J. Anal. Atom. Spectrom. 20 (2005) 467.
- [7] L.F. Chang, S.J. Jiang, A.C. Sahayam, J. Chromatogr. A 1176 (2007) 143.
- [8] L.H. Reyes, G.M. Mizanur Rahman, T. Fahrenholz, H.M. Skip Kingston, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 2123.
- [9] D.S. Vidler, R.O. Jenkins, J.F. Hall, C.F. Harrington, Appl. Organomet. Chem. 21 (2007) 303.
- [10] A.M. Carro, M.C. Mejuto, J. Chromatogr. A 882 (2000) 283.
- [11] J. Chen, H. Chen, J. Xianzhong, C. Haiting, Talanta 77 (2009) 1381.
- [12] A.I. Cabanero Ortiz, Y. Madrid Albarran, C. Camara Rica, J. Anal. Atom. Spectrom. 17 (2002) 1595.
- [13] M.V. Balarama Krishna, D. Manjusha Rajint, D. Karunasagar, J. Arunachalam, Talanta 67 (2005) 70.
- [14] A.V. Hirner, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 555.
- [15] M. Leermakers, W. Baeyens, P. Quevauviller, M. Horvat, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 383.
- [16] M. Wang, W. Feng, J. Shi, F. Zhang, B. Wang, M. Zhu, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai, Talanta 71 (2007) 2034.
- [17] D. Yan, L. Yang, Q. Wang, Anal. Chem. 80 (2008) 6104.
- [18] A. Prieto, O. Zuloaga, A. Usobiaga, N. Etxebarria, L.A. Fernandez, C. Marcic, A. de Diego, J. Chromatogr. A 1185 (2008) 130.
- [19] R. Garcia Fernandez, M. Montes Bayon, J.I. Garcia Alonso, A. Sanz-Medel, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 639.
- [20] M. Monperrus, E. Tessier, S. Veschambre, D. Amouroux, O. Donard, Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005) 854.
- [21] E. Bjoern, T. Larsson, L. Lambertsson, U. Skyllberg, W. Frech, Ambio 36 (2007) 443.
- [22] K. Inagaki, T. Kuroiwa, T. Narukawa, T. Yaritha, A. Takatsu, K. Okamoto, K. Chiba, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 2047.
- [23] G.M. Rahman Mizanur, T. Fahrenholz, H.M.S. Kingston, J. Anal. Atom. Spectrom. 24 (2009) 83.
- [24] R. Clough, S.T. Belt, E.H. Evans, B. Fairman, T. Catterick, J. Anal. Atom. Spectrom. 18 (2003) 1039.
- [25] D. Chaleil, F. Lefevre, P. Allain, G.J. Martin, J. Inorg. Biochem. 15 (1981) 213.
- [26] A.J. Percy, M. Korbas, G.N. George, J. Gailer, J. Chromatogr. A 1156 (2007) 331.
- [27] E.M. Krupp, B.F. Milne, A. Mestrot, A.A. Meharg, J. Feldmann, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 1753.
- [28] S.M. Wilbur, E. Soffey, Agilent ICP-MS J. 17 (2003) 2.
- [29] J.J. Thompson, R.S. Houk, Appl. Spectrosc. 41 (1987) 801.
- [30] R. Rai, W. Maher, F. Kirkowa, J. Anal. Atom. Spectrom. 12 (2002) 1560.
- [31] S.C. Hight, J. Cheng, Anal. Chim. Acta 567 (2006) 160.
- [32] B. Vallant, R. Kadnar, W. Goessler, J. Anal. Atom. Spectrom. 22 (2007) 322.
- [33] K. Wrobel, K. Wrobel, J.A. Caruso, J. Anal. Atom. Spectrom. 17 (2002) 1048.
- [34] [www.cfsan.fda.gov/~trf/seamehg2.html](http://www.cfsan.fda.gov/~trf/seamehg2.html) (consulted 20.02.09).
- [35] R. Maury-Brachet, G. Durrieu, D. Yannick, A. Boudou, Sci. Tot. Environ. 368 (2006) 262.
- [36] A.P. Baeta, H.A. Kehring, O. Malm, I. Moreira, WIT Trans. Biomed. Health 10 (2006) 183.
- [37] P. Marsalek, Z. Svobodova, T. Randak, J. Svehla, Acta Vet. BRNO 74 (2005) 427.

11. Gramss G, Ziegenhagen D, Sorge S (1999) *Microbial Ecol* 37:140–151
12. Gramss G, Voigt KD, Bublitz F, Bergmann H (2003) *J Basic Microbiol* 43:483–498
13. Qi BC, Aldrich C, Lorenzen L, Wolfaardt GM (2004) *Ind Eng Chem Res* 43:6309–6316
14. Grinhut T, Hadar Y, Chen Y (2007) *Fungal Biol Rev* 21:179–189
15. Rezacova V, Gryndler M (2006) *Folia Microbiol* 51:215–221
16. Rezacova J, Hrselova H, Gryndlerova H, Miksik I, Gryndler M (2006) *Soil Biol & Sci* 38:2292–2299
17. Holker U, Ludwig S, Scheel T, Hofer M (1999) *Appl Microbiol Biotechnol* 52:57–59
18. Canero DC, Roncero MIG (2008) *Phytopathology* 98:509–518
19. Rodriguez Flores C, Landero Figueroa JA, Wrobel K, Wrobel K (2009) *Eur Food Res Technol* 228:951–958
20. Di Pietro A, Roncero MIG (1996) *Physiol Mol Plant P* 49:177–185
21. Ziegenhagen D, Hofrichter M (1998) *J Basic Microbiol* 38:289–299
22. Holker U, Fakoussa RM, Hoffer M (1995) *Appl Microbiol Biotechnol* 44:351–355
23. Loffredo E, Berloco M, Casulli F, Senesi N (2007) *Biol Fertil Soils* 43:759–769
24. Medentsev AG, Akimenko VK (1998) *Phytochemistry* 47:935–959
25. Filip Z, Bielek P (2002) *Biol Fertil Soils* 36:426–433
26. Leinweber P, Schulten H-R (2000) *J Plant Nutr Soil Sci* 163:433–439
27. Das Sarma B (1956) *J Am Chem Soc* 78:892–894

## Effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on the degradation of humic acid associated with Cu, Pb, and Ni: an in vitro study

Alma Rosa Corrales Escobosa · Julio Alberto Landero Figueroa · J. Félix Gutiérrez Corona · Katarzyna Wrobel · Kazimierz Wrobel

Received: 29 April 2009 / Revised: 3 June 2009 / Accepted: 4 June 2009 / Published online: 22 June 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** The intent of this work was to gain further insight on the fungus-assisted degradation/solubilization of humic acid and the related changes in metal-binding profiles. In the experimental design, Aldrich reagent humic acid (HA) or HA enriched with Cu, Pb, and Ni (HA(Me)) was added to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultures in vitro. The cultures were supplied by different carbon- and nitrogen-containing nutrients (glucose, Glc, or glutamate, Glu and ammonium,  $\text{NH}_4^+$ , or nitrate,  $\text{NO}_3^-$ , ions, respectively) in order to examine their possible effect on HA and HA(Me) decomposition. During the first 48 h of fungus growth, gradual acidification to pH 2 was observed in medium containing Glc +  $\text{NH}_4^+$ , while for other cultures, alkalization to pH 9 occurred and then, the above conditions were stable up to at least 200 h. Size exclusion chromatography (SEC) with UV/Vis detection showed progressive degradation and solubilization of both HA and HA(Me) with the increasing time of fungus growth. However, the molecular mass distributions of HA-related soluble species were different in the presence of metals (HA (Me)) as referred to HA and were also influenced by the

composition of growth medium. The solubilization of Pb, Cu, and Ni and their association with HA molecular mass fractions were studied using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) detection. Under acidic conditions, relatively high concentrations of low-molecular-mass metallic species were found in culture supernatants, while in alkaline media, metal solubilization was generally poorer. In contrast to low pH culture, SEC-ICP-MS results obtained in alkaline supernatants indicated metal binding to degradation products of humic substances of MM > 5 kDa. In summary, the results of this study suggest that fungus-assisted degradation of HA and HA(Me) might be controlled using appropriate N- and C- sources required for fungus growth, which in turn would affect molecular mass distribution of soluble metallic species thus potentially influencing their actual bioaccessibility.

**Keywords** Humic acid · Metals · *Fusarium oxysporum* · SEC (size exclusion chromatography) · ICP-MS (inductively coupled plasma–mass spectrometry)

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00216-009-2894-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. A. Landero Figueroa · K. Wrobel · K. Wrobel (✉)  
Department of Chemistry, University of Guanajuato,  
L. de Retana 5,  
36000 Guanajuato, Mexico  
e-mail: kazimier@quijote.ugto.mx

A. R. Corrales Escobosa · J. F. Gutiérrez Corona  
Department of Biology, University of Guanajuato,  
L. de Retana 5,  
36000 Guanajuato, Mexico

### Introduction

About 60% of organic matter in soil corresponds to humic substances (HS), usually defined as heterogenous and polyelectrolytic compounds with a wide range of molecular masses (up to 500 kDa) that are built from both, aromatic and aliphatic units [1]. Two main fractions of HS can be separated based on their pH-dependent solubility, namely humic acid (HA) and fulvic acid (FA). Thus, HA fraction is soluble only in alkaline media while FA fraction is soluble in the whole range of pH values [2]. In general, FA refers to lower-molecular-mass compounds with smaller number of

total aromatic carbons as compared to HA, though specific structural differences between these two fractions have not been fully understood [2-4]. It has been suggested that FA might be a degradation product of HA [5, 6]. An important feature of HS is their ability to bind polyvalent cations, with the following affinity order: Cu(II)>Ni(II)>Co(II)>Pb(II)>Cd(II)>Cr(III)»(Mn(II), Mo(VI), Zn(II) [7, 8]. Different experimental evidences were obtained indicating that both, bridging between small molecules and complexation/chelation by individual molecules are involved in metal binding to HS [8, 9].

On the other hand, the participation of soil microorganisms, particularly fungi, in humification processes and in HS degradation is well established [5, 10-13]. The increased solubility of heavy metals in soil had been observed during microbial growth and this effect was ascribed to changes in soil acidity and related solubility of HS degradation products. The release of polyvalent metal cations participating in HS aggregation was also considered [11]. However, as pointed out by Grinhut et al., the details of the HS degradation processes are far from being fully understood and, in particular, these processes would depend on the fungus species involved [14].

Among common fungal species occurring in natural environments, *Fusarium oxysporum* is a plant pathogen that colonizes xylem. In particular, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* causes a tomato plant disease called *Fusarium* wilt, which is manifested by yellowing of leaves and brown discoloration in the vascular tissue, eventually followed by the plant death. Within the context of this study, the ability of different *Fusarium* species for coal solubilization and HS degradation has been reported [15-17]. Among possible mechanisms responsible for HA degradation, the production of alkaline substances, the extrusion of chelators and the activity of fungal exoenzymes have been reported [17, 18]

In the present work, the degradation/solubilization of humic acid and the related changes in heavy metal binding have been investigated in the presence of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. In order to obtain specific data on the interaction between fungi and HA, reagent-grade HA or HA saturated with Cu, Pb, and Ni were added to in vitro cultures. Since various authors had pointed to the importance of the nutrients composition [11, 12, 17], two different sources of carbon (glucose and glutamic acid) and nitrogen (ammonium and nitrate ions) were examined. The analytical tools employed for the evaluation of fungi-mediated changes were: size exclusion chromatography (SEC), UV/Vis spectrophotometry, and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The results obtained might contribute to better understanding of fungus-mediated degradation/solubilization of humic acid and HA-associated metals.

## Experimental

### Apparatus

An Agilent series 1200 liquid chromatograph equipped with an autosampler, a diode array detector and Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used. The chromatographic column was BioSep-SEC-S 3000 (300×7.80 mm, 5 μm), Phenomenex.

A model 7500ce inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) with a Meinhard nebulizer and Peltier-cooled spray chamber (4 °C) was used. Tuning procedure was performed daily using diluted Agilent solution (Li, Y, Tl, Ce, 1 μg L<sup>-1</sup> each). The optimization of collision/reaction cell was carried out as described elsewhere [19].

The chromatographic and ICP-MS instrument-operating conditions are given in Table 1.

### Reagents and solutions

All chemicals were of analytical reagent grade and deionized water (18.2 MΩ cm, Labconco, USA) was used throughout the experiments.

The stock solution of humic acid (HA, 5 mg mL<sup>-1</sup>) was prepared by dissolving Aldrich reagent HA in 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide and adjusting to pH 7.5 with 0.5 mol L<sup>-1</sup> nitric acid (Sigma reagents). Two aliquots (10 mL) were taken and 250 μL copper acetate, 250 μL lead nitrate and 250 μL nickel nitrate (100 mmol L<sup>-1</sup> each, Sigma reagents) were added to the first one. To assure the same HA concentration in the two solutions, 750 μL of deionized water were added to the second aliquot. The two solutions were left for 2 days at room temperature to complete metal binding to humic acid [7]. To eliminate the excess of non-bound metallic species, HA incubated with Cu, Pb, Ni (HA (Me)) and, in parallel, HA without metal addition, were precipitated by acidification with nitric acid 0.5 mol L<sup>-1</sup>. After centrifugation (3,000×g, 10 min), the supernatants were eliminated and the solid residues were washed three times with diluted nitric acid (pH 3). Finally, the residues were transferred to volumetric flasks and, in each case the volume was brought to 10 mL with deionized water (final pH 7.5 with sodium hydroxide).

Mobile phase for size exclusion chromatography was prepared by dissolving sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate (Fluka) and adjusting pH 7.5 with nitric acid.

### Fungus strain and growth conditions

*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strain 4287 (race 2) was generously provided by Professor M.I.G. Roncero (Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, España)

**Table 1** The instrument operating conditions of SEC-ICP-MS

ICP-MS determination of total soluble metallic species	
Forward power	1,500 W
Nebulizer gas flow	0.89 mL min <sup>-1</sup>
Make-up gas	0.15 mL min <sup>-1</sup>
Sample introduction	Meinhard nebulizer
Sample and skimmer cones	Nickel
Sample depth	10 mm
Collision/reaction cell gas	4.0 mL min <sup>-1</sup> He
Channels monitored	<sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb
Acquisition mode	spectrum analysis
Dwell time	100 ms
SEC analysis of culture supernatants	
Column	BioSep-SEC-S 3000 (300×7.80 mm, 5 μm)
Mobile phase	10 mmol L <sup>-1</sup> sodium pyrophosphate (pH 7.5)
Flow	0.8 mL min <sup>-1</sup>
Injection volumen	5 μL for UV/Vis and 20 μL for ICP-MS detection
UV/Vis detection	420 nm
ICP-MS detection	
Forward power	1,500 W
Nebulizer gas flow	0.89 mL min <sup>-1</sup>
Make-up gas	0.24 mL min <sup>-1</sup>
Sample introduction	MiraMist Teflon® nebulizer
Sample and skimmer cones	Nickel
Sample depth	10 mm
Collision/reaction cell gas	4.0 mL min <sup>-1</sup> He
Channels monitored	<sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb
Acquisition mode	Time-resolved analysis
Dwell time	100 ms

and stored as a microconidial suspension in 30% glycerol at -80 °C.

The fungus was grown in 250-mL Erlenmeyer flasks with 50 mL synthetic medium (SM) that contained 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g KCl, 0.01 g FeSO<sub>4</sub>, 0.01 g ZnSO<sub>4</sub>, and 0.01 g MnSO<sub>4</sub> in 1 L deionized water (Sigma reagents) [20]. Before autoclaving, this solution was supplemented alternatively with monosodium glutamate (Glu) or glucose (Glc) as a carbon source (final concentration 1% *m/v*) and ammonium chloride (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) or potassium nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) as a nitrogen source (final concentration 0.1% *m/v*, Sigma reagents). The growth media were additionally amended with 0.5 mL of humic acid (HA) or humic acid enriched with metals (HA(Me)), both of them prepared as described in the previous section. The fungus cultures were obtained by inoculation of 10<sup>6</sup> microconidia mL<sup>-1</sup> in each of the above media and incubation for 6 days at 28 °C on a rotary shaker at 150 rpm. In summary, a series of fungal cultures were obtained that can be described as follows, depending on the composition of the growth medium: Glu-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA, Glu-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA(Me), Glu-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA, Glu-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me), Glc-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA, Glc-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA

(Me), Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA, Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me). Cultures without addition of humic acid were also obtained as controls. Three aliquots of each suspension (2 mL) were taken for analysis at 0, 24, 48, 96, and 144 h from inoculation.

## Procedures

### ICP-MS determination of total metal concentrations in fungal supernatants

The aliquots (1 mL) of fungal cultures were taken at different times from the inoculation (0–144 h), centrifuged (10,000×g, 10 min) and appropriately diluted with deionized water. The instrument-operating conditions are given in Table 1. External calibration was performed using multi-element standard solution (0.1% nitric acid (*v/v*)) at element concentration levels: 0; 0.2; 0.4; 1.0; 2.0; 5.0; and 10 μg L<sup>-1</sup> with addition of the internal standard (1.0 μg L<sup>-1</sup> In), *r*<sup>2</sup> > 0.9996. The detection limits for Cu, Pb and Ni were 40 ng L<sup>-1</sup>, 15 ng L<sup>-1</sup>, and 28 ng L<sup>-1</sup>, respectively. For accuracy checking, NIST 1643d-certified reference material (trace elements in water) was analyzed.

For three independent analyses, the results obtained for Cu, Pb, and Ni were  $20.2 \pm 1.6 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $19.3 \pm 0.8 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $60.3 \pm 1.9 \mu\text{g L}^{-1}$ , showing a good agreement with the certified values ( $20.5 \pm 3.8 \mu\text{g L}^{-1}$  Cu;  $18.2 \pm 0.6 \mu\text{g L}^{-1}$  Pb;  $58.1 \pm 2.7 \mu\text{g L}^{-1}$  Ni). All analyses were run in triplicate.

#### Size exclusion chromatography with spectrophotometric and ICP-MS detection

The culture suspensions were sampled at 0, 24, 48, 96, and 144 h from inoculation, then centrifuged ( $10,000\times g$ , 10 min), twofold diluted with the mobile phase and introduced to size exclusion chromatography system with UV/Vis or ICP-MS detection. The instrument-operating conditions are given in Table 1. Calibration of the SEC column was performed using the following Sigma molecular mass standards: bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (29 kDa), cytochrome C from horse heart (12.4 kDa), apoprotin from bovine lung (6.5 kDa), and (Gly)<sub>6</sub> (0.36 kDa), detection at 280 nm,  $r^2 = 0.9995$ .

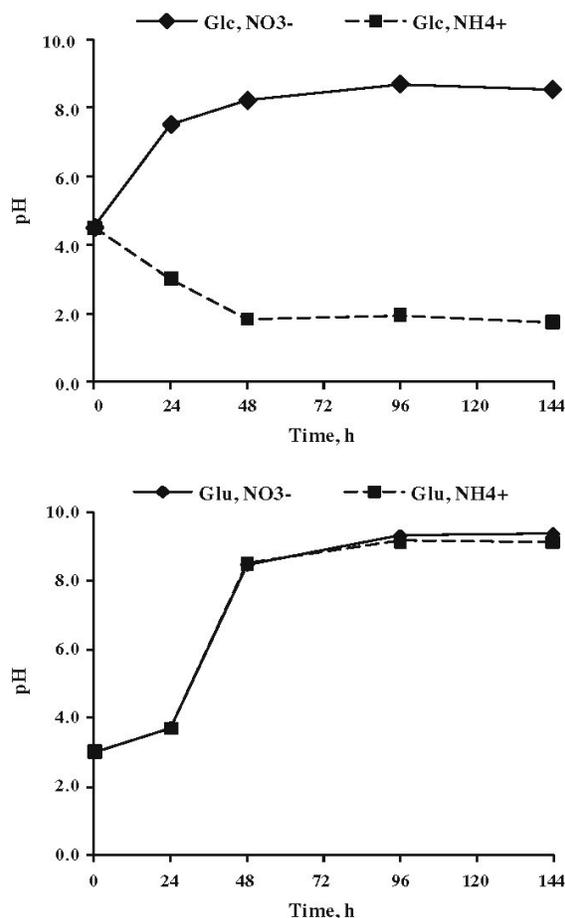
## Results and discussion

The original idea of the present study was to evaluate the effect of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* on the degradation/solubilization of humic acid enriched with heavy metals (HA (Me)) in the presence of different nitrogen- and carbon-containing nutrients required for fungus growth and to investigate the related changes in molecular mass distribution of soluble metallic species. For comparative purposes, the fungus was grown in contact with HA(Me) or humic acid without metals added (HA). Humic acid was used, because it had been reported that HA is more readily degraded by micro fungi as compared to FA [14, 16]. Aldrich reagent HA was preferred, since the fractionation of humic substances from natural environments is hindered by their complex interaction with mineral components and clays [14]. Furthermore, the use of reagent HA would facilitate the interpretation of fungus-mediated changes in HA elution profile obtained by size exclusion chromatography [7, 14, 21]. The selection of copper, lead, and nickel was based on their high affinity to humic substances [7, 8]. The culture supernatants were analyzed at different times from inoculation of fungus in order to obtain experimental evidences on the degradation/solubilization of HA(Me) and HA. The determination of soluble metals species was also performed.

#### Effect of nitrogen and carbon sources on *F. oxysporum*-mediated acidity changes

The initial pH values of the growth media were slightly acidic: pH 3.0 in the presence of glutamate (Glu) and pH

4.2 in the presence of glucose (Glc). The Aldrich reagent humic acid is comprised of a wide range of molecular masses (from MM < 1 kDa up to 450 kDa) [2, 14] and, at 0 h of fungus growth, the major fraction of HA and HA (Me) was present as a suspension. Since the important pH changes due to microbial activity had been reported and the observed effects were related to the presence of different carbon or nitrogen sources [11, 12, 17], in this work, the pH of cultures containing either Glu or Glc and  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$  was examined at 0, 24, 48, 96, and 144 h from the inoculation of *F. oxysporum*. In the presence of Glu- $\text{NO}_3^-$ , Glu- $\text{NH}_4^+$ , and Glc- $\text{NO}_3^-$ , pH gradually increased during the first 48 h to pH 9, while in the presence of Glc- $\text{NH}_4^+$  acidification of the cultures (pH 2) occurred (Fig. 1). It was experimentally verified that no pH changes occurred in the absence of fungus. On the other hand, essentially these same acidity changes as shown in Fig. 1 were observed in cultures without addition of HA, in cultures amended with

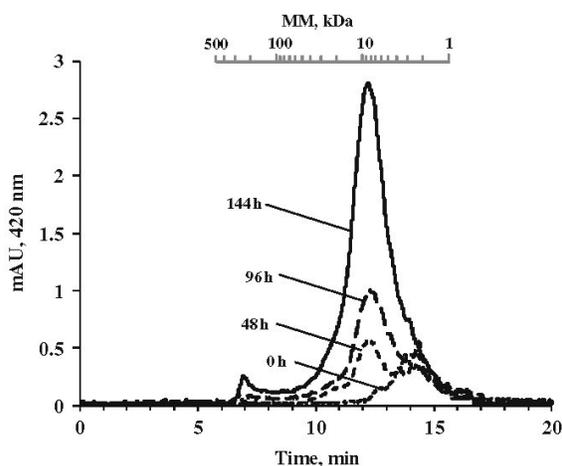


**Fig. 1** Effect of carbon and nitrogen sources on the pH changes of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultures during the 144 h growth period

HA and with HA(Me), which clearly indicates that these changes were due to the fungus metabolic activity. The results reported previously [11, 17, 22], were less specific, since only nitrogen compounds (casein, nitrate ion) or carbon sources (carboxylic acids or carbohydrates) had been considered. As could be expected, the results obtained in this work indicate that pH changes depend on the combination of nitrogen- and carbon nutrients and, in particular, glucose and ammonium ion were required to increase the acidity of in vitro *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultures.

### Degradation and solubilization of humic acid in the presence of fungus

In Fig. 2, size exclusion chromatograms obtained for supernatants of fungus culture made in medium containing glutamate, ammonium ion, and HA (Glu-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA) are presented at 0, 48, 96, and 144 h from inoculation. In agreement with the reported composition of Aldrich HA reagent [2], the molecular mass fractions eluted from the column cover the MM region from below 1 kDa up to 500 kDa. At 0 h from inoculation (pH 3.0), higher-molecular-mass compounds were not solubilized and the only molecular mass fraction eluted from the column corresponded to the compounds of MM < 5 kDa. For incubation times longer than 48 h (pH 9), total area under the chromatograms increased with the time of fungus growth, indicating the increasing solubility of HA-related compounds. However, the elution profile did not resemble typical distribution of MM in humic acid [8], since very low chromatographic signal can be observed at MM > 70 kDa.



**Fig. 2** SEC-UV/Vis chromatograms of the supernatants of *Fusarium* cultures containing glutamate, ammonium ion, and humic acid (Glu-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA) at different times from inoculation

On the contrary, the contribution of compounds with MM < 60 kDa in the culture supernatant increased at longer times of fungus contact with HA, which points to the degradation of HA with formation of soluble, lower-molecular-mass compounds (Fig. 1s in the Supplementary material shows that the fractions eluting in the MM range 5–60 kDa present typical humic acid UV/Vis spectra). Similar results were obtained in the analysis of cultures containing Glu-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA, Glu-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA, and Glc-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA (pH 9), while in the presence of Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA (pH 2), the degradation process was much less pronounced (data not shown).

The inhibition of *F. oxysporum* growth in the presence of humic substances (100–300 µg mL<sup>-1</sup>) was reported [23]. Since such inhibition could be an important factor in the evaluation of the fungus-assisted degradation and solubilization of HA and HA(Me), lower HA concentration (50 µg mL<sup>-1</sup>) was used in this work and it was experimentally verified that both HA and HA(Me) had no effect on the growth of fungal biomass (Fig. 2s in the Supplementary material).

In agreement with the previous reports, formation of naphthoquinone fungus metabolites was observed [24]. The synthesis of pigments was favored at acidic conditions (Glc + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), however, it was clearly inhibited in the presence of humic acid (Figs. 3s and 4s in the Supplementary material). Overall, no relationship between HA degradation and the formation of naphthoquinone metabolites was observed in this work.

Fungus cultures were also obtained in the absence of humic acid and the respective supernatants were analyzed by SEC-UV/Vis. In any growth conditions examined in this work, only small chromatographic peaks were observed, which confirms that compounds of MM in the range 5–60 kDa, eluting in the supernatants of cultures containing HA or HA(Me) corresponded to HA degradation products (Fig. 5s and 6s in the Supplementary material shows the chromatograms of supernatants from cultures obtained in different media in the absence and in the presence of humic acid, respectively).

Finally, the elution profiles of HA in the absence of the fungus were examined in the growth media adjusted to pH 2 or pH 9, respectively. As expected, under acidic conditions (Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), no solubilization of HA was observed. The supernatants of alkaline media, (Glu-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Glu-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and Glc-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pH 9) sampled at different times showed typical HA elution profile [8], which indicates that in the absence of fungus, the solubilization occurred without degradation.

From the results obtained, it can be deduced that *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* presents capability for degradation of humic acid with formation of lower MM soluble compounds, as previously shown for a wide range of soil micro fungi, including other *Fusarium* species [10, 17].

Furthermore, the results presented here indicate that the degradation and solubilization of HA by fungus activity might be attenuated by the choice of the nutrient composition that affects the acidity of medium.

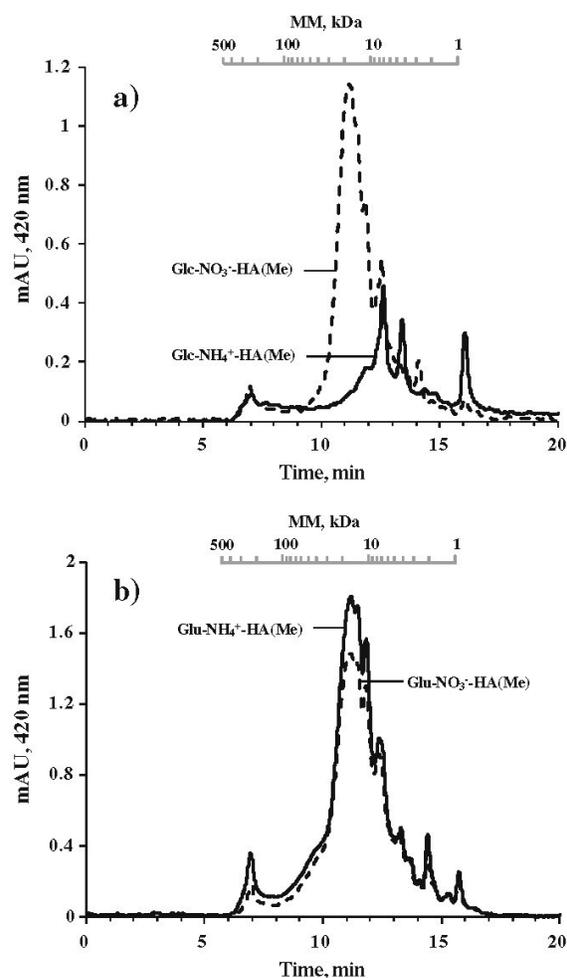
#### Metal binding to humic acid in the presence of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

To examine the fungus-mediated degradation/solubilization of humic acid enriched with heavy metals (HA(Me)), the supernatants from four cultures (Glu-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA(Me), Glu-

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me), Glc-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA(Me), Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me)) were obtained at different times from inoculation and analyzed by SEC-UV/Vis (420 nm). The chromatograms obtained at 144 h are presented in Fig. 3. The HA(Me) presented lower solubility as compared to HA, especially when glucose was added as the C-source (compare the intensity of chromatographic peaks in Figs. 2 and 3). Furthermore, the lowest solubility was observed in culture Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me) (pH 2), confirming pH-dependent degradation/solubilization. Similarly, as for cultures amended with HA, the contribution of high-molecular-mass compounds (MM > 70 kDa) was always relatively low. The major fraction of HA-related compounds eluted in the MM region from 60 kDa to 5 kDa, which indicates the degradation of HA(Me). However, the maximum chromatographic peak for HA(Me) corresponded to higher molecular mass as compared to HA (20 kDa versus 10 kDa, as shown in Figs. 2 and 3). These results support earlier findings that metal complexation by humic substances is responsible for their increased chemical stability and lower susceptibility to degradation [25, 26]. Furthermore, higher MM of the degradation products of HA(Me) with respect to HA observed in this work seems to confirm the role of metallic ions in the aggregation of humic acids [8, 9] and indicate that during fungus-mediated degradation of HA, metal-bridging effect is not totally eliminated.

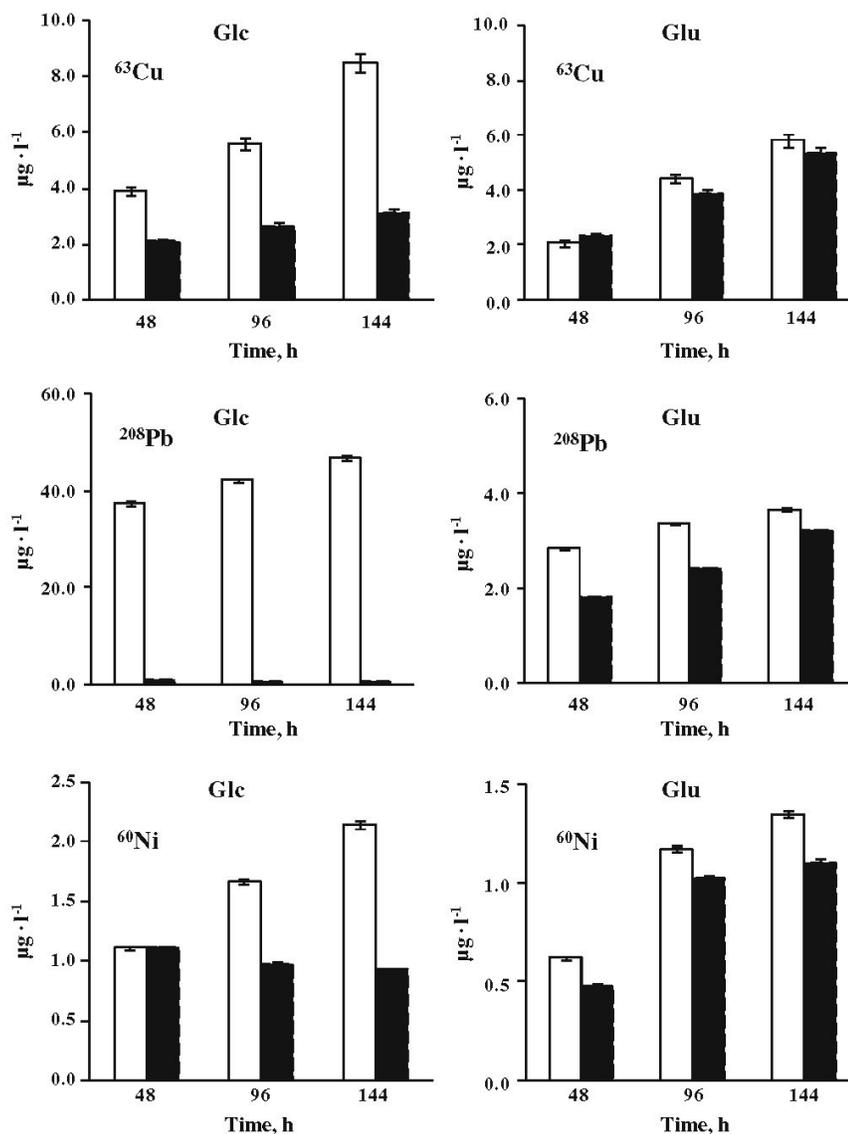
Independently, on the growth conditions, in the elution region corresponding to MM < 10 kDa, the fine structure of bulk chromatographic peak can be observed (Fig. 3), which was absent on the chromatograms of HA (Fig. 2). The results obtained suggest that metal binding contributes to molecular mass distribution of fungus-mediated HA(Me) degradation products. Furthermore, the sharp chromatographic peaks were best resolved in the supernatant of Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me) culture, in which HA-related compounds were poorly solubilized (pH 2). Therefore the low-molecular-mass compounds (MM around 1 kDa) could correspond to metal complexes absorbing at 420 nm. The role of chelators produced by fungus or the role of compounds present in the growth medium (e.g., glutamate, glucose or ammonium ion) in the complex formation could be considered, as proposed by other authors [12, 17]. In the earlier study, the presence of easily degradable C-sources was shown to facilitate HA degradation by fungi [14] and it seems possible that metal ion complexation might be one of the contributing processes.

Total metal concentration levels were determined in culture supernatants at different time of HA(Me) contact with *F. oxysporum* and the results are presented in Fig. 4. Since pH conditions varied at the beginning of fungal growth and because of the importance of pH for the solubilization of metal species, only the results obtained in supernatants sampled at 48, 96, and 144 h are shown (Fig. 1).



**Fig. 3** SEC-UV/Vis chromatograms of the supernatants of *Fusarium* cultures containing humic acid with metals (HA(Me)) and different sources of carbon and nitrogen (144 h from inoculation). (a) Glucose as a C-source: Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me) (solid line), Glc-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA(Me) (broken line); (b) Glutamate as a C-source: Glu-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me) (solid line), Glu-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA(Me) (broken line)

**Fig. 4** Concentration levels of total soluble Cu, Ni and Pb in supernatants of *Fusarium* cultures at different times of growth period (empty bar medium containing  $\text{NH}_4^+$ , filled bar medium containing  $\text{NO}_3^-$ )

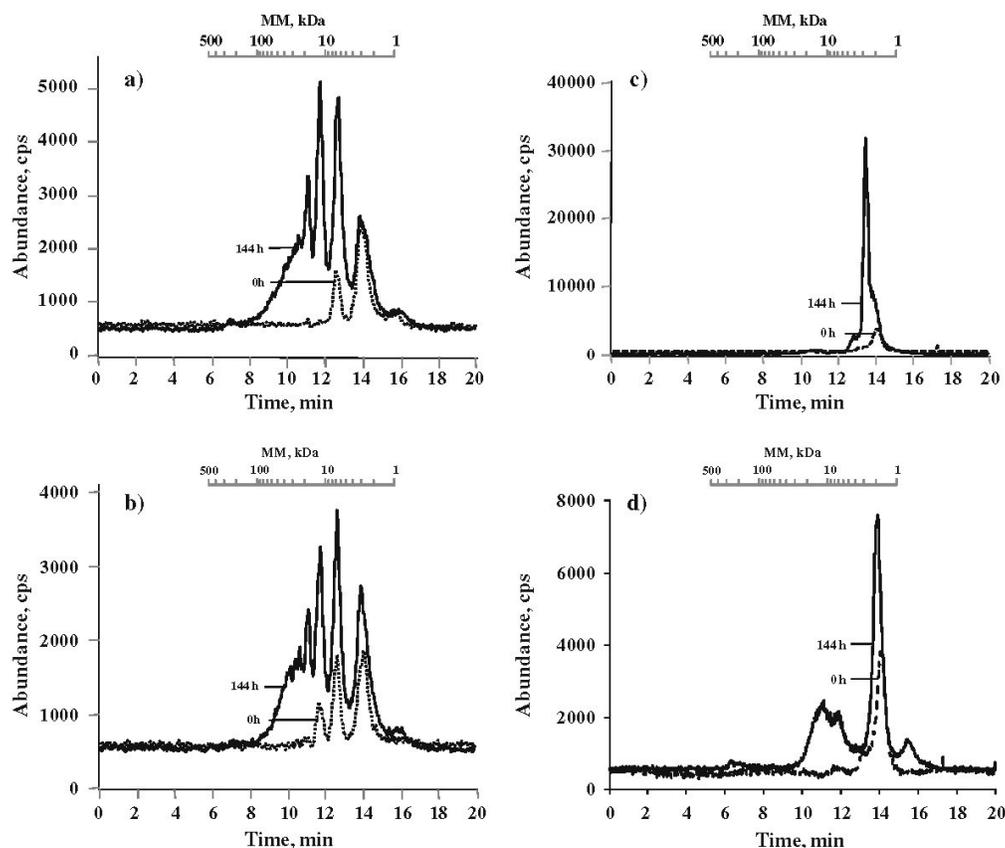


Significantly higher concentrations of soluble metals were found in acidic conditions (pH 2, Glc- $\text{NH}_4^+$ -HA(Me)) as compared to other cultures, in agreement with earlier findings [12]. On the other hand, in the three cultures at alkaline conditions (Glu- $\text{NH}_4^+$ -HA(Me), Glu- $\text{NO}_3^-$ -HA(Me), Glc- $\text{NO}_3^-$ -HA(Me)), the concentration levels of three metals were within similar range ( $0.45 - 5.46 \mu\text{g L}^{-1}$ ), however in the presence of ammonium ion, significantly higher concentrations were always found. The general trend toward better solubility of metal species with increasing time of fungus growth can be observed in all cultures.

To get an insight on the relative distribution of metals in molecular mass fractions of HA(Me)-related compounds,

the solution eluting from the SEC column was on-line introduced to ICP-MS for specific detection of Cu, Pb, and Ni.

SEC-ICP-MS chromatograms obtained for copper in culture supernatants at 0 and 144 h of fungal growth are presented in Fig. 5. In each case, total area under the chromatogram progressively increased from 0 to 144 h, which confirms the solubilization of metal species due to fungal metabolic activity, being the effect more pronounced in glutamate-containing cultures. Furthermore, better solubilization was observed in Glu- $\text{NH}_4^+$  medium with respect to Glu- $\text{NO}_3^-$  (compare peak intensity in Fig. 5a and 5b). The retention time of the last chromatographic peak is



**Fig. 5** SEC-ICP-MS elution profiles of copper in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* culture supernatants, obtained at 0 h (broken line) and 144 h (solid line) of growth period. (a) Glu-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me); (b) Glu-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA(Me); (c) Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me); (d) Glc-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-HA(Me)

essentially the same for each composition of medium, indicating the presence of free metal ions. For cultures containing glucose this was the unique metal form at 0 h, while for those containing glutamate, additional sharp chromatographic peaks can be observed at higher-molecular-mass region that could correspond to the elution of low-molecular-mass species of Cu and, in particular, its association with glutamate. After 144 h of HA(Me) contact with fungus, the elution profiles of copper changed. In cultures at alkaline conditions, copper was still present as

low-molecular-mass species, but it also eluted in molecular mass fractions ranging from 60 to 5 kDa, which indicates metal binding to HA(Me) degradation products (compare Fig. 3 with Fig. 5a, b, d). The retention times of sharp chromatographic peaks on SEC-ICP-MS chromatograms of cultures with glutamate (Fig. 5a, b) correspond to those observed by UV/Vis detection (Fig. 3), providing further evidence that copper contribute to the distribution of molecular mass fractions of fungus-mediated HA(Me) degradation products. Different elution profiles were

**Table 2** Relative distribution (%) of metals between molecular mass fractions in *Fusarium* culture supernatant, evaluated from the measurement of chromatographic peak areas (SEC – ICP-MS)

Growth conditions	Relative distribution ± SD, % (n=3)					
	Cu		Pb		Ni	
	5–60kDa	Below 5kDa	5–60kDa	Below 5kDa	5–60kDa	below 5kDa
Glu-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (pH 9)	74 ± 12	23 ± 5	nd	100 ± 5	39 ± 10	61 ± 9
Glu-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (pH 9)	69 ± 10	31 ± 8	23 ± 6	77 ± 10	34 ± 9	66 ± 11
Glc-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (pH 2)	6 ± 3	94 ± 7	nd	100 ± 8	nd	100 ± 8
Glc-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (pH 9)	42 ± 9	48 ± 10	19 ± 6	81 ± 9	23 ± 8	77 ± 15

nd no peak was detected

obtained for cultures containing glucose (Fig. 5c, d). In alkaline conditions (Glc-NO<sub>3</sub>-HA(Me), Fig. 5d), the amount of Cu eluted as low-molecular-mass compounds (MM < 5 kDa) increased from 0 h to 144 h and, at 144 h its contribution in the HA(Me) degradation products can also be observed (MM region from 60 to 5 kDa). However, the sharp peaks detected in the presence of glutamate were absent. The observed differences between glutamate and glucose containing alkaline cultures seem to confirm the importance of easily degraded C-source on the degradation pattern of HA(Me) [12, 14, 17, 22]. It was reported that copper glutamate complex presents dimer structure, in which the two Cu ions are joint by two glutamate molecules through a water bridge. In the presence of ammonium, the water-bridging is eliminated [27], which could result in Cu-Glu-binding to functional groups presented in degraded HA. The fine structure of Cu elution profile observed in the presence of glutamate and the increased metals solubility in media containing ammonium ion seems to support the formation of ternary (Glu-Cu-HA) structures [24].

As expected, in acidic conditions (Glc-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-HA(Me)) the amount of soluble copper species was significantly higher as compared to alkaline media and the main Cu fraction eluted in the region of low-molecular-mass compounds (Figs. 4 and 5c).

SEC-ICP-MS chromatograms obtained for Pb and Ni were substantially different as compared to Cu. Independent on the growth conditions, primary forms of the two metals eluted in the region of low-molecular-mass compounds (MM < 5 kDa), which indicates that their binding to HA degradation products was much lower than Cu and the release of free ions or low MM complexes predominated.

Relative distribution of Cu, Pb, and Ni between molecular mass fractions corresponding to the degraded/solubilized HA(Me) (60 – 5 kDa) and to low-molecular-mass species (MM < 5 kDa) was evaluated based on the chromatographic peak area measurements. The results obtained for 144 h cultures (Table 2) clearly show that fungus-mediated HA(Me) degradation yields different soluble species of Cu as compared to Ni and Pb. Apparently, the major fraction of copper was bound to higher MM of HA-degraded products (especially in medium containing glutamate and ammonium), while Ni and Pb were mainly present as low MM species.

## Conclusions

The results obtained in this work indicate that HA and HA (Me) solubilization, mediated by metabolic activity of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* involves the degradation of high-molecular-mass compounds initially present in Aldrich HA reagent. The above processes are influenced

by medium acidity, which may change depending on the C- and N-containing fungus nutrients. Progressive formation and solubilization of compounds with MM < 60 kDa was observed with the increasing time of fungus growth. Apparently, metal binding to HA affect the molecular mass distribution of the degradation products and, in particular, the results obtained confirm the bridging effect of metal ions in the aggregation of humic acid. The degradation/solubilization process of both HA and HA(Me) was favored in alkaline conditions. This process was accompanied by the increase of metal concentration levels in the culture supernatants. However, the solubility of metal species was much better in acidic media as compared to alkaline conditions. Furthermore, the results obtained by SEC-ICP-MS provided data on specific metal binding to molecular mass fractions of culture supernatants. Relative distribution of metals in soluble HA(Me) degradation products and low-molecular-mass species was found to be dependent on metal type, pH conditions, and the presence of glutamate or glucose as C-source. In alkaline conditions, the best metal solubilization was observed in the presence of glutamate and ammonium ion. In acidic medium, soluble metal species corresponded to MM fraction below 5 kDa. Overall, the results obtained suggest that fungus-assisted degradation of HA might be controlled using appropriate N- and C-sources required for fungus growth, which, in turn would affect actual molecular mass distribution of soluble metallic species thus potentially affecting their actual bioaccessibility.

**Acknowledgments** The financial support from CONACYT (Mexico), project 49405 and from CONCYTEG (Mexico), project 23681 is gratefully acknowledged.

## References

1. Hayes MHB (1998) Special Publication - RSC, 228 (Humic acids):1-27
2. Uyguner CS, Bekbolet M (2005) Desalination 176:167-176
3. Bertocini EI, D'Orazio V, Senesi N, Mattiazzo ME (2005) Anal Bioanal Chem 381:1281-1288
4. Werhaw RL, Kennedy KR (1998) Special Publication - RSC 228 (Humic Substances):61-68
5. Steffen KT, Hataka A, Hofrichter M (2002) Appl Environ Microbiol 68:3442-3448
6. Hertkom N, Permin A, Perminova I, Kovalevskii D, Yudov M, Petrosyan V, Kettrup A (2002) J Environ Qual 31:375-387
7. Sadi BB, Wrobel K, Wrobel K, Kannamkumarath SS, Castillo JR, Caruso JA (2002) J Environ Monit 4:1010-1016
8. Wrobel K, Sadi BB, Wrobel K, Castillo JR, Caruso JA (2003) Anal Chem 75:761-767
9. Simpson AJ, Kingery WL, Hayes MHB, Spraul M, Humpfer E, Dvorsak P, Kerssebaum R, Godejohann M, Hoffmann M (2002) Die Naturwissenschaften 89:84-88
10. Filip Z, Claus H, Dippel G (1998) Z Pflanz Bodenkunde 161:605-612

*Chapter 5*

**PHYTOCHELATINS IN THE WILD PLANTS FROM  
GUANAJUATO CITY – AN IMPORTANT SILVER AND  
GOLD MINING CENTER IN MEXICO**

***Kazimierz Wrobel, Julio Alberto Landero Figueroa  
and Katarzyna Wrobel<sup>1</sup>***

Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de Guanajuato,  
L. de Retana N° 5, 36000 Mexico

**ABSTRACT**

Phytochelatin (PCs) are a group of small, metal-binding peptides that are biosynthesized by higher plants, some fungi and algae in the response to heavy metal exposure. One actual research topic focuses on better understanding the global effect that all elements present in natural environments exert on the PCs production by plants.

In this work, PCs levels were evaluated in the wild plants, chronically exposed to low or moderate levels of heavy metals. The quantification of total PCs in plant extracts was carried out by HPLC with fluorimetric detection, after derivatization of free –SH groups with monobromobimane. Additionally, the distribution of metals in molecular mass (MM) fractions of these same extracts was studied by size exclusion chromatography with on-line UV and ICP-MS detection. All samples were collected in Guanajuato city (Mexico), which has long been an important silver and gold mining area. Among different metals reported in Guanajuato soils, lead, cadmium, copper and silver were selected in this study, because of their capability to induce phytochelatin in plants. The common plants from this region were analyzed, namely: *Ricinus communis* (castor bean), *Tithonia diversifolia* (Mexican sunflower) and *Opuntia ficus* (nopal). The analytical approach involved the ICP-MS analysis of total elements in soil, soil fractions and wild plants and also the evaluation of relationships between PCs, metal levels found in plants/soil and different soil parameters.

---

<sup>1</sup> Corresponding autor: katarzyn@quijote.ugto.mx.

In the analysis of plants, PC-2, PC-3 and PC-4 were detected in nopal, PC-2 in castor bean, while in Mexican flower no phytochelatins were found. In further development, the extracts of soil humic substances were obtained and the distribution of metals in molecular mass (MM) fractions was studied by size exclusion chromatography with on-line UV and ICP-MS detection. The soil humic substances (HS) were also assessed.

In search of possible relationship between the parameters measured, the statistical analysis of correlation was performed. The results obtained indicate that the binding of metals to soil HS contributes in lowering their uptake by castor bean plant. On the other hand, the soils collected at nopal roots presented low HS levels and no correlation with metals in plant was found. The results obtained in the sequential extraction of soils and the abundance of sulfide minerals in Guanajuato indicate that the sulfide bound metals were the primary forms of Pb, Cu and Cd in soil adjacent to nopal roots. Owing to their generally poor solubility, rizosphere processes should be important in mobilizing metals and their uptake by nopal.

Our results provide further evidence on the role of environmental conditions in the accumulation of heavy metals in relation to PCs production in different plant genotypes. In particular, multi-elemental approach is necessary in studies on PCs induction in actual field situations, where plants (or other organisms) are exposed to a variety of metals and metalloids.

## INTRODUCTION

Phytochelatins (PCs) are a group of small, metal-binding peptides of the general structure  $(\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , where  $n$  varies from 2 to 11 (Figure 1a) [1,2]. Other families of PCs, differing in the type of C-terminal amino acid have also been characterized [3]. PCs are biosynthesized by higher plants, some fungi and algae in the response to heavy metal exposure, which is considered a major detoxifying pathway for heavy metals in these organisms [4]. The PCs role in maintaining the homeostasis of intracellular levels of essential metal ions has also been highlighted [5]. Depending on the coordination capacity of metal ion and on the specific ability of plant for PCs synthesis, up to four sulfur atoms can be coordinated from either single or multiple PC molecules, resulting in PC-1, PC-2, PC-3 and PC-4 complexes (Figure 1b). The formation of PC-5 and PC-6 has also been reported, but only in transgenic plants [6], in cell cultures [7] and freshwater green alga [8].

The term phytochelatins was introduced by Zenk et al. in 1985, after isolation of novel metal-binding peptides from cell suspension cultures of a higher plant after exposure to Cd [9]. Since then, the extensive studies have been carried out aiming structural characterization of PCs and their metal complexes [10,11] as well as the elucidation of induction mechanisms [12,13]. In the first approach, the isolation and characterization of PC synthases from different organisms have been carried out. Most commonly, the experimental approach has involved plant growth (or other types of culture) under controlled exposure conditions, typically using the salt of one element at relatively high concentrations.

The expression of PCs not only enhances the tolerance to heavy metals but also causes their accumulation in plant tissues, so the feasibility of PCs for phytoremediation of toxic heavy metals from contaminated soil and water has been explored [14,15]. In particular, plant engineering to assure higher rates of PCs induction has been studied [16-18].

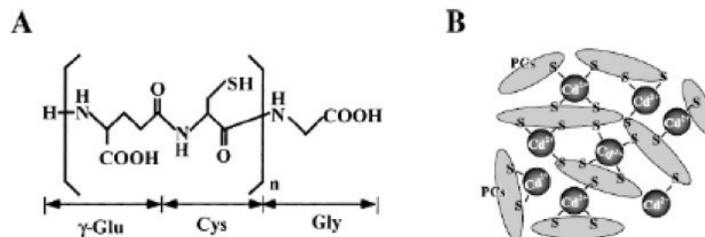


Figure 1. Primary structures of PCs (A) and PC-Cd complexes (B) [2].

However, before the routine use of plants in phytoremediation becomes possible, several questions regarding genetic regulation of PC synthase, its localization in plants and interaction of PCs and PCs synthase with different metal/metalloid forms, need to be answered. Furthermore, the mechanisms responsible for metal uptake and accumulation in plants in relation to PCs production are not fully understood. It should be realized that, in natural environments, plants are exposed to many elements and their forms at different concentration levels. In general, processes occurring in the soil-root system are considered important [19,20], yet the role of environmental parameters, possibly affecting metal bioavailability to plants, remains unclear. The increased production of phytochelatin has been observed in the presence of various organic chelators (ethylene diamine tetraacetate, ethylene diamine disuccinate, citric acid, etc.) as added to nutrient solution and/or soil [21-24]. On the other hand, metal binding by humic matter in soils has been shown to affect the mobility of metals in the environment. Depending on the experimental design and the type of metal, the increased or decreased uptake of Cd, Cu, Pb have been observed [25-30]. Importantly, the data relating soil humic substances with phytochelatin production in plants exposed to heavy metals are lacking.

In order to gain further insight on the induction of PCs and element complexation by these compounds in real-field situation, the global effect of different elements present at low concentrations should be studied together with possible effects of relevant environmental parameters.

Within this context, the present work has been focused on the wild plants growing in Guanajuato city, located in central Mexico. Guanajuato city has long been an important silver and gold mining center and the leaching of several metals and metalloids from the mine tailings to different environmental compartments has been reported [31,32]. Consequently, the plants growing in this area are chronically exposed to various metals, that are present in soils in relatively wide range of concentrations. Among those elements, we have focused on lead, cadmium, copper and silver, because of their capability to induce phytochelatin in plants [3,10,33-37] and also because of their abundance in the region of Guanajuato [31,32]. For the purposes of this work, three wild plants have been selected, namely *Ricinus communis* (castor bean), *Tithonia diversifolia* (Mexican sunflower) and *Opuntia ficus* (nopal). These plants are common in Guanajuato and they can grow within small distance one from another, which is important to assure similar exposure conditions of different plants. The accumulation of metals in castor bean has already been reported [38,39]. Its possible application in

phytoremediation has been explored [38,40], yet data available for Mexican sunflower and nopal are scarce [41]. Quite importantly, no information on possible induction of PCs in any of the three plant types has been found.

In a course of this study, we have focused on answering the following questions:

1. Do the wild plants chronically exposed to low/moderate concentrations of Ag, Cd, Cu and Pb induce PCs?
2. How to distinguish among elements that are important for PCs induction and those that are simply bound to PCs already existing?
3. Are the soil parameters important in PCs induction?

In the following sections, the experimental design and the results obtained in this study are systematically presented.

## EXPERIMENTAL DESIGN

The sampling sites were selected in order to cover a wide range of element concentrations in soil. Thus, the site 1 corresponded to the place where the silver ores had been processed in the past; the site 2 was located at the Guanajuato river close to the mine tailing; the site 3 was at a hill, relatively distant from the mines; the site 4 was in the urban area developed on main tailing; the site 5 was in the part of city far from the mines and the site 6 was at the riverside, but far from the mining zone. Additionally, nopal samples were also collected in the “clean area”, which corresponded to the countryside, about 40 km from Merida city, peninsula of Yucatán.

The plants were collected in November 2005 (just after the wet season), taking at each site three samples of roots and three samples of leaves from plants of similar size and color of leaves. To avoid possible variations of soil parameters, the area of any sampling site did not exceed 9 m<sup>2</sup>. At each sampling site, the pH of topsoil (0 - 30 cm) was measured. The relative variability of pH values for several measurements at one site did not exceed 2 % and the values found at different sites were in the range pH 7.7 to pH 8.0 (pH 8.0 – 8.1 in the soil from Merida).

For each plant species, the roots and leaves collected at one site were pooled. Roots were carefully separated from the adjacent soil and pooled. Three washing agents were tested, namely deionized water, 0.05 M CaCl<sub>2</sub> and 0.05 M EDTA (with and without ultrasonication). Since the washing procedure had no significant effect on the results, the roots were washed with deionized water in ultrasonic bath (10 min). Both, roots and leaves were cut into small pieces, freeze-dried and homogenized by mortar grinding in liquid nitrogen.

The soil samples were collected in these same sites, from which the plants were taken. (six samples of about 250 g per 9 m<sup>2</sup> site). For the determination of total Ag, Cd, Cu and Pb, the samples from each site were pooled and dried. Soil fractionation was carried out according to the simplified Tessier method [42]. Fresh soils, without pooling, were used for the assay of humic substances.

In plant material, total element concentrations were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after wet acid digestion. The extraction of PCs from

freeze-dried root and leave homogenates was carried out with ammonium acetate (pH 7.4) [43]. Metal binding to PCs was studied by size exclusion liquid chromatography (SEC) with on-line UV and ICP-MS detection. Total PCs were assayed by reversed phase high performance liquid chromatography (RPHPLC) with fluorimetric detection [44,45].

The analytical approach in soil involved: (i) the determination of total element concentrations by ICP-MS after acid digestion; (ii) ICP-MS determination of elements in soil fractions after Tessier sequential extraction, (iii) assessment of soil humic substances (HS) by UV/Vis spectrophotometry [46] and (iv) SEC – UV/Vis – ICP-MS analysis of HS extracts for examination of metal binding to HS.

In search of possible relationship among parameters measured, the statistical analysis of correlation was performed, based on the results obtained in six sampling sites (software package Statistica for Windows, StatSoft Inc. 2000, Tulsa OK).

### **CAPABILITY OF THE WILD PLANTS CHRONICALLY EXPOSED TO LOW OR MODERATE CONCENTRATIONS OF METALS IN SOIL FOR THE INDUCTION OF PHYTOCHELATINS**

In the first approach, cadmium, copper, silver and lead were determined in the pooled soils and plant roots. As an example, the results obtained in sites 1-3 are presented in Table 1. The metal levels found in soil were in agreement with the ranges reported previously [31,32], yet substantial differences can be observed among different sampling sites. Among four metals, lead was found to be the most abundant in soil (maximum concentration  $362 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$ , site 1), copper levels were generally lower with the highest value also at the site 1 ( $221 \pm 7 \mu\text{g g}^{-1}$ ), Ag levels were about 4 to 5 times lower than those for Cu (highest value  $42.2 \pm 0.7 \mu\text{g g}^{-1}$ , site 1) and cadmium presented concentrations below  $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$  at any site. Even though the three plant species were collected simultaneously from these same sites, the highest concentrations of metals were found in *Opuntia f.*, followed by *R. communis* and *T. diversifolia*, (Table 1). As could be expected, the concentrations of metals in roots were higher in plants collected from more contaminated sites (site 1 and 2 versus site 3).

In order to examine if any of three wild plants can produce PCs, the root and stem extracts were obtained and analyzed for phytochelatin by reversed phase chromatography. It should be stressed that, at this point, we were interested in the total content of PCs and not in specific metal – PCs binding. Thus, in the analytical procedure applied, metals bound to PCs were eliminated by DPTA complexation and, after reduction, the fluorescent derivatization of the free thiol groups was achieved [44,45,47]. In the analysis of plant extracts, phytochelatin were found in *Opuntia f.* and in *R. communis*, but not in *T. diversifolia* [36]. Furthermore, nopal extracts contained PC-2, PC-3 and PC-4 and castor bean extract only PC-2. Total PCs levels in the plant samples collected at sites 1-4 are presented in Table 2. It can be observed that nopal contained relatively high concentrations of PCs as compared to castor bean. Also, the PCs levels in roots were always higher than in leaves.

In the context of the first question put in this work, the results obtained indicate that the wild plants, chronically exposed to low or moderate metal levels in soil do biosynthesize phytochelatin. However, our results seem to confirm that this process is genotype - dependent [18,48].

**Table 1. Total cadmium, copper, lead and silver levels in soils and plant roots collected from three different sites in Guanajuato (1 - Hacienda when the silver ores had been processed in the past, 2 - Riverside close to the mine tailing, 3 – Site at a hill, relatively distant from the mines, each analysis was performed in triplicate)**

Sample	Site	Mean concentration of heavy metal $\pm$ SD, $\mu\text{g g}^{-1}$ (dried weight)			
		Ag	Cd	Cu	Pb
Soil	1	42.20 $\pm$ 0.65	0.373 $\pm$ 0.018	221 $\pm$ 7	362 $\pm$ 8
	2	3.40 $\pm$ 0.07	0.483 $\pm$ 0.010	20.6 $\pm$ 1.0	194 $\pm$ 7
	3	3.20 $\pm$ 0.32	0.296 $\pm$ 0.011	17.0 $\pm$ 0.5	19.4 $\pm$ 0.5
Mean concentration of heavy metal $\pm$ SD, $\text{ng g}^{-1}$ (freeze-dried roots)					
<i>R. communis</i>	1	131 $\pm$ 6	16 $\pm$ 3	2580 $\pm$ 80	2740 $\pm$ 60
	2	141 $\pm$ 9	123 $\pm$ 8	2600 $\pm$ 70	1720 $\pm$ 50
	3	85 $\pm$ 6	12 $\pm$ 2	992 $\pm$ 17	198 $\pm$ 6
<i>T. diversifolia</i>	1	23 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1	530 $\pm$ 16	805 $\pm$ 18
	2	35 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2	592 $\pm$ 20	445 $\pm$ 10
	3	< 5 (DL)	< 0.5 (DL)	187 $\pm$ 7	20.5 $\pm$ 0.6
<i>Opuntia f.</i>	1	27 $\pm$ 2	224 $\pm$ 9	5030 $\pm$ 110	3250 $\pm$ 87
	2	8.8 $\pm$ 1.2	173 $\pm$ 7	4050 $\pm$ 98	2190 $\pm$ 84
	3	5.3 $\pm$ 1.5	124 $\pm$ 7	5750 $\pm$ 103	854 $\pm$ 46

nf – not found.

**Table 2. Total PCs in the extracts from plants collected at three sampling sites characterized by different soil metal contents. (1 - Hacienda when the silver ores had been processed in the past, 2 - Riverside close to the mine tailing, 3 – Site at a hill, relatively distant from the mines, 4 – urban area developed on the mine tailing, each analysis was performed in triplicate)**

Sampling site	$\mu\text{g}$ of total PCs per gram of the freeze-dried plant homogenates		
	Nopal roots	Nopal leaves	Castor bean roots
1	12.2 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.2
2	16.8 $\pm$ 0.4	10.0 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.3
3	27.7 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.4
4	74.3 $\pm$ 0.3	20.3 $\pm$ 0.2	28.3 $\pm$ 0.8

### SPECIFIC ROLE OF METALS IN THE PRODUCTION OF PHYTOCHELATINS IN PLANTS, NATURALLY EXPOSED TO A WIDE RANGE OF ELEMENTS

In this work, four metals (Ag, Cd, Cu, Pb) were selected because of their abundance in the Guanajuato region and because of their known capability to induce phytochelatin in plants [10,33-35]. Since the highest levels of total phytochelatin were found in nopal (Table 2), the extracts of this plant were used to study specific metal-PCs binding. As an example, the chromatograms obtained for the plant material from site 3 in Guanajuato are presented in

Figure 2 (cadmium could not be detected). For lead, lower element levels were observed in stems than roots. Furthermore, it eluted mainly as bound to high molecular mass compounds (between 75 – 95 % of total area of chromatogram), but also in the low molecular mass fraction. For copper, only one elution peak was observed in the region of low molecular mass (Figure 2b). Contrary to lead, in many samples the copper abundance in stems was higher than in roots. The elution profile of silver (Figure 2a) indicates its association with high molecular weight compounds; however, the chromatographic peaks were relatively broad suggesting non-specific binding. The results obtained indicate different profiles of metal association with PCs. Based on peak area measurements, the relative distribution of three metals between high and low molecular mass fractions was estimated for each plant sample.

It should be stressed that the procedure by SEC – ICP-MS enabled to get data on specific binding of each metal to PCs, while RPHPLC with fluorimetric detection provided complementary quantitative information on total pool of PCs in plant material (Table 2). In the context of the second question to be answered in this work, which regards the role of individual metals in PCs production, it was considered that the correlation between total PCs and a metal bound to PCs would indicate that this metal is important in the induction of PCs. On the contrary, when no relationship between these two parameters exists, a metal would be just bound to PCs already existing.

The correlation analysis was performed taking the data obtained in the analysis of PCs-rich plant extracts by SEC – ICP-MS and RPHPLC with fluorimetric detection. For lead, significant correlation was found between total PCs and SEC-ICP-MS areas ( $r = 0.7026$ ,  $p = 0.088$  for roots and  $r = 0.8581$ ,  $p = 0.071$  for stems). Furthermore, total PCs correlated with lead eluted in SEC high molecular mass fraction ( $r = 0.6835$ ,  $p = 0.023$  for roots and  $r = 0.8818$ ,  $p = 0.048$  for stems). These results confirm the association of Pb with nopal phytochelatin and suggest its possible role in PCs induction. For copper, correlation was observed between total PCs and entire SEC-ICP-MS area in roots ( $r=0.7568$ ,  $p = 0.129$ ) and between total PCs and high molecular mass fraction of SEC in roots ( $r= 0.7455$ ,  $p=0.138$ ). Apparently, copper could be involved in the induction of PCs in roots, however the translocation of lead and copper through the plant is apparently different. No statistically important correlation was found for silver indicating that it is not associated with phytochelatin production.

## SOIL PARAMETERS IN RELATION TO THE INDUCTION OF PCs IN WILD PLANTS

As discussed in the Introduction, various processes occurring in the soil-root system are considered important for PCs induction, however the role of environmental parameters, possibly affecting metal bioavailability to plants, remains unclear [19,20]. Binding of polyvalent cations to humic substances derived from different environmental compartments has often been reported and the following order of decreasing affinity has been proposed:  $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Co(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Cr(III)} \gg (\text{Mn(II)}, \text{Mo(VI)}, \text{Zn(II)})$  [49-51].

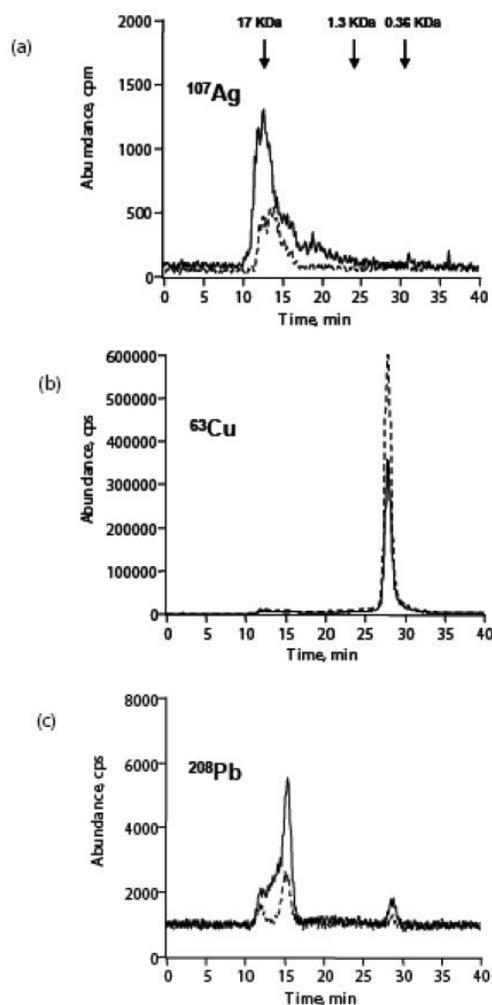


Figure 2. SEC – ICP-MS chromatograms of the (---) nopal stem extract; (—) nopal root extract: (a)  $^{107}\text{Ag}$ ; (b)  $^{63}\text{Cu}$ ; (c)  $^{208}\text{Pb}$ .

Several authors observed that humus matter is capable to reduce the bioavailability of certain metals in soils [25,30,52,53]. Based on the above reports, the focus of this work was to evaluate possible relationship between soil humic substances (HS) and PCs.

The HS were assayed in fresh soil samples taken at the roots of nopal and castor bean (two plant synthesizing PCs) and the results obtained are summarized in Table 3. As can be observed, the HS levels were significantly lower in the samples collected at cactus roots, which is in agreement with literature data [54,55]. Consequently, possible relationship between soil HS and PCs production was studied in castor bean plant.

**Table 3. The concentrations of soil humic substances found at the roots of two plants in different sampling sites**

Sampling site	Soil humic substances, mg g <sup>-1</sup> (fresh soil)	
	Nopal	Castor bean
1	75 ± 13	481 ± 38
2	453 ± 19	415 ± 42
3	175 ± 23	1345 ± 100
4	43 ± 8	553 ± 47
Merida	10 ± 6	-

The statistical analysis of correlation was performed, using all data obtained for Ag, Cd, Cu, Pb in soils and in plant roots, PC-2 in plant extracts and HS in soils. For Cd and Ag, the statistically important positive correlation between metal concentration in soils and in plants was observed ( $r = 0.8092$ ,  $p = 0.051$ ;  $r = 0.9261$ ,  $p = 0.009$ ), while for lead and copper this relation presented low statistical significance ( $r = 0.5232$ ,  $p = 0.287$  and  $r = 0.5849$ ,  $p = 0.223$  respectively). Strong positive correlation can also be observed between cadmium and lead levels in plant ( $r = 0.9664$ ,  $p = 0.002$ ). On the other hand, the inverse correlation of metal in plants and soil humic substances was found. The statistical significance of such relation decreased in the following order: Cu > Pb > Cd > Ag ( $r = -0.7457$ ,  $p = 0.089$ ;  $r = -0.6558$ ,  $p = 0.157$ ;  $r = -0.5280$ ,  $p = 0.282$ ;  $r = -0.2084$ ,  $p = 0.692$ , respectively). It should be stressed that the decreasing order of the statistical significance observed in this work is in agreement with the order of heavy metals affinity to humic substances, cited above [49-51]. In the view of our results, the binding of metals to soil humic substances contributes in lowering their uptake by *R. communis*. Apparently, the metals presenting strong affinity to HS have lower bioavailability to this plant. Indeed, there was no important relationship between soil and plant levels for Cu and Pb, but statistically important correlation between these parameters was found for other two elements, presenting lower affinity to HS (Ag and Cd).

On the other hand, the inverse correlation between soil HS and plant PC-2 was found ( $r = -0.7825$ ,  $p = 0.066$ ). Among four metals studied, cadmium levels in soil and in plant presented strong positive correlation with PC-2 ( $r = 0.7857$ ,  $p = 0.064$ ;  $r = 0.9395$ ,  $p = 0.005$ , respectively). For lead, the correlation was significant only between PC-2 and metal in plants ( $r = 0.9573$ ,  $p = 0.003$ ) and other two metals (Cu, Ag) did not correlate with PC-2 in plants. These results suggest that both, cadmium and lead promote phytochelatin induction in *R. communis*. The lack of correlation between soil Pb and plant PC-2 ( $r = 0.4261$ ,  $p = 0.400$ ) suggest that soil humic substances contribute in lowering the metal uptake by *R. communis*.

To examine the association of metals with soil humic substances, these compounds were extracted from soil with 0.1 M sodium pyrophosphate and analyzed by SEC – ICP-MS as described elsewhere [46]. As an example, two chromatograms are presented in [Figure 3](#) that were obtained in the analysis of soil from site 5 and 6 (HS concentrations 553 mg g<sup>-1</sup> and 143 mg g<sup>-1</sup> respectively). The relative distribution of metals in molecular mass fraction corresponding to HS was estimated at each sampling site, by calculating the fraction of metal co-eluted with HS in size exclusion chromatography (peak area between 10 and 18 min of chromatogram with respect to total area of ICP-MS chromatogram) and the results obtained are presented in [Table 4](#).

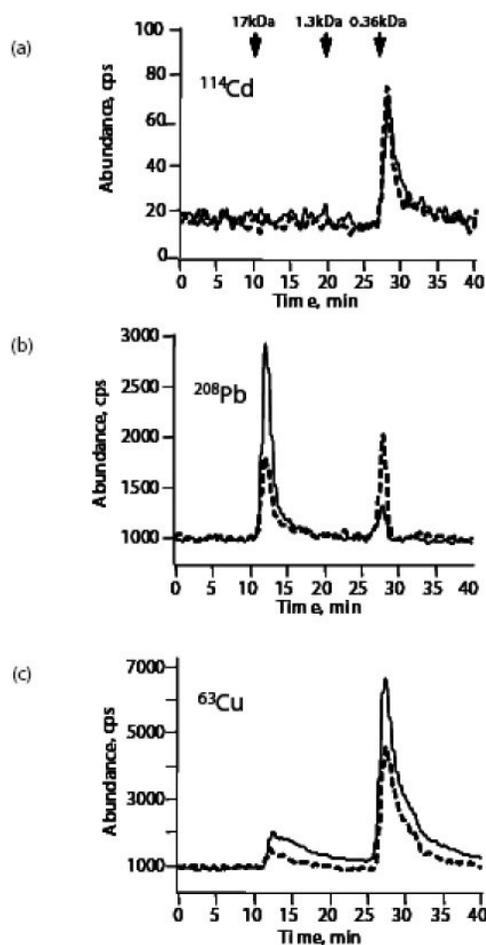


Figure 3. SEC – ICP-MS chromatograms of the soil extracts from site 5 (—) and site 6 (----): (a)  $^{114}\text{Cd}$ ; (b)  $^{208}\text{Pb}$ ; (c)  $^{63}\text{Cu}$ .

It can be observed that, independently of the HS level, cadmium co-eluted with low molecular mass fraction, so this metal apparently is not bound to HS (Figure 3a, Table 4). For copper and lead, their elution occurred in different molecular mass fractions of the soil extracts (Figure 3b, 3c). As shown in Table 4, higher relative contributions of lead with respect to copper were always observed in the elution region of high molecular mass. Furthermore, the relative distribution of lead was clearly affected by the concentration of HS (Figure 3b). In particular, for higher HS concentrations in soil extract, relatively lower contributions of metal in low molecular mass fractions was observed. These results provide further evidence that the soil humic substances contribute in lower bioavailability of Pb and Cu, that present high affinity to HS.

**Table 4. Humic substances in soils and a fraction of metal co-eluted with HS in size exclusion chromatography (based on the peak area measurement vs total area of chromatogram).**

Sampling site	HS, mg g <sup>-1</sup>	Metal association with soil HS <sup>(a)</sup>		
		Cd	Cu	Pb
1	481	0	1.4	14
2	415	0	15	100
3	1345	0	24	72
4	372	0	7.4	59
5	553	0	17	94
6	143	0	32	27

<sup>(a)</sup> - % of metal in soil extract, which co-eluted with HS in size exclusion chromatography.

Since soils adjacent to the nopal roots contained low concentrations of humic substances, it cannot be expected that this parameter would affect metal uptake by plant. To get more information on the bioavailable metal forms, sequential extraction of soils from sites 1 – 6 was performed and the four metals of interest were determined in each fraction. The simplified Tessier method enables to extract the following fractions: F1 – exchangeable; F2 - fraction bound to carbonates; F3 - associated with oxides of iron and manganese; F4 - organic matter and sulfides and F5 – residual. The results obtained showed that the major fractions of Pb and Cu were bound to F4 at any sampling site (62.9 % - 86.3 % of total soil Pb and 60.4 % - 65.1 % of total soil Cu respectively) Significantly lower levels of these two metals were found in carbonate fractions (F2: less than 10 % of total Pb and less than 10 % of Cu in soil) and only minute amounts corresponded to “free” Pb or Cu (F1). For Ag, practically all the metal was bound to the organic matter and sulfides (F4, more than 95 % of total soil Ag). As already mentioned, the Cd soil levels were lower as compared to other metals, however, relatively uniform metal distribution among F1 – F5 fractions was observed. At sites 1 and 4, the relative distribution of “free” Cd was 36 % and 32 % respectively.

In search of any relationship between Pb, Cu and Ag levels in soil fractions F1 – F5 and root/leave concentrations of these metals, the statistical correlation analysis was carried out taking analytical data obtained at six sampling sites (Cd was excluded, because of its low concentrations in soil and in plant tissues). No statistically important correlation was found between metal levels in soil versus leaves. The correlation parameters obtained for roots and soil data are presented in Table 5. At first, for Pb and Cu, total (acid-digested) metal in soil did not correlate strongly with its concentration in plant ( $r = 0.7321$ ,  $p = 0.176$  and  $r = 0.8169$ ,  $p = 0.091$ , respectively). Furthermore, no statistically important correlation was found between any metal in the fractions F1 (exchangeable), F2 (carbonates), F3 (manganese and iron oxides) or F5 (residual) and root metal, indicating that these fractions were not important for the uptake of Cu, Pb and Ag by nopal. On the other hand, statistically significant correlations found between metal in F4 and root metals ( $r = 0.8436$ ,  $p = 0.072$  for Pb;  $r = 0.8648$ ,  $p = 0.058$  for Cu;  $r = 0.8842$ ,  $p = 0.046$  for Ag, Table 5) suggest that organic matter and sulfide bound metals (fraction F4) should be bioavailable to nopal. The results obtained in spectrophotometric assay revealed low levels of humic substances (primary soil organic matter) in soils adjacent to the roots of nopal (Table 3). On the other hand, sulfide minerals are abundant in Guanajuato region [56].

**Table 5. Statistical analysis of correlation between total metal concentrations in soil and soil fractions F1 – F5 and their levels found in nopal roots**

metal in soil vs metal in roots	Pb	Cu	Ag
soil vs. root	0.7321	r = 0.8169	r = 0.9368
	0.176	p = 0.091	p = 0.019
F1 vs. root	nf	nf	nf
F2 vs. root	nf	nf	nf
F3 vs. root	nf	nf	nf
F4 vs. root	r = 0.8436	r = 0.8648	r = 0.8842
	p = 0.072	p = 0.058	p = 0.046
F4 vs. root	nf	nf	nf

nf – no statistically important correlation was found.

Our results suggest that sulfides are primary Pb, Cu and Cd forms in soil close to the cactus roots (at least 20 cm from the roots). The solubility of these compounds is generally poor, so the rhizosphere processes and, in particular root exudation of low-molecular weight carboxylic acids should be important in mobilizing sulphide bound metals [57,58]. However, the literature data on these processes in nopal or other cactaceous is scarce. Puente et al.[59] proposed the contribution of bacteria and fungi in the rhizoplane of nopal roots (the area at the plant and soil interface) as a factor increasing metal bioavailability.

## CONCLUSION

The results obtained in this study enable to answer the interrogations set up at the beginning. In particular it can be concluded that the wild plants, chronically exposed to low/moderate metal levels in soil biosynthesize phytochelatin. In the analysis of three different plants collected simultaneously at these same sites, PCs were found in nopal and in castor bean, but not in Mexican sunflower, which seems to confirm that phytochelatin induction is genotype dependent. Furthermore, lead and cadmium were found to be important for PCs induction in nopal. It is proposed that the uptake of these metals could be controlled by rizosphere processes. In the case of castor bean, the metals promoting PCs induction in plant were also cadmium and lead, however, their uptake is apparently controlled by the association of metals with soil HS.

In general, the results obtained provide evidence that PCs induction in plants growing in natural environments depends on: (i) total element concentrations in soil; (ii) actual physicochemical forms of elements in soil; (iii) organic matter content in soil and (iv) different processes occurring in rizosphere.

## REFERENCES

- [1] Zenk, M.H. Gene 1996, 179, 21-30.
- [2] Hirata, K.; Tsuji, N.; Miyamoto, K. J Biosci Bioeng 2005, 100, 593–599.

- [3] Persson, D.P.; Hansen, T.H.; Holm, P.E.; Schjoerring, J.K.; Hansen, H.C.B.; Nielsen, J.; Cakmak, I.; Husted, S. *J. Anal. At Spectrom.* 2006, 21, 996-1005.
- [4] Clemens, S. *Planta* 2001, 212, 475-486.
- [5] Thumann, J.; Grill, E.; Winnacker, E.L.; Zenk, M.H. *FEBS Lett* 1991, 284, 66-91.
- [6] Takagi, M.; Satofuka, H.; Amano, S.; Mizuno, H.; Eguchi, Y.; Hirata, K.; Miyamoto, K.; Fukui, K.; Imanaka, T. *J Biochem (Tokyo)* 2002, 131, 233-239.
- [7] Yen, T.Y.; Villa, J.A.; DeWitt, J.G. *J. Mass Spectrom.* 1999, 34, 930-941.
- [8] Le Faucheur, S.; Behra, R.; Sigg, L. *Environ.Toxicol. Chem.* 2005, 24, 1731-1737.
- [9] Grill, E.; Winnacker, E.L.; Zenk, M.H. *Science* 1985, 230, 674-676.
- [10] Scarano, G.; Morelli, E. *Biometals* 2002, 15, 145-151.
- [11] Spain, S.M.; Rabenstein, D.L. *Anal. Chem.* 2003, 75, 3712-3719.
- [12] Cobbett, C.S. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000, 3, 211-216.
- [13] Clemens, S. *J. Plant. Physiol.* 2006, 163, 319-332.
- [14] Mejare, M.; Bülow, L. *Trends Biotechnol* 2001, 19, 67-73.
- [15] Meagher, R.B. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000, 3, 153-162.
- [16] Bovet, L.; Feller, U.; Martinoia, E. *Environ. Int.* 2005, 31, 263-267.
- [17] Yang, X.; Feng, Y.; He, Z.; Stoffella, P.J. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2005, 18, 339-353.
- [18] Clemens, S. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 2001, 14, 235-239.
- [19] Koster, M.; Reijnders, L.; van Oost, N.R.; Peijnenburg, W.J. *Environ. Pollut.* 2005, 133, 103-116.
- [20] Lucho Constantino, C.A.; Prieto García, F.; del Razo, L.M.; Rodriguez Vazquez, R.; Poggi Valardo, H.M. *Agric. Ecosys. Environ.* 2005, 108, 57-71.
- [21] Piechalak, A.; Tomaszewska, B.; Baralkiewicz, D. *Phytochemistry* 2003, 64, 1239-1251.
- [22] Sun, Q.; Wang, X.R.; Ding, S.M.; Yuan, X.F. *Chemosphere* 2005, 60, 22-31.
- [23] Meers, E.; Ruttens, A.; Hopgood, M.J.; Samson, D.; Tack, F.M. *Chemosphere* 2005, 58, 1011-1022.
- [24] Turgut, C.; Katie Pepe, M.; Cutright, T.J. *Environ. Pollut.* 2004, 131, 147-154.
- [25] Lorenzo, J.I.; Beiras, R.; Mubiana, V.K.; Blust, R. *Environ. Toxicol. Chem.* 2005, 24, 973-980.
- [26] Voets, J.; Bervoets, L.; Blust, R. *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 1003-1008.
- [27] Garcia-Mina, J.M.; Antolin, M.C.; Sanchez-Diaz, M. *Plant. and Soil.* 2004, 258, 57-68.
- [28] Misra, V.; Pandey, S.D. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2005, 74, 725-731.
- [29] Inaba, S.; Takenaka, C. *Environ. Int.* 2005, 31, 603-608.
- [30] Kungolos, A.; Samaras, P.; Tsiridis, V.; Petala, M.; Sakellaropoulos, G. *J. Environ. Sci. Health A Tox Hazard Subst Environ. Eng.* 2006, 41, 1509-1517.
- [31] Garcia-Meza, V.; Ramos, E.; Carrillo-Chavez, A.; Duran-de-Bazua, C. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2004, 72, 170-177.
- [32] Morton-Bermea, O.; Carrillo-Chavez, A.; Hernandez, E.; Gonzalez-Partida, E. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2004, 73, 770-776.
- [33] Morelli, E.; Scarano, G. *Mar. Environ. Res.* 2001, 52, 383-395.
- [34] Keltjens, W.G.; Van Beusichem, M.L. *Plant and Soil* 1998, 203, 119-126.
- [35] Maitani, T.; Kubota, H.; Sato, K.; Yamada, T. *Plant Physiol.* 1996, 110, 1145-1150.
- [36] Landero Figueroa, J.A.; Wrobel, K.; Afton, S.; Caruso, J. A.; Gutierrez Corona, J.F.; Wrobel, K. *Chemosphere* 2008, 70, 2084-2091.