

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO

POSGRADO EN QUÍMICA

***“APLICACIONES DE SOPORTES DE CROMATOGRAFÍA DE  
AFINIDAD EN METALÓMICA”***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

MANUEL MÉNDEZ GARCÍA

GUANAJUATO, GTO JULIO, 2014

REALIZADA POR:  
**MANUEL MÉNDEZ GARCÍA**

DIRIGIDA POR:  
Director: **Dra. Katarzyna Dorota Wrobel**  
Co-Director: **Dr. Kazimierz Wrobel**

S I N O D A L E S

---

Dra. Minerva Martínez Alfaro  
Presidente

---

Dra. Eunice Yáñez Barrientos  
Secretario

---

Dr. Rogelio Costilla Salazar  
Vocal

---

Dra. Alma Hortensia Serafín Muñoz  
Suplente

Guanajuato, Gto. Julio de 2014

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado “**Aplicaciones de soportes de cromatografía de afinidad en metalómica**”, realizado por el Q. Manuel Méndez García, para obtener el título de **MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (M.C)**, en las Instalaciones del Campus Guanajuato en el Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Director:

---

**Dra. Katarzyna Dorota Wrobel**

Co-Director:

---

**Dr. Kazimierz Wrobel**

## Índice General

ÍNDICE DE SIGLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
RESUMEN.....	xii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
I.1. Metales/metaloideos en el medio ambiente.....	2
I.2. Metalómica.....	7
1.3. Análisis dirigido al efecto (EDA).....	8
1.4. IMAC .....	8
I.4.1. Interacción GSH-metales pesados.....	9
I.4.2. Revisión bibliográfica enfocada en la inmovilización de GSH en soportes cromatográficos.....	12
I.5. JUSTIFICACIÓN.....	19
II. OBJETIVOS .....	20
II.1. Objetivo general .....	20
II.2. Objetivos particulares .....	20
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
III.1. Material y reactivos.....	21
III.2. Instrumentación analítica y equipos .....	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
IV.1. Activación de soportes de cromatografía de afinidad .....	23
IV.2. Inmovilización de GSH en soportes activados .....	24
IV.3. Caracterización de soportes de cromatografía de afinidad activados y modificados con GSH .....	26
IV.3.1. Caracterización de soportes de cromatografía de afinidad activados con CNBr y modificados con GSH .....	28
IV.3.2 Caracterización de perlas de sílice activadas con NaOH/Ca(II) y modificadas con GSH .....	30
IV.4. Ensayos espectrofotométricos utilizados en la determinación de iones metálicos.....	32
IV.4.1 Determinación de iones metálicos con geles de Sepharose 6B activados con BrCN y modificados con GSH y de su concentración residual en la solución .....	35

IV.4.2 Determinación de iones metálicos retenidos en perlas de sílice, de 0.55 mm de diámetro, activadas con NaOH y modificadas con GSH y de su concentración residual en la solución .....	36
IV.4.3 Determinación de iones metálicos retenidos en perlas de sílice, de 75 µm de diámetro, activadas con NaOH y modificadas con GSH y de su concentración residual en la solución..	38
IV.4.4 Determinación de iones metálicos retenidos en perlas de sílice, de 75 µm de diámetro, activadas con Ca(II)/NaOH y modificadas con GSH y de su concentración residual en la solución .....	39
IV.4.5 Análisis comparativo de los resultados de ensayos para soluciones de iones individuales .....	41
IV.5. Pruebas de re-uso de perlas de sílice modificadas con GSH. ....	42
IV.6. Efecto de ácidos húmicos en la sorción de iones metálicos en los soportes modificados con GSH.....	43
IV.7. Procedimiento de determinación de metales por MP-AES para su uso en evaluación de la captación de iones metálicos a partir de soluciones de sus mezclas .....	45
IV.7.1 Estudio de la captación de iones metálicos a partir de su mezcla en régimen estacionario .....	47
IV.7.2 Estudio de la captación de iones metálicos a partir de su mezcla en régimen hidrodinámico, utilizando soportes modificados y sin modificar .....	48
IV.7.3 Efecto de ácidos húmicos en la captación efectiva de iones metálicos a partir de su mezcla utilizando soportes sin modificación y los modificados con GSH.....	50
V. CONCLUSIONES .....	53
VI. REFERENCIAS .....	54

## ÍNDICE DE SIGLAS

<b>Símbolo</b>	<b>Unidad/Significado</b>
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades.
CRETIB	Corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable y biológico infeccioso.
BrCN	Bromociano.
CMC	Concentración micelar crítica.
Cys	Cisteína.
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.
DPC	1,5-difenilcarbazida.
<sup>1</sup> D	Primera derivada de absorbancia.
EDA	Análisis dirigido al efecto.
ESI-MS	Espectrometría de Masas con Ionización por Electronebulización.
EPA	Agencia de Protección al Ambiente.
GSH	Glutación, $\gamma$ -Glu-Cys-Gly, $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina.
GSSG	Glutación en forma de disulfuro.
Glu	Glutamato.
Gly	Glicina.
Hcy	Homocisteína.
H <sub>2</sub> Dz	Ditizona, difeniltiocarbazona o 3-mercapto-1,5-difenilfomazan.
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer.
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Ionización en Plasma Acoplado Inductivamente.
IDA	Ácido iminodiacético.
IMAC	Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
INSHT	Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
LC	Límite de cuantificación.
LD	Límite de detección.
MeCN	Acetonitrilo.
MNMC	Meta del nivel máximo del contaminante.
NMC	Nivel máximo del contaminante.
MP-AES	Espectrometría de Emisión Atómica con Ionización con Plasma de Microondas
NPM	Nanopartículas metálicas.
NPAu	Nanopartículas de oro.

NPAg	Nanopartículas de plata.
NPMag	Nanopartículas magnéticas.
NTA	Ácido nitrilotriacético.
NTB <sup>2-</sup>	Ánión 2-nitro-5-benzoato.
OSHA	Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo.
PD	Promedio diario.
PDDA	Cloruro de poli-dialildimetilamonio.
PM	Promedio mensual.
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
SOD	Enzima Cu-Zn-superóxido dismutasa.
v/v	Relación: volumen Sóluto / volumen Disolvente.
WFD	Directiva Marco del Agua de la Unión Europea.
WHO	Organización Mundial de la Salud.

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Interacción de grupos sulfhídrido (-SH) de una enzima con iones metálicos como el Zn(II).....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura del glutatión reducido (GSH, $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) y sus principales unidades constituyentes.....	10
<b>Figura 3.</b> Estructura de agarosa (1,3-D-galactopiranos- $\beta$ -1-4,3,6-anhidro-L-galactosa).....	13
<b>Figura 4.</b> Estructura de las perlas de vidrio, mostrando grupos silanol libres presentes en la superficie (Si-OH).....	15
<b>Figura 5.</b> Método de activación de soportes sólidos, que contienen grupos -OH superficiales, con bromociano (BrCN) y su acoplamiento con aminas primarias, alifáticas o aromáticas.....	16
<b>Figura 6.</b> Método de activación de soportes de cromatografía con Bromociano (BrCN).....	23
<b>Figura 7.</b> Activación de perlas de sílice, propuesta, mediante NaOH.....	24
<b>Figura 8.</b> Activación de perlas de sílice, propuesta, con Ca(II) y NaOH.....	24
<b>Figura 9.</b> Modificación con GSH de los soportes activados mediante BrCN.....	25
<b>Figura 10.</b> Modificación con GSH de las perlas de sílice activadas con NaOH y Ca(II)/NaOH.....	26
<b>Figura 11.</b> Reacción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DNTB) con el GSH, hasta formar el anión 2-nitro-5-benzoato (NTB <sup>2-</sup> ).....	26
<b>Figura 12.</b> Espectro UV-Vis del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DNTB), con (---) y sin (—) GSH 0.05 mM, pH 8.2.....	27
<b>Figura 13.</b> Espectros UV-Vis y curva de calibración de la reacción de DTNB con GSH (0,014 mM – 0,120 mM), pH 8,2.....	27
<b>Figura 14.</b> Primera derivada de espectros UV-Vis y curva de calibración para la determinación de GSH (0,0143 mM – 0,120 mM), pH 8,2.....	28
<b>Figura 15.</b> Fotografías del ensayo DNTB para la determinación de GSH inmovilizado en geles de Sepharose 6B .....	29
<b>Figura 16.</b> Estudio espectrofotométrico de la reacción del GSH, captado por las perlas de sílice 75 $\mu$ m de diámetro, con DTNB, en función del tiempo de interacción y activadas mediante NaOH con y sin incubación de Ca(II).....	31
<b>Figura 17.</b> A) Ditionato metálico (M = Hg(II), Zn(II) y Cd(II)), B) Estructura del Tritón X-100.....	33
<b>Figura 18.</b> Espectros UV-Vis de diferentes iones metálicos con 1,5 difenilcarbazida (DPC), para Cr(VI) 4.5 mg/L, y ditizona (H <sub>2</sub> Dz) para Zn(II) 10 mg/L, Hg(II) 10 mg/L, Pb(II) 8mg/L y Cd(II) 8 mg/L. (—) DPC, H <sub>2</sub> Dz; (----) DPC + Cr(VI), H <sub>2</sub> Dz + Zn(II), Hg(II), Pb(II), Cd(II).....	34
<b>Figura 19.</b> Gráfica de los cambios de porcentaje de captación de iones metálicos con el tiempo de contacto (5, 10, 15 y 20 minutos) con geles de Sepharose 6B activados con BrCN y modificados mediante la unión con GSH.....	36
<b>Figura 20.</b> Gráfica de los cambios de porcentaje de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto (5, 10, 15 y 20 minutos) con perlas de sílice de 0.55 mm, activadas con NaOH y modificados mediante la interacción con GSH.....	38



<b>Figura 21.</b> Gráfica de los porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto (5, 10, 15 y 20 minutos) con perlas de sílice de 75 µm, activadas con NaOH y modificados mediante la interacción con GSH.....	<b>39</b>
<b>Figura 22.</b> Gráfica de los cambios de porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto (5, 10, 15 y 20 minutos) con perlas de sílice de 75 µm, activadas con CaSO <sub>4</sub> /NaOH y modificados mediante la interacción con GSH.....	<b>41</b>
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de captación de los iones metálicos en perlas de sílice activadas con NaOH, en sucesivos ciclos de modificación con GSH.....	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Niveles máximos permitidos de contaminantes inorgánicos en el agua, establecidos por la EPA.....	<b>4</b>
<b>Tabla 2.</b> Límites máximos permisibles en concentración de metales para descarga a cuerpos receptores de agua. NOM-001-SEMARNAT-1996.....	<b>5</b>
<b>Tabla 3</b> límites máximos permisibles de metales y contaminantes en descargas a sistemas de alcantarillado municipal de acuerdo a la NOM-002-SEMARNAT-1996.	<b>6</b>
<b>Tabla 4.</b> Constantes de estabilidad aparente para uniones de Hg(II), Cd(II), Pb(II) con diferentes grupos nucleofílicos presentes en biomoléculas .....	<b>10</b>
<b>Tabla 5.</b> Parámetros analíticos de UV-Vis y UV-Vis <sup>1</sup> Dnm para la reacción entre DTNB con GSH.....	<b>28</b>
<b>Tabla 6.</b> Valores de la señal analítica y concentración de grupo tiol por gramo de geles sepharose 6B, activados por BrCN y modificados con GSH, (seis réplicas independientes).....	<b>29</b>
<b>Tabla 7.</b> Valores de la señal analítica ( <sup>1</sup> D) y concentraciones del GSH inmovilizado en perlas de sílice, activadas por BrCN obtenidos en el ensayo espectrofotométrico con DTNB (dos réplicas independientes).....	<b>30</b>
<b>Tabla 8.</b> Cantidad de µmol de grupos -SH por un gramo de perlas de vidrio de 0.55 mm de diámetro.....	<b>30</b>
<b>Tabla 9.</b> Concentración en µmol de grupos -SH por gramo de perlas de sílice, de 75 µm de diámetro, activadas mediante NaOH sin y con incubación de Ca(II).....	<b>32</b>
<b>Tabla 10.</b> Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración para la determinación de iones metálicos por ensayos espectrofotométricos UV-Vis con 1,5-difenilcarbazida y ditizona.....	<b>35</b>
<b>Tabla 11.</b> Porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto con geles de Sepharose 6B activados con BrCN y modificados mediante la unión con GSH , cantidad de ion metálico captado, así como su porcentaje de recuperación y su grado de saturación.....	<b>36</b>
<b>Tabla 12.</b> Porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto con perlas de sílice, de 0.55 mm, activadas con NaOH y modificadas mediante la interacción con GSH y cantidad de ion metálico captado, así como su porcentaje de recuperación y su grado de saturación.....	<b>37</b>
<b>Tabla 13.</b> Porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto con perlas de sílice, de 75 µm, activadas con NaOH y modificadas mediante la interacción con GSH y cantidad de ion metálico captado, así como su porcentaje de recuperación y su grado de saturación.....	<b>39</b>

<b>Tabla 14.</b> Cambios de porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto con perlas de sílice, de 75 $\mu\text{m}$ , activadas con $\text{Ca(II)/NaOH}$ y modificadas mediante la interacción con GSH y cantidad de ion metálico captado, así como su porcentaje de recuperación y su grado de saturación.....	40
<b>Tabla 15.</b> Resumen de los resultados obtenidos en ensayos de captación de iones metálicos con soportes modificados y relación molar entre ión retenido y grupos -SH disponibles en 0.5 g .....	42
<b>Tabla 16.</b> Evaluación comparativa de porcentajes de captación de iones metálicos en soportes modificados en ausencia y en presencia de ácidos húmicos de ácidos húmicos.....	45
<b>Tabla 17</b> Condiciones de operación utilizados para el equipo Agilent 4100 MP-AES .....	45
<b>Tabla 18.</b> Parámetros usados en la adquisición de señales y concentraciones para el proceso de calibración para cada uno de los elementos en el análisis por MP-AES .....	46
<b>Tabla 19.</b> Parámetros analíticos de diferentes elementos obtenidos por la técnica MP-AES .....	46
<b>Tabla 20.</b> Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en soportes no modificados en régimen estacionario. (GESM: gel sepharose; p55ESM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75ESM: perlas de vidrio 75 $\mu\text{m}$ diámetro). Se presentan valores promedios (P) como $\mu\text{g}$ de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de desviación estándar (DE) obtenidos con base en dos réplicas independientes.....	48
<b>Tabla 21.</b> Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en soportes modificados con GSH en régimen estacionario. (GER: gel sepharose; p55ER: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75ER: perlas de vidrio 75 $\mu\text{m}$ diámetro). Se presentan valores promedios (P) como $\mu\text{g}$ de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de DE obtenidos con base en dos réplicas del experimento.....	49
<b>Tabla 22.</b> Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en soportes no modificados, en régimen hidrodinámico (GHSM: gel sepharose; p55HSM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75HSM: perlas de vidrio 75 $\mu\text{m}$ diámetro). Se presentan valores promedios (P) como $\mu\text{g}$ de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de DE, obtenidos con base en dos réplicas del experimento.....	49
<b>Tabla 23.</b> Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en soportes modificados con GSH en régimen hidrodinámico (GHR: gel sepharose; p55HR: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75HR: perlas de vidrio 75 $\mu\text{m}$ diámetro). Se presentan valores promedios (P) como $\mu\text{g}$ de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de DE, obtenidos con base en dos réplicas del experimento.....	50
<b>Tabla 24.</b> Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en presencia de ácidos húmicos, soportes cromatográficos sin modificar con agitación. (GAcSM: gel sepharose; p55AcSM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75AcSM: perlas de vidrio 75 $\mu\text{m}$ diámetro). Se presentan valores promedios (P) como $\mu\text{g}$ de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de DE, obtenidos con base en dos réplicas del	

experimento.....	51
<b>Tabla 25.</b> Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en presencia de ácidos húmicos, soportes cromatográficos modificados con agitación. (GAcM: gel sepharose; p55AcM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75AcM: perlas de vidrio 75 $\mu$ m diámetro). Se presentan valores promedios (P) como $\mu$ g de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de DE, obtenidos con base en dos réplicas del experimento.....	52
<b>Tabla 26.</b> Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en presencia y ausencia de ácidos húmicos, soportes cromatográficos modificados con agitación. (GAcM: gel sepharose; p55AcM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75AcM: perlas de vidrio 75 $\mu$ m diámetro). Se presentan valores promedios ( $\mu$ g de metal retenido por 1 g de soporte) con base en dos réplicas.....	53

## RESUMEN

Los metales y metaloides se encuentran en la naturaleza en diferentes estados de oxidación, como compuestos inorgánicos, asociados a materia orgánica. Debido a diferentes propiedades fisicoquímicas de estas formas y especies, su determinación tiene relevancia ambiental y biológica. En este sentido, el objetivo de la reciente área de investigación denominada metalómica, es caracterizar de la manera más completa posible la cantidad y el comportamiento de la totalidad de metales/metaloides en un sistema dado. En estos estudios, se enlaza la información sobre distribución y especiación analítica de los elementos con el impacto que ejercen en los organismos vivos, estableciendo de esta manera los mecanismos de acción específica <sup>[1-3]</sup>. En cuanto a las herramientas utilizadas en metalómica, se deben mencionar diferentes tipos de técnicas de separación y técnicas de espectrometría de masas atómica y molecular recurriendo a menudo a las técnicas híbridas con el fin de obtener de manera prácticamente simultánea la cuantificación de los elementos de interés y la caracterización molecular de sus especies o biomoléculas con las que forman diferentes tipos de unión <sup>[4]</sup>.

Hoy en día, la contaminación de sistemas acuáticos con metales/metaloides es un problema ambiental a nivel mundial. Debido a su carácter persistente, la remoción de estos contaminantes de las aguas residuales y también naturales es un tema actual. Con el avance en el conocimiento sobre los riesgos toxicológicos y en el área de metalómica, los organismos gubernamentales en diferentes países establecen cada vez más bajas concentraciones como máximos niveles permisibles; tal es el caso de la Norma Oficial Mexicana para agua de consumo humano (NOM-127-SSA1-1994) que inicialmente consideró 50 µg/L como valor límite para As, posteriormente este valor fue modificado gradualmente hasta llegar a 25 µg/L en el año 2005; mientras que en el proyecto de la nueva NOM (PROY-NOM-SSA1-250-2007) se propone el máximo nivel permisible para As de 10 µg/L. Asimismo, se reconoce la importancia de las formas fisicoquímicas del contaminante elemental, recomendando distinguir entre As inorgánico y orgánico, cromo tri- y hexavalente, mercurio inorgánico y metilmercurio, etc.

En búsqueda de la información sobre el impacto potencial de todos contaminantes presentes en el sistema, se han desarrollado los procedimientos del análisis dirigido al

efecto (EDA, por sus siglas en inglés). Como dice su nombre, en lugar de llevar a cabo el análisis sistemático y cuantitativo de todas especies presentes en el sistema estudiado, el objetivo de EDA es encontrar los contaminantes de mayor toxicidad y evaluar sus efectos en los organismos vivos.

En el presente trabajo de tesis se desarrolló un nuevo procedimiento analítico que permite captar los metales/metaloides presentes en sistemas acuáticos de manera selectiva, aprovechando su afinidad al grupo tiol inmovilizado en un soporte sólido. Puesto que el primer blanco de los llamados elementos tóxicos en los organismos vivos son precisamente los grupos sulfhídrico (en glutatión y en proteínas), el procedimiento propuesto podría ser empleado para elaborar los sensores pasivos de toxicidad “efectiva” de metales/metaloides en un sistema acuático dado. La selección de elementos y especies tóxicas se realizó en función de la problemática medioambiental actual. En una primera etapa del trabajo se activaron soportes de Sepharose 6B, y perlas de sílice (Si-OH) con bromociano (BrCN) para enlazar al glutatión (GSH), así mismo se logró unir el grupo amino (NH<sub>2</sub>) del GSH al hidroxilo superficial ionizado ( $-O^- \leftrightarrow -OH$ ) de las perlas, mediante un tratamiento previo con NaOH. El grupo tiol (-SH) libre del GSH inmovilizado sirvió para captar iones metálicos en medio acuoso de acuerdo a su afinidad a ese grupo. En una segunda etapa se estudió la captación de elementos a partir de su mezcla y en presencia de la matriz orgánica (ácidos húmicos) sobre estos soportes cromatográficos, para examinar la factibilidad de su uso en evaluación de la toxicidad “efectiva” de los metales presentes en ecosistemas acuáticos.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El medioambiente está compuesto por elementos químicos que se encuentran presentes en una gran variedad de formas fisicoquímicas, incluyendo diferentes estados de oxidación, formas orgánicas e inorgánicas, compuestos de diferente masa molecular, etc. En el caso de metales/metaloides, el papel que juegan estos elementos en un sistema determinado depende fuertemente de las propiedades adyacentes a cada una de sus formas y especies, por lo que existe un interés particular en caracterizar cualitativa y cuantitativamente los contenidos totales y también las formas y las especies presentes en diferentes tipos de muestras. Aunado a lo anterior, es de gran importancia el estudio de las posibles interacciones antagónicas y sinérgicas entre los diferentes elementos. Este tipo de estudios se engloba en el concepto de metalómica, definido precisamente como el estudio cualitativo y cuantitativo de la totalidad de las formas y especies de diferentes metales y metaloides en los niveles de organización biológica (célula, tejido, órgano, organismo), incluyendo las posibles interacciones entre ellos <sup>[2]</sup>.

Los estudios enfocados a la toxicidad de metales/metaloides se lleva a cabo utilizando combinaciones de técnicas cromatográficas, electroforéticas, diferentes tipos de espectrometrías, técnicas de electroanálisis u otras <sup>[5]</sup>. La mayoría de los procesos analíticos se basan en la separación cromatográfica acoplada a un detector de alta selectividad y sensibilidad. Aunado a lo anterior la cromatografía de afinidad es una técnica de separación que aprovecha interacciones específicas entre los solutos y la fase estacionaria y por lo tanto, es la única técnica cromatográfica en la que se diseña un soporte cromatográfico para que interactúe con un soluto particular. Por otro lado la cromatografía de afinidad por ion metálico inmovilizado (IMAC, por sus siglas en inglés) es una técnica de separación basada en las interacciones entre moléculas en solución e iones metálicos fijados en un soporte sólido, el cual es usualmente un polímero hidrofílico entrecruzado. En este sentido, el ion metálico fijado en una matriz polimérica, gracias a su afinidad al soluto permite su retención en la columna; cabe notar que el ión metálico, debe estar localizado en las posiciones de la red reticular del polímero que permitan una mayor accesibilidad para asegurar la interacción con el soluto <sup>[6]</sup>.

En el presente trabajo de tesis se propone un nuevo procedimiento que permita la captación selectiva de las formas/especies de algunos metales y metaloides presentes en un sistema acuático, en función de su toxicidad potencial para los organismos vivos. Puesto

que el grupo sulfhidrilo es el primer blanco de los llamados “metales pesados” en el ambiente celular, la idea original consiste en modificar la superficie de un soporte cromatográfico mediante la inmovilización del glutatión obteniéndose de esta manera el grupo sulfhidrilo disponible para metales/metaloideos presentes en el ambiente. Al poner en contacto el soporte modificado con la muestra de agua, se espera que la selectividad de sorción dependa de la afinidad de cada una de las formas/especies al grupo sulfhidrilo. El análisis comparativo del perfil de elementos enlazados al grupo tiol y del perfil de concentraciones totales determinado directamente en las muestras de agua permitirá estimar la “toxicidad efectiva” relacionada con la presencia de estos elementos en este sistema sin necesidad de llevar a cabo el análisis de especiación química de cada uno de ellos. La selección de elementos se realizó en función de la problemática medioambiental actual. En cuanto a los soportes cromatográficos, se seleccionaron la Sepharose 6B y perlas de sílice (Si-OH) y se propuso su modificación mediante la activación con bromociano (BrCN) seguida por la inmovilización de glutatión, del cual se utilizó su grupo tiol (-SH) libre que sirvió como blanco para formas de metales en medio acuoso.

### **I.1. Metales/metaloideos en el medio ambiente**

Los elementos pueden clasificarse de una forma general como metales, no metales y metaloides, sus propiedades son básicamente consecuencia del número de electrones de valencia y su electronegatividad, las cuales confieren características diferentes. Asimismo la variedad de formas fisicoquímicas, en las que se presentan los metales/metaloideos en el medioambiente incluye sus diferentes estados de oxidación, compuestos orgánicos e inorgánicos, especies de baja, mediana y alta masa molecular, aquellas donde el elemento está unido mediante un enlace iónico o covalente y otras donde la unión es menos fuerte, etc. La determinación de estas formas y especies tiene relevancia ambiental y biológica debido a que el comportamiento de un elemento depende fuertemente de su distribución relativa entre las formas fisicoquímicas y de las propiedades adyacentes a cada una de ellas [2].

Por otra parte, se consideran metales pesados a cualquier elemento químico que tenga una densidad relativamente alta (mayor de  $5 \text{ mg/cm}^3$ ) y el número atómico mayor de 20; algunos de los metales pesados son tóxicos para organismos vivos incluso en muy bajas concentraciones. Tradicionalmente, en el grupo de “metales pesados” se incluyen también algunos metaloides tales como As y Se que cumplen con el criterio de masa atómica (masa

nominal 75 g/mol y 79 g/mol, respectivamente) y cuya densidad es cercana a 5 g/cm<sup>3</sup> (4.7 g/cm<sup>3</sup>).

Algunos ejemplos de “metales pesados” clasificados como potencialmente tóxicos incluyen el mercurio, cadmio, arsénico, cromo, talio y plomo. Los metales pesados tienen carácter persistente, y pueden ser acumulados en diversos organismos que forman parte de la cadena alimenticia del hombre. Asimismo, en cantidades muy pequeñas se incorporan a nuestros cuerpos mediante agua potable y el aire principalmente <sup>[7]</sup>, aunque también se considera la exposición por ingesta de la resuspensión de material particulado del suelo y como se mencionó anteriormente alimento. Recientemente, la contaminación de sistemas acuáticos por metales pesados tóxicos provenientes de las industrias y la agricultura se ha convertido en uno de los más graves problemas ambientales y públicos <sup>[8]</sup>. Aunque muchos de los metales pesados son necesarios como micronutrientes para los seres humanos, animales y plantas, cantidades en exceso de estos metales pueden producir una variedad de efectos tóxicos en diferentes formas de vida. Por ejemplo, la toxicidad de cobre se asocia con el aumento de estrés oxidativo; mercurio provoca trastornos neuroconductuales, trastornos de hiperactividad por déficit de atención y disminución de coeficiente intelectual; cadmio inactiva la defensa antioxidante, es nefrotóxico, provoca daños en sistema óseo <sup>[9]</sup> y es considerado carcinógeno por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés). Muchos de los metales pesados son clasificados como agentes mutagénicos y cancerígenos en diferentes tipos de organismos, por lo tanto es necesario el control de las concentraciones de metales pesados en sistemas acuáticos.

Las agencias regulatorias en décadas recientes han prestado cada vez más atención a la evaluación de compuestos contaminantes del ambiente, particularmente en los ecosistemas acuáticos. Por lo cual, la Directiva del Marco del Agua de la Unión Europea (WFD, por sus siglas en inglés) se convirtió en parte de la legislación en el Reino Unido en diciembre de 2003 con el objetivo de proveer una planificación y prestación de una mejor calidad de las aguas superficiales, aguas subterráneas y aguas costeras <sup>[10]</sup>. En particular, la WFD ayudará a hacer frente a la contaminación difusa que sigue siendo un problema ambiental grave <sup>[11]</sup>. Por otra parte, la Directiva sobre el Marco de la Estrategia Marina entró en vigor en Junio de 2008, y sus principales objetivos son similares, es decir proteger y mejorar el estado actual de las aguas marinas para el año 2020 <sup>[12]</sup>. Asimismo, la mayoría de las estrategias utilizadas actualmente para evaluación de “calidad” de agua se basa en la



determinación de 33 productos químicos prioritarios y otros ocho contaminantes. Se trata principalmente de compuestos orgánicos junto con metales como cadmio, plomo, mercurio y níquel. Las concentraciones medidas se comparan con los estándares de calidad ambientales establecidos por la Comisión Europea del Ambiente para cada uno de estos contaminantes <sup>[13]</sup>.

Por otra parte existen organismos normativos que regulan el nivel de los contaminantes que afectan al ambiente, por ejemplo la Agencia de Protección Medioambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos ha establecido estándares para niveles máximos permitidos de contaminantes inorgánicos (Tabla 1), orgánicos, radionucleidos, y microorganismos en agua potable <sup>[14]</sup>.

**Tabla 1.** Niveles máximos permitidos de contaminantes inorgánicos en el agua, establecidos por la EPA.

<b>Contaminante</b>	<b>MNMC (mg/L)</b>	<b>NMC o TT (mg/L)</b>
Arsénico	Ninguno	0.05
Cadmio	$5.00 \times 10^{-3}$	$5.00 \times 10^{-3}$
Cromo (total)	0.10	0.10
Cobre	1.30	Nivel de acción = 1.3; TT
Cianuro (como cianuro libre)	0.20	0.20
Flúor	4.00	4.00
Plomo	0.00	Nivel de acción= 0.015; TT
Mercurio (inorgánico)	$2.00 \times 10^{-3}$	$2.00 \times 10^{-3}$
Nitrato (medido como nitrógeno)	10.0	10.0
Selenio	0.05	0.05

MNMC- Meta del Nivel Máximo del Contaminante; es el nivel de un contaminante en el agua potable por debajo del cual no se conocen o no se esperan riesgos para la salud.

NMC- Nivel Máximo del contaminante; Es el máximo nivel permitido de un contaminante en agua potable.

TT- Técnica de Tratamiento; proceso obligatorio, cuya finalidad es reducir el nivel de un contaminante dado en el agua potable.

En este sentido, México a través de Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) cuenta con normas que regulan el contenido de contaminantes en diferentes compartimentos del medioambiente. La Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 <sup>[15]</sup>, establece los valores máximos permisibles de contaminantes que puede contener una descarga de agua cuando se vierte directamente a un cuerpo de agua

(ríos, lagos, lagunas). En la Tabla 2 se muestra los límites permitidos en concentraciones de metales en descargas a cuerpos receptores para diferentes usos.

**Tabla 2.** Límites máximos permisibles en concentración de metales para descarga a cuerpos receptores de agua. NOM-001-SEMARNAT-1996.

Parámetros (*) (mg/L)	Ríos						Embalses naturales y artificiales				Aguas costeras					
	Uso en riego agrícola (A)		Uso público urbano (B)		Protección de vida acuática (C)		Uso en riego agrícola (A)		Uso público urbano (B)		Explotación pesquera, navegación y otros usos (A)		Recreación (B)		Estuarios (B)	
	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD
Cobre	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0
Cromo	1.0	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	1.0	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	1.0	1.5	0.5	1.0
Níquel	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	4.0
Plomo	0.5	1.0	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1.0	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1.0	0.2	0.4
Arsénico	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2
Cadmio	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2
Mercurio	0.001	0.002	0.0005	0.001	0.0005	0.001	0.0	0.002	0.0005	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002
Zinc	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20

(\*) Medidos de manera total, PM-Promedio mensual, PD-Promedio Diario.

La Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996 <sup>[16]</sup> establece los límites máximos permisibles para descargas directas a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. En la Tabla 3 se enumera una serie de contaminantes regulados en esta norma, además, otro parámetro que es regulado es el pH de los efluentes y los valores permitidos se encuentran en el intervalo de 5.5 y 10. Así mismo se establece como temperatura máxima 40 °C en las descargas.

**Tabla 3** Límites máximos permisibles de metales y contaminantes en descargas a sistemas de alcantarillado municipal de acuerdo a la NOM-002-SEMARNAT-1996.

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES			
Parámetros (mg/L, excepto cuando se especifique otra)	Promedio Mensual	Promedio Diario	Instantáneo
Grasas y aceites	50.0	75.0	100
Sólidos sedimentables (ml/L)	5.00	7.50	10.0
Cobre total	10.0	15.0	20.0
Cr (VI)	0.50	0.80	1.00

Níquel total	4.00	6.00	8.00
Plomo total	1.00	1.50	2.00

Los lodos producidos durante el tratamiento de las aguas residuales provenientes del lavado de metales para remover soluciones concentradas, están sujetos a la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005 <sup>[17]</sup>. Estos son considerados como residuos peligrosos, de acuerdo a la prueba CRETIB (corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable y biológico infeccioso), por ser considerados tóxicos principalmente.

Recientemente la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) ha anunciado un límite de consumo máximo de 0.3 mg de Hg(II) por semana y una concentración máxima aceptable de 1 µg/L de Hg(II) en agua potable y para el cobre como límite máximo 1000 µg/L <sup>[18]</sup>.

Por otra parte existen otros Organismos Normativos Nacionales e Internacionales encargados de regular los niveles máximos de un contaminante metálico en sistemas acuáticos. Entre estos organismo se pueden mencionar: el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), la Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR), la Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo (OSHA), el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH), Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Estos organismos se encargan de regular los niveles máximos de los contaminantes medioambientales y asimismo de buscar estrategias para su remoción.

Sin embargo, hasta ahora la gran mayoría de las normas ambientales habla de concentraciones totales sin considerar que la movilidad, la reactividad, bioaccesibilidad y efectos biológicos dependen fuertemente de las formas/especies de estos elementos, por lo tanto, existe cada vez mayor énfasis en la determinación de las formas/especies elementales como un complemento necesario de su contenido total en un sistema acuático. Una interesante alternativa para la normatividad sería establecer límites permisibles para aquella fracción de metales/metaloides que englobe todas sus formas/especies potencialmente biodisponibles y tóxicas en un sistema dado, sin especificar la identidad y sin cuantificar cada una de ellas. Con el proyecto de tesis se pretende contribuir en el desarrollo de herramientas analíticas que proporcionen este tipo de información.

## **I.2. Metalómica**

La determinación de metales y metaloides forma una parte importante de los estudios medioambientales y tiene una relevancia indudable en las investigaciones biomédicas. Con el avance del conocimiento, en las últimas décadas el interés se desplazó gradualmente desde la evaluación de los contenidos totales hacia la caracterización cualitativa y cuantitativa de las formas fisicoquímicas de estos elementos, desarrollando la instrumentación y metodología de la especiación analítica. Tal como ya se describió antes, la metalómica se enfoca no solamente en la caracterización del estatus de elementos y de sus especies en los sistemas biológicos, sino también en el entendimiento de sus rutas metabólicas y funciones específicas en organismos vivos.

En el campo de metalómica, se pretende enlazar la información sobre metales/metaloides, su distribución y especiación analítica con su impacto potencial en los organismos vivos <sup>[2]</sup>. La metalómica es un área relativamente reciente que apenas se está estableciendo en el campo de interdisciplina adoptando de manera provisional la siguiente definición: “metalómica es un estudio de la totalidad de las formas y especies de diferentes metales y metaloides en un sistema dado, incluyendo las posibles interacciones con otros componentes del sistema con el fin de conocer los mecanismos responsables de sus efectos en organismos vivos” <sup>[1, 3]</sup>. En este sentido el análisis bio-inorgánico en el campo de la metalómica ha evolucionado de forma notoria en los últimos años gracias al avance en el desarrollo de técnicas de espectrometría de masas atómica y molecular y a su acoplamiento a técnicas separativas de gran resolución, aplicable tanto a la caracterización elemental como a la caracterización molecular de las especies formadas en un sistema biológico <sup>[2]</sup>. Mediante esta combinación de técnicas ha sido posible solucionar los principales problemas que presentan estos análisis: concentraciones muy bajas de los compuestos de interés, matrices muy complejas, degradación o inter-conversión de las especies, su labilidad, etc. Se requieren además procedimientos de tratamiento de la muestra eficaces, pero poco agresivos, con capacidad para purificar y pre-concentrar las especies de interés, buscando obtener de manera prácticamente simultánea la cuantificación de los elementos de interés y la caracterización molecular de sus especies o biomoléculas con las que forman diferentes tipos de unión <sup>[4]</sup>.

Asimismo en los estudios medioambientales, el principal reto relacionado con el análisis de metales/metaloides es conocer el posible riesgo impuesto por su presencia,

información que no se obtiene realizando la determinación de las concentraciones totales de cada uno de ellos. Con el enfoque metalómico, se requiere de la evaluación de la biodisponibilidad, captación/acumulación de metales/metaloides por los organismos expuestos, caracterización de sus formas fisicoquímicas y por otro lado interacciones in vivo, así como la evaluación del impacto que estos agentes tengan en los seres vivos <sup>[5]</sup>. Estos procedimientos de especiación, aunque son eficaces, no son apropiados para llevar a cabo el control rutinario de los riesgos impuestos por la presencia de metales pesados en sistemas acuáticos. Es por ello que se han buscado otras alternativas para evaluar este riesgo.

### **1.3. Análisis dirigido al efecto (EDA)**

Debido a que la metalómica se enfoca en la elucidación del efecto global de todos los elementos y sus formas presentes en el sistema estudiado, las herramientas y procedimientos del análisis dirigido al efecto parecen ser útiles en estudios metalómicos. EDA tiene como finalidad identificar y cuantificar las especies químicas de mayor riesgo (toxicidad) en muestras medioambientales complejas, con base en procedimientos de fraccionamiento de muestras, pruebas de efectos biológicos (toxicidad) de cada una de las fracciones obtenidas, selección de las más relevantes y su análisis para identificación/cuantificación de los contaminantes. Como resultado, el desarrollo y aplicación de los procedimientos EDA ha permitido identificar los agentes mutagénicos en partículas del aire, algunos interruptores endocrinos en sistemas acuáticos, principales compuestos tóxicos en aguas del desecho, etc <sup>[6]</sup>. Es por ello que el concepto EDA se puede enfocar para evaluar la toxicidad “efectiva” de todos los metales/metaloides, presentes en un sistema acuático y que tal estrategia pertenece al dominio de la metalómica <sup>[6]</sup>.

### **1.4. IMAC**

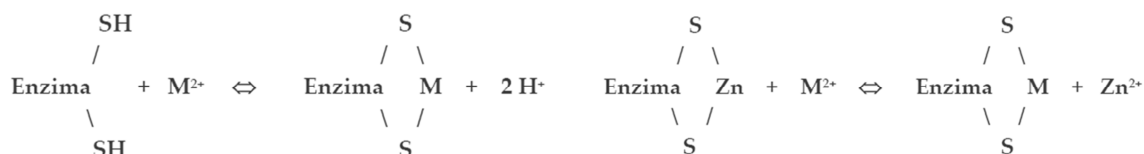
Entre los diferentes tipos de las separaciones por cromatografía de líquidos, la cromatografía de afinidad aprovecha las interacciones específicas entre el soluto de interés y compuestos o grupos funcionales que se encuentran inmovilizados en el soporte sólido mediante el enlace covalente. Típicas aplicaciones de esta técnica incluyen el uso de anticuerpos específicos que, unidos al soporte sólido, permiten purificar las proteínas a partir de los extractos de tejidos, fluidos biológicos, etc. Además de anticuerpos, el soporte sólido puede tener grupos funcionales, compuestos o iones metálicos que permiten

fraccionar las proteínas, dependiendo de su afinidad a estas especies. En particular, una de las herramientas básicas para la separación de proteínas y péptidos que interactúan con metales es la cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados [19, 20]. En la mayoría de los sistemas IMAC, para la inmovilización de iones metálicos se usa el ácido nitrilotriacético (NTA) o el ácido iminodiacético (IDA) unido a un soporte sólido [21]. En IMAC, los grupos electrodonadores de aminoácidos disponibles en la superficie de la proteína o péptido (grupo imidazol en histidina o grupo tiol en cisteína) son responsables por la interacción de la molécula con iones metálicos inmovilizados. De manera de ejemplo, la inmovilización de iones de Ni(II), Co(II) o Cu(II) permite la captación de proteínas mediante la interacción de estos iones con histidina [22, 23] mientras que los soportes conteniendo iones de Zn(II) o Fe(III) sirven para retener las proteínas fosforiladas [24, 25].

Con el proyecto de tesis se pretende avanzar en el desarrollo de metodología analítica enfocando el trabajo en la evaluación de la toxicidad efectiva de metales/metaloides presentes en aguas naturales. Para ello, se propuso, utilizar soportes de cromatografía de afinidad que contengan inmovilizado a grupos tiol (-SH) que simule el blanco de unión/efecto de los metales/metaloides en un organismo vivo.

#### I.4.1. Interacción GSH-metales pesados

El primer blanco de toxicidad de los metales y algunos metaloides in vivo son los grupos sulfhidrilo (-SH), presentes en un gran número de biomoléculas importantes a nivel celular. La forma principal en la que estos elementos ejercen su toxicidad es la inactivación de la defensa antioxidante, inhibición de la función enzimática, o su acción mediante sustitución de elementos esenciales como por ejemplo el Zn(II) (Fig. 1).



**Figura 1.** Interacción de grupos sulfhidrilo (-SH) de una enzima con iones metálicos como el Zn(II) [26].

La cinética de estas reacciones viene controlada por factores tales como la solubilidad de la especie que libera el ión metálico, la afinidad del ión metálico al azufre (M-S) y la accesibilidad del metal al nucleófilo [26].

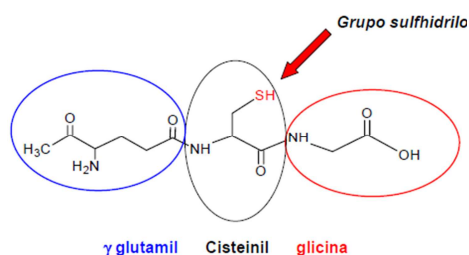
Obviamente, en el ambiente celular los iones metálicos presentan también afinidad a otro tipo de nucleófilos. En la Tabla 4 se presentan de manera de ejemplo las constantes de formación de diferentes uniones para mercurio, cadmio y plomo; como se puede observar los valores más altos corresponden a las uniones con el grupo tiol <sup>[26]</sup>.

**Tabla 4.** Constantes de estabilidad aparente para uniones de Hg(II), Cd(II), Pb(II) con diferentes grupos nucleofílicos presentes en biomoléculas <sup>[26]</sup>.

Grupo	Log K (pH = 7)		
	Hg(II)	Cd(II)	Pb(II)
Carboxílico	5.60	1.80	1.90
Amino	6.00	0.30	0.50
Imidazol	3.70	2.70	2.20
Tiol	10.2	5.60	4.90
Fosfato	---	2.70	3.10
Cloruro	7.30	2.00	1.60

Además, es importante hacer ver que, dependiendo del elemento y su forma/especie la afinidad a los grupos –SH varía, lo que puede relacionarse con diferencias en la toxicidad entre elementos/especies.

En este sentido el glutatión (GSH) es una de las moléculas importantes a nivel celular debido a su papel de antioxidante; se encuentra presente en altas concentraciones (0.1 mM – 10 mM) y por lo tanto es el tiol no proteico más abundante <sup>[27]</sup>. El GSH ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) está constituido por los aminoácidos glutamato (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly).



**Figura 2.** Estructura del glutatión reducido (GSH,  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) y sus principales unidades constituyentes.

En las células y tejidos sanos, más del 90 % de glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10 % en forma oxidada (GSSG). La formación del puente disulfuro, es el proceso redox responsable por la función antioxidante del glutatión <sup>[28]</sup>.

Con estos antecedentes que se acaban de mencionar, el estudio planteado en este proyecto de tesis tiene como enfoque principal exponer el grupo  $-SH$  a formas de metales/metaloides presentes en el agua natural, esperando la captación selectiva en función de la afinidad a este grupo o, en otras palabras, en función de su toxicidad dentro del organismo vivo. Para realizar esto se propone modificar soportes cromatográficos comerciales, inmovilizando GSH en su superficie.

Por otro lado, en los últimos años se ha acumulado una gran cantidad de información sobre la formación de aductos con GSH de iones metálicos tales como: Cu(I), Nd(III), Zn(II), Cr(VI), Cd(II), Pb(II), Hg(II), As(III) por mencionar algunos.

Ascone y colaboradores en el año 1993, caracterizaron el complejo Cu(I)-GSH, relacionado con la reconstitución de la enzima Cu-Zn-superóxido dismutasa (SOD) bovina, en el cual el cobre es directamente transferido como Cu(I) desde su complejo formado con GSH hacia el sitio activo de la enzima SOD. Ellos prepararon el complejo de Cu(I) con GSH por adición de  $CuSO_4$  a una solución de GSH en tampón de fosfatos 0.1 M a pH 7.4. La adición de Cu(II) a GSH en relación 3:1 causa la oxidación de cantidades estequiométricas de GSH a GSSG y la formación del complejo resultante de Cu(I) con el GSH restante<sup>[29]</sup>.

Así mismo Aliaga y colaboradores en el año 2011, estudiaron la reducción intracelular del ion libre Fe(III) a través del complejo Cu(I)-[GSH]<sub>2</sub> que tiene la capacidad de reducir el oxígeno molecular en radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a partir de los cuales se genera la especie activa-redox de Fe(II). En este trabajo se demuestra que a lo largo de una reacción mediada por  $O_2^{\cdot-}$ , el complejo Cu(I)-[GSH]<sub>2</sub> es capaz de reducir Fe(III) libre y liberar Fe(II). El complejo Cu(I)-[GSH]<sub>2</sub> fue preparado mezclando  $CuCl_2$  y GSH en relación molar 1:3<sup>[30]</sup>.

Singh en el 2004, realizó un estudio espectral sobre la diferencia en parámetros de energía en la formación del complejo de Nd(III) con GSH reducido en presencia y ausencia de Zn(II) utilizando disolventes orgánicos como: metanol, dioxano, acetonitrilo y dimetilformamida. De la presente investigación se ha observado que es posible la participación de Zn(II) en la complejación de Nd(III) y GSH, revelada por la comparación de los espectros de absorción y respaldada por la disminución del valor del parámetro de repulsión inter-electrónica (parámetro Slater-Condon,  $F_K$ ) y el aumento de los valores de la relación nephelauxetic ( $\beta$ ) que se produce cuando un ion libre de metal de transición forma



un complejo con ligandos. El complejo Nd(III)-GSH fue sintetizado por la mezcla de  $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3$  2 mM con GSH 4 mM en presencia de diferentes disolventes orgánicos. Para la preparación del complejo Nd(III)-GSH-Zn(II), se adicionó  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  1 mM a una mezcla de Nd(III) 1 mM con GSH 2 mM <sup>[31]</sup>.

Polec y colaboradores (2007) investigaron la complejación de Cd(II), Pb(II) y Cu(I) con GSH por Espectrometría de Masas con Ionización con Electrospray (ESI-MS) y por cromatografía de exclusión de tamaño molecular acoplada con ICP-MS y ESI-MS. En este trabajo se evalúa la diferencia en afinidad que tienen estos iones metálicos por el GSH, estudiando la aceleración en los procesos de oxidación sobre el GSH. La actividad redox de los iones metálicos fue:  $\text{Cu(I)} > \text{Pb(II)} > \text{Cd(II)}$  <sup>[32]</sup>.

El Cr(VI), un estado de oxidación de cromo tóxico y mutagénico, forma complejos con el GSH, mediante la reacción de dicromato de potasio con GSH en relación molar 1:1. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) muestran que el glutatión actúa como un ligando monodentado y se une al Cr(VI) a través del grupo tiol de la cisteína formando el complejo  $\text{GSCrO}_3^-$  <sup>[33]</sup>.

De todos los iones metálicos el que más daño produce a los sistemas de GSH es el mercurio. La afinidad del Hg(II) por el grupo -SH de la Cys en proteínas y péptidos puede ser perjudicial para una función normal a nivel celular. Uno de los mecanismos de protección implica su interacción con GSH. Mah y Farideh Jalilehvand han estudiado complejos de GSH formados con Hg(II) en soluciones acuosas a pH fisiológico, obteniendo mejores resultados a pH 7.4 ya que a este pH obtienen complejos Hg(II)-GSH más estables <sup>[34]</sup>.

En resumen, los estudios realizados hasta la fecha confirman que diferentes iones metálicos forman complejos con glutatión y que en condiciones fisiológicas dicha interacción tiene importancia biológica. Con base en la revisión bibliográfica, se propone utilizar glutatión inmovilizado en un soporte sólido para lograr la captación selectiva de diferentes formas de elementos presentes en un sistema acuático y de esta manera evaluar la toxicidad efectiva relacionada con presencia de metales/metaloides en dicho sistema.

#### **I.4.2. Revisión bibliográfica enfocada en la inmovilización de GSH en soportes cromatográficos**

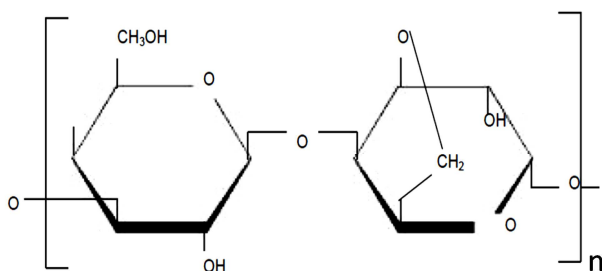
Los soportes cromatográficos deben cumplir con una serie de requisitos a fin de lograr obtener el producto deseado con menores dificultades y en mayor grado de pureza.

El soporte ideal debe tener las siguientes propiedades: insolubilidad en agua, gran permeabilidad y área específica, rigidez, mínima susceptibilidad a la sorción inespecífica, baja reactividad y alta resistencia a microorganismos.

Los soportes utilizados en cromatografía de afinidad pueden ser de varios tipos: soportes de polisacáridos (agarosa, celulosa y dextrano), soportes sintéticos (poliacrilamina, vidrio) y soportes como hidroxialquilmecrilato, copolímeros de etileno y oxiranos acrílicos [35-37].

En este trabajo se propuso utilizar soportes comerciales de agarosa (Sephrose 6B) y perlas de vidrio (Si-OH), ya que ambos pueden ser activados para la inmovilización del glutatión y así simular un blanco de toxicidad hacia iones metálicos.

La agarosa es un polímero lineal de 1,3-D-galactopiranos- $\beta$ -1-4,3,6-anhidro-L-galactosa que facilita la formación de poros de tamaño muy grande [38].



**Figura 3.** Estructura de agarosa (1,3-D-galactopiranos- $\beta$ -1-4,3,6-anhidro-L-galactosa).

La estructura tridimensional de la agarosa en estado sólido se mantiene gracias a los puentes de hidrógeno entre cadenas vecinas, probablemente hélices triples. Sin embargo, cuando se adicionan agentes que destruyen estos puentes, como urea, cloruro de guanidinio, iones y algunos detergentes no se aprecia una disminución en la estabilidad de un soporte de agarosa.

Un soporte de agarosa pierde su estabilidad cuando es expuesto a temperaturas menores de los 0 °C y por encima de los 40 °C en un periodo prolongado de tiempo. Por otro lado, estas matrices son estables en un rango de pH de 4 - 9 y muestran una tolerancia adecuada a la exposición de 0.1 M NaOH ó 1 M HCl de 2 - 3 horas. También se ha demostrado que estas matrices no se deforman durante la exposición a 1-2 M NaCl, 8 M urea, 6 M cloruro de guanidino, 0.4% deoxicolato de sodio, 3% SDS y 0.5% Triton X-100. Asimismo, toleran bajas concentraciones de solventes orgánicos como etilenglicol, etanol, metanol, acetona, butanol, piridina (hasta 80% v/v) y dimetil formamida (hasta 50%) [38].

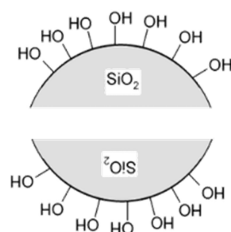
A fin de proporcionar una mayor estabilidad a la matriz se puede adicionar epíclorohidrina, 2,3 dibromopropanol o divinil sulfona. Estos agentes entrecruzan las cadenas vecinas de agarosa lo cual permite su utilización en un mayor rango de pH (3- 12) e incluso posibilitan el uso de solventes orgánicos como tetrahidrofurano, cloroformo, diclorometano, dicloroetano y dicloroetano:piridina (1:1). En este trabajo se utilizó como uno de los soportes la Sepharose 6B que es un polímero entrecruzado que contiene 6% de agarosa y es obtenido del extracto de algas.

Por su parte, los soportes de vidrio han sido ampliamente usados para inmovilizar moléculas biológicamente activas pero su uso en cromatografía de afinidad ha sido relativamente poco explotado.

Estos soportes están conformados de dos fases: una rica en sílice y resistente al tratamiento con ácidos y una segunda fase, formada principalmente por óxido bórico y fácilmente atacada por ácidos. La fase de sílice corresponde a cerca el 96% del total mientras que la de borato a cerca del 4%; además de poder encontrarse trazas de otros óxidos inorgánicos <sup>[38]</sup>.

La distribución del tamaño de poro en estos soportes es muy restringida (4.5- 250 nm) lo que lo convierte en el soporte cromatográfico más uniforme de todos los disponibles y permite una buena resolución y excelente reproducibilidad, cuando se usan en separaciones cromatográficas. El rango de porosidad es suficientemente bueno para incluir la mayoría de las biomoléculas desde sustratos hasta células completas. En cuanto a las características mecánicas, son soportes completamente insolubles y no se ven afectados por cambios en la composición del eluyente, presión, velocidad de flujo, pH o fuerza iónica empleada en la columna cromatográfica. No son atacados por microorganismos y pueden ser esterilizados tanto en autoclave como mediante el uso de desinfectantes.

Como ya se había mencionado, estos soportes contienen cerca del 4% de borato, de éste alrededor del 30% se encuentra en la superficie del vidrio. Los numerosos sitios que pueden formar un ácido de Lewis, dado por los grupos boro, pueden interaccionar inespecíficamente con nucleófilos tales como las aminos de las proteínas y/o grupos amonio, que dan lugar a centros cargados positivamente. Adicionalmente, al igual que todos los vidrios de sílice, las superficies de las partículas de estos soportes contienen grupos silanol libres (Si-OH) que confieren la carga ligeramente negativa en soluciones acuosas aumentando la sorción no específica <sup>[38]</sup>.

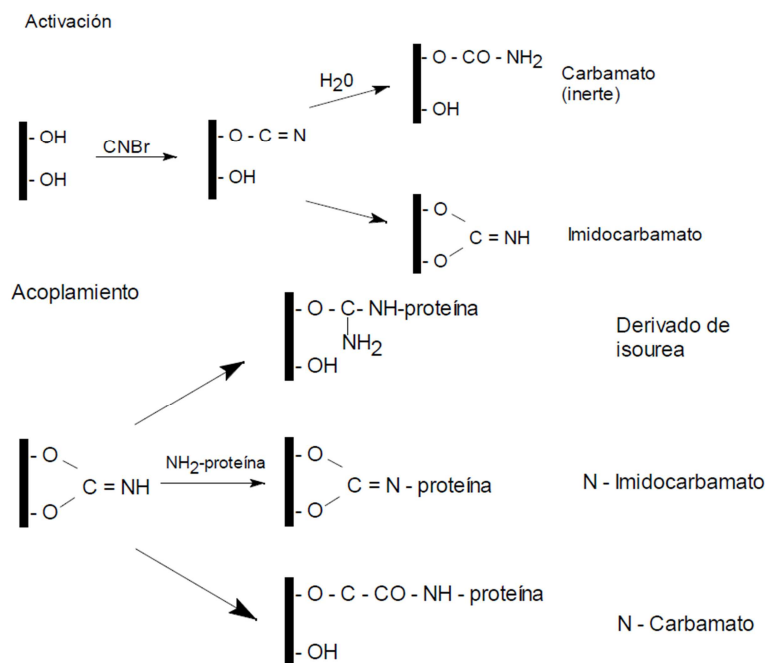


**Figura 4.** Estructura de las perlas de vidrio, mostrando grupos silanol libres presentes en la superficie (Si-OH).

Para introducir grupos funcionales de interés en la superficie del soporte, la primera etapa consiste en su activación para favorecer la unión covalente del compuesto con el grupo funcional. En algunas ocasiones resulta muy útil introducir moléculas que alejen el ligando de la matriz (estas moléculas son conocidas como brazos espaciadores), a fin de aumentar la sorción de una molécula de interés. Algunos autores sugieren que es mejor acoplar el ligando al brazo espaciador antes de unirlos covalentemente con el soporte. Este método es recomendable dado que se conoce bien la naturaleza química del ligando lo cual es de enorme importancia para el diseño e interpretación de los datos de purificación. Otros autores prefieren acoplar el ligando cuando el brazo espaciador ya está unido al soporte activado. Este método permite cierta flexibilidad en la síntesis de derivados para un problema en particular <sup>[35-37]</sup>.

Los soportes de cromatografía de afinidad son activados introduciendo grupos electrofílicos a fin de hacerlos más reactivos en la etapa de introducción del grupo que represente afinidad para una aplicación dada (glutación en el caso de este trabajo).

Bromociano es el agente químico más utilizado para unir ligandos a los soportes cromatográficos que poseen grupos hidroxilo (-OH) superficiales. La activación del soporte con BrCN, es seguida del acoplamiento de aminas primarias, alifáticas o aromáticas. Durante la etapa de activación, se forma un intermediario de cianato que puede interactuar con los hidroxilos adyacentes para formar imidocarbonatos cíclicos y acíclicos. Estos sitios activados facilitan la unión covalente del modificador y además, dan lugar a un decremento en la capacidad de hinchamiento del soporte cromatográfico y le proporciona mayor estabilidad térmica debido a que el imidocarbonato reacciona con los hidroxilos de las cadenas vecinas aumentando el entrecruzamiento entre ellas <sup>[39-42]</sup>.



**Figura 5.** Método de activación de soportes sólidos, que contienen grupos –OH superficiales, con BrCN y su acoplamiento con aminas primarias, alifáticas o aromáticas <sup>[40]</sup>.

Como puede apreciarse en la Fig. 5, el intermediario de cianato puede hidrolizarse a una forma inestable de carbamato. La hidrólisis alcalina prolongada bajo condiciones suaves convierte un soporte activo en un soporte con un carbamato no reactivo. Por esta razón es muy importante llevar a cabo la activación dentro de un periodo muy corto, usualmente de 8 a 12 min con el fin de asegurar el mayor posible número de grupos imidocarbamato <sup>[40]</sup>.

De acuerdo con el esquema presentado en la Fig. 5, el GSH puede ser inmovilizado en los soportes comerciales de agarosa (Sepharose 6B) y perlas de vidrio (Si-OH) activados previamente con BrCN, mediante su grupo –NH<sub>2</sub> del γ-Glu.

#### **I.4.2.1. Uso de compuestos con el grupo tiol y de nanopartículas metálicas en la elaboración de sensores para iones metálicos**

Recientemente se han reportado varios estudios sobre las interacciones potenciales de nanopartículas metálicas (NPM) con tioles naturales del cuerpo como el GSH, Cys y homocisteína (Hcy) <sup>[43]</sup>. En este sentido, las NPM se han utilizado con éxito en la determinación de diversos metales pesados y metaloides tales como Hg(II) <sup>[44]</sup>, Fe(III) <sup>[45]</sup>, As(III) <sup>[46]</sup>, Cu(II) <sup>[47]</sup> y Pb(II) <sup>[48]</sup> con ventajas de que el procedimiento es simple, rápido y económico. El GSH puede ser usado como un agente reductor, estabilizador y agente

protector en la síntesis de NPM y también muestra una gran afinidad por ciertos metales/metaloides tóxicos presentes a nivel ambiental.

En un trabajo reciente <sup>[49]</sup> se reporta un nuevo método para la determinación selectiva de Cr(III) y Cr(VI), en muestras de agua medioambientales. En este procedimiento se mide decremento de la fluorescencia inducida por el analito, a diferente pH, mediante nanopartículas de oro estabilizadas con glutatión (NPAu-GSH). El Cr(III) se detecta directamente a pH 6.5 donde la disminución de la intensidad de fluorescencia relativa de NPAu-GSH depende de la concentración del analito (debido a la formación de Cr(III)-GSH). El Cr(VI) se cuantifica en base a la diferencia entre las intensidades de fluorescencia relativas de las NPAu-GSH a pH 3.5 y 5.0. Además, los efectos de otros iones metálicos como Pb(II), Cu(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Zn(II) y Mn(II) sobre las intensidades de fluorescencia de NPAu-GSH a diferentes pH's fueron estudiadas para evaluar la selectividad de este método. El límite de detección (LD) de Cr(III) y Cr(VI) fue de 2.5 µg/L y 0.5 µg/L respectivamente <sup>[49]</sup>. Los estudios de las interacciones de NPAu funcionalizadas con GSH u otras biomoléculas son importantes no sólo para fines del análisis cuantitativo, sino también para facilitar la comprensión de los efectos que se producen en el entorno real en tejidos y a nivel medioambiental.

En la actualidad, un nuevo método ha sido propuesto para realizar la detección de Hg(II) a través de la anti-agregación de NPAu preparadas usando cloruro de poli-dialildimetilamonio (PDDA) como reductor y estabilizador, en presencia de Cys. En este trabajo, se desarrolló un simple sensor colorimétrico, en el que ocurre cambio de color de las NPAu en solución de rubí rojo a púrpura real, como resultado de la agregación de NPAu. Debido a la alta constante de estabilidad del complejo Cys-Hg(II), en la pre-incubación de Hg(II) con Cys se formará dicho complejo Hg(II)-Cys, lo que reducirá significativamente la concentración de moléculas de Cys libre, interrumpiendo la agregación de NPAu. Con el incremento de la concentración de Hg(II) el color de las NPAu en solución pasara desde púrpura a rojo, lo que permite la determinación indirecta de Hg(II) en un rango de  $5.0 \times 10^{-8}$  M a  $1.0 \times 10^{-5}$  M con un límite de detección de  $2.8 \times 10^{-8}$  M <sup>[50]</sup>.

Los sensores colorimétricos están ganando cada vez más atención debido a su sencillez, rapidez de respuesta, alta sensibilidad y facilidad de medición. En este sentido una forma viable para el desarrollo de este tipo de sensores, es el utilizar nanopartículas metálicas y en particular, las nanopartículas de plata (NPAg). Recientemente se ha

reportado un nuevo sensor colorimétrico como sonda para la detección de Ni(II) en medio acuoso a base de nanopartículas de plata estabilizadas con glutatión (NPAg-GSH); Se ha demostrado una buena selectividad del sensor NPAg-GSH respecto otros iones metálicos de transición (Zn(II), Co(II), Cd(II), Mn(II), Hg(II), Cu(II)), iones de metales alcalinos (Li(I), Na(I), K(I)), y iones de metales alcalinotérreos (Mg(II), Ca(II), Sr(II), Ba(II)), excepto para el Co(II) que presentó una interferencia moderada. El límite de detección para el Ni(II) por NPAg-GSH fue  $7.5 \times 10^{-5} \text{ M}$  [51].

#### **I.4.2.2. Tendencias actuales en la elaboración de soportes para sorción de iones metálicos en sistemas acuáticos**

Recientemente las nanopartículas magnéticas (NPMag) multifuncionales, han tomado gran importancia debido a su facilidad de síntesis, alta eficacia de sorción, fácil recuperación y ausencia de contaminantes secundarios con lo cual se respeta al medioambiente [52].

En este sentido, las MPMag funcionalizadas con agentes quelantes tienen muchas aplicaciones en el mundo actual. Grupos funcionales tradicionales, como tiol [53, 54], imidazol [55], amino [56-62] y carboxílico [63] pueden ser introducidos sobre la superficie de NPMag, lo que confiere a los soportes características deseables. Hasta la fecha, la introducción de un grupo amino sobre la superficie de NPMag se ha obtenido por diferentes tipos de modificación, tales como la técnica de injerto (grafting) [[56], [60], [62]], síntesis directa o condensación [64]. Debido a la buena preservación de la estructura de las nanopartículas después de su modificación mediante grafting, esta técnica se ha convertido en la más común en la modificación de la superficie de NPMag [65].

Teniendo en cuenta la parte anterior, se han reportado los efectos de los diferentes contenidos de grupo amino en la formación de NPMag modificadas, como lo es la producción de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  por un proceso de síntesis en un solo paso de 5 horas. La síntesis de NPMag de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  presentan una estructura con capas de núcleo uniforme y con carga relativamente alta de grupos amino, colocados en la superficie. La aplicación potencial de las NPMag de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  se reportó para la eliminación de Pb(II) del medio acuoso, con una alta capacidad de sorción del mismo por estas NPMag. Así mismo también se ha reportado que sorbentes a base de NPMag de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  pueden ser regenerados fácilmente y utilizarse repetidamente durante muchos ciclos y por lo tanto pueden ser considerados como un material potencial para la

eliminación de Pb(II) en el tratamiento de aguas residuales. Recientemente, se ha reportado un nuevo nano-sorbente magnético desarrollado mediante la modificación de la superficie de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (NPMag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) con cascara de naranja en polvo con el objetivo de explorar su viabilidad como sorbente para la eliminación de cadmio de las soluciones acuosas [66].

Finalmente, la celulosa es el biopolímero renovable más abundante, y es una materia prima muy prometedora, disponible a bajo costo [67-70]. Recientemente, la celulosa modificada se ha utilizado para la eliminación de diferentes tipos de iones metálicos en medio acuoso [71-73]. Entre otros, se reportó el uso celulosa con nanopartículas magnéticas de hierro, obtenidas por la precipitación de celulosa en presencia de una mezcla de Fe(II) / Fe(III) e introduciendo grupos funcionales amino a través de un tratamiento sucesivo con glicidilmetacrilato y tetraetilenpentamina. En los soportes obtenidos, se estudió la sorción de Hg(II), Cu(II) y Ag(I) [74]. En otro trabajo se demostró que las membranas de acetato de celulosa, modificadas con grupos funcionales, tales como -COOH, -SO<sub>3</sub>H y -NH<sub>2</sub>, tienen capacidad de captar iones de metales pesados, siendo una alternativa para la remoción de estos elementos a nivel ambiental [75].

## **I.5. JUSTIFICACIÓN**

Con los antecedentes que se acaban de presentar en la parte introductoria, el estudio planteado en este proyecto de tesis tiene como enfoque principal establecer una nueva aplicación de los soportes de cromatografía de afinidad para evaluar la toxicidad “efectiva” de metales en efluentes ambientales. En particular, se propone inmovilización de GSH en los soportes de Sepharose 6B y perlas de vidrio, previa activación de grupos -OH libres en su superficie con BrCN o con hidróxido de sodio. Se seleccionó trabajar con GSH, como el primer blanco de la toxicidad, de los llamados “metales pesados”, sobre organismos vivos.

Al poner en contacto el soporte modificado con el agua natural, se espera que la selectividad de sorción dependa de la afinidad de cada una de las formas/especies de los elementos contaminantes al grupo -SH. Hay que resaltar que el objetivo de este trabajo es lograr el perfil de sorción de diferentes metales en una pequeña porción de soporte modificado, de acuerdo con la afinidad de sus formas presentes en el medio al grupo tiol; pero no se pretende llevar a cabo la remoción de especies contaminantes.

El análisis comparativo del perfil de elementos enlazados al grupo tiol y del perfil de concentraciones totales determinado directamente en las muestras de agua permita



estimar la “toxicidad efectiva” relacionada con la presencia de estos elementos en este sistema sin necesidad de llevar a cabo el análisis de especiación de cada uno de ellos.

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1. Objetivo general**

El objetivo principal del proyecto de tesis es establecer una nueva aplicación de los soportes de cromatografía de afinidad mediante la construcción de dispositivos que permitan la captación de metales/metaloides en función de su biodisponibilidad y toxicidad con el fin de evaluar la toxicidad efectiva de estos elementos en aguas naturales.

### **II.2. Objetivos particulares**

Con el fin de lograr el objetivo general se definieron los siguientes objetivos particulares:

1. Realizar la revisión bibliográfica enfocada en la toxicidad de metales/metaloides, en búsqueda de los dispositivos de toxicidad global existentes, en las aplicaciones de cromatografía de afinidad y además, en la revisión de los conceptos básicos y herramientas de metalómica.
2. Elegir soportes cromatográficos que permitan la inmovilización de glutatión en su superficie para captar metales/metaloides presentes en agua natural en función de su afinidad a los grupos tiol libres. Se propone utilizar soportes comerciales de agarosa (sepharose 6B) y perlas de vidrio (Si-OH).
3. Obtener los soportes modificados con GSH.
4. Realizar estudio de captación de iones metálicos en soportes modificados con GSH en condiciones estacionarias, variando composición de la solución (un solo ion metálico, mezclas de iones con diferentes concentraciones, efecto de pH, fuerza iónica, materia orgánica, etc).
5. Evaluar la eficacia de la captación en diferentes condiciones, mediante el análisis de metales/metaloides por espectrofotometría UV-Vis y espectrometría de emisión atómica (MP-AES).
6. Elaborar el documento de tesis y presentar el examen de grado.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

A continuación se presentan los materiales, reactivos y equipos utilizados durante el desarrollo del presente trabajo de tesis:

#### III.1. Material y reactivos

##### Reactivos

- ❖ Gel de Sepharose 6B.
- ❖ Perlas de Vidrio 0.55 mm de diámetro.
- ❖ Perlas de Vidrio 75  $\mu\text{m}$  de diámetro, Supelco.
- ❖ Bromociano o Cianuro de Bromo, Aldrich.
- ❖ L-Glutation reducido, Sigma-Aldrich.
- ❖ Acetonitrilo Grado HPLC.
- ❖ Hidróxido de sodio, Fluka.
- ❖ Glicina, Sigma.
- ❖ Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, Sigma-Aldrich.
- ❖ Metanol grado HPLC.
- ❖ Sales Metálicas:  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Cd}(\text{Ac})_2$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ , Karal, Sigma, Baker.
- ❖  $\text{HNO}_3$  concentrado, grado analítico.
- ❖  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado grado analítico.
- ❖ 1,5-difenilcarbazona, Sigma.
- ❖ Ditizona o difeniltiocarbazona, Sigma.
- ❖ Tritón X-100, Sigma.
- ❖ HCl concentrado, grado analítico.
- ❖ Ácido húmico, sal de sodio, Aldrich.
- ❖ Solución estándar multielemental conteniendo los siguientes elementos: Fe, Pb, Sb, Cd, Zn, Ag, V, Co, Ni, Cr, y Al 10 mg/L, Agilent.
- ❖ Estándar interno de itrio (Y), Agilent.

##### Material

- ❖ Vasos de precipitado.
- ❖ Tubos de ensayo.
- ❖ Agitadores magnéticos.
- ❖ Agitador de vidrio.

- ❖ Tubos eppendorf 2 mL.
- ❖ Matraces Erlenmeyer.
- ❖ Embudos de plástico.
- ❖ Papel filtro No1.
- ❖ Celdas de cuarzo 1 mL UV-Vis.

### **III.2. Instrumentación analítica y equipos**

- ❖ Espectrofotómetro UV-Vis Milton Roy.
- ❖ Espectrómetro de emisión atómica con excitación en plasma de microondas, modelo 4100 MP-AES, Agilent Technologies.
- ❖ pH metro.
- ❖ Bomba de vacío.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Como se mencionó en las secciones anteriores, en este trabajo se prepararon dos tipos de soportes de cromatografía de afinidad, el primero a partir de geles de Sepharose 6B activados mediante una metodología clásica con BrCN, para su posterior unión con GSH, y para el segundo se utilizaron perlas de vidrio de sílice de diferente tamaño (de diámetro 0.55 mm y 75  $\mu\text{m}$ ) estableciendo una nueva forma de activación, mediante una incubación previa con Ca(II), seguida por adición del NaOH y finalmente su interacción con GSH. Para afinar el proceso de modificación de los soportes, se llevó a cabo la determinación de grupos -SH inmovilizados en la superficie y de las concentraciones residuales de GSH en la solución, variando el tiempo de interacción. Los soportes obtenidos fueron utilizados para evaluar la factibilidad de la captación de iones metálicos en función de su afinidad al grupo -SH del GSH. Para ello, se seleccionaron los siguientes formas de metales: Cr(VI), Hg(II), Cd(II), Pb(II) y Zn(II). Los ensayos de captación se llevaron a cabo en las soluciones de iones individuales, en mezclas de diferentes metales y en presencia de ácidos húmicos (como componente abundante de la matriz química de aguas naturales). Utilizando simples ensayos espectrofotométricos y mediante el análisis por MP-AES, se determinaron las concentraciones residuales de cada una de las especies metálicas en función de la composición de la solución y del tiempo de su contacto con el soporte modificado; asimismo se determinó la cantidad de metal retenido en el soporte, evaluando en cada uno

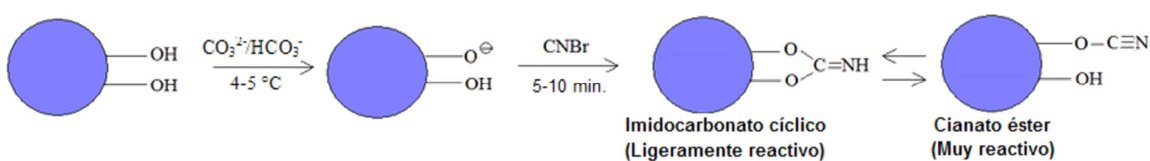
de los casos el balance de masa. A continuación se describen los resultados obtenidos en el desarrollo experimental.

#### IV.1. Activación de soportes de cromatografía de afinidad

La activación de soportes de cromatografía de afinidad es la parte más importante en el desarrollo de un nuevo procedimiento analítico, ya que en la superficie de estos soportes se lleva a cabo la inmovilización de un agente que presente afinidad a especies de interés.

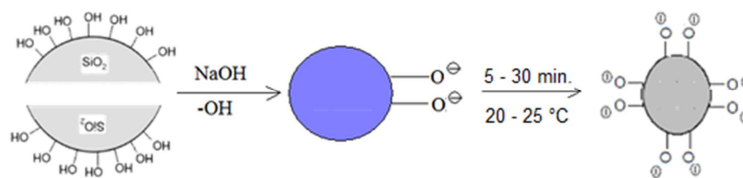
En el presente trabajo de tesis se utilizaron soportes cromatográficos comerciales, como geles de sepharose 6B (250  $\mu\text{m}$  – 350  $\mu\text{m}$  de diámetro) y perlas de vidrio de sílice (75  $\mu\text{m}$  y 0.5 mm de diámetro). En una primera instancia, estos soportes cromatográficos, por separado, fueron activados mediante una metodología clásica con BrCN, descrita en la introducción general, en la cual una cantidad de masa húmeda del soporte se suspende en un volumen igual de tampón de carbonato/bicarbonato ( $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ ) 2 M, pH 10.9, a una temperatura de 4 °C por 10 minutos a la cual enseguida se le adiciona una cantidad de 100 mg de BrCN, disuelto en acetonitrilo (MeCN), por un gramo de soporte cromatográfico, y finalmente esta mezcla se deja incubando por 10 minutos entre 4-5 °C con el fin de asegurar el mayor posible número de grupos imidocarbonatos cíclicos [39-42].

Esta activación da lugar a un decremento en la capacidad de hinchamiento de la matriz y le proporciona una mayor estabilidad térmica debido a que el imidocarbonato reacciona con los hidroxilos de las cadenas vecinas aumentando el entrecruzamiento entre ellas (Fig. 6).



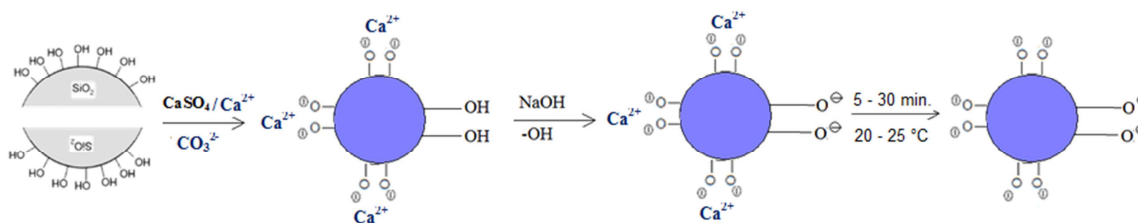
**Figura 6.** Método de activación de soportes de cromatografía con BrCN [39-42].

Asimismo, en una segunda instancia se propuso la activación de soportes cromatográficos, en particular de perlas de vidrio en el medio de hidróxido de sodio 0.1 M, según el mecanismo que se presenta en la Fig. 7. Esta activación propuesta tiene como ventaja de que la activación se logra en un solo paso, en un intervalo de tiempo de 5 – 30 min a temperatura ambiente entre 20 – 25 °C y además, de manera amigable al medio ambiente en comparación con la metodología con BrCN.



**Figura 7.** Activación de perlas de sílice, propuesta, mediante NaOH.

Para mejorar la activación, el procedimiento anterior se modificó con un tratamiento previo de las perlas de sílice con  $\text{Ca(II)}$  0.01 M incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente 20 – 25 °C (Fig. 8).



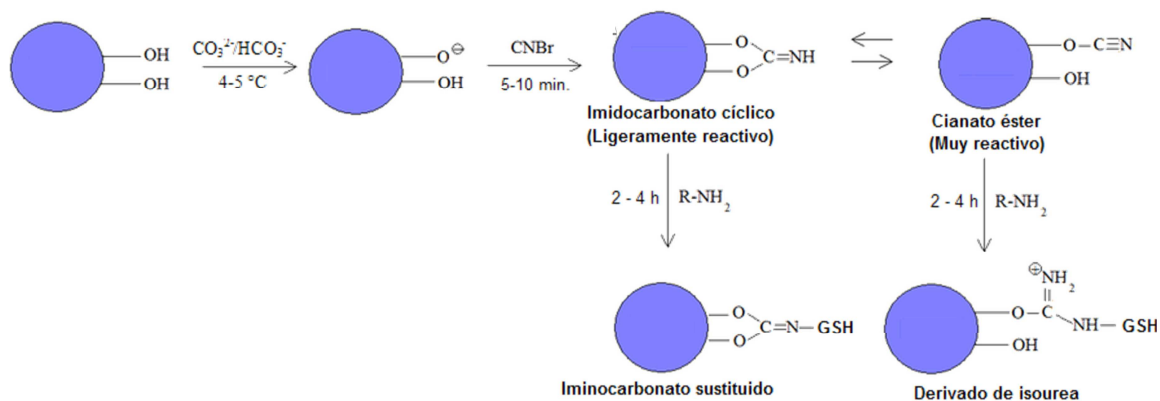
**Figura 8.** Activación de perlas de sílice, propuesta, con  $\text{Ca(II)}$  y NaOH.

Como se aprecia en la Fig. 8, con adición de  $\text{Ca(II)}$  se espera favorecer la disociación de grupos silanol de la superficie.

#### IV.2. Inmovilización de GSH en soportes activados

Los soportes cromatográficos (Sepharose 6B y perlas de sílice), después de su activación, fueron modificados mediante inmovilización del GSH. En el procedimiento con BrCN, después de la activación, los soportes fueron lavados en frío con HCl 1 mM para preservar los grupos cianato. Enseguida se lavaron con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y luego con solución tampón de  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ , a pH 10.9 (5 mL por gramo de soporte). Para inmovilizar GSH, los soportes fueron transferidos, a una solución de GSH (10 mg por gramo de soporte) en 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  pH 8.5, y las mezclas se dejaron durante 2 horas entre 2 – 8 °C. Después, el soporte modificado con GSH se lavó con la solución tampón de acoplamiento ( $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$  pH 10.9) y los grupos que no reaccionan se bloquean con glicina 0.2 M por 2 horas entre 2 – 8 °C. Finalmente se lavó extensivamente para remover la solución de bloqueo (glicina 0.2 M) primero con una solución tampón de acetatos 0.1 M, pH 4, y luego con una solución tampón de  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ , pH 10.9. Una vez obtenido, antes de su uso el soporte modificado con GSH se conserva con NaCl 0.1 M de 2 – 8 °C [76, 77].

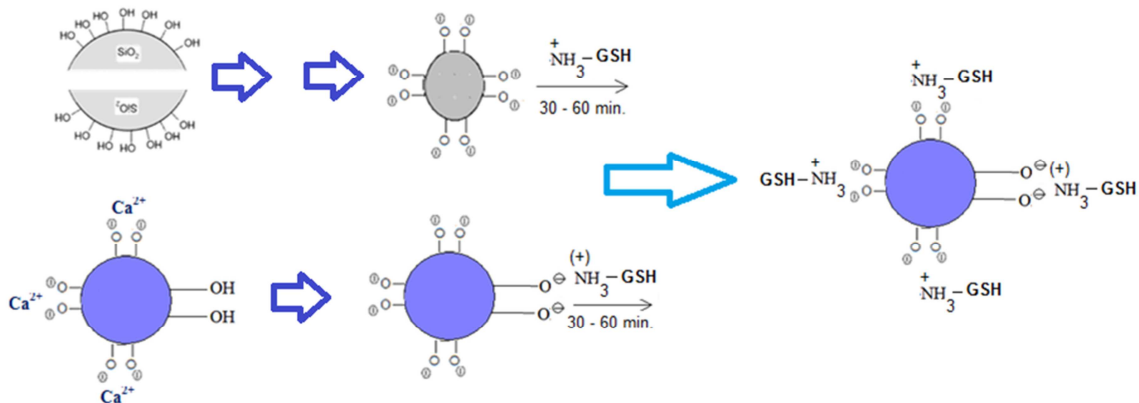
En el procedimiento con BrCN, la unión del GSH al soporte cromatográfico puede llevarse a cabo mediante interacción del grupo amino de glutatión con el grupo  $-O-CN$  del sitio activado, formando un derivado de isourea que es cargado positivamente en condiciones de pH neutro y por lo tanto inestable. Por otro lado, la unión más estable se realiza por medio de los grupos imidocarbonato cíclicos ( $-O-C(NH)-O-$ ) y el mismo grupo terminal  $NH_2$  de glutatión; en ambos casos sin embargo el grupo tiol ( $-SH$ ) del GSH queda libre para su interacción con iones metálicos (Fig. 9).



**Figura 9.** Modificación con GSH de los soportes activados mediante BrCN [76].

Las desventajas del procedimiento con BrCN incluyen la toxicidad de bromuro de cianógeno y su sensibilidad a la oxidación.

Como una alternativa, en este trabajo se ha explorado la interacción del GSH con las perlas de vidrio de sílice ( $75\text{ }\mu\text{m}$  y  $0.5\text{ mm}$  de diámetro), activadas con NaOH  $0.1\text{ M}$  sin y con adición de iones calcio  $0.01\text{ M}$ , donde la inmovilización ocurre mediante fuerzas electrostáticas (aunque usualmente la inmovilización se realiza mediante unión covalente). En esta modificación el GSH en un medio de solución tampón de  $CO_3^{2-}/HCO_3^-$ , pH  $8.2$  tiene su grupo amino terminal protonado ( $-NH_3^+$ ,  $pK_{a(NH_2)} = 8.75$ ) y por ello atraído electrostáticamente hacia la gran área superficial de las perlas de sílice cargadas negativamente, dejando el grupo tiol ( $-SH$ ) del GSH libre (Fig. 10).

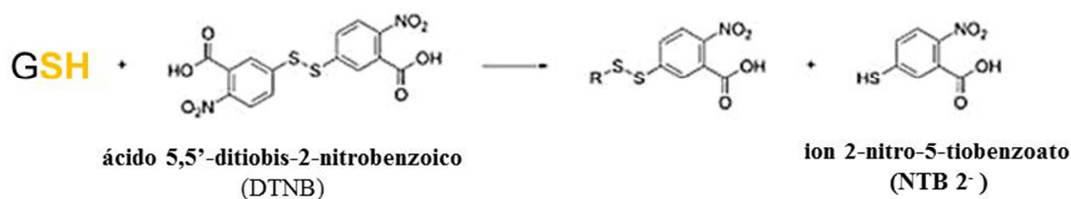


**Figura 10.** Modificación con GSH de las perlas de sílice activadas con NaOH y Ca(II)/NaOH.

A continuación, se estudió la eficacia de inmovilización de GSH, por medio de ambos procedimientos de modificación.

### IV.3. Caracterización de soportes de cromatografía de afinidad activados y modificados con GSH

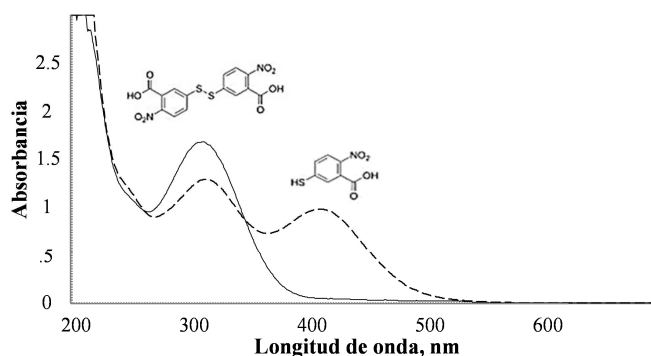
La caracterización de los soportes cromatográficos modificados con GSH se realizó en función del contenido de grupos tioles (-SH) presentes en la superficie de los mismos. Esta determinación se realizó empleando el procedimiento propuesto por Ellman <sup>[78]</sup>, la cual consiste en la cuantificación de los tioles libres o asociados a proteínas mediante la reacción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), hasta formar el anión 2-nitro-5-benzoato (NTB<sup>2-</sup>) (Fig. 11). Para ello, se preparó una solución amortiguadora compuesta por CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pH 8.2. El reactivo de trabajo DTNB, se preparó disolviendo 29.7 mg de DTNB en 25 ml de metanol.



**Figura 11.** Reacción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DNTB) con el GSH, hasta formar el anión 2-nitro-5-benzoato (NTB<sup>2-</sup>).

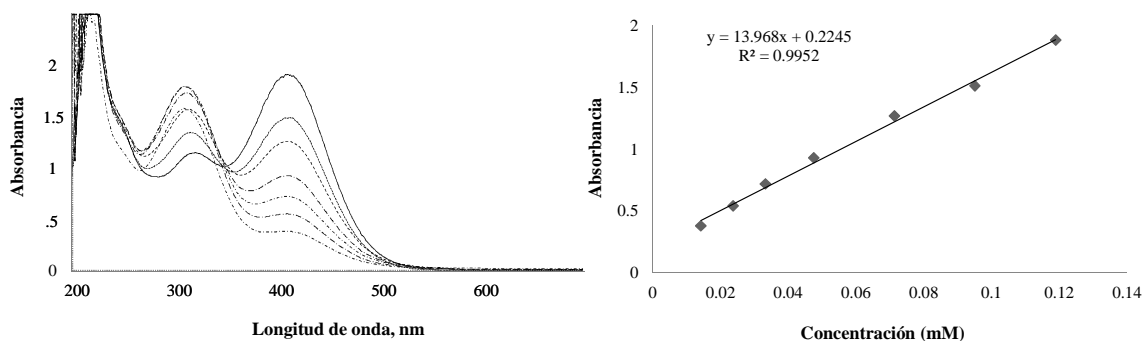
Esta reacción es rápida y estequiométrica; un mol de tiol produce un mol de NTB<sup>2-</sup>, especie que presenta banda de absorción con el máximo en 412 nm, longitud de onda en la que se mide absorbancia para la cuantificación indirecta del GSH (Fig. 12). Para ello se

preparó una serie de soluciones estándar de glutatión (GSH); a partir de una solución patrón de GSH 50 mM, se prepararon las soluciones de calibración de 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM GSH.



**Figura 12.** Espectro UV-Vis del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DNTB), con (---) y sin (—) GSH 0.05 mM, pH 8.2.

A 50  $\mu$ L de las soluciones de calibración, de GSH, se les adicionó 150  $\mu$ L de tampón de carbonatos pH 8.2, 800  $\mu$ L de metanol y 50  $\mu$ L de DTNB (1.19 mg/mL), se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se adquirió el espectro UV-Vis de estas soluciones y se midió absorbancia en 412 nm (máximo de la banda de absorción) para obtener la cuantificación indirecta del GSH (Fig. 13).

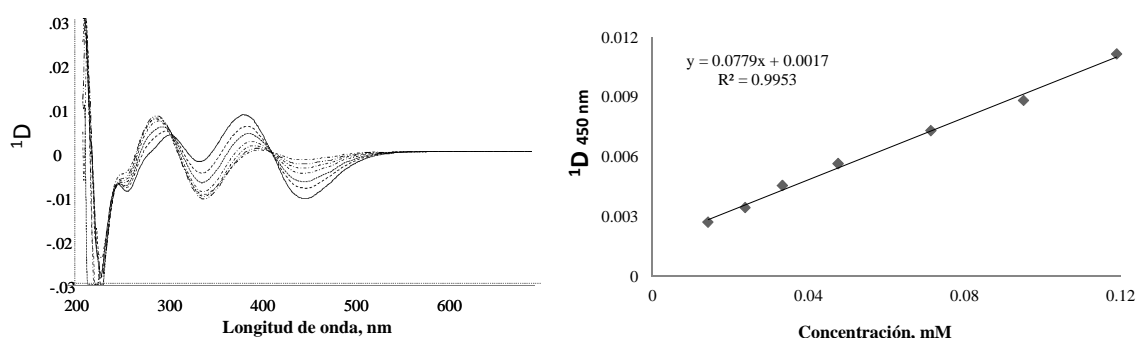


**Figura 13.** Espectros UV-Vis y curva de calibración de la reacción de DTNB con GSH (0.014 mM – 0.120 mM), pH 8.2.

En la caracterización de soportes obtenidos mediante inmovilización de glutatión, se cuantificó GSH unido a la superficie en cada uno de los casos. Para ello, se utilizó el mismo procedimiento espectrofotométrico descrito por Ellman <sup>[78]</sup>, con algunas modificaciones. En aplicación a la evaluación de soportes, era necesario eliminar la contribución de turbidez de las muestras, por lo que se utilizó la técnica de la primera derivada (<sup>1</sup>D), utilizando como señal analítica <sup>1</sup>D<sub>450 nm</sub> para determinar la cantidad de grupos –SH asociados a los soportes



modificados. En la Fig. 14 se presenta la primera derivada de los espectros UV-Vis y la curva de calibración obtenida para el GSH.



**Figura 14.** Primera derivada de espectros UV-Vis y curva de calibración obtenida para la determinación de GSH (0.0143 mM – 0.120 mM), pH 8.2.

A continuación se presentan parámetros analíticos obtenidos en el proceso de calibración, como límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), longitud de onda ( $\lambda$ ), coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) y función de calibración, obtenidos para la cuantificación analítica de grupos  $-SH$  (Tabla 5).

**Tabla 5.** Parámetros analíticos de UV-Vis y UV-Vis  $^1D_{nm}$  para la reacción entre DTNB con GSH.

Método UV-Vis (señal analítica - A)				
$\lambda$ (nm)	LD ( $\mu M$ )	LC ( $\mu M$ )	$R^2$	Función de Calibración
412	0.54	1.82	0.99	$y=1.40 \times 10^3 x + 0.23$
Método UV-Vis (señal analítica - $^1D$ )				
$\lambda$ (nm)	LD ( $\mu M$ )	LC ( $\mu M$ )	$R^2$	Función de Calibración
450	0.61	2.02	0.98	$y=0.08x + 0.0017$

De esta manera y utilizando la función de calibración se determinó espectrofotométricamente la cantidad de grupos  $-SH$ , en micromoles por gramo de soporte cromatográfico.

#### IV.3.1. Caracterización de soportes de cromatografía de afinidad activados con CNBr y modificados con GSH

En una primera instancia se caracterizaron los soportes de cromatografía de afinidad, Sepharose 6B (250  $\mu m$  – 350  $\mu m$  de diámetro) y perlas de vidrio de sílice (0.55 mm de diámetro), activados con BrCN y modificados con GSH.

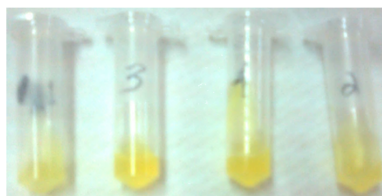
Una cantidad entre 0.1 – 0.5 g de soporte modificado se colocó en un tubo eppendorf de 2 mL y se le adicionó 150  $\mu L$  de tampón de carbonatos pH 8.2, 800  $\mu L$  de

metanol y 50  $\mu\text{L}$  de DTNB, se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Trascorrido ese tiempo, se registró el espectro de absorción y se obtuvo la primera derivada midiendo la señal como  $^1\text{D}_{450\text{nm}}$  para fines de cuantificación. En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para Sepharose 6B, representando la cantidad de grupos tiol en  $\mu\text{mol}$  por un gramo de soporte modificado. Se determinó una relación de  $73 \pm 21.8$   $\mu\text{mol}$  de grupos  $-\text{SH}$  por gramo de gel de sepharose 6B.

**Tabla 6.** Valores de la señal analítica y concentración de grupo tiol por gramo de geles sepharose 6B, activados por BrCN y modificados con GSH, (resultados de seis replicas independientes).

Sepharose 6B (g)	$^1\text{D} (\times 10^{-3})$	$-\text{SH} [\mu\text{mol/g del soporte}]$
0.17	1.80	78.0
0.23	3.40	94.0
0.28	4.60	132
0.48	4.70	80.0
0.51	3.00	32.0
0.50	5.20	92.0
Promedio $\pm$ DE	$3.80 \pm 1.28$	$73.0 \pm 21.8$

Así mismo, se puede demostrar físicamente la presencia de grupos  $-\text{SH}$  en los geles de sepharose 6B modificados con GSH debido a que estos presentan una coloración amarilla en el ensayo con DNTB (Fig. 15).



**Figura 15.** Fotografías del ensayo DNTB para la determinación de GSH inmovilizado en geles de Sepharose 6B.

De la misma manera se determinó la concentración de grupos  $-\text{SH}$  inmovilizados en la superficie de perlas de vidrio de sílice activadas con BrCN y modificadas con GSH. En la Tabla 7 se presenta la concentración en  $\mu\text{mol}$  de grupos  $-\text{SH}$  por gramo de perlas de sílice activadas con BrCN y modificadas mediante su interacción con GSH.

**Tabla 7.** Valores de la señal analítica ( $^1\text{D}$ ) y concentraciones del GSH inmovilizado en perlas de sílice, activadas por BrCN obtenidos en el ensayo espectrofotométrico con DTNB (dos replicas independientes).

Perlas de Sílice (g)	<sup>1</sup> D(x10 <sup>-3</sup> )	-SH [μmol/g de soporte]
0.52	8.60	85.0
0.54	12.5	129
Promedio ± DE	10.6 ± 2.76	107 ± 31.10

Para las perlas de vidrio de sílice se determinó una concentración de  $107 \pm 31.1$  μmol de grupos -SH por gramo de perlas de vidrio. Puede apreciarse un mayor contenido de grupos -SH unido a las perlas sílice en comparación con los geles de Sepharose 6B, esto puede deberse a una mayor cantidad de grupos hidroxilo (-OH) superficiales en las perlas de sílice.

#### IV.3.2 Caracterización de perlas de sílice activadas con NaOH/Ca(II) y modificadas con GSH

Con el fin de examinar si existe el efecto inductivo de iones de Ca(II) en la activación de soportes cromatográficos de perlas de vidrio, el soporte activado se puso en contacto con GSH y se evaluó la captación de glutatión en función del tiempo, utilizando el mismo ensayo espectrofotométrico de la reacción del GSH.

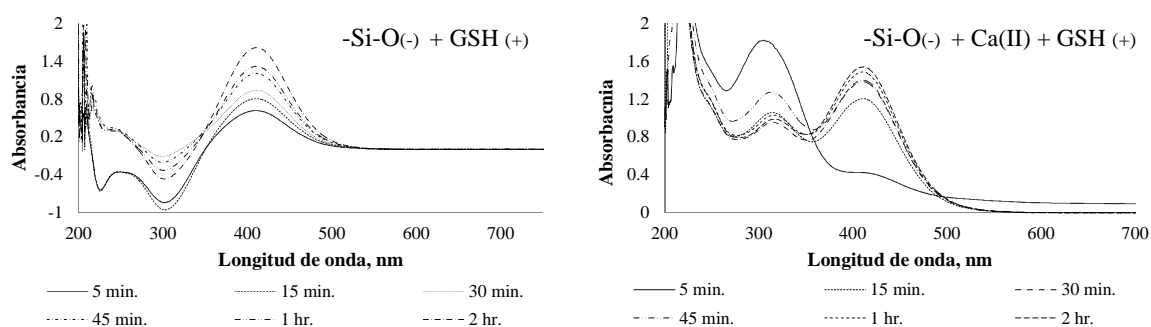
Para las perlas de vidrio de sílice, de 0.55 mm de diámetro, incubadas por 15 min. con Ca(II) 0.01M y activadas por 30 min con NaOH 0.1 M, se determinó la cantidad de grupos -SH/gramo de soporte, mediante la metodología con DTNB, en función del tiempo de interacción con GSH (Tabla 8).

**Tabla 8.** Cantidad de μmol de grupos -SH por un gramo de perlas de vidrio de 0.55 mm de diámetro.

Masa de Perlas 0.55 mm = 0.43 g		
Tiempo	A <sub>412 nm</sub>	-SH [μmol/g de soporte]
5 min	0.65	72.0
15 min	0.68	77.0
30 min	0.71	81.4
45 min	0.82	105
1 hr	0.86	112
5 hr	0.87	115
24 hr	0.89	118

<b>30 min – 24 h</b>	<b>Promedio ± DE</b>	<b>106 ± 14.7</b>
----------------------	----------------------	-------------------

A continuación, se llevaron los experimentos similares utilizando perlas de sílice de tamaño micrométrico (diámetro 75  $\mu\text{m}$ ) con el fin de observar posible efecto del tamaño de partícula en la eficacia de la captación de GSH en este soporte. Estas perlas de sílice fueron activadas con NaOH, sin y con incubación previa de Ca(II) 0.01M. Las perlas activadas se pusieron en contacto con GSH y se evaluó la captación de glutatión en función del tiempo, utilizando el ensayo espectrofotométrico con DTNB (Fig. 16).



**Figura 16.** Estudio espectrofotométrico de la reacción del GSH, captado por las perlas de sílice 75  $\mu\text{m}$  de diámetro, con DTNB, en función del tiempo de interacción y activadas mediante NaOH con y sin incubación de Ca(II).

Se determinó el contenido de grupos  $-\text{SH}$  por gramo de perlas de sílice activadas, en función del tiempo de interacción con GSH (Tabla 9). Se logró en dos horas, un máximo de 184.3  $\mu\text{mol}$  de grupos  $-\text{SH}$  por gramo de perlas de sílice activadas con NaOH y 194.12  $\mu\text{mol}$  de grupos  $-\text{SH}$  por gramo de perlas de sílice activadas mediante la incubación previa con Ca(II) y su posterior activación con NaOH.

**Tabla 9.** Concentración en  $\mu\text{mol}$  de grupos  $-\text{SH}$  por gramo de perlas de sílice, de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro, activadas mediante NaOH sin y con incubación de Ca(II).

<b>0.51 g perlas vidrio 75 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b><math>-\text{Si-O}^{(-)} + \text{GSH}^{(+)}</math></b>		<b><math>-\text{Si-O}^{(-)} + \text{Ca(II)} + \text{GSH}^{(+)}</math></b>	
	<b><math>A_{412 \text{ nm}}</math></b>	<b><math>-\text{SH}</math> [<math>\mu\text{mol/g}</math> de soporte]</b>	<b><math>A_{412 \text{ nm}}</math></b>	<b><math>-\text{SH}</math> [<math>\mu\text{mol/g}</math> de soporte]</b>
5 min.	0.62	55.0	0.42	28.0
15 min.	0.80	80.0	1.20	137
30 min.	0.94	100	1.38	163
45 min.	1.21	137	1.40	165
1 h.	1.32	153	1.48	177

2.00 h.	1.61	184	1.54	194
<b>30 min – 2 h</b>	<b>Promedio ± DE</b>	144 ± 34.9	<b>Promedio ± DE</b>	174 ± 14.2

Se puede apreciar, con los resultados obtenidos hasta el momento, que la presencia de iones Ca(II) favorece la activación de los soportes cromatográficos, con las perlas de sílice, ya que se refleja con el aumento de la captación de grupos –SH por gramo de soporte.

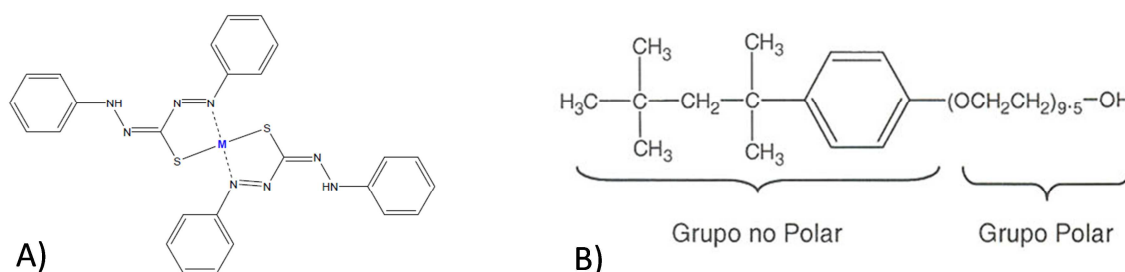
#### **IV.4. Ensayos espectrofotométricos utilizados en la determinación de iones metálicos**

Los soportes de cromatografía de afinidad modificados con GSH fueron utilizados para la captación de iones metálicos. Entre los iones metálicos, se utilizaron metales no esenciales como cromo, mercurio, cadmio, plomo y metales esenciales como el zinc. Se prepararon soluciones estándar de sales metálicas de  $K_2Cr_2O_7$ ,  $HgCl_2$ ,  $Cd(Ac)_2$ ,  $Pb(NO_3)_2$ ,  $ZnSO_4$  en agua desionizada a una concentración del metal de 10 mg/L y cada una de estas soluciones se puso en contacto con los soportes cromatográficos modificados, evaluando su captación en función del tiempo. Este estudio se realizó mediante la medición de la concentración residual de estos iones metálicos a tiempos, entre 5, 10, 15, 20 minutos y 20 horas. Terminado el experimento, se determinó también la cantidad de ion metálico retenido en el soporte cromatográfico mediante un tratamiento con  $HNO_3$  al 30 % v/v.

La cuantificación de los iones metálicos se realizó a través de ensayos espectrofotométricos UV-Vis. El cromo hexavalente Cr(VI) se determinó mediante el método establecido por la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-044-SCFI-2001, que se basa en la reacción de Cr(VI) con la 1,5-difenilcarbazona (DPC), disuelta en acetona, en medio ácido ( $H_2SO_4$  0.2 N) formando el complejo de transferencia de carga Cr(III)-1,5-difenilcarbazona de color violeta. La cuantificación se llevó a cabo midiendo absorbancia en 540 nm; en cumplimiento de ley de Lambert-Beer, dicha absorbancia fue directamente proporcional a la concentración de cromo hexavalente en la muestra <sup>[79]</sup>.

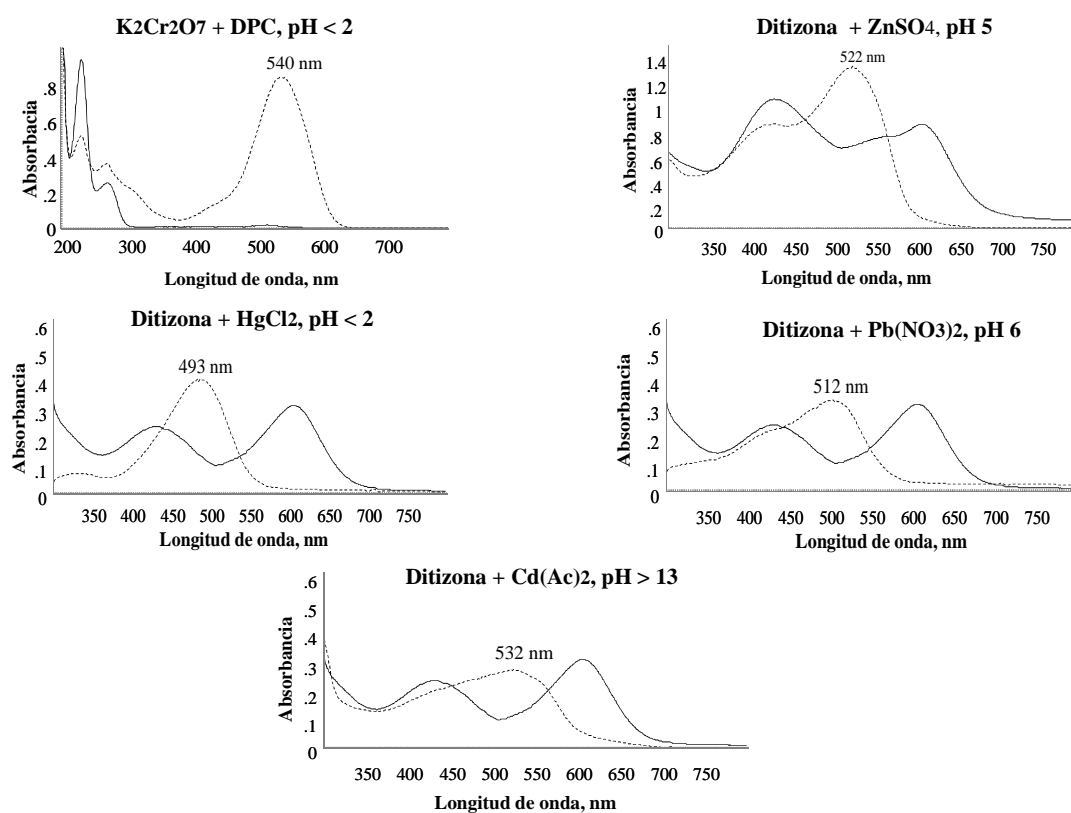
La determinación de Zn(II), Hg(II), Pb(II) y Cd(II) se realizó formando respectivos complejos con ditizona ( $H_2Dz$ ) o difeniltiocarbazona (3-mercapto-1,5-difenilfomazan) <sup>[80, 81]</sup> (Fig. 17 A) en un medio micelar de Tritón X-100 (surfactante no-iónico, Fig. 17 B) al 5 % v/v estabilizado en HCl 0.1 M <sup>[82]</sup>. Una importante aplicación analítica de las micelas de surfactantes no-iónicos es la capacidad de disolver algunos complejos metálicos poco solubles en solución acuosa, evitando así extracciones con solventes orgánicos.

Publicaciones recientes han demostrado que el Triton X-100 proporciona un medio apropiado para solubilizar complejos metálicos, en efecto Cheng-Hi <sup>[83]</sup> investigó la sensibilidad y selectividad de la determinación de cadmio en presencia de surfactantes no iónicos.



**Figura 17.** A) Ditionato metálico (M = Hg(II), Zn(II) y Cd(II)), B) Estructura del Tritón X-100.

Para la determinación espectrofotométrica, se preparó una solución de Tritón X-100 al 5% en HCl 0.1 M. A 30 mL de esta solución se adicionó 50 mg de H<sub>2</sub>Dz, se agitó (formando un medio micelar), y se filtró. El Hg(II) se determinó en medio ácido HCl 1N, pH 1, y el Cd(II) en NaOH 10% m/v. Finalmente para el caso del análisis de Pb(II) y Zn(II) su determinación se llevó a cabo en un medio de solución tampón de fosfatos a pH 6 y 5 respectivamente.



**Figura 18.** Espectros de absorción UV-Vis de diferentes iones metálicos con 1,5 difenilcarbazida (DPC), para Cr(VI) 4.5 mg/L, y ditizona (H<sub>2</sub>Dz) para Zn(II) 10 mg/L, Hg(II) 10 mg/L, Pb(II) 8mg/L y Cd(II) 8 mg/L. (—) DPC, H<sub>2</sub>Dz; (----) DPC + Cr(VI), H<sub>2</sub>Dz + Zn(II), Hg(II), Pb(II), Cd(II).

En la Figura 18 se presentan los espectros de absorción de los complejos formados para la determinación de los iones metálicos antes mencionados. En cada uno de los casos, se utilizó la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción para cuantificar iones metálicos en experimentos de su captación por soportes cromatográficos obtenidos en el presente trabajo.

La cuantificación de estos iones se llevó a cabo mediante la curva de calibración utilizando los intervalos de concentración de 0.57 – 5.72 mg/L para Cr(VI), 1.25 – 12.5 mg/L para Zn(II), 1.53 – 12.3 mg/L para Hg(II), 3 – 8 mg/L para Pb(II) y 3.64 – 9.10 mg/L para Cd. Los parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración se presentan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración para la determinación de iones metálicos por ensayos espectrofotométricos UV-Vis con 1,5-difenilcarbazida y ditizona.

Ión Metálico	$\lambda$ , nm	Intervalo de Concentración (mg/L)	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	LC ( $\mu\text{g/L}$ )	Función de Calibración	R <sup>2</sup>
Cr(VI)	540	0.57 – 5.72	4.33	14.4	$y = 0.19x - 0.03$	0.99
Zn(II)	522	1.25 – 12.5	8.18	27.3	$y = 0.09x + 0.01$	0.99
Hg(II)	493	1.53 – 12.3	15.7	52.2	$y = 0.03x + 0.09$	0.99
Pb(II)	512	3.00 – 8.00	41.5	114	$y = 0.08x - 0.18$	0.99
Cd(II)	532	3.64 – 9.10	53.7	179	$y = 0.03x - 0.04$	0.99

En las siguientes secciones se describen resultados obtenidos en los ensayos de captación para cada uno de los soportes modificados. En estos experimentos se puso en contacto 0.5 g del soporte cromatográfico modificado con GSH con 10 mL de una solución conteniendo la concentración de ión metálico de 10 mg/L. La determinación de iones en la solución se llevó a cabo después de 5, 10, 15, 20 minutos y 20 horas de contacto con el soporte, tomando en cada uno de los casos 0.5 mL de la solución. Finalizando el tiempo (20 h), se recuperó el soporte de la solución, se le agregó 3 mL de HNO<sub>3</sub> al 30 % v/v para liberar los iones retenidos en el soporte y para su determinación mediante los mismos ensayos espectrofotométricos.

#### IV.4.1 Determinación de iones metálicos con geles de Sepharose 6B activados con BrCN y modificados con GSH y de su concentración residual en la solución

Los resultados obtenidos poniendo en contacto las soluciones de iones individuales con Sepharose 6B modificada se presentan en la Tabla 11. Para mayor claridad, se reporta el porcentaje de captación de cada uno de los iones metálicos en función del tiempo de contacto con el soporte. En la misma Tabla 11 se presentan también los resultados de determinación de los mismos iones retenidos en el soporte después de las 20 h de contacto con la solución; se observa claramente que el orden decreciente de la cantidad de ión metálico retenido en el soporte fue  $\text{Cr(VI)} > \text{Zn(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Hg(II)}$ . Además se presenta el grado de saturación de soporte fue evaluado como la relación de moles de metal captado por moles de grupos tiol presentes en el soporte. Finalmente se presenta el balance de masa evaluado en este experimento ( $[\text{concentración residual a 20 h}] + [\text{concentración correspondiente al ion retenido 20 h}] / [\text{concentración inicial}]$ ), donde se obtuvieron los valores en el intervalo 91.2 – 96.5 % de recuperación, lo que indica la confiabilidad de los datos obtenidos en estos análisis.

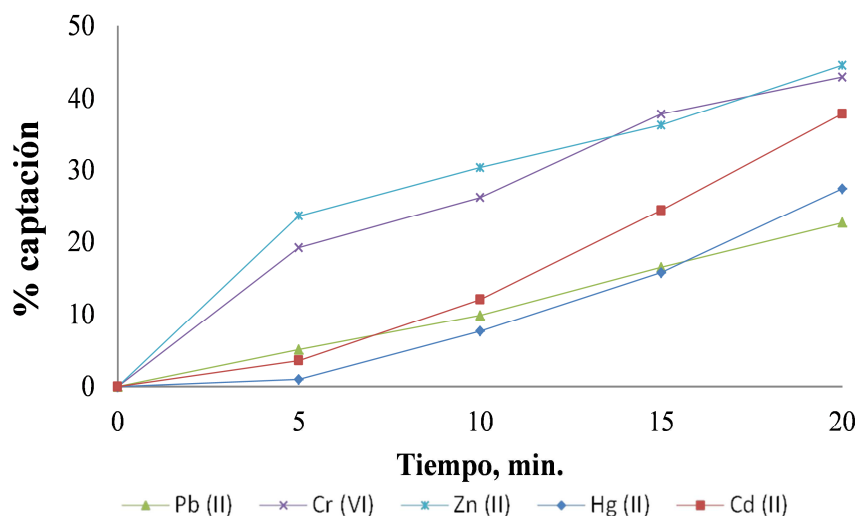
**Tabla 11.** Porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto con geles de Sepharose 6B activados con BrCN y modificados mediante la unión con GSH, cantidad de ion metálico captado, así como su porcentaje de recuperación y su grado de saturación.

<b>% de captación en el soporte</b>					
<b>Tiempo</b>	<b>Pb(II)</b>	<b>Cr(VI)</b>	<b>Zn(II)</b>	<b>Hg(II)</b>	<b>Cd(II)</b>
<b>0 min</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>5 min</b>	5.10	19.2	23.6	1.00	3.60
<b>10 min</b>	9.90	26.2	30.4	7.66	12.0
<b>15 min</b>	16.5	37.8	36.3	15.8	24.4
<b>20 min</b>	22.7	43.0	44.6	27.4	37.9
<b>20 h</b>	37.0	51.4	47.9	30.5	41.8
<b>Masa de metal retenida en soporte, µg.</b>					
<b>20 h</b>	31.0	46.5	41.7	27.0	33.0
<b>Balance de masa: % de recuperación.</b>					
<b>20 h</b>	93.9	95.1	93.8	96.5	91.2
<b>Grado de saturación: moles metal/moles SH, %.</b>					
<b>20 h</b>	0.41	2.49	1.75	0.37	0.82

Para mejorar apreciación visual, los cambios de porcentaje de captación de cada uno de los iones, conforme aumentó el tiempo de contacto con el soporte se presentan en la



Figura 19. Con estos experimentos queda claro que los iones del estudio presentan diferente afinidad al GSH, de acuerdo con lo esperado.



**Figura 19.** Gráfica de los cambios de porcentaje de captación de iones metálicos con el tiempo de contacto (5, 10, 15 y 20 minutos) con geles de Sepharose 6B activados con BrCN y modificados mediante la unión con GSH.

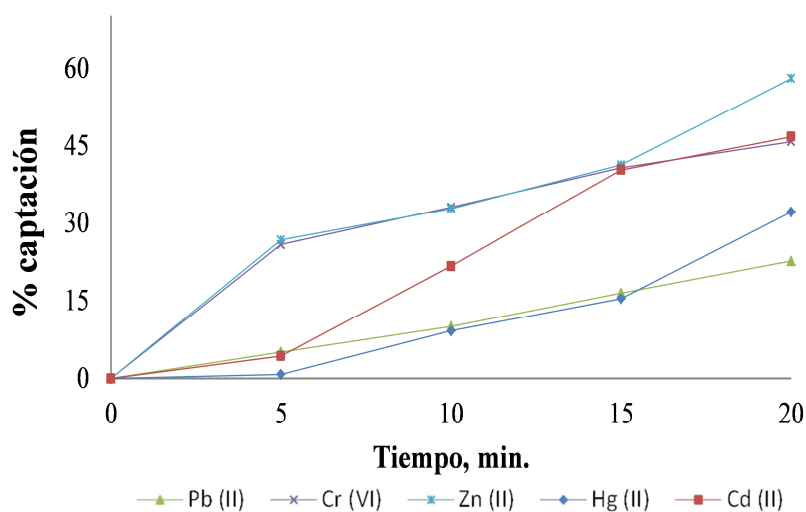
#### IV.4.2 Determinación de iones metálicos retenidos en perlas de sílice, de 0.55 mm de diámetro, activadas con NaOH y modificadas con GSH y de su concentración residual en la solución

Los resultados obtenidos poniendo en contacto las soluciones de iones individuales con perlas de sílice, de 0.55 mm de diámetro, modificadas se presentan en la Tabla 12. Para mayor claridad, se presentan los porcentajes de captación de iones metálicos conforme aumenta el tiempo de contacto con el soporte. Asimismo, en la Tabla 12 se presentan también los resultados de la determinación de los mismos iones retenidos en el soporte después de las 20 h de contacto con la solución; se observa claramente que el orden decreciente de la cantidad de ión metálico retenido en el soporte fue: Zn(II) > Cd(II) > Cr(VI) > Hg(II) > Pb(II). Además se presenta su grado de saturación de moles de metal captado por moles de grupos tiol presentes en el soporte. Finalmente se presenta el balance de masa evaluado en este experimento, donde se obtuvieron los valores en el intervalo 87.4 % - 96.3 % de recuperación, lo que indica la consistencia de los datos obtenidos en estos análisis.

**Tabla 12.** Porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto con perlas de sílice, de 0.55 mm, activadas con NaOH y modificadas mediante la interacción con GSH y cantidad de ion metálico captado, así como su porcentaje de recuperación y su grado de saturación.

% de captación en el soporte					
Tiempo	Pb(II)	Cr(VI)	Zn(II)	Hg(II)	Cd(II)
0 min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5 min	5.10	25.8	26.7	0.80	4.30
10 min	10.0	33.0	32.7	9.18	21.6
15 min	16.5	40.7	41.2	15.4	40.2
20 min	22.7	45.8	58.0	32.1	46.7
20 h	37.0	54.5	64.8	46.3	58.2
Masa de metal retenida en soporte, $\mu\text{g}$ .					
20 h	31.0	47.0	57.2	42.6	45.6
Balance de masa: % de recuperación.					
20 h	93.9	92.6	92.4	96.3	87.4
Grado de saturación: moles metal/moles SH, %.					
20 h	0.37	2.27	2.16	0.52	1.00

Para mejor apreciación visual, los cambios de porcentajes de captación de cada uno de los iones en la solución, conforme aumentó el tiempo de contacto con el soporte se presentan en la Fig. 20. Con estos experimentos queda claro que los iones del estudio presentan diferente afinidad al GSH, de acuerdo con lo esperado.



**Figura 20.** Gráfica de los cambios de porcentaje de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto (5, 10, 15 y 20 minutos) con perlas de sílice de 0.55 mm, activadas con NaOH y modificados mediante la interacción con GSH.

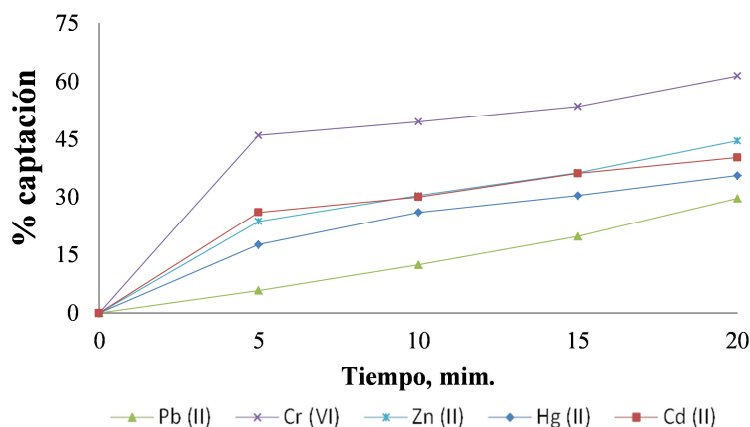
#### IV.4.3 Determinación de iones metálicos retenidos en perlas de sílice, de 75 $\mu\text{m}$ de diámetro, activadas con NaOH y modificadas con GSH y de su concentración residual en la solución

Los resultados obtenidos poniendo en contacto las soluciones de iones individuales con perlas de sílice, de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro, activadas con NaOH y modificadas con GSH se presentan en la Tabla 13. Para mayor claridad, se presentan los porcentajes de captación de iones metálicos conforme aumenta el tiempo de contacto con el soporte. En la misma Tabla 13 se presentan también los resultados de determinación de los mismos iones retenidos en el soporte después de las 20 h de contacto con la solución; se observa claramente que el orden decreciente de la cantidad de ión metálico retenido en el soporte fue: Cr(VI) > Zn(II) > Cd(II) > Hg(II) > Pb(II). Además se presenta su grado de saturación de moles de metal captado por moles de grupos tiol presentes en el soporte. Finalmente se presenta el balance de masa evaluado en este experimento, donde se obtuvieron los valores en el intervalo 86.8 % - 92.4 % de recuperación, lo que indica la consistencia de los datos obtenidos en estos análisis.

**Tabla 13.** Porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto con perlas de sílice, de 75  $\mu\text{m}$ , activadas con NaOH y modificadas mediante la interacción con GSH y cantidad de ion metálico captado, así como su porcentaje de recuperación y su grado de saturación.

<b>% de captación en el soporte</b>					
<b>Tiempo</b>	<b>Pb(II)</b>	<b>Cr(VI)</b>	<b>Zn(II)</b>	<b>Hg(II)</b>	<b>Cd(II)</b>
<b>0 min</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>5 min</b>	5.80	46.0	23.6	17.6	26.0
<b>10 min</b>	12.4	49.6	30.4	26.0	30.0
<b>15 min</b>	19.7	53.6	36.3	30.3	36.1
<b>20 min</b>	29.6	61.4	44.6	35.6	40.3
<b>20 h</b>	38.6	64.3	62.2	53.4	59.2
<b>Masa de metal retenida en soporte, <math>\mu\text{g}</math>.</b>					
<b>20 h</b>	31.0	53.3	49.0	42.0	48.7
<b>Balance de masa: % de recuperación.</b>					
<b>20 h</b>	92.4	89.0	86.8	88.6	89.5
<b>Grado de saturación: moles metal/moles, SH.</b>					
<b>20 h</b>	0.30	2.10	1.51	0.44	0.88

Para mejor apreciación visual, los porcentajes de captación de cada uno de los iones en la solución, conforme aumentó el tiempo de contacto con el soporte se presentan en la Fig. 21. Con estos experimentos queda claro que los iones del estudio presentan diferente afinidad al GSH, de acuerdo con lo esperado.



**Figura 21.** Gráfica de los porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto (5, 10, 15 y 20 minutos) con perlas de sílice de 75  $\mu\text{m}$ , activadas con NaOH y modificadas mediante la interacción con GSH.

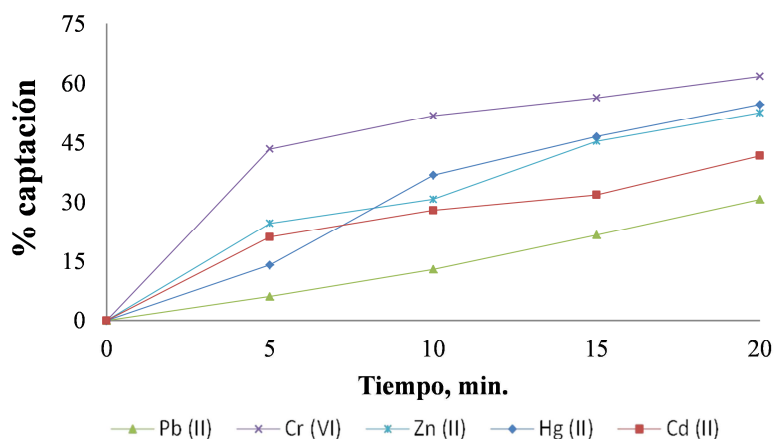
#### IV.4.4 Determinación de iones metálicos retenidos en perlas de sílice, de 75 $\mu\text{m}$ de diámetro, activadas con Ca(II)/NaOH y modificadas con GSH y de su concentración residual en la solución

Los resultados obtenidos poniendo en contacto las soluciones de iones individuales con perlas de sílice, de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro, activadas con Ca(II)/NaOH y modificadas con GSH se presentan en la Tabla 14. Para mayor claridad, se presentan los porcentajes de captación de iones metálicos conforme aumenta el tiempo de contacto con el soporte. En la misma Tabla 14 se presentan también los resultados de determinación de los mismos iones retenidos en el soporte después de las 20 h de contacto con la solución; se observa claramente que el orden decreciente de la cantidad de ión metálico retenido en el soporte fue: Cr(VI) > Zn(II) > Hg(II) > Cd(II) > Pb(II). Además se presenta su grado de saturación de moles de metal captado por moles de grupos tiol presentes en el soporte. Finalmente se presenta el balance de masa evaluado en este experimento, donde se obtuvieron los valores en el intervalo 86.8 % - 92.4 % de recuperación, lo que indica la consistencia de los datos obtenidos en estos análisis.

**Tabla 14.** Cambios de porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto con perlas de sílice, de 75  $\mu\text{m}$ , activadas con  $\text{Ca(II)/NaOH}$  y modificadas mediante la interacción con GSH y cantidad de ion metálico captado, así como su porcentaje de recuperación y su grado de saturación.

<b>% de captación en el soporte</b>					
<b>Tiempo</b>	<b>Pb(II)</b>	<b>Cr(VI)</b>	<b>Zn(II)</b>	<b>Hg(II)</b>	<b>Cd(II)</b>
<b>0 min</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>5 min</b>	6.10	43.4	24.7	14.1	21.2
<b>10 min</b>	13.0	51.8	30.8	36.8	28.0
<b>15 min</b>	21.7	56.4	45.4	46.5	31.9
<b>20 min</b>	30.7	61.8	52.6	54.7	41.7
<b>20 h</b>	39.2	66.3	65.3	63.1	61.8
<b>Masa de metal retenida en soporte, <math>\mu\text{g}</math>.</b>					
<b>20 h</b>	35.7	61.3	59.1	53.9	54.7
<b>Balance de masa: % de recuperación.</b>					
<b>20 h</b>	96.5	95.0	93.8	90.8	92.9
<b>Grado de saturación: moles metal/moles SH, %.</b>					
<b>20 h</b>	0.21	1.50	1.14	0.34	0.61

Para mejor apreciación visual, los cambios de porcentajes de captación de cada uno de los iones en la solución, conforme aumentó el tiempo de contacto con el soporte se presentan en la Fig. 22. Con estos experimentos queda claro que los iones del estudio presentan diferente afinidad al GSH, de acuerdo con lo esperado.



**Figura 22.** Gráfica de los cambios de porcentajes de captación de iones metálicos en solución con el tiempo de contacto (5, 10, 15 y 20 minutos) con perlas de sílice de 75  $\mu\text{m}$ , activadas con  $\text{CaSO}_4/\text{NaOH}$  y modificados mediante la interacción con GSH.

#### IV.4.5 Análisis comparativo de los resultados de ensayos para soluciones de iones individuales

En la Tabla 15 se presentan de manera resumida los resultados obtenidos poniendo en contacto las soluciones de cada uno de los iones individuales con soportes modificados. Para fines comparativos, en primer lugar se repiten brevemente las condiciones de modificación de cada uno de los soportes y la concentración de grupos tiol inmovilizados en cada uno de ellos ( $\mu\text{mol GSH/g}$  de soporte). Asimismo los porcentajes de remoción obtenidos después de 20 h de contacto de 0.5 g de soporte con 10 mL de la solución conteniendo 10 mg/L del ión metálico. Finalmente, se presenta la relación molar entre ión metálico retenido en soporte y la cantidad de grupos tiol disponibles en 0.5 g de este soporte utilizado en ensayo.

Estos resultados son muy prometedores. En primer lugar se observa que los mayores porcentajes de captación de iones metálicos se obtuvieron con las perlas de sílice, de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro, de acuerdo con el mayor número de grupos  $-\text{SH}$  inmovilizados respecto a otros soportes modificados. Por otra parte, la cantidad molar de cada uno de los iones captados por micromol de los grupos  $-\text{SH}$  disponibles en el soporte presentó el mismo orden decreciente en cada uno de los casos ( $\text{Cr(VI)} > \text{Zn(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Hg(II)}$ ), excepto en Sepharose 6B activada con BrCN, donde se invirtió el orden para Hg(II) y Pb(II) y en perlas de sílice 0.55 mm activadas con NaOH, el orden se invirtió para Cr(VI), Zn(II) y Cd(II)). Se deduce entonces que los soportes obtenidos son capaces de captar los iones metálicos en función a su afinidad específica al grupo  $-\text{SH}$ .

**Tabla 15.** Resumen de los resultados obtenidos en ensayos de captación de iones metálicos con soportes modificados y relación molar entre ión retenido y grupos  $-\text{SH}$  disponibles en 0.5 g.

Modificación del soporte				Resultados de captación									
soporte	activación	GSH, min	$\mu\text{mol GSH/g}$ soporte	Cr(VI)		Zn(II)		Hg(II)		Pb(II)		Cd(II)	
				%*	**	%*	**	%*	**	%*	**	%*	**
Sepharose 6B	BrCN 10 min	120 – 240	$73.0 \pm 22.0$	51.4	2.49	47.9	1.75	30.5	0.37	37.0	0.41	41.8	0.82
Perlas 0.55 mm	NaOH 30 min	30.0	$106 \pm 14.0$	54.5	2.27	64.8	2.16	46.3	0.52	37.0	0.37	58.2	1.00
Perlas 75 $\mu\text{m}$	NaOH 30 min	30.0	$144 \pm 35.0$	64.3	2.10	62.2	1.51	53.4	0.42	38.6	0.30	59.2	0.88
Perlas 75 $\mu\text{m}$	Ca(II) 15 min. NaOH 30 min	30.0	$174 \pm 14.0$	66.3	1.50	65.3	1.14	63.1	0.34	39.2	0.21	61.8	0.61

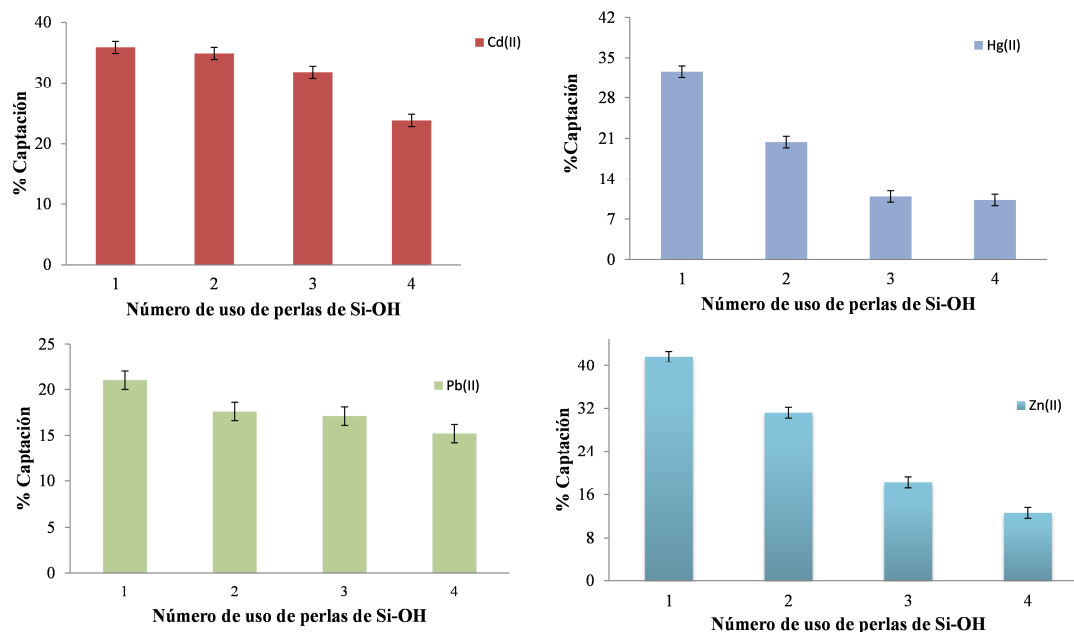
%* Porcentaje de captación después de 20 h.
** Relación molar entre ión retenido y la cantidad de -SH disponible en 0.5 g de soporte, %.

De esta manera, los soportes modificados con GSH podrían ser utilizados para evaluar la captación de metales/metaloideos presentes en aguas naturales y para poder estimar la “toxicidad efectiva” relacionada con la presencia de estos elementos sin necesidad de llevar a cabo el análisis de especiación de cada uno de ellos.

#### **IV.5. Pruebas de re-uso de perlas de sílice modificadas con GSH.**

Una característica importante a evaluar en un soporte modificado es su estabilidad, especialmente el número de veces que se podrían utilizar para la captación selectiva de metales pesados.

En este sentido, se estudió la repetibilidad de la captación de Hg(II), Zn(II), Pb(II), y Cd(II), por las perlas de sílice, de 0.55 mm de diámetro, modificadas con GSH (Si-O<sup>(-)</sup> <sup>(+)</sup>NH<sub>3</sub>-GSH) en función del número de ciclos de sorción. En este experimento, 0.5 g de soportes modificados se puso en contacto con 10 mL de las soluciones de iones metálicos individuales 10 mg/L durante 20 h, después se eliminó la fase acuosa, de cada una de las soluciones, y se trató los soportes con 3 mL de HNO<sub>3</sub> 30 % para librar los iones retenidos. En el extracto ácido se determinó la concentración de ión metálico y el porcentaje de captación, mientras que el soporte se lavó con agua y se volvió a modificar con GSH (sin etapa de activación), para utilizarse en el sucesivo ciclo de captación. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 23. Se observa que para el rendimiento de captación de iones Cd(II) y Pb(II) se mantiene hasta el tercer ciclo de modificación, pero para los iones Hg(II) y Zn(II) la capacidad de captación del soporte disminuyó en el segundo ciclo.



**Figura 23.** Porcentaje de captación de los iones metálicos en perlas de sílice activadas con NaOH, en sucesivos ciclos de modificación con GSH.

Es importante mencionar que los resultados obtenidos son alentadores ya que se logró la captación de iones metálicos durante por lo menos cuatro ciclos de sorción, lo que confirma que las perlas permanecen activadas después de su uso y después del tratamiento con ácido nítrico; en la solución de sosa; sin embargo en un trabajo futuro será necesario afinar las condiciones de la modificación para lograr un mayor número de los ciclos de re-uso. Por otro lado, debido a simplicidad y bajo costo del procedimiento de modificación, aún con necesidad de renovar la inmoilización de GSH, utilización de estos soportes para captación de metales en función de su afinidad al grupo  $-SH$  parece una alternativa viable.

#### IV.6. Efecto de ácidos húmicos en la sorción de iones metálicos en los soportes modificados con GSH

La materia orgánica, tanto soluble como suspendida, altera la distribución de los metales pesados en sistemas acuáticos, produciéndose una disminución de los niveles de iones libres y un aumento de la concentración de metales en forma de complejos orgánicos, en asociación con la fase coloidal, y suspensión así como en los sedimentos<sup>[84]</sup>. En este sentido las sustancias húmicas, tienen capacidad de interacción con iones metálicos, óxidos metálicos, hidróxidos metálicos y otras sustancias orgánicas y minerales para formar complejos solubles o insolubles en agua, de muy diferente naturaleza físico-química y



variable estabilidad. Los metales polivalentes son fuertemente complejados con las sustancias húmicas. Entre los factores que afectan su estabilidad cabe citar el estado de oxidación del elemento, polaridad o carga de la especie iónica y efectos de campo ligando. Generalmente la estabilidad del complejo aumenta con el aumento de la carga de especie iónica y disminuye con su radio iónico <sup>[85-90]</sup>. Puesto que la materia orgánica es abundante en aguas naturales, su presencia afecta potencialmente la biodisponibilidad y en consecuencia toxicidad de metales/metaloides presentes en estos sistemas. El intento de este trabajo ha sido lograr la captación de metales en función de afinidad de sus formas actuales al grupo tiol de GSH, por lo que se estudió el efecto de ácidos húmicos en dicha captación.

Para este propósito se utilizó ácido húmico de grado reactivo (Sigma) que son complejas agrupaciones macromoleculares en las que las unidades fundamentales son compuestos de quinona, fenol, catecol y restos de azúcares que juegan un papel vital en el control del comportamiento fisicoquímico de iones metálicos.

Se preparó la solución de ácidos húmicos disolviendo 1 g del reactivo Sigma en 100 mL de NaOH 0.1M; la mezcla se centrifugó y se utilizó para preparar soluciones de  $K_2Cr_2O_7$ ,  $HgCl_2$ ,  $Cd(Ac)_2$ ,  $Pb(NO_3)_2$ ,  $ZnSO_4$  a una concentración de 10 mg/L para cada uno de los iones metálicos. A las alícuotas de 10 mL de estas soluciones se agregaron 0.5 g de soporte modificado y después de 20 h del contacto, la solución se eliminó y el soporte fue tratado con  $HNO_3$  30 % v/v para evaluar la cantidad de metal retenido en el soporte. Así mismo se realizó un análisis comparativo entre la cantidad de especies metálicas que interaccionan con los soportes cromatográficos en presencia y ausencia de ácidos húmicos.

En esta parte del trabajo se utilizaron geles de Sepharose 6B y perlas de sílice (0.55 mm de diámetro), modificados con GSH. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 16. Se puede observar que la captación de metales fue afectada por la presencia de ácidos húmicos. El decremento de los porcentajes de captación en presencia de ácidos húmicos indica que los iones metálicos quedan acomplejados por las sustancias húmicas, lo que disminuye su afinidad hacia el grupo tiol libre del GSH inmovilizado en la superficie de los soportes cromatográficos. Estos resultados confirman que los soportes modificados tienen capacidad de enlazar las formas/especies de elementos en función de su labilidad (estrictamente relacionada con biodisponibilidad y toxicidad).

**Tabla 16.** Evaluación comparativa de porcentajes de captación de iones metálicos en soportes modificados en ausencia y en presencia de ácidos húmicos.

Ión metálico	Porcentajes de captación de iones metálicos en perlas de sílice (0.55 mm de diámetro) modificadas		Porcentajes de captación de iones metálicos en geles de Sepharose 6B modificado	
	Sin ácidos húmicos	Con ácidos húmicos	Sin ácidos húmicos	Con ácidos húmicos
<b>Cr(VI)</b>	54.5	16.8	51.4	9.70
<b>Zn(II)</b>	64.8	9.80	47.9	6.70
<b>Hg(II)</b>	46.3	12.6	30.5	6.04
<b>Pb(II)</b>	37.0	5.20	37.0	3.20
<b>Cd(II)</b>	58.2	10.8	41.8	6.50

#### **IV.7. Procedimiento de determinación de metales por MP-AES para su uso en evaluación de la captación de iones metálicos a partir de soluciones de sus mezclas**

Para evaluar captación de iones metálicos a partir de las soluciones mixtas, se decidió utilizar la técnica de espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma de microondas (MP-AES), debido a la posibilidad de adquirir las señales analíticas de todos los elementos en una sola corrida de muestra, con buena sensibilidad y sin necesidad de tratamiento alguno. Se utilizó el espectrómetro modelo 4100 MP-AES de Agilent Technologies, las condiciones instrumentales se presentan en Tabla 17.

**Tabla 17.** Condiciones de operación utilizados para el equipo Agilent 4100 MP-AES.

Parámetros instrumentales	Ajustes
Nebulizador	Concéntrico meinhard ®
Cámara de rociado	De un solo paso ciclónica de vidrio
Tiempo de lectura	3 s
Numero de replicas	3
Tiempo de estabilización	10 s
Toma de muestra	85 rpm, 10 s
Estabilización	15 rpm, 10 s

Para el proceso de calibración, se preparó un estándar multielemental conteniendo los siguientes elementos: (Al(III), Fe(III), V(V), Cr(VI), Zn(II), Ni(II), Sb(III), Cd(II), Pb(II), Ag(I) y Co(II)) 10 mg/L, así como un estándar interno de Itrio (Y) 0.5 mg/L concentración final. Se decidió usar mezclas de un mayor número de elementos respecto a la primer parte del trabajo, las condiciones de adquisición de las señales para cada uno de ellos se enlistan en Tabla 18.

**Tabla 18.** Parámetros usados en la adquisición de señales y concentraciones para el proceso de calibración para cada uno de los elementos en el análisis por MP-AES.

Elemento	$\lambda$ , nm	Rango de concentración, mg/L	Presión del nebulizador
Fe	259.9	0.10 - 2.50	120
Pb	405.8	0.10 - 2.50	120
Sb	217.6	0.10 - 2.50	140
Cd	228.8	0.10 - 2.50	140
Zn	472.2	0.10 - 2.50	160
Ag	328.1	0.10 - 2.50	200
V	310.2	0.10 - 2.50	220
Co	340.5	0.10 - 2.50	220
Ni	341.5	0.10 - 2.50	220
Cr	425.4	0.10 - 2.50	220
Al	396.2	0.10 - 2.50	240

Se evaluaron los parámetros analíticos, incluyendo, límites de cuantificación (LC), funciones de regresión lineal y coeficientes de correlación lineal ( $R^2$ ) para cada uno de los (Tabla 19).

**Tabla 19.** Parámetros analíticos de diferentes elementos obtenidos por la técnica MP-AES.

Elemento	$R^2$	LC ( $\mu\text{g/L}$ )	Función de calibración
Fe	0.99	11.0	$y = 3.11 \times 10^3 x + 31.3$
Pb	0.99	53.0	$y = 1.87 \times 10^3 x - 35.6$
Sb	0.99	64.0	$y = 1.15 \times 10^3 x - 17.1$
Cd	0.99	42.0	$y = 1.59 \times 10^4 x - 124$
Zn	0.99	56.0	$y = 3.80 \times 10^2 x - 4.48$
Ag	1.00	42.0	$y = 5.30 \times 10^4 x - 486$
V	0.99	69.0	$y = 2.12 \times 10^4 x - 219$
Co	0.99	61.0	$y = 1.07 \times 10^4 x + 180$
Ni	0.99	70.0	$y = 1.87 \times 10^4 x + 89.7$
Cr	0.99	71.0	$y = 3.32 \times 10^4 x - 456$
Al	0.99	50.0	$y = 2.35 \times 10^4 x + 74.1$

Una vez establecidas las condiciones y parámetros de trabajo se procedió a realizar estudios de captación efectiva de metales/metaloideos en los soportes de cromatografía de afinidad modificados con GSH. Para cada uno de los soportes, se agregó 3 - 4 g a 10 mL de una solución multi-elemental 10 mg/mL durante 24 horas. La captación de iones metálicos se estudió bajo diferentes condiciones: a) estado estacionario, b) régimen hidrodinámico y c) en presencia de ácidos húmicos. Igual que en experimentos anteriores, se extrajeron

iones metálicos retenidos en el soporte con 3 mL del ácido nítrico 30 %, de los cuales se tomó 1 mL y después de una dilución 10:1 con agua desionizada, la muestra fue introducida al MP-AES.

En primer lugar se analizaron los blancos que fueron obtenidos siguiendo el mismo procedimiento, pero poniendo agua desionizada en contacto con soporte. No se detectó la presencia de ninguno de los elementos para ninguno de los soportes estudiados, excepto para el plomo, para el cual se encontró 34 – 48 µg por gramo de soporte modificado.

Para demostrar la importancia de grupos tiol inmovilizados en la superficie de soportes, se compararon los resultados de captación de iones metálicos en soportes sin modificar con respecto a los modificados.

Los resultados obtenidos se describen en las siguientes secciones.

#### IV.7.1 Estudio de la captación de iones metálicos a partir de su mezcla en régimen estacionario

Los ensayos en régimen estacionario se llevaron a cabo agregando el soporte a la solución mixta de iones metálicos y dejando la mezcla por 24 h. Los resultados obtenidos para diferentes soportes sin y con modificación con GSH se presentan en las tablas 20 y 21; los valores corresponden a miligramos de metal por gramo de soporte cromatográfico (mgM/gS).

**Tabla 20.** Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en soportes no modificados en régimen estacionario. (GESM: gel sepharose; p55ESM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75ESM: perlas de vidrio 75 µm diámetro). Se presentan valores promedios (P) como µg de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de desviación estándar (DE) obtenidos con base en dos replicas independientes.

Elemento	GESM		p55ESM		p75ESM	
	P	DE	P	DE	P	DE
Fe(III)	127	6.00	39.0	8.00	43.0	7.00
Pb(II)	89.0	5.00	46.0	12.0	65.0	22.0
Sb(III)	84.0	9.00	58.0	9.00	80.0	25.0
Cd(II)	33.0	6.00	11.0	2.00	17.0	1.00
Zn(II)	66.0	8.00	17.0	8.00	25.0	9.00
Ag(I)	13.0	2.00	11.0	3.00	13.0	1.00
V(V)	161	56.0	118	81.0	154	55.0
Co(II)	14.0	13.0	9.00	1.00	10.0	1.00
Ni(II)	30.0	4.00	12.0	2.00	12.0	7.00

<b>Cr(VI)</b>	53.0	1.00	26.0	2.00	30.0	3.00
<b>Al(III)</b>	272	1.00	98.0	7.00	112	9.00

En la tabla 20 se observa que, para cada uno de los tres soportes sin modificación ocurrió captación de cada uno de los elementos, pero en cantidades más bajas respecto a los soportes modificados con GSH (Tabla 21). Captación de iones metálicos en los soportes cromatográficos sin modificar, se debe a la presencia de los grupos OH; es este caso las más altas cantidades retenidas en soportes se encontraron para Al, Fe y V, mientras que para otros elementos las cantidades fueron claramente menores. El aumento de la captación de metales retenidos en los mismos soportes después de inmovilización de GSH demuestra que la captación principalmente se lleva a cabo mediante interacción de iones con el grupo sulfhidrilo, de acuerdo con la idea original de la tesis (Tabla 21)

**Tabla 21.** Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en soportes modificados con GSH en régimen estacionario. (GER: gel sepharose; p55ER: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75ER: perlas de vidrio 75  $\mu$ m diámetro). Se presentan valores promedios (P) como  $\mu$ g de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de desviación estándar (DE) obtenidos con base en dos replicas independientes.

Elemento	GER		p55ER		p75ER	
	P	DE	P	DE	P	DE
<b>Fe(III)</b>	297	6.00	116	1.00	307	11.0
<b>Pb(II)</b>	271	38.0	74.0	17.0	170	13.0
<b>Sb(III)</b>	463	59.0	150	58.0	572	23.0
<b>Cd(II)</b>	337	10.0	115	3.00	330	6.00
<b>Zn(II)</b>	287	4.00	115	5.00	304	1.00
<b>Ag(I)</b>	25.0	4.00	11.0	2.00	25.0	4.00
<b>V(V)</b>	875	85.0	283	64.0	752	77.0
<b>Co(II)</b>	208	14.0	79.0	3.00	245	10.0
<b>Ni(II)</b>	313	25.0	101	6.00	288	16.0
<b>Cr(VI)</b>	487	30.0	140	3.00	392	14.0
<b>Al(III)</b>	521	30.0	152	2.00	422	12.0

#### **IV.7.2 Estudio de la captación de iones metálicos a partir de su mezcla en régimen hidrodinámico, utilizando soportes modificados y sin modificar**

A diferencia de los experimentos anteriores, en esta sección se presentan resultados obtenidos cuando la mezcla soporte/solución fue agitada con un agitador magnético durante

24 h de contacto. En las tablas 22 y 23 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los soportes (sin modificar y modificados) y para cada uno de los iones metálicos presentes en la solución.

**Tabla 22.** Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en soportes no modificados, en régimen hidrodinámico (GHSM: gel sepharose; p55HSM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75HSM: perlas de vidrio 75  $\mu\text{m}$  diámetro). Se presentan valores promedios (P) como  $\mu\text{g}$  de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de desviación estándar (DE) obtenidos con base en dos replicas independientes.

Elemento	GHSM		p55HSM		p75HSM	
	P	DE	P	DE	P	DE
Fe(III)	224	1.00	91.0	6.00	91.0	1.00
Pb(II)	105	30.0	75.0	17.0	66.0	11.0
Sb(III)	87.0	26.0	65.0	16.0	82.0	10.0
Cd(II)	60.0	3.00	25.0	5.00	26.0	4.00
Zn(II)	92.0	4.00	33.0	2.00	24.0	8.00
Ag(I)	17.0	4.00	11.0	3.00	13.0	3.00
V(V)	155	21.00	137	45.0	174	43.0
Co(II)	34.0	8.00	6.00	3.00	3.00	1.00
Ni(II)	56.0	11.0	20.0	3.00	22.0	5.00
Cr(VI)	86.0	4.00	39.0	2.00	41.0	4.00
Al(III)	521	26.0	198	9.00	185	12.0

En la tabla 22 se observa que, para cada uno de los tres soportes sin modificación ocurrió captación de cada uno de los elementos, pero en cantidades más bajas respecto a los soportes modificados con GSH (Tabla 23). Captación de iones metálicos en los soportes cromatográficos sin modificar, se debe a la presencia de los grupos OH; es este caso las más altas cantidades retenidas en soportes se encontraron para Al, Fe y V, mientras que para otros elementos las cantidades fueron claramente menores. El aumento de la captación de metales retenidos en los mismos soportes después de inmovilización de GSH demuestra que la captación principalmente se lleva a cabo mediante interacción de iones con el grupo sulfhidrilo, de acuerdo con la idea original de la tesis (Tabla 23)

**Tabla 23.** Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en soportes modificados con GSH en régimen hidrodinámico (GHR: gel sepharose; p55HR: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75HR: perlas de vidrio 75  $\mu\text{m}$  diámetro). Se presentan valores promedios (P)

como  $\mu\text{g}$  de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de desviación estándar (DE) obtenidos con base en dos replicas independientes.

Elemento	GHR		p55HR		p75HR	
	P	DE	P	DE	P	DE
<b>Fe(III)</b>	8378	11.0	1155	29.0	1177	11.0
<b>Pb(II)</b>	312	41.0	290	6.00	302	13.0
<b>Sb(III)</b>	261	50.0	319	39.0	524	23.0
<b>Cd(II)</b>	220	4.00	211	4.00	374	6.00
<b>Zn(II)</b>	311	8.00	295	6.00	405	1.00
<b>Ag(I)</b>	69.0	3.00	64.0	4.00	83.0	4.00
<b>V(V)</b>	679	93.0	760	82.0	972	71.0
<b>Co(II)</b>	117	5.00	92.0	4.00	182	5.00
<b>Ni(II)</b>	219	15.0	187	7.00	272	16.0
<b>Cr(VI)</b>	379	4.00	311	5.00	451	14.0
<b>Al(III)</b>	1255	12.0	960	1.00	1328	10.0

#### IV.7.3 Efecto de ácidos húmicos en la captación efectiva de iones metálicos a partir de su mezcla utilizando soportes sin modificación y los modificados con GSH

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando la solución de iones metálicos que contenía ácidos húmicos (reactivo Sigma), siguiendo el mismo protocolo que se describe en la sección IV.6. A esta solución se agregaron aproximadamente 3 – 4 g del soporte. En las tablas 24 y 25 se presentan los resultados obtenidos, de manera similar que en secciones anteriores. Se aprecia para los soportes cromatográficos, modificados y no modificados, que la afinidad se ve afectada por la presencia de ácidos húmicos, obteniéndose mejores resultados para aluminio y vanadio, así como una menor captación para plata.

**Tabla 24.** Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en presencia de ácidos húmicos, soportes cromatográficos sin modificar con agitación. (GAcSM: gel sepharose; p55AcSM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75AcSM: perlas de vidrio 75  $\mu\text{m}$  diámetro). Se presentan valores promedios (P) como  $\mu\text{g}$  de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de desviación estándar (DE) obtenidos con base en dos replicas independientes.

Elemento	GAcSM		p55AcSM		p75AcSM	
	P	DE	P	DE	P	DE
<b>Fe(III)</b>	73.0	3.00	31.0	9.00	38.0	4.00
<b>Pb(II)</b>	61.0	32.0	61.0	32.0	57.0	13.0
<b>Sb(III)</b>	86.0	16.0	60.0	17.0	71.0	17.0

<b>Cd(II)</b>	22.0	1.00	11.0	1.00	13.0	1.00
<b>Zn(II)</b>	47.0	8.00	19.0	7.00	19.0	9.00
<b>Ag(I)</b>	13.0	1.00	11.0	1.00	13.0	3.00
<b>V(V)</b>	174	28.0	118	23.0	194	28.0
<b>Co(II)</b>	12.0	2.00	10.0	2.00	13.0	3.00
<b>Ni(II)</b>	20.0	6.00	10.0	1.00	9.00	1.00
<b>Cr(VI)</b>	38.0	2.00	23.0	1.00	26.0	1.00
<b>Al(III)</b>	167	5.00	81.0	6.00	85.0	3.00

**Tabla 25.** Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en presencia de ácidos húmicos, soportes cromatográficos modificados con agitación. (GAcM: gel sepharose; p55AcM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75AcM: perlas de vidrio 75  $\mu$ m diámetro). Se presentan valores promedios (P) como  $\mu$ g de metal retenido por 1 g de soporte y los respectivos valores de desviación estándar (DE) obtenidos con base en dos replicas independientes.

<b>Elemento</b>	<b>GAcM</b>		<b>P55AcM</b>		<b>P75AcM</b>	
	<b>P</b>	<b>DE</b>	<b>P</b>	<b>DE</b>	<b>P</b>	<b>DE</b>
<b>Fe(III)</b>	123	17.0	79.0	1.00	167	17.0
<b>Pb(II)</b>	59.0	13.0	45.0	9.00	79.0	21.0
<b>Sb(III)</b>	59.0	17.0	68.0	13.0	170	17.0
<b>Cd(II)</b>	33.0	1.00	22.0	3.00	50.0	18.0
<b>Zn(II)</b>	49.0	6.00	29.0	1.00	69.0	7.0
<b>Ag(I)</b>	12.0	1.00	10.0	1.00	10.0	4.00
<b>V(V)</b>	158	22.0	125	30.0	310	25.0
<b>Co(II)</b>	67.0	1.00	3.00	1.00	12.0	4.00
<b>Ni(II)</b>	27.0	4.00	16.0	1.00	30.0	19.0
<b>Cr(VI)</b>	47.0	3.00	30.0	1.00	55.0	10.0
<b>Al(III)</b>	284	15.0	183	4.00	348	28.0

De nuevo se observa una menor captación de iones metálicos en soportes sin modificar respecto a los modificados con GSH. Aunado a esto, la cantidad del ión retenido en presencia de ácidos húmicos fue siempre menor comparando con el ensayo de su captación en solución acuosa sin matriz química (Tabla 26), confirmando de esta manera que los grupos  $-SH$  disponibles en la superficie de soporte son capaces de enlazar las más lábiles (y por ello más tóxicas) formas de los elementos, mientras que iones asociados con ácidos húmicos no son retenidos en los soportes. Por otro lado, los resultados obtenidos confirman una vez más que las perlas de sílice del diámetro 75  $\mu$ m presentan mayor



capacidad de unir iones metálicos, por el hecho de tener mayor superficie y mayor número de grupos –SH inmovilizados.

**Tabla 26.** Captación de iones metálicos a partir de su mezcla en presencia y ausencia de ácidos húmicos, soportes cromatográficos modificados con agitación. (GAcM: gel sepharose; p55AcM: perlas de vidrio 0.55 mm diámetro; p75AcM: perlas de vidrio 75 µm diámetro). Se presentan valores promedios (µg de metal retenido por 1 g de soporte) con base en dos replicas.

Elemento	GAcM		p55AcM		p75AcM	
	Sin ácidos húmicos	Con ácidos húmicos	Sin ácidos húmicos	Con ácidos húmicos	Sin ácidos húmicos	Con ácidos húmicos
<b>Fe(III)</b>	838	123	1155	79.0	1177	167
<b>Pb(II)</b>	312	59.0	290	45.0	302	79.0
<b>Sb(III)</b>	261	59.0	319	68.0	524	170
<b>Cd(II)</b>	220	33.0	211	22.0	374	50.0
<b>Zn(II)</b>	311	49.0	295	29.0	405	69.0
<b>Ag(I)</b>	69.0	12.0	64.0	910	83.0	10.0
<b>V(V)</b>	679	158	760	125	972	400
<b>Co(II)</b>	117	7.00	92.0	3.00	182	12.0
<b>Ni(II)</b>	219	27.0	187	16.0	272	30.0
<b>Cr(VI)</b>	379	47.0	311	30.0	451	55.0
<b>Al(III)</b>	1255	284	960	183	1328	348

Finalmente, los resultados obtenidos utilizando solución mixta de iones metálicos indican que la afinidad de iones metálicos al grupo –SH en ausencia de compuestos orgánicos decrece en el orden: Al(III) > Fe(III) > V(V) > Cr(VI) > Zn(II) > Ni(II) > Sb(III) > Cd(II) > Pb(II) > Ag(I) > Co(II) (dicho orden se obtuvo sustituyendo la masa por número de moles de metal por un gramo de soporte, Tabla 23). De igual manera, en presencia de ácidos orgánicos se obtuvo el siguiente orden: Al(III) > V(V) > Fe(III) > Sb(III) > Cr(VI) > Zn(II) > Pb(II) > Ni(II) > Co(II) > Cd(II) > Ag(I). Estos resultados indican la factibilidad del uso de los soportes obtenidos para la evaluación de la toxicidad efectiva de los metales en un sistema acuático con base en la determinación de la fracción retenida en dichos soportes, en donde perlas de sílice del diámetro 75 µm ofrecen la mejor capacidad de captación. Es importante resaltar que, cuando la solución contiene varios iones metálicos, se mantiene el decreciente orden de la captación de los iones estudiados de manera individual en la primera parte de trabajo: Cr(VI) > Zn(II) > Cd(II) > Pb(II) (Hg(II) no

incluido en las soluciones mixtas), lo que sustenta que dicha captación refleja la afinidad de cada uno de los iones al grupo -SH. Es también importante hacer notar que la relación molar entre metal retenido en el soporte y la cantidad de los grupos -SH disponibles fue relativamente baja (más alto valor 2.49% para Cr(VI)), por lo que no existe competencia entre iones presentes en la solución por los grupos -SH y la sorción ocurre realmente en función de afinidad de cada uno de los iones al grupo sulfhidrilo.

## V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis se desarrolló un nuevo procedimiento que permite la sorción de los metales/metaloideos presentes en sistemas acuáticos de manera selectiva, de acuerdo a su afinidad al grupo tiol inmovilizado en un soporte sólido. Para ello, se han obtenido los soportes cromatográficos, geles de sepharose 6B y perlas de vidrio, modificados con GSH mediante diferentes procedimientos de activación. Los soportes modificados demostraron su viabilidad para la captación efectiva de metales/metaloideos en medio acuoso. Utilizando BrCN para activación de grupos -OH de la Sepharose 6B y de las perlas de vidrio, se obtuvo la inmovilización de  $73 \pm 21.8 \mu\text{mol}$  y de  $107 \pm 31.1 \mu\text{mol}$  de GSH por un gramo de soporte, respectivamente. Además se demostró la factibilidad de activación de las perlas de vidrio utilizando NaOH, obteniéndose la inmovilización de  $81.4 \pm 4.7 \mu\text{mol}$  de grupos tiol por gramo de perlas en solo 30 minutos de modificación. Este procedimiento resulta atractivo debido a su rapidez, carácter amigable al medioambiente y su bajo costo. Asimismo y como una alternativa, en este trabajo se propuso la interacción del GSH con las perlas de vidrio de sílice ( $75 \mu\text{m}$  y  $0.5 \text{ mm}$  de diámetro), activadas con NaOH 0.1 M y con adición de iones calcio 0.01 M, donde en la inmovilización por atracción electrostática se aprovecha el efecto inductivo de Ca(II). En esta modificación el GSH en un medio de solución tampón de  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$  a pH 8.2 tiene su grupo amino terminal protonado ( $-\text{NH}_3^{(+)}$ ) y por ello atraído electrostáticamente hacia la gran área superficial de las perlas de sílice cargadas negativamente, dejando el grupo tiol (-SH) del GSH libre.

Los soportes de Sepharose 6B y perlas de vidrio Si-OH modificados con GSH presentan claramente el siguiente orden decreciente de la cantidad molar de ión metálico retenido por micromol de grupos -SH disponibles en el soporte: Cr(VI) > Zn(II) > Cd(II) > Hg(II) > Pb(II). Esta afinidad por estos iones metálicos hacia los soportes modificados con

GSH se ve afectada por la presencia de ácidos húmicos, lo que parece confirmar que los soportes modificados tienen capacidad de enlazar las formas/especies de elementos en función de su labilidad (estrictamente relacionada con toxicidad).

Finalmente, los resultados obtenidos utilizando solución mixta de iones metálicos indican que la afinidad de iones metálicos al grupo -SH en ausencia de compuestos orgánicos decrece en el orden: Al(III) > Fe(III) > V(V) > Cr(VI) > Zn(II) > Ni(II) > Sb(III) > Cd(II) > Pb(II) > Ag(I) > Co(II). Por su parte, en presencia de ácidos orgánicos, este orden se vio afectado de la siguiente manera: Al(III) > V(V) > Fe(III) > Sb(III) > Cr(VI) > Zn(II) > Pb(II) > Ni(II) > Co(II) > Cd(II) > Ag(I). Lo que refleja diferente grado de asociación de cada uno de estos metales con ácidos húmicos y soporta aún más la viabilidad de los soportes modificados para evaluación de la “toxicidad efectiva” de un total de las formas/especies de todos metales/metaloides presentes en un sistema acuático.

En continuación de este trabajo se requieren más estudio dirigidos a aspectos de elaboración de soportes, repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos, aplicaciones en el análisis de muestras reales y elaboración/evaluación de dispositivos pasivos. Sería también interesante realizar un estudio comparativo entre los resultados de la “toxicidad efectiva” con los resultados de especiación analítica llevada a cabo en las mismas muestras medioambientales.

## VI. REFERENCIAS

1. Haferburg, H., *Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010. **19**(1): p. 127-80.
2. Haraguchi, H., *Metallomics as integrated biometal science*. J. Anal. At. Spectrom., 2004. **19**(1): p. 5-14.

3. Trampezyńska, A., et al, *Nicotianamine forms complexes with Zn (II) in vivo*. Metallomics., 2009. **2**(1): p. 57-66.
4. Szpunar, J., ed. *The Analyst (CR)*. Vol. 130. 2005. 442-465.
5. Telecka, E., *Arsenic speciation analysis in water samples: a review of the hyphenated techniques*. Environ. Monit. Assess., 2005. **107**(1-3): p. 259-84.
6. Porath, J., ed. *Immobilized metal ion affinity chromatography Expression*. Vol. 7. 1992. 263-281.
7. IARC, *Agents Classified by the IARC Monographs*. 2012.
8. Sud, D., Mahajan, G., Kaur, M. P. , *Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions – A review*. . Bioresour. Technol., 2008. **25**(2): p. 6017–6027.
9. Theophanides, T., Anastassopoulou, J., *Copper and carcinogenesis*. Crit. Rev. Oncol. Hemat., 2002. **42**(1): p. 57–64.
10. Commission, E., *The European Water Framework Directive in WFD;2000/60/EC*. 2000.
11. Stoate, C., Báldi, A., Beja, P., Boatman, N.D., *Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe-a review*. J. Environ. Manage., 2009. **91**(1): p. 22–46.
12. Commission, E., *European Commission, The European Marine Strategy Framework Directive 2008*.
13. Commission, E., *European Commission, Directive on Environmental Quality Standards 2008*.
14. EPA, *Agencia de Proteccion Ambiental de los Estados Unidos in Documento EPA 815-F 00-007*. 2000.
15. SEMARNAT, *Norma Oficial Mexicana, NOM-001-SEMARNAT-1996*. 1997.
16. SEMARNAT, *Norma Oficial Mexicana, NOM-002-SEMARNAT-1996*. 1996.
17. SEMARNAT, *Norma Oficial Mexicana, NOM-052-SEMARNAT-2005*. 2005.
18. OMS, *Organizacion Mundial de la Salud, OMS 2000*.
19. He, Q.Y., Sun, X.S, Chiu, J.F., *IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MOLECULAR TARGETS OF NATURAL PRODUCTS BY MASS SPECTROMETRY*. Expert. Rev. Proteomics., 2005. **29**(1): p. 126-155.
20. Smith, S.D., Roberts, E.A., Sarkar, B., *Using immobilized metal affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to identify hepatocellular proteins with copper-binding ability*. J. Proteome. Res., 2004. **3**(3): p. 834-840.
21. Abu, M., Elisma, F., Zhou, H., *Proteomics: from technology developments to biological applications*. Anal. Chem., 2009. **81**(12): p. 4585-4599.
22. Wang, C., Li, B., Ao, J., *Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn<sup>2+</sup> and LC-MS/MS*. Food. Chem.. 2012. **134**(2): p. 1231-1238.
23. Jiang, W., Prescott, M., R.J. Devenish, R.J., Spiccia, L., Hearn, M.T., *Separation of hexahistidine fusion proteins with immobilized metal ion affinity chromatographic (IMAC) sorbents derived from M(N+)-tacn and its derivatives*. Biotechnol. Bioeng., 2009. **103**(4): p. 747-756.
24. Aryal, K., Krochko, J.E., Ross, A.R., *Identification of phosphoproteins in Arabidopsis thaliana leaves using polyethylene glycol fractionation, immobilized metal-ion affinity chromatography, two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. J. Proteome Res., 2012. **11**(1): p. 425-438.
25. Tsai, C.F., Wang, Y.T., Chen, Y., *Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics*. J. Proteome Res., 2008. **7**(9): p. 40-58.
26. [www.uco.es/iq2sagri/qIMedioambiente/transpTema9-web.pdf](http://www.uco.es/iq2sagri/qIMedioambiente/transpTema9-web.pdf).

27. Meister, A., *Glutathione metabolism and its selective modification*. J. Biol. Chem., 1988. **7**(9): p. 4058-4069.
28. Simplicio, P., Cacace, M.G., Lusini, L., Giannerini, F., Giustarini, D., Rossi, R., *Role of Protein-SH groups in Redox Homeostasis: The Erythrocyte as a Model System*. Arch. Biochem. Biophys., 1998. **355**(2): p. 145-152.
29. Asconea, I., Longoald, A., *An X-ray absorption study of the reconstitution process of bovine Cu,Zn superoxide dismutase by Cu(I)-glutathione complex*. Fed. Eur. Biochem. Soc., 1993. **322**(2): p. 165-167.
30. Aliaga, M.E., Carrasco, C., *Superoxide-dependent reduction of free Fe<sup>3+</sup> and release of Fe<sup>2+</sup> from ferritin by the physiologically-occurring Cu(I)-glutathione complex*. Bioor. Med. Chem., 2011. **19**(1): p. 534-541.
31. Singh, D.T., Sumitra, C.H., *Spectral study of complexation of Nd(III) with glutathione reduced (GSH) in the presence and absence of Zn (II) in aquated organic solvents*. J. Chem. Sci. , 2004. **116**(2): p. 303-309.
32. Potec, K., Ruzik, R., *Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(I) complexation by glutathione and its component amino acids by ESI-MS and size exclusion chromatography coupled to ICP-MS and ESI-MS*. Talanta., 2007. **113**(1): p. 1564-1572.
33. Brauer, S.L., Wetterhahn, K.E., *Chromium (VI) Forms a Thiolate Complex with Glutathione*. J. Am. Chem. Soc., 1990. **113**(2): p. 3001-3007.
34. Mah, V., Jalilehvand, F., *Glutathione Complex Formation with Mercury(II) in Aqueous Solution at Physiological pH*. Chem. Res. Toxicol., 2010. **23**(2): p. 1815-1823.
35. Cuatrecasas, P., *Protein purification by affinity chromatography*. J. Biol. Chem., 1970. **245**(1): p. 3059-3065.
36. Lowe, C.R., *an introduction to affinity chromatography*. J. Biom., 1979. **9**(1): p. 516.
37. Turková, J., *Affinity chromatography*. E. Science., 1978. **11**(1): p. 332-344.
38. Carbajal, A., *Cromatografía de afinidad*. 1998. p. 5-16
39. Cuatrecasas, P., Anfinsen C. B., *Selective enzyme purification by affinity chromatography*. Proc. Nat. Acad. Sci., 1968. **61**(2): p. 636-643.
40. Dean, P., Johnson, W. F., Middle, F. A. , ed. *Affinity chromatography a practical approach*. 1985, Washington. IRL press.
41. Amersham, *Affinity chromatography principles and methods*, in *Ser. Handbooks from Amersham Pharmacia Biotech*. 2001.
42. Nisnevith, M., Firer, M. A. , *The solid phase in affinity chromatography: strategies for affinity attachment*. J. Biochem. Biophys. Methods., 2001. **61**(2): p. 467-480.
43. Maye, M.M., Lim, I.I.S., Luo, J., Rab, Z., Rabinovich, D., *Kinetic and Thermodynamic Assessments of the Mediator-Template Assembly of Nanoparticles*. J. Am. Chem. Soc., 2005. **127**(2): p. 1519-1529.
44. Xie, J., Zheng, Y., Ying, J.Y., *Facile synthesis of water-soluble Au<sub>25</sub>-xAg<sub>x</sub> nanoclusters protected by mono- and bi-thiolate ligands*. Chem. Commun., 2010. **46**(2): p. 961-963.
45. Annie Ho, J.A., Chang, H.C., Su, W., *Anal. Chem.*, 2012. **84**(2): p. 3246-3253.
46. Roy, S., Palui, G., Banerjee, A., *Nanoscale*. J. Fluid. Eng., 2012. **26**(1): p. 2734-2740.
47. Chen, W., Tu, X., Guo, X., *Fluorescent gold nanoparticles-based fluorescence sensor for Cu(II) ions*. Chem. Commun., 2009. **13**(2): p. 1736-1738.
48. Yuan, Z., Peng, M., He, Y., Yeung, E.S., *Functionalized fluorescent gold nanodots: synthesis and application for Pb<sup>2+</sup> sensing*. Chem. Commun., 2011. **19**(2): p. 11981-11983.
49. Zhang, H., Liu, Q. , *Facile preparation of glutathione-stabilized gold nanoclusters for selective determination of chromium (III) and chromium (VI) in environmental water samples*. Anal. Chim. Acta., 2013. **770**(3): p. 140-146.
50. Ding, N., Zhao, H. , *A simple colorimetric sensor based on anti-aggregation of gold nanoparticles for Hg<sup>2+</sup> detection*. Anal. Chim. Acta, 2012. **395**(2): p. 161-167.

51. Li, H., Cui, Z., *Glutathione-stabilized silver nanoparticles as colorimetric sensor for Ni<sup>2+</sup> ion*. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 2009. **143**(1): p. 87-92.
52. Gupta, V.K., Arunima N., *Cadmium removal and recovery from aqueous solutions by novel dsorbents prepared from orange peel and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles*. *Chem. Eng. J.* , 2012. **180**(2): p. 81–90.
53. Hakami, T., Zhang, Y., Banks, C.J., *Thiol-functionalised mesoporous silica-coated magnetite nanoparticles for high efficiency removal and recovery of Hg from water*. *Water. Res.* , 2012. **46** (2): p. 3913–3922.
54. Hakami, Q., Zhang, Y., Banks, C.J, *Thiol-functionalised mesoporous silica-coated magnetite nanoparticles for high efficiency removal and recovery of Hg from water*. *Water. Res.* , 2012. **46**(2): p. 3913-3922.
55. Madrakian, T., Afkhami, A., Zolfigol, M.A, Ahmadi, M., Koukabi, N., *Application of modified silica coated magnetite nanoparticles for removal of iodine from water samples*, . *Micro. Nano. Lett.* , 2012. **4**(1): p. 57-63.
56. Anbia, M., Lashgari, M., *Synthesis of amino-modified ordered mesoporous silica as a new nano-sorbent for the removal of chlorophenols from aqueous media*. *Chem. Eng. J.* , 2009. **150**(1): p. 555–560.
57. Wang, J., Zheng, S., Liu, J., Xu, Z., *Tannic acid adsorption on amino-functionalized magnetic mesoporous silica*. *Chem. Eng. J.* , 2010. **165**(1): p. 10–16.
58. Cestari, A.R., Vieira, E.F.S., Vieira, G.S., Costa, L.P. , *The removal of reactive dyes from aqueous solutions using chemically modified mesoporous silica in the presence of anionic surfactant – the temperature dependence and a thermodynamic multivariate analysis*. *J. Hazard. Mater.*, 2009. **161**(2): p. 307–316.
59. Wang, J., Zheng, C., Ding, S., Ma, H., *Behaviors and mechanisms of tannic acid adsorption on an amino-functionalized magnetic nano-adsorbent*,. *Desalination.*, 2011. **273**(2): p. 285–291.
60. Tan, Y., Chen, M., Hao, Y., *High efficient removal of Pb(II) by aminofunctionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nano-particles*. *Chem. Eng. J.* , 2012. **191**(2): p. 104– 111.
61. Hao, Y.M., Chen, M.C., Hu, Z.B., *Effective removal of Cu(II) ions from aqueous solution by amino-functionalized magnetic nanoparticles*. *J. Hazard. Mater.*, 2010. **184**(2): p. 392–399.
62. Wang, J., Zheng, S., Shao, Y., Liu, J., Xu, Z., Zhu, D., *Amino-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@sio<sub>2</sub> core-shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal*. *J. Colloid. Interface. Sci.* , 2010. **349**(3): p. 293–299.
63. Fu, X., Chen, J., Wang, J., *Fabrication of carboxylic functionalized superparamagnetic mesoporous silica microspheres and their application for removal basic dye pollutants from water*. *Microporous Mesoporous Mater.*, 2011. **139**(2): p. 8–15.
64. Qu, H., Caruntu, D., Liu, H., Connor, *Water-dispersible iron oxide magnetic nanoparticles with versatile surface functionalities*. *Langmuir.*, 2011. **27**(2): p. 2271–2278.
65. Zhao, X.S., Lu, G.Q., *Modification of MCM-41 by surface silylation with trimethylchlorosilane and adsorption study*. *J. Phys. Chem. B.*, 1998. **102**(2): p. 1556–1561.
66. Zhang, J., Zhai, S. , *Pb(II) removal of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NH<sub>2</sub> core-shel nanomaterials prepared via a controllable sol-gel process*. *Chem. Eng. J.*, 2013. **215**(2): p. 215-216.
67. Vismaraa, E., Melonea, L., Gastaldi, G., Cosentinob, C., Torri, G., *Surface functionalization of cotton cellulose with glycidylmethacrylate and its application for the adsorption of aromatic pollutants from wastewaters*. *J. Hazard. Mater.*, 2009. **170**(2): p. 798–808.
68. Dahou, W., Ghemati, D., Oudia, A., Aliouche, D., *Preparation and biological characterization of cellulose graft copolymers*. *Biochem. Eng. J.* , 2010. **48**(2): p. 187–194.
69. Marinich, J.A., Ferrero, C., *Graft copolymers of ethyl methacrylate on waxy maize starch derivatives as novel excipients for matrix tablets: Physicochemical and technological characterization*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009. **72**(2): p. 138–147.

70. Zhao, Y., Huang, M., Wu, W., Jin, W., *Synthesis of the cotton cellulose based Fe(III)- loaded adsorbent for arsenic(V) removal from drinking water*. Desalination., 2009. **249**(2): p. 1006–1011.
71. Anirudhan, T.S., Jalajamony, S., Suchihra, P.S., *Improved performance of a cellulose-based anion exchanger with tertiary amine functionality for the adsorption of chromium(VI) from aqueous solutions*. Colloids. Surf. A: Phys., Eng. Aspects. , 2009. **335**(2): p. 107–113.
72. Jnior, O.K., Gurgel, L.V.A., Freitas, R.P., Gil, L.F., *desorption of Cu(II), Cd(II), and Pb(II) from aqueous single metal solutions by mercerized cellulose and mercerized sugarcane bagasse chemically modified with EDTA dianhydride (EDTAD)*. Carbohydrate Polym., 2009. **77**(1): p. 643–650.
73. Anirudhan, T.S., Jalajamony, S., Divya, L., *Efficiency of amine-modified poly(glycidyl methacrylate)-grafted cellulose in the removal and recovery of vanadium(V) from aqueous solutions*. Ind. Eng. Chem. Res. , 2009. **48**(2): p. 2118–2124.
74. Donia, A.M., Atia, A.A. , *Preparation and characterization of nano-magnetic cellulose with fast kinetic properties towards the adsorption of some metal ions*. Chem. Eng. J., 2012. **191**(2): p. 22-30.
75. Tian, Y., Wu, M., *Electrospun membrane of cellulose acetate for heavy metal ion adsorption in water treatment*. Carbohydrate Polym., 2011. **83**(2): p. 743-748.
76. Koohn, J., Wilchek, K., Koohn, M., ed. *New approaches for the use of CNBr and relative cyanilating agents for the preparation of activated polysaccharide resins*. . ed. A.c.a.b. recognition. 1983, Academic Press.: Londres. 197-208.
77. Chaiken, I., Wilchek, K., Pacakh, I., *Molecular interactions, affinity methods and the synergism between affinity chromatography and biological recognition*. Academic. Press. Londres, 1983: p. 197-208.
78. Ellman, L., *A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans*. Arch. of Biochem. Biophys., 1958. **74**(2): p. 443-450.
79. NMX-AA-044-SCFI-2001, *Análisis de Aguas – Determinación de Cromo Hexavalente en Aguas Naturales, Potables, Residuales y Residuales Tratadas in NMX-AA-044-SCFI-2001*, SEMARNAT, Editor. 2001.
80. Onishi, B., Sandell, H., ed. *Spectrophotometric Determination of Elements*. ed. j.W.a.S. Inc. Vol. Tomo 1. 1977: New York. 579-633
81. Gina, J.H., Christian, C.M., *Solubilización de la Ditzona y sus Complejos de Mercurio, Plomo y Cadmio en Medio Micelar y su Aplicación en el Análisis Espectrofotométrico*. R. UNI. REVICIUNI., 2006. **10**(1): p. 23-27.
82. Hinze, W., Mittal, K. L. , ed. *Solution Chemistry of Surfactants*. ed. P. Press. 1979: New York.
83. Chao, S., Hong, J., Cheng, H, J, Talanta., 1980. **27**(2): p. 676.
84. Sánchez, S.A., *Mejora de la Eficacia de los Quelatos de Hierro Sintético a Través de Sustancias Húmicas y Aminoácidos*. 2002: Alicante, ESP. p. 333-339.
85. Bohn, H.L., McNeal, B.L. , Connor, G.A. , ed. *Química del suelo*. México, D.F., ed. E. Limusa. 1993.
86. Förstner, U., Müller, G., *Heavy metal accumulation in river sediments: A response to environmental pollution*. Geoforum., 1973. **4**(2): p. 53-61.
87. Schnitzer, M., *Humic Substances: Chemistry and Reactions: in Soil Organic Matter (Ed.) Schnitzer and Khan*. Soil. Organic. Matter., 1978. **19**(1): p. 111-123.
88. Schnitzer, M., Ghosh, A. , *Characteristics of water-soluble fulvic acid-copper and fulvic acid-iron complexes*. Soil. Sci. , 1982. **134**(1): p. 354-363.
89. Schnitzer, M., Poapst, P., *Effects of a soil humic compound on root initiation*. Nature., 1967. **33**(3): p. 598-599.

90. Schnitzer, M., Ghosh, A., *Soil Organic Matter-The Next 75 Years*. Soil. Sci., 1991. **51**(3): p. 41-58.