REAL ACADEMIA
GALEGA DE CIENCIAS

Importancia dos metais nas Ciencias da Vida: Especiación de Elementos Traza e Metalómica

Pilar Bermejo Barrera
Grupo de Elementos Traza, Espectroscopia y Especiación
Facultade de Química
Universidade de Santiago de Compostela

Excmo. Sr. Presidente da Real Academia Galega de Ciencias,

Reitor Magnífico da Universidade de Santiago de Compostela,

Reitor Magnifico da Universidade da Coruña,

Ilmo Sr. Concelleiro de Educación e Cidadanía do Concello de Santiago de Compostela

Ilmo. Vicepresidente da Real Academia Galega de Ciencias

Ilmos. Sres. Académicos, Autoridades, Compañeiros,

Ben queridos familiares e amigos, Miñas donas e meus señores:

Quero comezar a miña intervención expresando o meu agradecemento ao presidente desta Real Academia Galega de Ciencias, así como a todos os académicos, por considerar que o meu labor científico e profesional merece este nomeamento.

A verdade é que esta distinción foi para min unha gran sorpresa. Supón un honor e un recoñecemento que agradezo de corazón, porque me honra, tanto no nivel profesional como no persoal.

Eu non estaría hoxe facendo este discurso de ingreso na Academia se non tivese excelentes mestres ao longo da miña vida. Por iso quero deixar constancia da miña gratitude a todos os profesores da Facultade de Química da USC, pero quero facer constar o meu agradecemento persoal aos profesores Manuel Bao, Miguel Angel Ríos, Florencio Arce e Juan Manuel Antelo. E, moi especialmente, ao profesor Francisco Bermejo Martínez. Eles foron e son una referencia importante na miña carreira.

Grazas, así mesmo, aos profesores Pedro Rodríguez e Jesus Sanmartín, que me acompañan na actualidade nas responsabilidades do decanato, e a todo o persoal de administración e servicios da Facultade de Química da Universidade de Santiago de Compostela.

Igualmente, quero expresar o meu agradecemento a todos os membros do Grupo de Investigación en Elementos Traza, Espectroscopia e Especiación, que coordino desde o ano 1990: os profesores Adela Bermejo, Antonio Moreda, Manuel Aboal, Raquel Domínguez, M.ª Carmen Barciela, Elena Peña e Paloma Herbello. Levamos moitos anos traballando xuntos, ás veces con moitas dificultades. Inclúo tamén a todos os doutores e doutoras que se formaron no noso grupo, así como a todo o alumnado que fixo connosco os seus traballos de fin de licenciatura, de fin de grao e de fin de mestrado.

Neste capítulo de recordo e gratitude reservo para o final o espazo máis persoal, porque unha soa non é ninguén. O que somos debémosllo maioritariamente aos que viven e están ou estiveron a carón de nós.

En primeiro lugar, á miña familia. A meu pai, de quen aprendín moitas cousas. Entre elas que o rigor, a seriedade e a perseveranza no traballo son as ferramentas básicas para facer ben as cousas.

A miña nai, que foi quen de renunciar á súa vida profesional para coidar da súa familia. Dela aprendín a importancia do servizo aos demais e da solidariedade.

Aos meus irmáns e irmás, por todo o que levamos vivido xuntos.

Ao meu inseparable compañeiro Jose, con quen comparto a vida, porque sempre está aí, dando ánimos e apoiando nos momentos máis difíciles.

Aos meus fillos Ana, Juan e Albert. E, como non, ao meu neto, Martín. Eles danme a forza necesaria para o traballo de cada día.

Non é doado atopar un tema de investigación en química analítica que poida ser de interese para un auditorio tan diverso, por iso espero non ter errado e que o meu discurso sirva para dar un pouco de luz nesta liña de investigación en que levamos traballando desde hai máis de 30 anos.

O termo **metal** ten, en xeral, connotacións negativas cando se fala de contaminación ambiental ou de problemas de toxicidade. Non obstante, como mostraremos ó longo deste discurso, os metais son elementos indispensables para a vida.

Como se pode ver na táboa periódica dos elementos químicos (Figura 1), a maioría dos elementos químicos que existen na natureza son **metais** (*son os elementos que se atopan na parte esquerda e están marcados en cor azul*).

Os elementos marcados en cor verde son os coñecidos como **non-metais**. E, os de cor vermella, que se atopan entre ambos, son os chamados **semimetais** ou **metaloides**. A maioría dos metais presenta propiedades físicas e químicas características que, de xeito xeral, reciben o nome de **propiedades metálicas**.

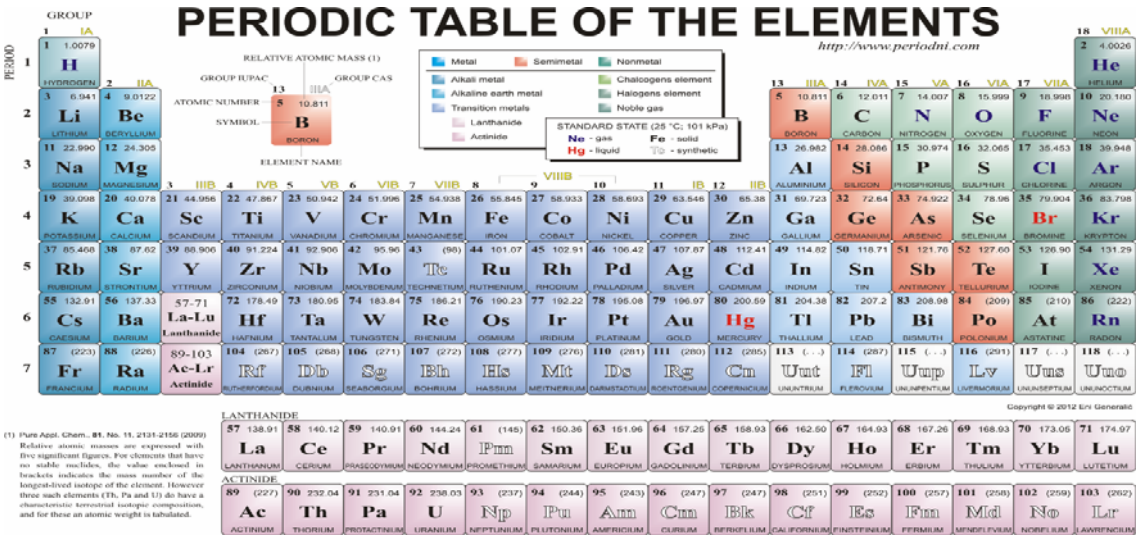


FIGURA 1. Táboa periódica dos elementos químicos.

Á hora de falar da reactividade química dun metal pode utilizarse o valor do potencial normal E^o das reaccións redox nas que intervén:

$$M^{n+}_{(aq)} + n\,e^- \rightarrow M_{(s)}$$

Un potencial negativo elevado representa unha maior tendencia do metal a ceder electróns e a forma-lo correspondente ión positivo en disolución, o que significa que o metal terá unha actividade química maior.

Isto é común para a maioría dos metais, por tanto, as súas formas químicas máis importantes en medios acuosos e en medios biolóxicos serán maioritariamente catiónicas, $M^{n+}_{(aq)}$.

Pola súa banda, estes ións teñen tendencia a formar facilmente especies complexas do tipo $[ML_n]^x$, chamadas **complexos** ou **compostos de coordinación**. A formación deste tipo de especies con diferentes tipos de moléculas ou ións determina as posibles funcións biolóxicas do elemento e inflúe nos seus efectos terapéuticos ou tóxicos.

Os non-metais representan preto do 98,1% do peso da maioría dos organismos vivos, mentres que os metais todos xuntos non representan máis do 1,9%. Desta porcentaxe, a práctica totalidade, o 1,89%, corresponde a catro elementos: sodio, potasio, calcio e magnesio. Estes elementos, chamados **elementos maioritarios** ou **macroelementos**, atópanse no organismo en elevadas concentracións.

O resto dos elementos non representa, entre todos, máis que un 0,012% do peso corporal. A estes elementos, que participan con pequenas concentracións (en xeral, menos do 0,01% da masa corporal total) e que adoitan precisar uns ingresos dietéticos da orde de 100 mg/día, chamámolos **elementos traza**. Os

elementos traza se definen polo tanto como " metais e non metais que están a niveis de concentración do orden de mg/l ó µg/l.

Desde o punto de vista nutricional é de grande importancia coñecer se un elemento participa ou non en reaccións bioquímicas ou en procesos fisiolóxicos.

Neste sentido, UNDERWOOD en 1997 (1) realizou unha clasificación dos elementos traza en tres grupos: **esenciais**, posiblemente **esenciais** e **non-esenciais** (Táboa 1).

Táboa 1- Clasificación dos elementos traza

A.- Elementos con probadas funcións esenciais 1.- Con problemas coñecidos de nutrición e deficiencias en humanos F, Cr, Fe ,Cu, Zn, Se, I 2.- Con deficiencias coñecidas só en animais Si, Mn, Co, Ni, Mo
B.- Elementos con función esencial sospeitada, pero cun mecanismo de acción descoñecido As, B, Br, Cd, Li, Pb, Sn, V
C.- Elementos sen función esencial coñecida. Tóxicos? **Hg…**

Porén, esta clasificación pode cambiar. Así, algúns dos elementos considerados hoxe esenciais, como o selenio ou o cromo, noutrora foron considerados tóxicos. Por iso, esta clasificación non se pode considerar pechada, senón que o avance no

coñecemento das funcións dos elementos traza fará que os elementos cambien de lugar nela.

Os elementos traza actúan e teñen funcións biolóxicas importantes no organismo humano. Ó igual que as compoñentes maioritarias do organismo, son indispensables e deben estar presentes en concentracións definidas, para que os procesos vitais se leven a cabo en condicións óptimas.

A súa carencia ou exceso relaciónase sempre cun efecto ou redución das funcións vitais e obsérvanse tanto irregularidades metabólicas como cambios patolóxicos no organismo. Por iso todos presentan un nivel óptimo de concentración en cada compartimento do organismo. Este nivel óptimo defínese como "a cantidade adecuada do elemento que garante o desempeño cabal das funcións biolóxicas no organismo".

Se a concentración é máis alta da normal, o elemento pasa a ter características tóxicas. No caso oposto manifféstanse síntomas carenciais no organismo. Este rango óptimo de concentración é moi variable entre os distintos elementos.

Mais, se hoxe desexamos falar sobre os perigos dos metais pesados ou da importancia dos elementos traza como elementos esenciais, non podemos considerar só a información relativa á concentración total do metal. É máis importante considerarmos a forma química, é dicir, a posibilidade de existencia de diferentes especies dun mesmo elemento nunha matriz particular. Soamente co coñecemento destas especies se poderán tirar conclusións sobre **mobilidade, resorción, biodispoñibilidade, acumulación e toxicidade** dun determinado elemento.

A primeira pregunta que debemos facernos é: que entendemos por **especie química** e por **especiación**? Téñense dado moitas definicións de ámbolos termos, pero hoxe en día a definición recoñecida é a proposta pola IUPAC (2):

Especie química: "É unha forma específica dun elemento definida en relación coa súa composición isotópica, electrónica ou estado de oxidación, e/ou estrutura molecular ou complexa".

Especiación dun elemento: "É a distribución dun elemento entre as especies químicas definidas nun sistema".

A primeira vez que se falou da importancia de coñece-la forma química en que se atopa un metal foi no ano 1950, en relación cun caso grave de intoxicación por mercurio que se produciu entre os habitantes da baía de Minamata, no Xapón, por consumiren pescado contaminado.

As verteduras de mercurio realizadas na baía produciron nos peixes dous efectos. Por unha banda, un efecto acumulativo, pero, pola outra, a súa transformación desde a forma de mercurio inorgánico á forma libre, ata converterse en **metilmercurio**. Esta segunda especie de mercurio é moito máis tóxica que o mercurio vertido inicialmente, xa que o seu carácter orgánico favorece a súa absorción e acumulación no ser humano.

Por esta razón, na actualidade, a Organización Mundial da Saúde establece recomendacións sobre o consumo de certos tipos de pescados, sobre todo para as poboacións máis vulnerables, como son os nenos e as mulleres embarazadas (3).

Posteriormente, en 1970, na baía de Arcachon, en Francia, produciuse outro importante episodio de contaminación, que afectou drasticamente as ostras. Neste caso o problema debeuse á presenza dun composto de estaño, o **tributilestaño**, TBT, que, debido ás súas propiedades antivexetativas, se utilizaba nas pinturas dos barcos para impedi-las incrustacións na súa superficie.

Este composto non era estable nas pinturas, liberábase ó medio e ocasionou os problemas de toxicidade nas ostras. Hoxe, o uso destes dous compostos está prohibido, pero aínda quedan no medio mariño cantidades importantes que pasan ós peixes e, xa que logo, constitúen un problema de seguridade alimentaria.

Mais, fóra destes dous exemplos, que especies químicas son de interese, en xeral, nas ciencias da vida?

A día de hoxe é difícil darmos unha resposta completa a esta pregunta, porque moitas desas especies aínda nos son descoñecidas. Vanse descubrindo a medida que se desenvolven novos métodos analíticos.

Deseguido citamos algúns exemplos. O simple cambio do estado de oxidación dun elemento pode ter un efecto moi importante sobre a súa biodispoñibilidade e toxicidade. Así, mentres o cromo(III) é un elemento esencial, o cromo(VI) é altamente tóxico. Mais para o arsénico, o arsénico(III) é máis tóxico que o arsénico(V). Para algúns complexos inorgánicos, o simple cambio na orientación dos ligandos pode afectar á súa efectividade, como ocorre, por exemplo, no coñecido axente antitumoral diclorodiamin platino(IV).

Por outra banda, os complexos organometálicos de metais pesados, como o **metilmercurio**, o **tributilestaño** ou o **tetratetilchumbo**, son normalmente máis tóxicos que os ións libres, mentres os complexos con moléculas como as proteínas, os azucres ou os cofactores enzimáticos son moi importantes desde o punto de vista nutricional.

Como pode verse na Figura 2, produciuse un cambio importante no tipo de especies metálicas estudadas, aumentando, por un lado, o tamaño das moléculas e, polo outro, a súa complexidade.

Comezamos estudando compostos organometálicos sinxelos, algúns tóxicos, como os xa citados de metilmercurio e tributilestaño, e outros de interese nutricional, como a **seleniometionina** ou a **arsenobetaína**.

Na actualidade, a investigación en especiación enfócase principalmente ó estudo de moléculas grandes de interese biolóxico, complexos metálicos con proteínas, ácidos nucleicos ou carbohidratos, así como cara ós compostos organometaloides naturais, caso dos **arsenoazucres** ou as **selenoproteínas**. Ademais, tamén é de interese o establecemento da relación destes compostos cos procesos de alteración do ADN, coas proteínas e metaloproteínas, cos metabolitos xerados e mais coas funcións biolóxicas.

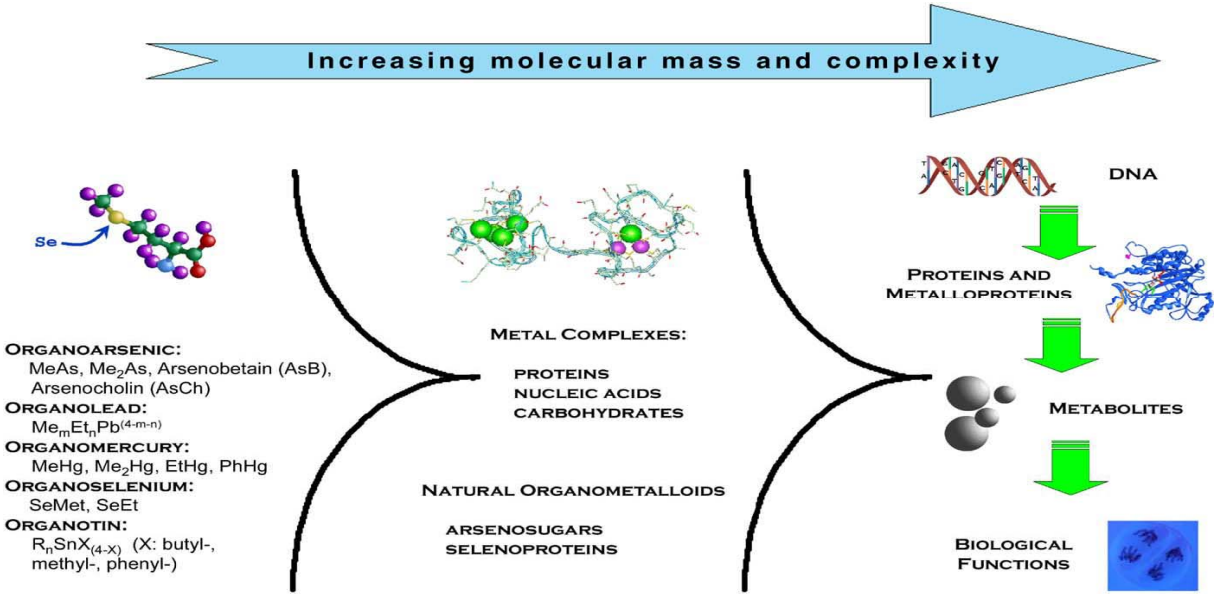


Figura 2. Evolución do concepto de especiación

A química dunha célula necesita ser caracterizada non só polo seu xenoma característico do núcleo e o seu contido proteico (o proteoma), senón tamén pola distribución de metais e metaloides entre as diferentes especies metálicas e compartimentos celulares.

Neste sentido, introduciuse o termo **metaloma**, que se define como “a distribución de metais e metaloides entre as diferentes especies e compartimentos da célula”. A disciplina científica correspondente, a **metalómica**, defínese como “o estudo do metaloma, das interaccións e conexións funcionais de ións metálicos e outras especies metálicas con xenes, proteínas, metabolitos e outras biomoléculas en sistemas biolóxicos”(4). Na seguinte figura podemos ve-la relación entre tódalas ciencias ómicas: a xenómica, proteómica, glicómica, metabolómica e metalómica (5).

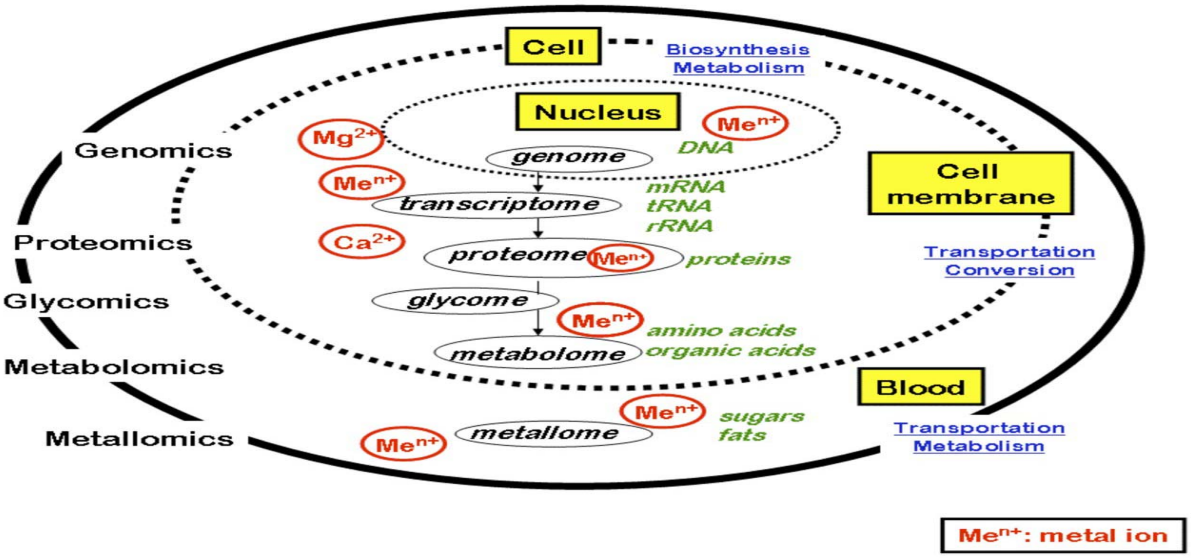


Figura 3.- Modelo simplificado dun sistema biolóxico e as ciencias ómicas relacionadas (5)

O interese desta nova disciplina científica deu lugar a que, en primero lugar no ano 2002 crearase EVISA (European Virtual Institute for Speciation Analysis), en 2007 celebrarase o primero congreso sobre Metalómica, e no ano 2009, a *Royal Society of Chemistry* (RSC), publicase a primeira revista científica sobre este tema, ***Metallomics.*** Hoxe podemos afirmar que xa estamos ante unha disciplina científica establecida, estreitamente relacionada con outras moitas disciplinas das ciencias da vida. Na Figura 4 podemos ver tódalas que están vinculadas coa **metalómica**.

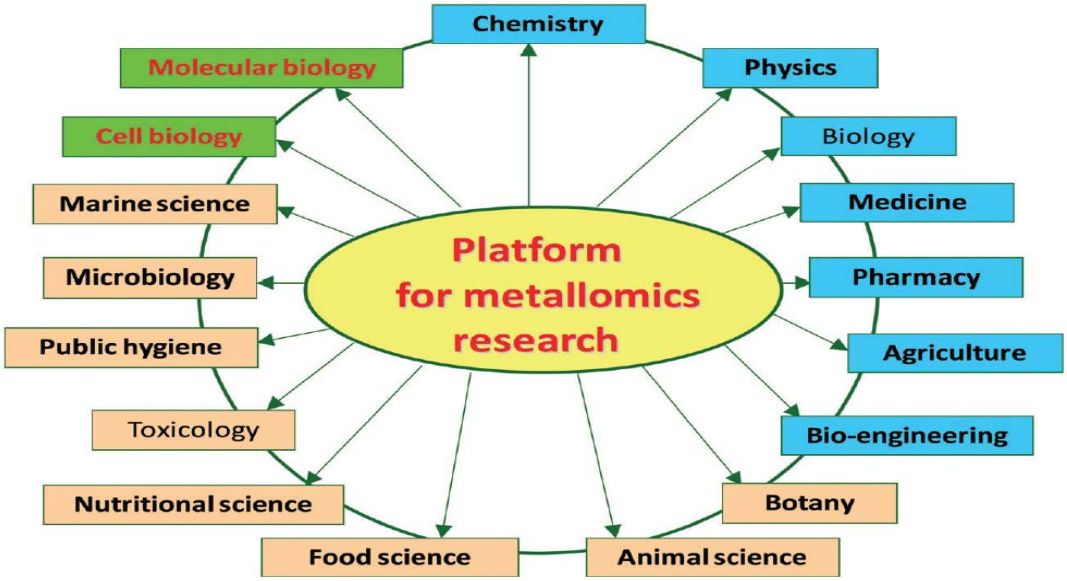


Figura 4.- Disciplinas relacionadas coa investigación en metalómica

No seguinte esquema, Figura 5, podemos ver cales son os principais heteroátomos en proteínas e os seus complexos que son de interese na actualidade. Nalgúns deles, os metais atópanse unidos por enlaces covalentes, mentres que noutros as interaccións metal-biomolécula son máis débiles. Estes últimos son os máis difíciles de estudar, xa que, coa simple manipulación da mostra para observala, esta interacción pode verse alterada (7).

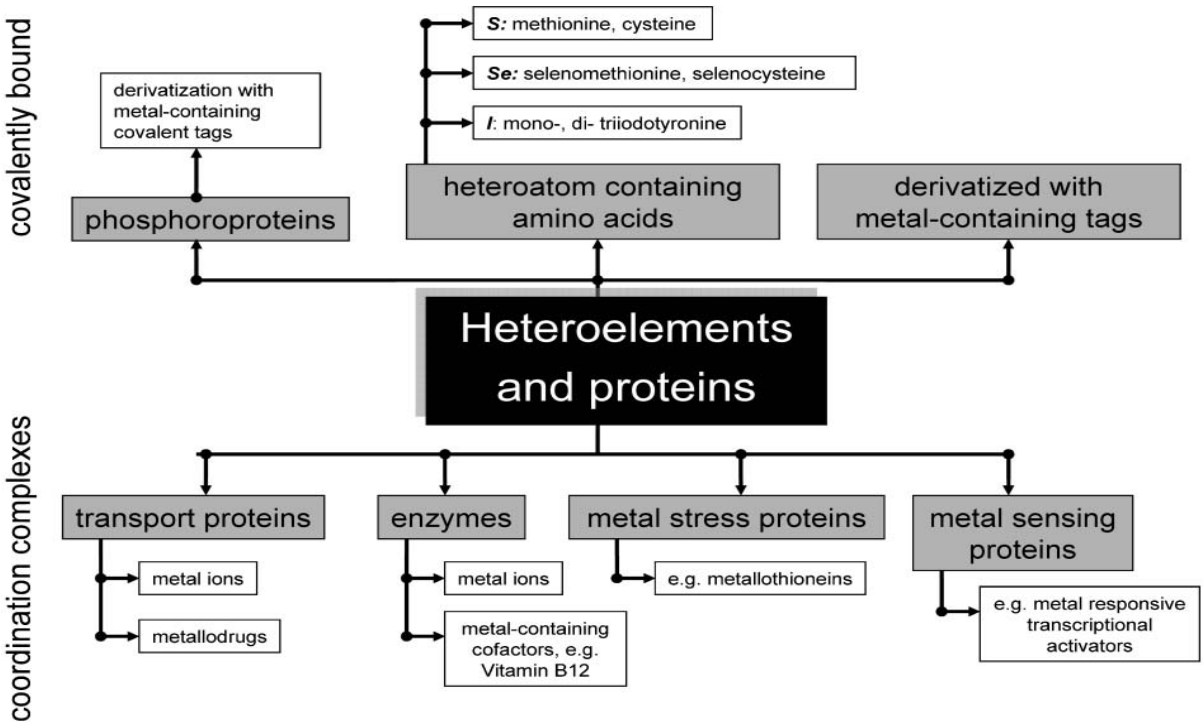


Figura 5.- Orixe de heteroatómos e proteínas

O desenvolvemento dos estudos de especiación e de metalómica foi paralelo ós avances da instrumentación analítica. Os primeiros estudos estiveron máis orientados a cuestións ambientais e, posteriormente, a mostras de seres vivos, tanto de plantas e animais como de humanos.

Sen dúbida ningunha, o desenvolvemento das técnicas espectrométricas atómicas, ICP-OES e ICP-MS, xunto co incremento da capacidade de resolución da espectrometría de masas molecular, da resonancia magnética nuclear e das técnicas de microscopia foi paralelo co progreso da **metalómica**.

Con todo, dada a complexidade das mostras obxecto de estudo e a dificultade de perda da interacción metal ligando, cómpre botar man de técnicas analíticas de alto poder de resolución

acopladas a técnicas analíticas de alta capacidade de detección, procedemento que chamamos **técnicas híbridas**.

Na Figura 6 móstrase un resumo das principais técnicas analíticas utilizadas na actualidade (7). Nelas podemos ver unha gran cantidade de técnicas de separación diferentes, principalmente cromatográficas e electroforéticas. Canto ás técnicas de detección, sen dúbida ningunha, a ICP-MS é a máis utilizada para realiza-la cuantificación de especies, e a **espectrometría de masas molecular**, nas súas diferentes modalidades, a máis axeitada para identificar especies descoñecidas.

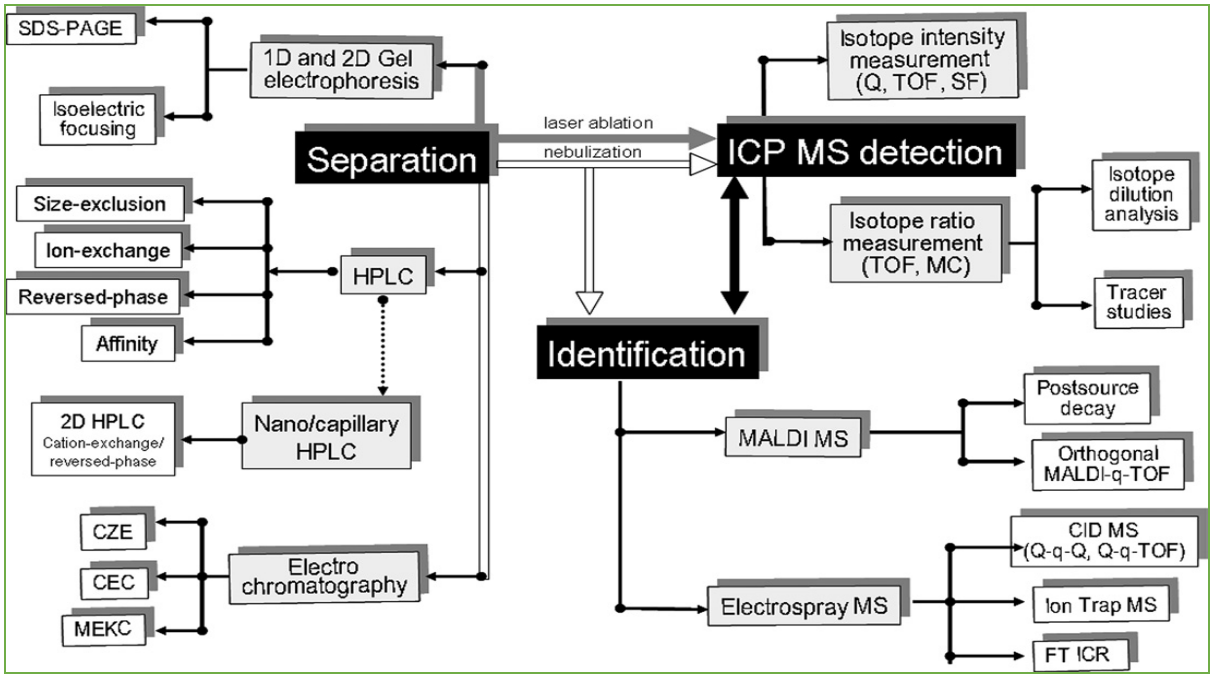


Figura 6.- Principais técnicas híbridas utilizadas nos estudos de especiación

Non obstante, un dos problemas máis importantes que aínda existen hoxe para realizar este tipo de estudos é o relacionado

coa preparación da mostra. Na Figura 7 podemos ver tódalas etapas necesarias dun estudo de especiación completo.
Malia se produciren avances importantes nas técnicas de detección, cuantificación e identificación, as primeiras etapas do proceso analítico relativas á extracción das especies desde a mostra orixinal, así como á súa preconcentración (necesaria debido ós baixos niveis), aínda non están ben resoltas.

O problema da separación das especies metálicas desde unha mostra complexa, sen se produciren cambios na súa estrutura e concentración, é aínda un importante reto analítico.

Isto débese, primeiro de todo, a que se trata de analitos que están en niveis de concentración moi baixos (da orde das partes por billón ou menos) en mostras moi complexas. Nestas mostras preséntanse varias especies químicas do mesmo elemento, que, aínda diferentes, son moi semellantes desde o punto de vista estrutural. E, en segundo lugar, enfrontámonos co problema da inestabilidade das especies, porque poden producirse nelas reaccións de interconversión que alteran a composición orixinal da mostra.

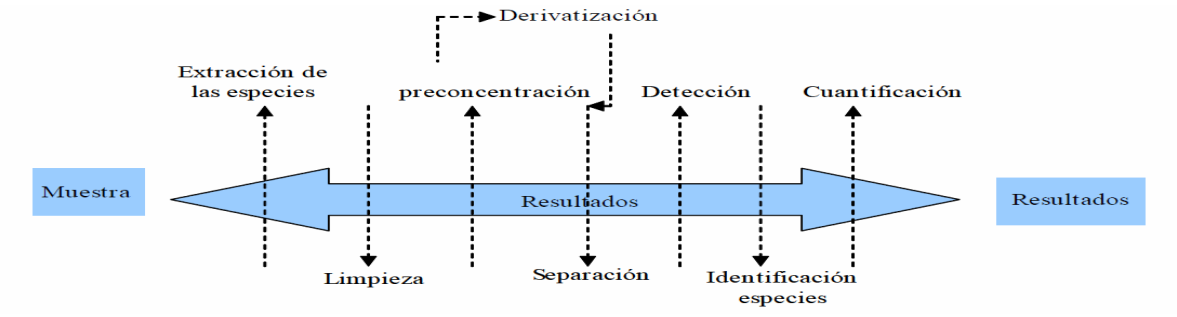


Figura 7.- Esquema das diferentes etapas necesarias para realizar estudos de especiación en mostras biolóxicas

Deseguido, móstranse algúns exemplos de interese nos ámbitos alimentario, ambiental e clínico.

Especiación, fortificación e biodispoñibilidade de elementos traza en alimentos

Un primeiro exemplo está relacionado co estudo comparativo da especiación de elementos traza no leite materno e nas fórmulas infantís utilizadas para a súa substitución.

É un feito, de sobra coñecido, que o leite materno é o alimento ideal na alimentación infantil, mais cando este non pode ser utilizado debemos dispoñer de fórmulas que sexan o máis semellantes posibles canto á súa composición química.

Resulta interesante coñecer como é a forma química na que se atopan os elementos traza esenciais, como por exemplo o ferro, o cobre e o zinc no leite materno e no leite de fórmula que se prepara a partir do soro de leite de vaca.

Para facer este estudo cómpre, en primeiro lugar, separa-las proteínas do leite e, en cada unha delas, realiza-lo estudo do perfil metálico.

Na Figura 8 vemos, dunha banda, o diferente perfil proteico en relación co peso molecular das proteínas presentes no leite materno e na fórmula infantil; e, da outra, a distribución de ferro, cobre e zinc entre as distintas proteínas (9).

Malia ser diferente o comportamento de cada metal, percíbese unha clara diferenza entre as metaloproteínas presentes no leite humano e nas fórmulas infantís. Esta diferenza pode explica-lo

comportamento distinto en relación coa biodispoñibilidade dos elementos traza en ámbolos tipos de leite.

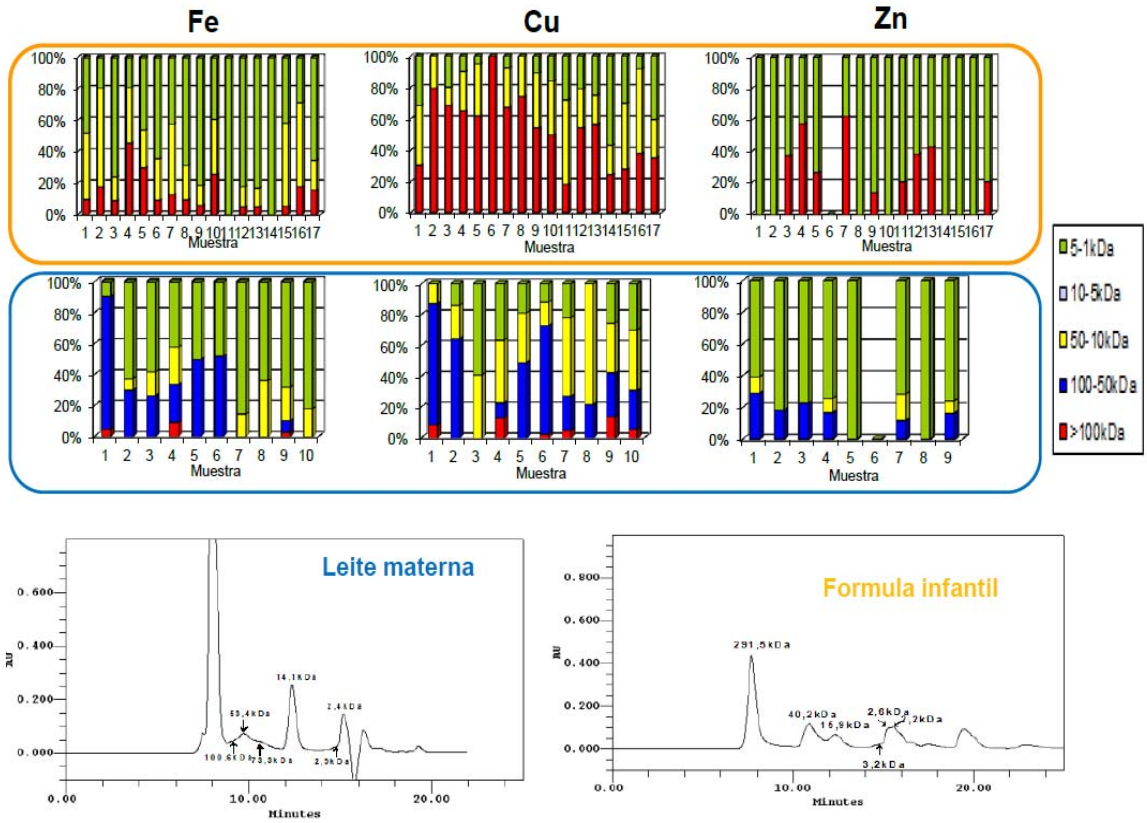


Figura 8.- Especiación de ferro, cobre e zinc en leite materno e fórmula infantil.

Outro elemento de grande interese, desde o punto de vista nutricional, para toda a poboación, é o **selenio**. Este é un elemento traza esencial que forma parte de moitas selenoenzimas, das cales a glutatión peroxidase é a máis significativa.

Esta enzima xoga un papel clave no metabolismo do osíxeno. As súas disfuncións relaciónanse con multitude de síntomas asociados co déficit de selenio.

A principal vía de absorción do selenio é a través da dieta. Nos alimentos aparece basicamente en forma de compostos orgánicos, sobre todo selenometionina, selenocisteína e selenocistina. A primeira delas, a selenometionina, é a especie máis biodispoñible.

A cantidade de selenio nos alimentos está estreitamente relacionada coa súa dispoñibilidade desde o solo. Por mor das características ácidas dalgúns solos, os niveis son baixos en moitos alimentos.

Isto explica que en rexións con problemas de deficiencia de selenio, como é o noso caso, se formulen diferentes propostas para reforzar de xeito adecuado algún tipo de alimento básico. Unha das vías sería a suplementación con microorganismos empregados na fermentación. Por exemplo, o fermento usado para fabricar pan. Tamén mediante o enriquecemento de vexetais, con base na súa capacidade de transformación do selenio inorgánico en selenio orgánico.

Unha terceira alternativa sería o enriquecemento de produtos animais mediante a suplementación da súa dieta. No caso de Galicia, esta foi unha das opcións utilizadas e ten un dobre interese.

Por un lado, debido ó carácter ácido dos nosos solos, os pastos presentan baixos niveis de selenio, polo que se precisa realizar unha suplementación deste elemento ó gando.

Se, ademais, conseguimos que o selenio que se lle dá ó gando pase ó leite dun xeito que sexa biodispoñible para o ser humano,

estariamos actuando para resolver dous problemas: os déficits do gando e o da poboación.

Agora ben, cómpre selecciona-la especie química do selenio que sexa máis biodispoñible para o gando, o que suporá unha mellora na súa saúde, así como nos alimentos xerados para o home, fundamentalmente no leite.

Cando se realiza a suplementación con selenio inorgánico, en forma de selenito sódico e con selenometionina, podemos observar (Figura9) que só o selenio en forma de seleniometionina é absorbido e está presente no leite. Xa que logo, esta especie resulta a máis idónea para realiza-la suplementación.

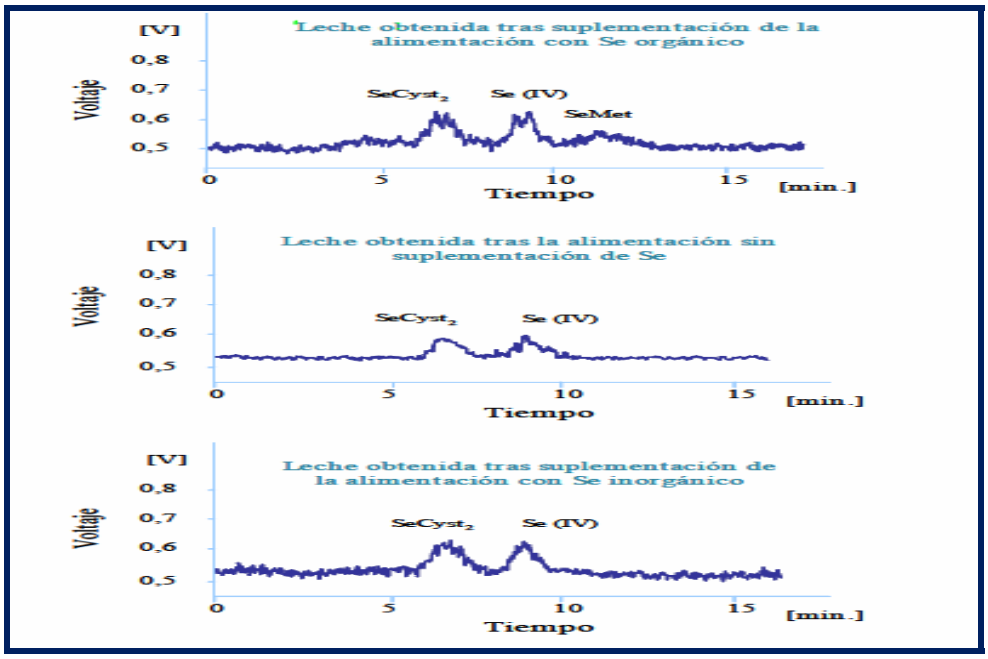


Figura 9.- Especies de selenio en leite de vaca despois dun proceso de fortificación con selenio inorgánico e con selenometionina

Outro exemplo, un pouco máis complexo, é o **arsénico**, elemento que, por mor da súa posición na táboa periódica, pertence ó grupo dos chamados metaloides, con propiedades químicas intermedias entre os metais e os non-metais.
Isto fai que sexa moi alto o número de especies químicas presentes nunha mostra de alimento (algunhas delas claramente tóxicas e outras non).

Neste sentido, estudamos un alimento que, malia que poida parecer un pouco raro, é unha importante fonte de riqueza para Galicia: **as algas**.

Das algas obtense unha gran cantidade de compostos químicos, que se usan logo en cosmética, na industria farmacéutica, como aditivos alimentarios e, máis recentemente, como alimentos.

Neste último uso ou propiedade presentan aspectos nutricionais moi interesantes, posto que teñen un alto contido en fibra e proteínas e baixo en graxas, para alén de altos contidos en elementos traza esenciais, mais tamén poden conter altos contidos de elementos tóxicos. De aí que sexa tan importante o estudo da súa seguridade.

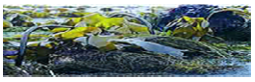
En relación co arsénico, as algas presentan un elevado número de especies químicas cuxa toxicidade pode ser moi variable. A toxicidade das especies mostradas na seguinte táboa diminúe ó descender nela. A especie As III é a máis tóxica e os arsenoazucres son especies non tóxicas.

Táboa 2.- Especies químicas do arsénico e a súa toxicidade

Nomenclatura	Nome abreviado	Fórmula molecular
Arsenite (arsenous acid)	AsIII	$As(OH)_3$
Arsenate (Arsenic acid)	AsV	$AsO(OH)_3$
Monomethylarsonous acid	MMAIII	$CH_3As(OH)_2$
Monomethylarsonic acid	MMAV	$CH_3AsO(OH)_2$
Dimethylarsinous acid	DMAIII	$(CH_3)_2AsOH$
Dimethylarsinic acid	DMAV	$(CH_3)_2AsO(OH)$
Arsenobetaine	AB	$(CH_3)_3As^+CH2COO^-$
Arsenocholine	AC	$(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OH$
3-[5´-deoxy-5´-(dimethylarsinoyl)-ß-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropylene glycol	Glycerol-ribose, OH-sugar	
3-[5´-deoxy-5´-(dimethylarsinoyl)-ß-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropane sulfonic acid	Sulfonate-ribose, SO_3-sugar	
3-[5´-deoxy-5´-(dimethylarsinoyl)-ß-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl hydrogen sulfate	Sulfate-ribose, SO_4-sugar	
3-[5´-deoxy-5´-(dimethylarsinoyl)-ß-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl-2,3-hydroxypropyl phosphate	Phosphate-ribose, PO_4-sugar	

Se estudamos en primeiro lugar o contido total de arsénico nas algas galegas, podemos ver que nalgunhas especies é realmente alto, en particular os niveis da especie Kombu. Pero esta información non abonda para tirarmos conclusións sobre a posible toxicidade. Para iso precisamos coñecer cales son as especies químicas presentes.

Táboa 3.- Niveis de arsénico en algas de Galicia

Tipo de alga	Nome	Rango [As]/µg.g^{-1}
	Lechuga de mar *(Ulva rigida)*	2.7-6.0
	Kombu *(Laminaria ochroleuca)*	56.4-383.8
	Espagueti de mar *(Himanthalia elongata)*	10.5-16.0
	Wakame *(Undaria pinnatifida)*	23.6-45.5
	Dulse *(Palmaria palmata)*	3.1-7.3
	Nori *(Porphyra umbilicalis)*	10.7-48.8

Para realizar este estudo é preciso desenvolver metodoloxía analítica que nos permita separar, detectar, identificar e cuantificar tódalas especies de arsénico presentes.

Debido á gran variedade de especies, necesítase empregar unha separación cromatográfica en dúas dimensións, baseada, primeiro, no tamaño e, despois, no seu carácter iónico.

Non obstante, logo de realizar esa separación aparecen especies aínda non identificadas, razón pola que cómpre realizar unha análise cualitativa das ditas especies mediante técnicas de espectrometría de masas de alta resolución (11).

Como conclusión do estudo atopouse que a maioría das especies presentes son arsenoazucres, que hoxe en día no se consideran compostos tóxicos.

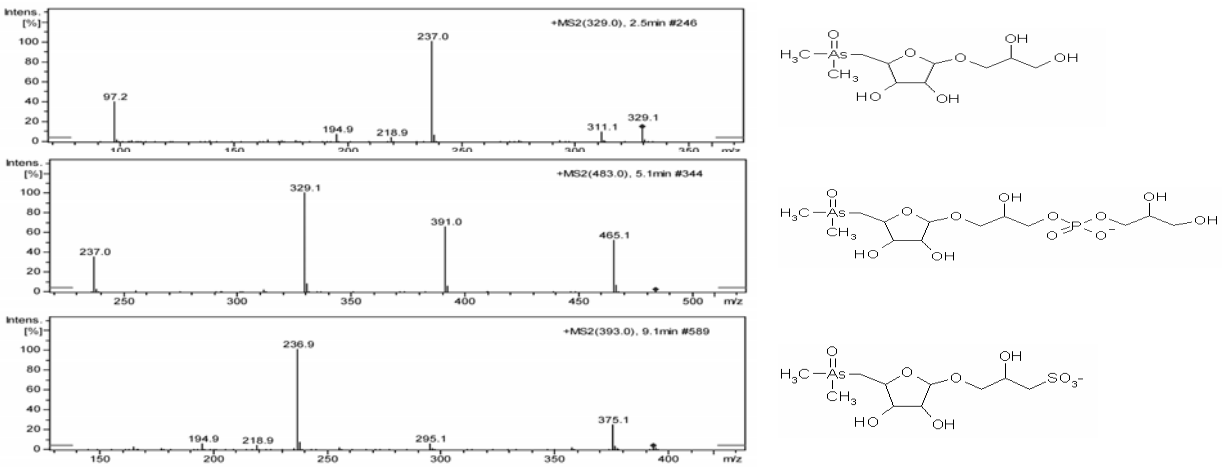


Figura 10.- Identificación de especies de arsénico por ESI-MS/MS

Se se quere dar un paso máis no estudo de seguridade dun alimento, débese valora-la súa posible **biodispoñibilidade**. A biodispoñibilidade defínese como 'unha porcentaxe dun nutriente capaz de ser absorbido e dispoñible para ser almacenado'.

Para o seu estudo pódense utilizar métodos *in vivo, in vitro* e métodos *in silico.* Vexamos un exemplo de aplicación dun método *in vitro,* no que se simula no laboratorio a dixestión gástrica e intestinal do alimento, empregando as enzimas adecuadas –tal como se ve no seguinte esquema– e posteriormente úsanse membranas de diálise que simulan a parede intestinal.

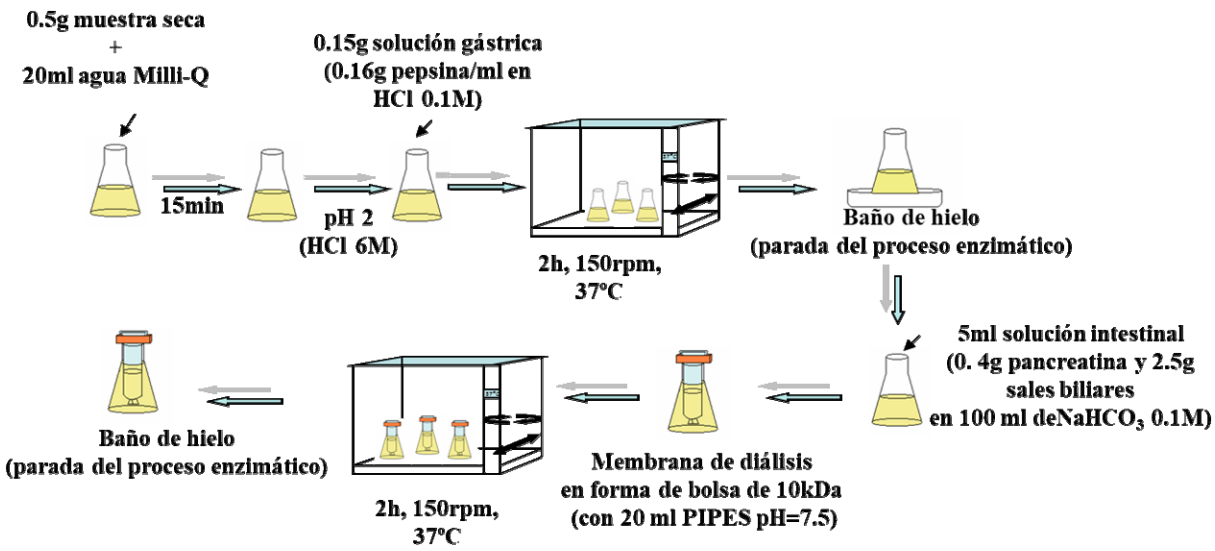


Figura 11.- Esquema dun proceso de dixestión *in vitro*

A biodispoñibilidade do elemento relaciónase entón coa porcentaxe de dializabilidade, que se calcula como o cociente entre a cantidade de arsénico que atravesou a membrana de diálise e a concentración total do arsénico na mostra.

$$\%Dializabilidade = \frac{[As]dializado}{[As]total} x100$$

Os resultados obtidos nos catro tipos de algas estudadas pódense ler na seguinte táboa. A conclusión máis importante é que a porcentaxe de biodispoñibilidade do arsénico nas algas é moi baixo, polo que estas se poden considerar como un alimento seguro (12).

Táboa 4.- Porcentaxe de biodispoñibilidade de arsénico en algas

Tipo de alga	**$[As]_{total}$ ± SD µg.g^{-1}**	**$[As]_{biodispoñible}$ ± SD µg.g^{-1}**	**% dializabilidade**
Kombu	56.4 ± 1.4	7.6 ±1.1	13.5 ± 1.9
Wakame	38,3 ±1.7	4.4 ±0.8	11.4 ± 2.1
Leituga de mar	4.8 ± 0.05	0.6 ±0.07	11.6 ±1.4
Nori	48.8 ±2.5	8.0 ±1.3	16.4 ±2.8

¿E que pasa coas especies de arsénico durante a dixestión?, pois afortunadamente poidemos comprobar que non se produce interconversión das especies.

Especiación en mostras de interese ambiental

Canto ás aplicacións de interese ambiental, citarei brevemente como o estudo das metaloproteínas pode ser tamén de interese nos estudos de contaminación ambiental.

Para avalia-la contaminación por metais pesados en auga de mar, debido ós baixos niveis presentes nas mostras e á dificultade de uso da auga mariña como mostra analítica, resulta máis sinxelo facer uso de bioindicadores, como, por exemplo, os mexillóns. Estes bivalvos filtran grandes cantidades de auga e, xa que logo, teñen a capacidade de concentra-los posibles contaminantes.

Dentro das metaloproteínas e desde o punto de vista ambiental, interesa o estudo das **metalotioneínas**. Trátase de proteínas de tipo citoplasmático que destacan polo seu alto contido en grupos sulfidrilos, de baixo peso molecular, e que presentan alta

afinidade polos elementos traza, tanto tóxicos como esenciais, polo que son bos indicadores de exposición ambiental.
A modo de exemplo, nun estudo realizado en mexillóns da ría de Arousa, preséntanse (como se pode ver na Figura 12) as dúas isoformas: a MLP-I e a MLP-II, unidas a algúns elementos como cobre, estroncio, bario, manganeso e zinc.

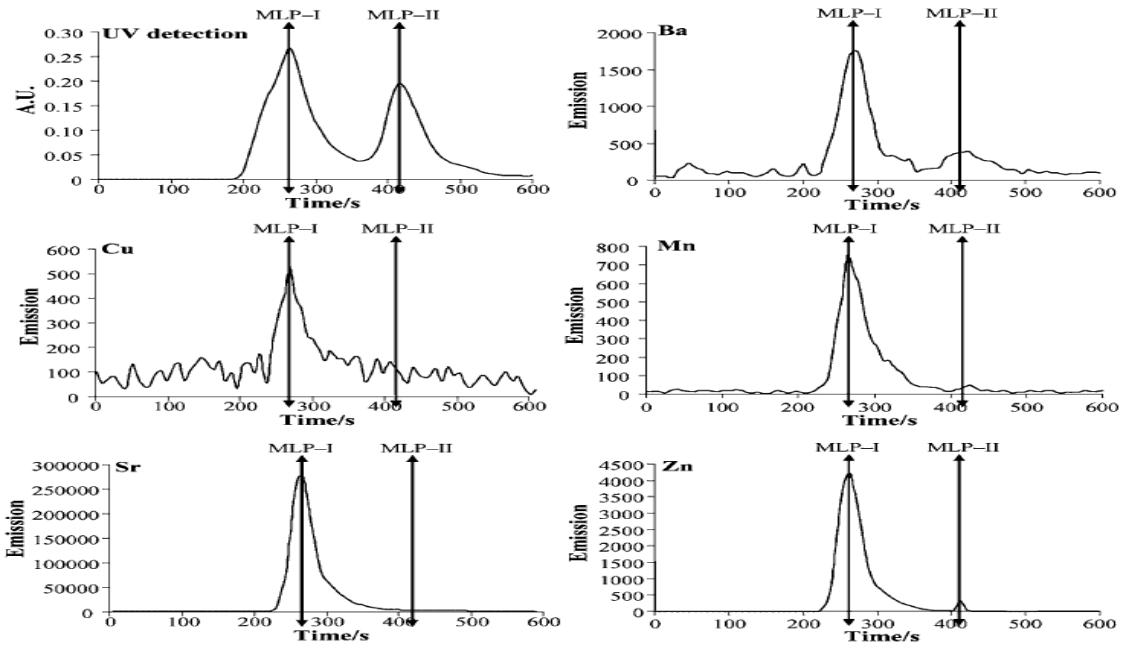


Figura 12.- Perfil de metalotioneínas presentes en mostras de mexillóns

Se realizamos unha análise de compoñentes principais e unha análise de clúster coa información dos metais unidos á MLP-I (como se observa na Figura 13), aparecen dous grupos claramente diferenciados.

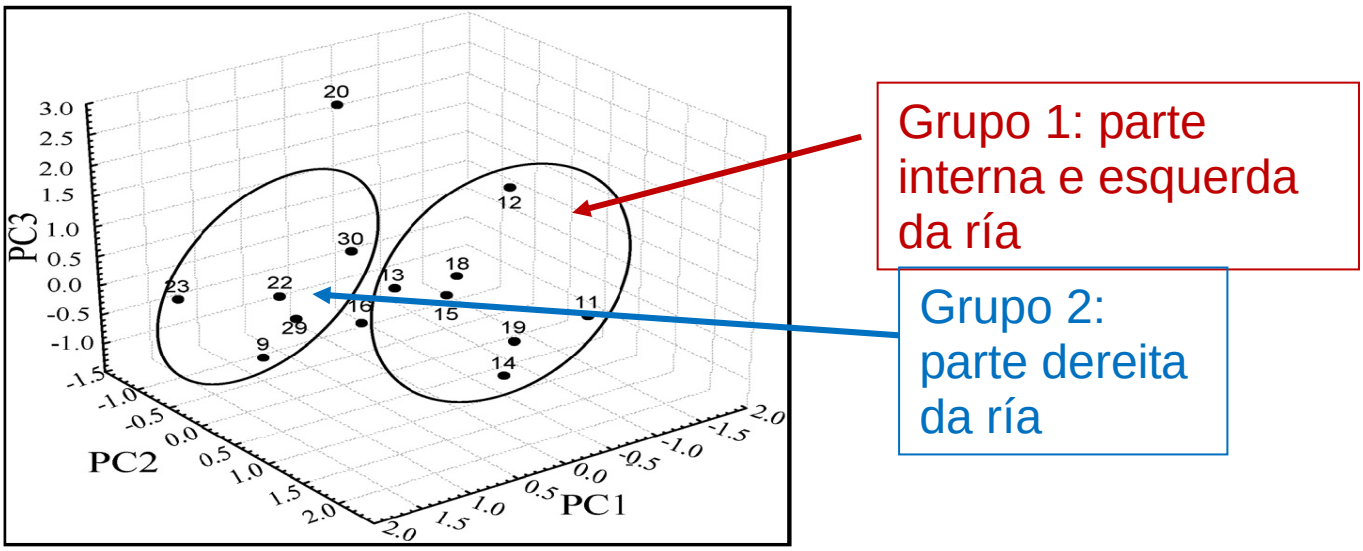


Figura 13. Clasificación de mexillóns da ría de Arousa en función das metalotioneínas

O grupo 1, formado por mostras que corresponden á parte interna e esquerda da ría, e o grupo 2, con mostras da parte dereita. Estes resultados concordan cos datos de circulación de auga na ría. Hai unha corrente de auga que entra pola parte dereita do esteiro e outra que sae pola parte esquerda. Os mexillóns cultivados na parte esquerda son os máis expostos ás descargas do río Ulla e, daquela, están sometidos a un meirande estrés metálico.

Especiación en mostras de interese clínico

O uso das metaloproteínas como bioindicadores de alteracións sufridas polos organismos vivos pode ser tamén unha ferramenta moi importante no ámbito da medicina, xa que estas moléculas poden ser utilizadas como biomarcadores, tanto para o

diagnóstico precoz de enfermidades como para o seu seguimento.
Nesta liña, estase a traballar intensamente no estudo do papel da metalómica, a proteómica e a metaloproteómica en moitas enfermidades, con especial interese no terreo das enfermidades neurodexenerativas, caso do alzhéimer, o párkinson ou a esclerose múltiple, debido á súa elevada incidencia.
Nestas patoloxías é moi importante o diagnóstico precoz, porque axuda a procurar unha estratexia terapéutica adecuada para minimizar, ou mesmo impedir, o desenvolvemento a un estadio máis avanzado da doenza.

Cando aparecen estas enfermidades, as proteínas do plasma, principalmente as minoritarias, poden estar sobre-expresadas ou mostrar modificacións postranslacionais, o que será de utilidade para establecer novos biomarcadores. Hoxe disponse dunha importante cantidade de información que relaciona algúns elementos esenciais (entre outros, o cobre, o ferro, o manganeso, o zinc e o selenio) e outros considerados tóxicos, (como o arsénico, o chumbo e o cadmio) cos procesos neurodexenerativos.

Para realizarmos este estudo, unha vez obtidas as proteínas minoritarias do soro, sepáranse por electroforese bidimensional en xel. Deseguido faise, por unha parte, a análise dos metais en cada proteína utilizando a ablación láser-ICP-MS e, pola outra, a identificación das proteínas usando a espectrometría de masas MALDI-TOF-MS.

Toda a información obtida sobre o coñecemento do perfil metálico completo nas mostras de soro, e a presenza e/ou

cambios nas metaloproteínas correspondentes, pode ser útil no diagnóstico temperán destas enfermidades.

Novos retos nos estudos de especiación

Nos últimos anos xurdiu un novo reto na **especiación de elementos traza**. En particular, pola necesidade de ter en conta o tamaño e o tipo de partícula en que se atopa a especie química. O estudo da natureza e tipo de partícula á que está asociada unha especie química é moi importante para coñece-lo impacto que ten na súa biodispoñibilidade, toxicidade e mobilidade.

Tradicionalmente, nun sistema acuoso establécese a diferenza entre a fracción disolta e a fracción particulada. Baséase normalmente na separación de ámbalas fraccións a través de filtros de 0,45 µm. Non obstante, na actualidade as partículas defínense como materiais que teñen un tamaño maior de 1 µm, mentres os coloides son compostos cun rango de tamaños que varía entre 1 nm e 1 µm. As nanopartículas son consideradas substancias cun tamaño entre 1 nm e 100 nm. En consecuencia, as nanopartículas constitúen unha subfracción dos coloides, tal como se expón na Figura 14.

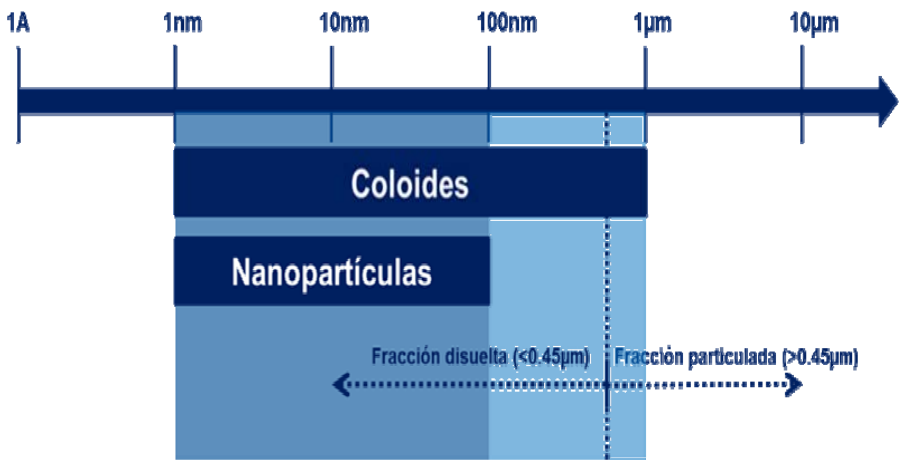


Figura 14. Definición de tamaños para nanopartículas e coloides (14)

Polo demais, os coloides nos medios naturais acuáticos poden ser de orixe natural, de orixe antropoxénica ou de orixe sintética.

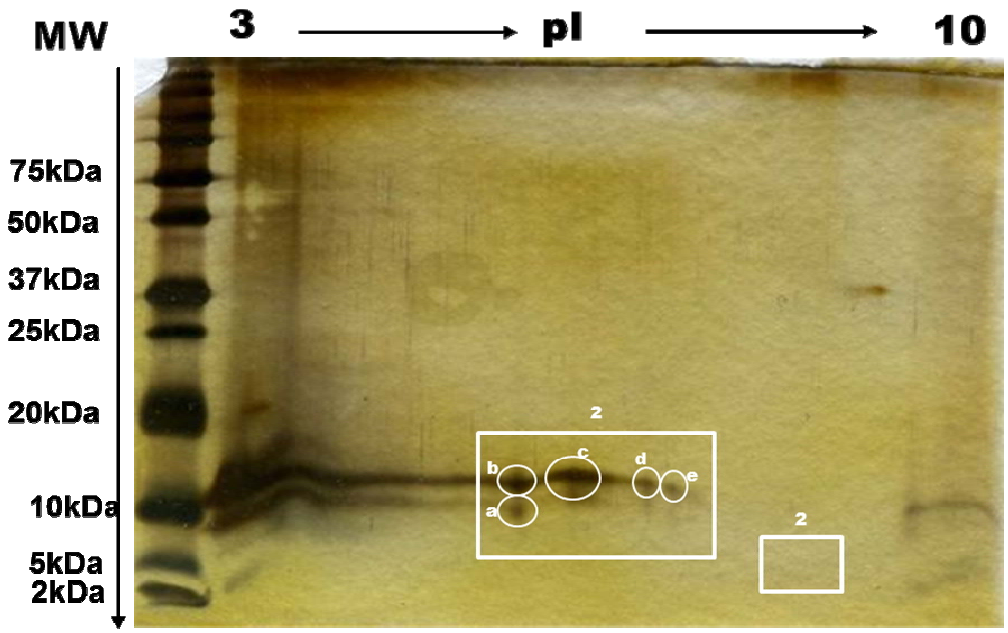
Especiación de nanopartículas naturais

En relación co primeiro caso, centrámonos nas nanopartículas naturais no medio mariño, onde os metais poden existir libres, en forma de ións ou enlazados á materia orgánica disolta, DOM. O interese de estudio da DOM é debido a seu papel principal no Ciclo Global do Carbono e polo tanto a súa implicación nos procesos de retención do dióxido de carbono atmosférico.

Esta materia pode estar formada por diferentes tipos de moléculas orgánicas, como proteínas, lípidos, carbohidratos, substancias húmicas e outras moléculas agrupadas co nome de CRAM (moléculas alicíclicas ricas en grupos carboxilo). De todas elas, fixámonos no caso das proteínas presentes na materia orgánica disolta na auga de mar.

Para levar adiante este estudo preséntanse dous importantes problemas. O primeiro, os moi baixos niveis da DOM na auga de mar. O segundo, o alto contido salino. Para solucionalos efectuamos unha separación da DOM que nos permita a súa preconcentración e a separación da matriz salina. Utilizamos a ultrafiltración en fluxo tanxencial con membranas de diálise de 10KDa e unha separación posterior das sales con pequenas columnas de desalgadura.

Unha vez obtidas as proteínas logo da súa precipitación e purificación, sepáranse por electroforese bidimensional en xel e procédese á análise dos metais en cada proteína, empregando a ablación láser-ICP-MS e a identificación das proteínas por MALDI-TOF-MS. Na Figura 16 observamos un exemplo dun xel obtido para unha mostra de auga de mar superficial, o tamaño das proteínas atopadas, así como os metais unidos a cada proteína.



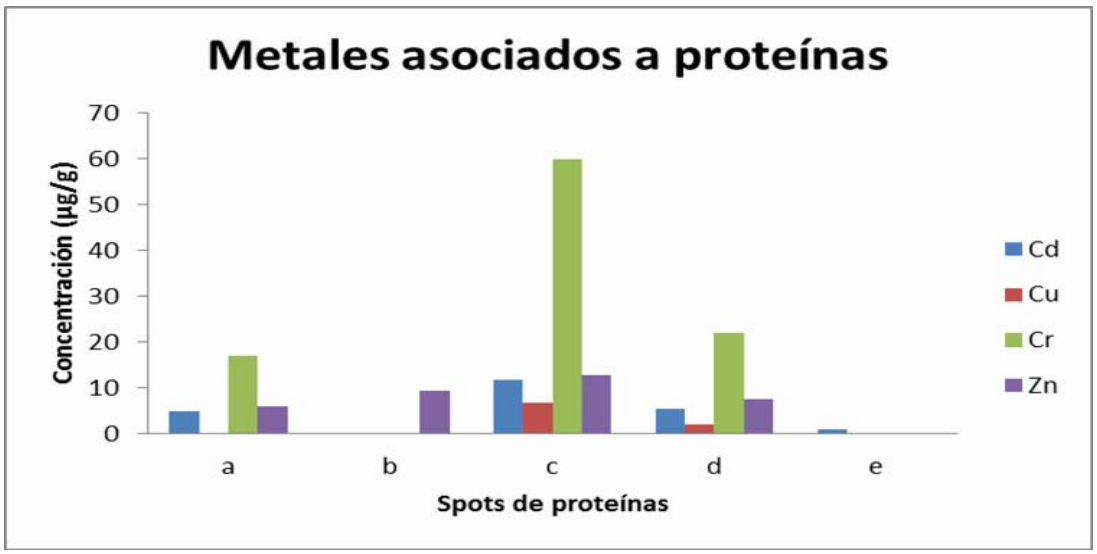


Figura 15.- Xel obtido para a separación de proteínas da DOM en auga de mar e metais asociados ás proteínas

A continuación, procédese á identificación das proteínas usando a espectrometría de masas na súa forma MALDI-TOF-MS e a base de datos NCBInr e SwissProt para a procura das proteínas. Os resultados obtidos móstranse na Táboa 5. Como se ve, as proteínas disoltas maioritariamente son enzimas procedentes de diferentes compoñentes celulares do plancto mariño e dúas proteínas TRAP-T e LysA, que son proteínas de membrana (16).

Táboa 5.- Proteínas identificadas na DOM da auga de mar

Protein name	Peptide tag	Score	matching peptides	MW (kDa)		pI	
				Theo.	Exp.	Theo.	Exp.
Penicillinase repressor	AAVMNVLWEAA	69	10/11	13.9	49.0	6.31	4.0
Flagelarhook-associated protein FliD	ARMDTGTGVDI	68	10/11	70.0	49.0	6.74	4.0
Glucose/sorbosone dehydrogenase	TTKYYTSSNRSRNA	69	11/14	51.2	41.0	5.91	3.4
Carbamoyl-phosphate synthase	GTNNNSDESSKLY	68	11/13	43.0	44.0	9.23	3.8
TRAP-T	MMADVLMLSMPM	76	10/12	70.7	49.0	9.13	3.5
L-aspartate oxidase	MKMMGELVMLS	73	9/11	58.9	49.0	6.01	3.5
Translation elongation factor Tu	GEELELVGLR	63	10/10	43.1	46.0	5.03	4.9
Malate synthase A	HKRGSPAAGGM	62	9/11	59.0	60.0	6.11	5.7
ATP-dependent DNA helicase RecQ	DKPDVRFGAHVE	74	11/12	67.5	14.0	5.96	4.2
Glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylase	RDRVWRNNPG	74	9/10	91.9	35	5.56	4.1

Especiación en nanopartículas metálicas de orixe sintética

Polo que atinxe ás nanopartículas metálicas de orixe sintética, cómpre salienta-lo gran desenvolvemento de todo tipo de nanomateriais nos últimos anos. Débese, sen dúbida ningunha, a que ofrecen importantes aplicacións en moitos campos diferentes, incluindo a química analítica, xa que nos permiten

desenvolver métodos analíticos mais potentes. Pero hoxe, a miña intervención neste campo é en relación aos posible problemas producidos polos novos materiais.

Na Figura 16 exprésase o incremento exponencial do uso dos nanomateriais. Dentro deste tipo de nanomateriais, as nanopartículas metálicas de prata e de ouro, as de óxidos metálicos de titanio, aluminio e ferro, e os *quantum dots* con cadmio, selenio, teluro etc, son as máis amplamente utilizadas.

Na actualidade estase a producir unha liberación ó medio ambiente de todas estas nanopartículas que, a través do aire, da auga, os alimentos e outros produtos de consumo, poden chegar ó ser humano.

Supoñen as nanopartículas metálicas un problema de saúde? A día de hoxe non temos unha resposta a esta pregunta, porque carecemos de datos suficientes. A preocupación por este tema levou á creación dunha plataforma a nivel europeo, NanoSafety Cluster, en que se engloban tódolos estudos específicos que se están realizando.

Os obxectivos desta plataforma son: establecer sinerxías entre proxectos de investigación, colaborar para maximiza-lo seu impacto, elaborar normas, planificar accións futuras, establecer unha cooperación internacional e proporcionar formación e consenso en nanotoxicoloxía.

Acaba de se publicar, a petición da Comisión Europea, o informe titulado *Nanosafety in Europe 2015-2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations*, en

que se recollen os retos e as prioridades na investigación sobre nanoseguridade (16).

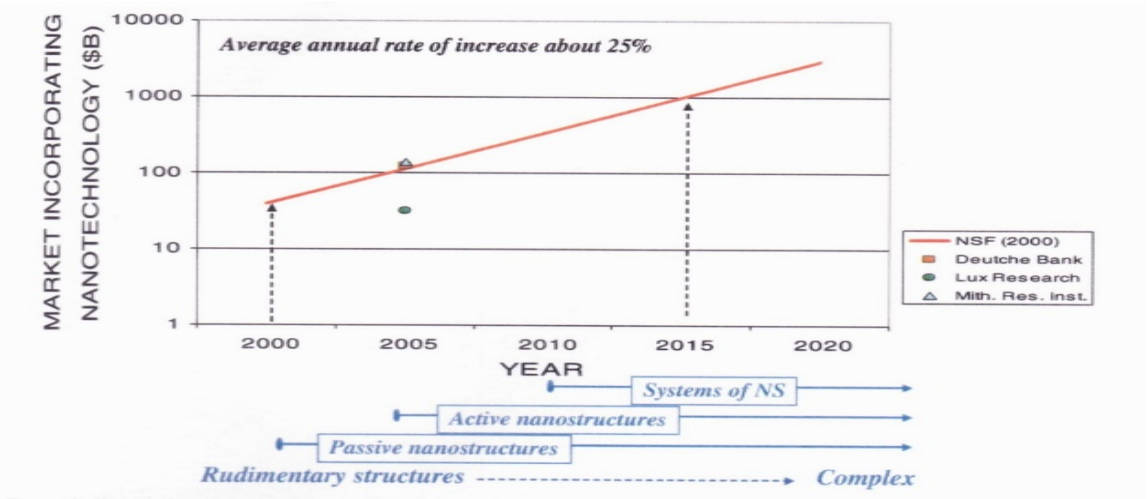


Figura 16.- Incremento industrial dos nanomateriais a nivel mundial

Para enfronta-lo estudo das nanopartículas metálicas en distintos tipos de mostras, no só importa determina-la súa concentración, senón tamén ter en conta outras propiedades súas que afectan ó seu comportamento no medio ambiente e á súa toxicidade. Entre elas, debemos destacar: a súa forma, tamaño, distribución de tamaños, composición, estrutura, porosidade e área superficial, funcionalidade da súa superficie, así como a súa carga e o seu estado de aglomeración.

Non dispoñemos aínda de técnica analítica ningunha que por si soa sexa quen de nos achegar toda esta información. É preciso o desenvolvemento de novas **plataformas nanometrolóxicas** que nos permitan abordar este novo problema. As técnicas máis utilizadas agora son: a microscopia (TEM e SEM), as técnicas de espectrometría atómica (ICP-MS e XAS), as técnicas de

separación (cromatografía hidrodinámica, electroforese capilar e o fraccionamento en campo de fluxo) e técnicas electroanalíticas, como a voltametría e a coulombimetría.

A modo de exemplo, veremos moi brevemente as posibilidades dunha das técnicas espectroscópicas atómicas, o ICP-MS, técnica amplamente utilizada nos estudos da especiación de metais, na súa nova modalidade de *Single Particle-ICP-MS*. Esta técnica é utilizada fai moi tempo no analise de aerosoles e partículas atmosféricas, e na actualidade no campo das nanopartículas metálicas.

Cos avances dos últimos anos –en especial pola maior velocidade de lectura do sinal pasando de milisegundos a microsegundos– esta técnica é capaz de diferenciar entre o metal que se encontra disolto nunha mostra e o metal que se encontra en forma de nanopartícula. Ademais, presenta outras vantaxes: a súa alta sensibilidade, a posibilidade de detección de varios elementos, alén da posibilidade de determina-lo tamaño da nanopartícula, a distribución de tamaños e a concentración do número de nanopartículas.

Na seguinte figura vemos un exemplo de aplicación desta técnica ó estudo da presenza de nanopartículas de titanio en moluscos de Galicia.

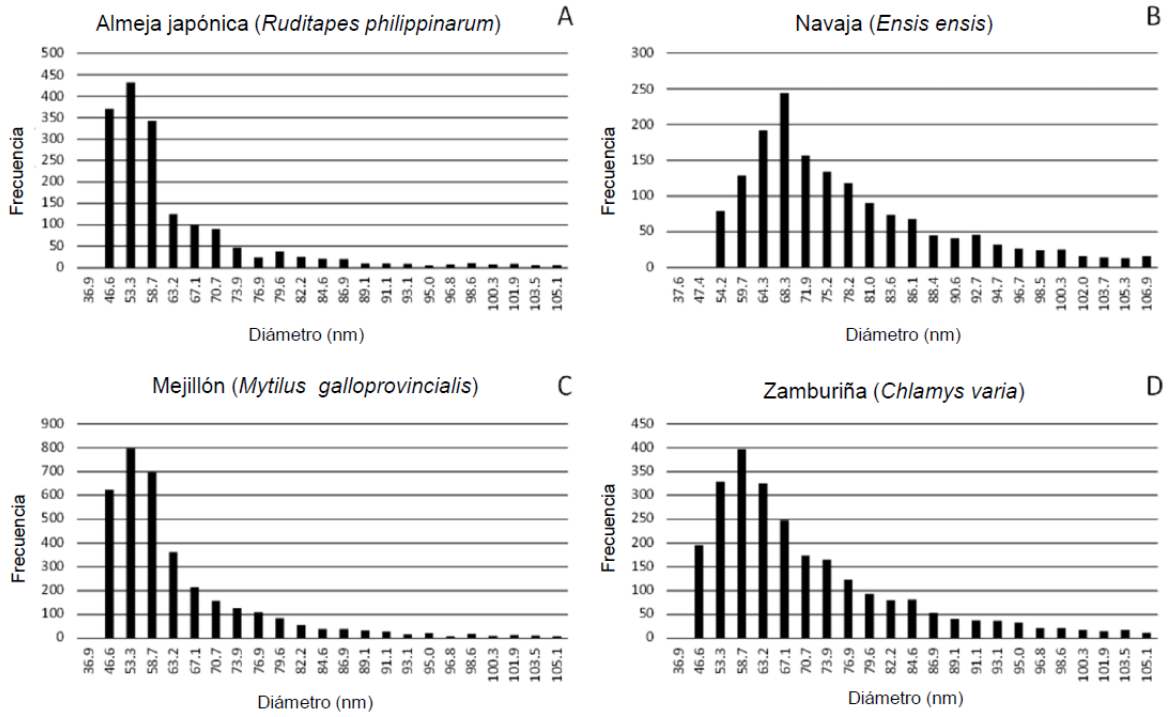


Figura 17.- Niveis de nanopartículas de dióxido de titanio e a súa distribución por tamaño en moluscos de Galicia

No hai dúbida ningunha de que as nanopartículas pasaron xa á cadea alimentaria, quer de forma accidental, como neste caso, quer intencionadamente, como ocorre, por exemplo, coa adición de nanopartículas de dióxido de titanio ó leite, ó surimi etcétera, ou a outros alimentos para mellorar simplemente o seu aspecto visual.

Non podemos baixa-la garda, volver cometer erros coma no pasado e orixinar problemas de contaminación a nivel global que despois non teñen fácil solución, como sucede, poño por caso, co mercurio.

A modo de conclusión, gustaríame sinalar que, aínda que nos últimos anos se produciron importantes avances neste campo da

especiación de elementos traza e a metalómica, quedan moitos problemas por resolver.

Os principais retos aínda pendentes podémolos resumir en catro puntos:

- a necesidade de desenvolver metodoloxías simples para a análise de rutina,
- a necesidade de estudiar os problemas de estabilidade das especies
- é imprescindible unha maior colaboración multidisciplinar entre a química, a bioloxía, a medicina, etcétera
- unha maior transferencia de resultados da investigación a lexisladores, industrias e laboratorios de control.

Pero, ó igual que sucedeu ó longo da historia da química analítica, a medida que avance a tecnoloxía, xunto coa electrónica, a informática e o tratamento masivo de datos, e poidamos así dispoñer de ferramentas analíticas máis potentes e sinxelas, avanzaremos tamén no coñecemento do papel dos elementos traza na Química da Vida.

Referencias

1.- Underwood, E.J., *Trace Elements in human and animal nutrition.* Academic Press, New York, USA, 1977

2.- Templenton, D.M., Ariese,F., Corelis, R., Danielsson, L., Muntau, H., Van Leeuwen, H.P., Loninski,R., *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches*, Pure Appl.Chem., 2000, 72, 8, 1453-1470

3.- World Health Organization (WHO).Exposure to Mercury: A Major Public Health Concern. 2007

(Http://www.who.int/phe/news/Mercury-flyer.pdf, consultado 25/04/2018)
4.- Lobisnki,R., Becker, J., Haraguchi, H,Sarkar, B., Metallomics: guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report), Pure and Appl. Chem, 2010, 82, 2, 493-504.
5.- Haraguchi, H. Metallomics as Integrated Biometal Science, J.Anal.At.Spectrom., 2004, 19, 5-14.
6.- Haraguchi, H., Metallomics: the history over the last decade and a future Outlook, Metallomics, 2017, 9, 1001-1013.
7.- Szpunar, J., Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics, The Analyst, 2005, 130, 442-465.
8.- Montes-Bayón, M., Metal Speciation in biomolecules. Anal.Bioanal.Chem.,2003,376,287-288.
9.- M.ª Raquel Domínguez Gónzalez, Especiación de Fe, Cu y Zn en leche mediante Cromatografía Líquida-espectrometría Atómica, tese de doutoramento, Universidade de Santiago de Compostela, 1996.
10.- Oscar Muñiz Naveiro, Fortificación, biodisponibilidad y Especiación de selenio en leche de vaca, tese de doutoramento, Universidade de Santiago de Compostela, 2005.
11.- Cristina García Sartal, Biodisponibilidad y Especiación de Arsénico en algas marinas, tese de doutoramento, Universidade de Santiago de Compostela 2012.
12.- C. García Sartal, S. Taebunpakul, E. Stokes, M.C. Barciela Alonso, P. Bermejo Barrera, Heide Goenaga Infante, Two-Dimensional HPLC coupled to ICP-MS and Electrospray ionisation (ESI) MS/MS for investigating the bioavailabilty in vitro of arsenic species from edible seaweed. Anal. Bioanal. Chem. 2012, 402, 3359-3369.

13.- Sandra Santiago Rivas, Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón, tese de doutoramento, Universidade de Santiago de Compostela, 2012.
14.- J.R. Lead, K.J. Wilkinson, Environ. Chem., 2006, 3, 159-171.
15.- Natalia García Otero, Desarrollo de métodos de preconcentración y de especiación funcional y química multielemental en materia orgánica disuelta y proteínas en agua de mar, tese de doutoramento, Universidade de Santiago de Compostela, 2013.
16.- Nanosafety in Europe 2015-2025: Toward Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations. Finish Institute of Occupational Health, 2013.