# Presència i distribució de compostos d'arsènic en algues i plantes aquàtiques: un estudi comparatiu sobre mostres de diferents localitzacions geogràfiques

Albert Pell i Lorente

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

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

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

# PRESÈNCIA I DISTRIBUCIÓ DE COMPOSTOS D'ARSÈNIC EN ALGUES I PLANTES AQUÀTIQUES: UN ESTUDI COMPARATIU SOBRE MOSTRES DE DIFERENTS LOCALITZACIONS GEOGRÀFIQUES

Universitat de Barcelona

ALBERT PELL I LORENTE

**Programa de Doctorat**

*Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució*

# *Presència i distribució de compostos d'arsènic en algues i plantes aquàtiques: un estudi comparatiu sobre mostres de diferents localitzacions geogràfiques*

Presentada per:

**Albert Pell i Lorente**

**Dr. José Fermín López Sánchez**
Professor Titulat
Departament de Química Analítica
Universiat de Barcelona

**Dra. Roser Rubio i Rovira**
Professora Emèrita
Departament Química Analítica
Universitat de Barcelona

El Dr. José Fermín López Sánchez, Professor Titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, i la Dra. Roser Rubio i Rovira, Professora Emèrita del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona,

FAN CONSTAR

Que la presenta memòria que duu per títol:

**"Presència i distribució de compostos d'arsènic en algues i plantes aquàtiques: un estudi comparatiu sobre mostres de diferents localitzacions geogràfiques"**

Ha estat realitzada sota la seva direcció i per n'Albert Pell i Lorente, per optar al Títol de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Dr. José Fermín López Sánchez  Dra. Roser Rubio i Rovira

Barcelona, 4 de març de 2014

*Als meus pares,*

## Agraïments

A la Universitat de Barcelona i al Departament de Química Analítca per permetre'm desenvolupar la tesi doctoral.

Als meus directors, el professors José Fermín López i la Dra. Roser Rubio per dirigir la tesi, dedicant'hi el seu temps i esforç.

Als companys de Qüestram i del Departament, en especial a aquells amb els que hi he col·laborat més estretament.

To the people from Bremen, to host me as a guest researcher.

Al meus amics de procedència tan diversa, de Girona, de Barcelona, coneguts durant els estudis o durant les aficions.

Als parents, que s'intesessen estiguin aprop o lluny de tu.

I molt especialment als meu pares, per ser sempre allà, recolzar-me en tot moment, per ajudar-me sempre que ho he necessitat, per encoratjar-me a seguir endavant, per facilitar-me el camí que he seguit, per deixar-me triar allò que més m'agradava en cada ocasió, per la paciència que tenen amb mi i per creure en mi més del que ho faig jo mateix.

# CONTINGUT

Capítol 1 Introducció ..... 1
1.1 Compostos i usos d'arsènic ..... 2
1.2 Distribució de l'arsènic ..... 5
1.3 Exposició ..... 6
1.4 Toxicitat ..... 8
1.5 Metabolisme dels compostos d'arsènic ..... 8
1.6 Cicle biogeoquímic de l'arsènic en el medi aquàtic ..... 11
1.7 Arsènic i Algues ..... 16
1.8 Especiació analítica d'arsènic ..... 18
1.8.1 Pre-tractament i extracció d'espècies de la mostra ..... 18
1.8.2 Tècniques de Separació ..... 19
1.8.3 Mètodes de detecció ..... 20
1.8.4 Materials de Referència Certificats ..... 26
1.9 Objectius ..... 31
Capítol 2 Metodologia analítica ..... 33
2.1 Presa de mostra i descripció de les zones de mostreig ..... 33
2.2 Pre-tractament de la mostra ..... 36
2.3 Instrumentació i aparells ..... 37
2.4 Reactius ..... 38
2.5 Patrons i materials de referència ..... 38
2.6 Determinació d'arsènic total per tècniques espectroscòpiques ..... 39
2.6.1 Mineralització de la mostra ..... 39
2.6.2 Mesura d'arsènic total mitjançant ICP-MS ..... 40
2.6.3 Mesura d'arsènic total en aigua de mar mitjançant HG-AFS ..... 40
2.7 Especiació analítica d'arsènic ..... 41
2.7.1 Extracció de les espècies d'arsènic ..... 41
2.7.2 Separació i quantificació de les espècies d'arsènic per tècniques acoblades ..... 41
2.8 Paràmetres de Control de Qualitat ..... 43
2.8.1 Exactitud ..... 43
2.8.2 Precisió ..... 43
2.8.3 Eficiència d'extracció ..... 43
2.8.4 Recuperació de columna ..... 44

2.8.5 Identificació dels arsenosucres ..... 44
2.8.6 Límit de detecció i Límit de quantificació ..... 44
Capítol 3 Estudis Metodològics ..... 45
3.1 Efectes del processament i l'emmagatzematge sobre l'especiació d'arsènic en mostres de *Cystoseira mediterranea* ..... 45
3.1.1 Descripció de la zona de mostreig: Costa Brava ..... 45
3.1.2 Resultats ..... 47
3.1.3 Discussió ..... 51
3.2 Adaptació del sistema cromatogràfic a l'acoblament LC-TOF-MS ..... 53
3.2.1 Disseny del mètode ..... 53
3.2.2 Resultats i discussió ..... 55
3.3 Posada a punt d'un mètode per a l'obtenció d'arsenosucres a partir d'una mostra d'alga ..... 61
3.3.1 Disseny operacional ..... 62
3.3.2 Resultats i discussió ..... 63
3.4 Viabilitat d'un material per al control de la qualitat per espècies d'arsènic: *Undaria pinnatífida* ..... 71
3.4.1 Preparació d'un material de referència ..... 71
3.4.2 Estudi de l'homogeneïtat del material ..... 71
3.4.3 Discussió i recomanacions ..... 74
Capítol 4 Estudis de caire ambiental i contribució al coneixement del biogeocicle de l'arsènic ..... 77
4.1 Estudi de l'impacte de l'arsènic, d'origen natural i antropogènic, en algues del golf Termaic, Egeu Nord (Grècia) ..... 77
4.1.1 Descripció de la zona d'estudi ..... 78
4.1.2 Presa, pretractament i anàlisi de les mostres ..... 79
4.1.3 Resultats ..... 79
4.1.4 Discussió ..... 83
4.2 Estudi de la presència d'arsènic en algues procedents de la Costa Caribenya de Panamà ..... 86
4.2.1 Descripció de les zones de mostreig ..... 86
4.2.2 Presa i pretractament de les mostres ..... 88
4.2.3 Resultats ..... 88
4.2.4 Discussió ..... 90

4.3 Estudi sobre la distribució d'arsènic i espècies d'arsènic en *Cystoseira mediterranea*, *Padina pavonica* i *Macrocystis pyrifera* ..... 93
4.3.1 Descripció de les zones de mostreig ..... 95
4.3.2 Presa i pre-tractament de les mostres ..... 96
4.3.3 Resultats ..... 97
*4.3.4 Macrocystis pyrifera* ..... 100
4.3.5 Paràmetres de qualitat ..... 103
4.3.6 Discussió ..... 103
4.4 Contribució a l'estudi del cicle biogeoquímic de l'arsènic en una zona amb activitat hidrotermal submarina, Santorí, Grècia ..... 108
4.4.1 Metodologia ..... 110
4.4.2 Resultats ..... 111
4.5 Estudi de l'impacte de l'arsènic, d'origen natural i antropogènic, en algues i plantes aquàtiques de la conca del riu Loa, Xile. ..... 114
4.5.1 Descripció de la zona de mostreig ..... 115
4.5.2 Presa i pretractament de les mostres ..... 116
4.5.3 Resultats i Discussió ..... 118
Capítol 5 Global overview of the results ..... 125
5.1 Analytical considerations ..... 125
5.1.1 Arsenic Speciation Methodology ..... 125
5.1.2 Quality Control in Analytical Speciation ..... 128
5.2 Environmental outlook ..... 132
5.2.1 Algae ..... 132
5.2.2 Marine plants ..... 136
5.2.3 Freshwater algae and plants ..... 137
5.3 Final commentaries ..... 138
Capítol 6 Conclusions ..... 141
Bibliografia ..... 149
Annexos: Articles i resums ..... 169

## *Acrònims*

| | |
|---|---|
| iAs | Arsènic inorgànic |
| met-iAs | Arsenats metilats |
| As-sug | Arsenosugars |
| As(III) | Arsenit |
| As(V) | Arsenat |
| MA | Metilarsenat |
| DMA | Dimetilarsenat |
| TMAO | Òxid de trimetilarsina |
| TETRA | Ió tetrametril arsoni |
| AB | Arsenobetaïna |
| AC | Arsenocolina |
| gly-sug | Glicerol-arsenosucre |
| SO3-sug | Sulfonat-arsenosucre |
| SO4-sug | Sulfat-arsenosucre |
| PO4-sug | Fosfat-arsenosucre |
| DMAA | Àcid dimetilarsinoilacètic |
| DMAE | Dimetilarsinoiletanol |
| ICP-MS | Plasma induït per alta freqüència acoblat a espectrometria de masses |
| HG-AFS | Espectrofotòmetre de fluorescència atòmica amb generació d'hidrurs |
| ICP-AES | Espectrometria d'emissió atòmica de Plasma d'Acoblament Inductiu |
| ICP-SF-MS | Plasma induït per alta freqüència acoblat a espectrometria de masses amb sector magnètic de doble enfocament |
| ESI-MS | Espectròmetre de masses amb electrosprai |
| ESI-MSD-TOF | Espectròmetre de masses de temps de vol |
| HLPC | cromatografia de líquids d'alta pressió |
| CRM | Material de Referència Certificat |
| BCR | Bureau Communautaire de Références |
| NIST | National Institute of Standards and Technology |

# Capítol 1

# Capítol 1
## INTRODUCCIÓ

L'arsènic és un element del grup del nitrogen (Grup 15) de número atòmic 33. Etimològicament, la paraula arsènic prové de llatí *arsenicum* que, al seu torn, prové del grec *άρσενικόν* (*arsenicon*) i aquest, del persa *az-zarnīkh* que significa orpiment groc, un mineral d'arsènic ($As_2S_3$). La seva configuració electrònica en nivell fonamental és $[Ar]3d^{10}4s^24p^3$. Presenta un únic isòtop estable de massa 74,92160(2) que suposa el 100 % de l'abundància en fonts naturals. L'arsènic elemental presenta tres formes al·lotròpiques, la més comuna de les quals és la forma α-As (Figura 1) que té color gris metàl·lic i simetria romboèdrica. En fase vapor, l'arsènic es troba en molècules tetraèdriques; la tercera forma és l'arsenolamprita, ε-As, que possiblement tingui simetria ortoròmbica.[1] A la Taula 1 es recullen les propietats atòmiques d'aquest element.

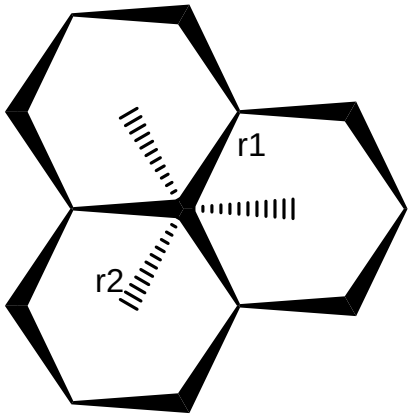



**Figura 1: Esquema de l'estructura d'una capa de α-As. Es pot veure la coordinació piramidal de cada àtom amb els seus veïns (r1 252 pm; 96,7°). La distància amb els veïns de la següent capa (r2) és de 312 pm.**

L'arsènic presenta els estats d'oxidació -3, 0, +3 i +5, tot i que la forma elemental i l'hidrur arsina ($AsH_3$) no són gaire estables i s'oxiden amb facilitat. L'arsènic elemental és estable en aire sec, però la humitat afavoreix l'oxidació de la superfície donant-li un aspecte daurat que envelleix a negre. Quan s'escalfa, sublima i s'oxida a $As_4O_6$ que té olor a all i és tòxic. A temperatures superiors a 250°C, el sublimat és fosforescent. En presència d'altres metalls forma arseniürs, s'inflama amb el $F_2$ donant $AsF_5$ i amb la resta d'halògens forma $AsX_3$. L'arsènic elemental no reacciona ràpidament amb l'aigua,

ni amb solucions alcalines, ni amb solucions d'àcids no oxidants. En àcid nítric diluït forma àcid arseniós, en àcid nítric concentrat i calent es genera àcid arsènic, i en àcid sulfúric concentrat i calent es genera $As_4O_6$.[1]

**Taula 1: Propietats atòmiques de l'arsènic.**[1]

| Propietat | | |
|---|---|---|
| **Número atòmic** | | 33 |
| **Número màssic (1997)** | | 74,92160(2) |
| **Configuració electrònica** | | $[Ar]3d^{10}4s^{2}4p^{3}$ |
| **Energies d'ionització** | **(I)** | 0,947 MJ $mol^{-1}$ |
| | **(II)** | 1,798 MJ $mol^{-1}$ |
| | **(III)** | 2,736 MJ $mol^{-1}$ |
| **Electronegativitat** | | 2,18 (Escala de Pauling) |
| **Radi covalent (As-III enllaç senzill)** | | 120 pm |
| **Radi iònic (As-III/As-V)** | | 58/46 pm |
| **Punt de fusió (α-As)** | | 816°C (38,6 atm//3,91 MPa) |
| **Punt de sublimació (α-As)** | | 615°C |
| **Densitat a 25°C (α-As)** | | 5,778 g $cm^{-3}$ |
| **Duresa (α-As)** | | 3,5 Mohs |
| **Resistivitat elèctrica (α-As)** | | 33 μΩ cm |
| **Contracció al congelar-se (α-As)** | | 10 % |

## 1.1 Compostos i usos d'arsènic

L'arsènic és capaç de formar una àmplia varietat de compostos químics: arseniürs, hidrurs, halurs, òxids i oxocompostos, i compostos organometàl·lics.[1,2] Els compostos d'interès a la present tesi no abasten el total d'aquests compostos i s'ha treballat amb els que presenten interès al medi aquàtic: els àcids inorgànics (iAs), els arsenats metilats (met-iAs) i els arsenosucres (As-sug). Aquests compostos es recullen a la Figura 2 i es pot observar que el número d'oxidació per l'arsènic és generalment +5.

*Arsènic inorgànic*

Els dos àcids inorgànics d'interès són l'arseniós, $As(OH)_3$, i l'arsènic, $H_3AsO_4$; es poden obtenir de la dissolució dels seus òxids respectius, $As_2O_3$ i $As_2O_5$, que corresponen als estats d'oxidació +3 i +5. La dissolució de $As_2O_5$, que és extremadament higroscòpic, resulta en la formació d'àcid arsènic, $H_3AsO_4$. És un àcid tripròtic amb $pK_{a1}$ = 2,2; $pK_{a2}$ = 6,9; i $pK_{a3}$=11,5.[1] L'àcid arseniós, $As(OH)_3$, és l'espècie principal en solucions neutres o àcides i és probable que tingui estructura piramidal, però no s'ha pogut aïllar (com l'àcid carbònic). En solucions alcalines hi ha evidències espectroscòpiques de la presencia dels anions $[AsO(OH)_2]^-$, $[AsO_2(OH)]^{2-}$, i $[AsO_3]^{3-}$. El pKa corresponent a la pèrdua del primer protó és de 9,2, per tant l'àcid arseniós és molt feble.[1]

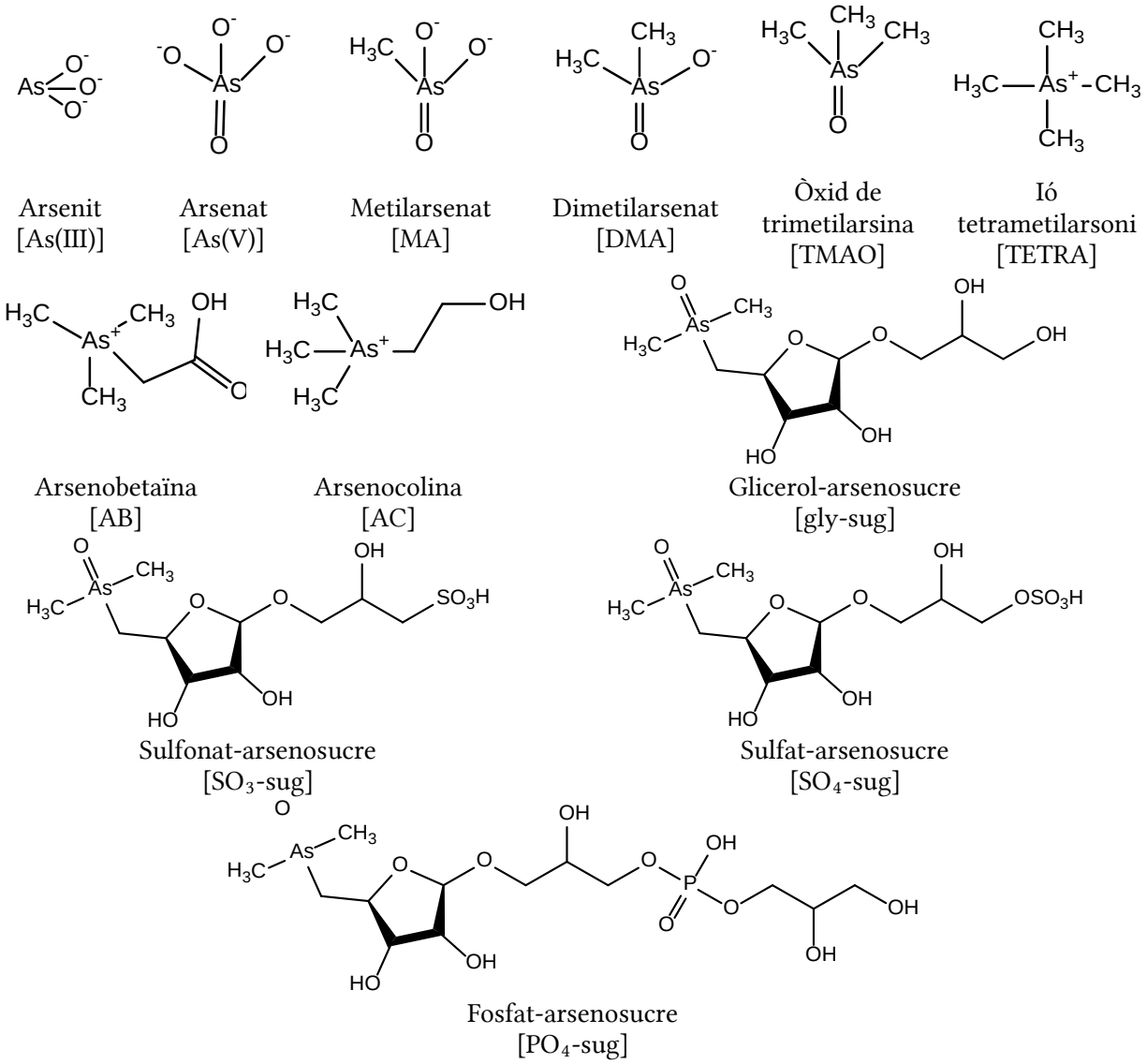



**Figura 2: Estructura i abreviacions dels principals compostos d'arsènic d'interès ambiental estudiats.**

*Organometàl·lics*

L'arsènic presenta la possibilitat d'enllaçar-se amb el carboni formant una gran varietat de compostos organometàl·lics. L'enllaç amb un radical orgànic, com ara el metil, es dóna en arsines, arsenits i arsenats generant els corresponents compostos organometàl·lics. Així doncs, en la present tesi els compostos estudiats són els arsenats metilats (met-iAs) monometilarsenat (MA), dimetilarsenat (DMA) i òxid de tetrametilarsina (TMAO), a més de l'iò tetrametilarsoni (TETRA) (Figura 2).

L'arsènic (III) es pot trobar en la química d'heterocicles. El compost heterocíclic més senzill és l'arsenina, $AsC_5H_5$, que pot actuar com a lligand en compostos de

coordinació: $[Cr(\eta^6\text{-}C_5H_5As)_2]$, $[Mo(\eta^6\text{-}C_5H_5As)(CO)_3]$, $[Fe(\eta^6\text{-}C_4H_4As)_2]$. Així mateix, s'han descrit compostos homòlegs als de fòsfor i de nitrogen, com poden ser l'arsenobetaïna (AB) i l'arsenocolina (AC) en organismes aquàtics.[3] Així mateix, destaquen els arsenosucres, que són una família de ribofuranòsids on el carboni 5 està funcionalitzat amb un grup que conté arsènic (Figura 2).[4]

*Usos dels compostos d'arsènic*

El principal ús de l'arsènic elemental és en aliatges base plom i coure. L'addició de petites quantitats d'arsènic millora les propietats de les bateries de Pb/Sb, la duresa del metall i l'esfericitat de la munició de Pb. Els compostos intermetàl·lics amb Al, Ga i In són semiconductors III-V, dels quals GaAs i InAs s'utilitzen per sistemes com els díodes emissors de llum (LED), díodes de túnel, emissors infrarojos, entre d'altres.[5]

La utilització de compostos d'arsènic com a herbicides i pesticides en usos agrícoles està fortament restringida per motius mediambientals. L'àcid arsènic encara es fa servir en formulacions per a conservar fusta i l'òxid s'utilitza per a decolorar vidre.[1]

Degut a la toxicitat d'alguns compostos d'arsènic, aquests s'han utilitzat com a fàrmac des de l'antigor. L'arsenit potàssic, el iodur d'arsènic i el triclorur d'arsènic es van fer servir per a tractar una gran varietat de malalties fins al segle passat.[6,7] L'arsenofenamina es feia servir per tractar la sífilis abans del descobriment dels antibiòtics.[6] Tanmateix, la toxicitat dels compostos d'arsènic ha provocat que hagin caigut en desús. De totes formes, encara hi ha compostos organometàl·lics que es fan servir com a medicaments. La triparsamida (àcid [4-(2-amino-2-oxoetil)-amino]-arsònic) s'administra contra la malaltia de la son africana, causada pel protozou paràsit *Trypanosoma brucei*. L'àcid retinoic (RA) és un antileucèmic molt potent que es prescriu en leucèmia promielocítica aguda (APL),[8] el triòxid d'arsènic també ha mostrat una gran efectivitat combatent la APL.[9] Ara bé, és en el camp de les medicines tradicionals on l'ús de preparats que contenen arsènic està més estès a l'actualitat. El sistema mèdic Ayúrveda de l'Índia fa servir arsènic per tractar pacients amb malalties hematològiques.[10] Respecte la medicina tradicional xinesa, es van detectar quantitats potencialment perilloses d'arsènic en comprimits de plantes en un inventari realitzat pel National Fish and Wildlife Forensic Laboratory (EUA).[11] L'ús d'alguns preparats de medicina tradicional xinesa que contenien arsènic inorgànic hauria induït malalties dermatològiques i carcinògens, entre d'altres.[12] En preparats homeopàtics també es

van trobar quantitats elevades d'arsènic inorgànic, les etiquetes dels quals no n'avisaven dels riscos que això implicava.[13] És clar que es necessita control i regulació d'aquests tipus de preparats per no posar en risc la població.[14]

## 1.2 Distribució de l'arsènic

L'arsènic, en ordre d'abundància, ocupa el lloc 51 a l'escorça terrestre, el 14 a l'aigua de mar i el 12 al cos humà.[1,15]

*Escorça*

L'arsènic presenta un contingut a l'escorça terrestre de 1,8 mg $kg^{-1}$. Té una afinitat elevada pels calcògens S, Se i Te; per tant, és més fàcil trobar-lo com a sulfur que com a òxid. Els minerals d'arsènic es troben àmpliament distribuïts per l'escorça terrestre i també es pot trobar l'element lliure en petites quantitats.[14] Els minerals més comuns són els sulfurs realgar ($As_4S_4$) i orpiment ($As_2S_3$), a més de l'òxid arsenolita ($As_2O_3$). Els arseniürs de Fe, Co i Ni i els sulfurs mixtos amb aquests metalls formen un altre grup de minerals que contenen arsènic de naturalesa molt variada com ara la loelingita ($FeAs_2$), la saforlita (CoAs), la niccolita (NiAs) i arsenopirita (FeAsS). Els sòls no contaminats presenten una concentració que varia entre 0,1 i 40 mg As $kg^{-1}$, sempre i quan el llit rocós no s'alteri o es redistribueixi ja sigui per causes naturals o antropogèniques.[1]

*Atmosfera*

L'arsènic a l'atmosfera es troba principalment en les partícules en suspensió, ja que les arsines no són gaire estables i s'oxiden amb facilitat. Normalment es tracta d'una mescla de arsenit i arsenat, on la presència dels organometàl·lics és pràcticament nul·la excepte en el llocs on s'han fet servir pesticides amb compostos d'arsènic.[16]

*Hidrosfera*

La concentració d'arsènic en aigua marina sol ser inferior a 2 µg As $l^{-1}$.[17] En aigües continentals, l'interval habitual de concentracions és de 1 - 10 µg As $l^{-1}$ per a zones no contaminades.[18,19] La principal font no antropogènica de contaminació d'aigües continentals és l'activitat geotèrmica: desert d'Atacama, Xile, 200 – 4.400 µg As $l^{-1}$;[20] Perú, ~ 500 µg As $l^{-1}$;[21] Nepal, 8 – 2.660 µg As $l^{-1}$;[22] Bengala Occidental, Índia, 3 – 3.700 µg As $l^{-1}$;[23] Bangladesh, 10 – 1.000 µg As $l^{-1}$;[24] i Hongria, 1 – 174 µg As $l^{-1}$.[21] Les espècies predominants són les inorgàniques, en diferent

proporció d'As(III) i As(V) segons les condicions redox del medi.[25] Les espècies orgàniques són minoritàries en aigües superficials i s'ha descrit la presència d'espècies metilades, de l'àcid dimetilarsinoilacètic (DMAA) i del dimetilarsinoiletanol (DMAE) i de compostos orgànics complexos com l'arsenobetaïna, l'arsenocolina i els arsenosucres.[25]

La química de l'arsènic en medi aquós és complexa, especialment quan el pH i la disponibilitat d'oxigen és variable. En medis lleugerament oxigenats predomina l'As(V), en les quatre formes possibles segons el pH: $H_3AsO_4$, $H_2AsO_4^-$, $HAsO_4^{2-}$, $AsO_4^{3-}$. Si les condicions són lleugerament reductores, les espècies d'As(III) són estables i per tant es pot trobar $H_3AsO_3$, $H_2AsO_3^-$ i $HAsO_3^{2-}$. A més, aquests equilibris es poden modificar per la presència de processos fisicoquímics concurrents, com l'adsorció, la precipitació i la metilació.[14]

*Biota*

Les formes predominants en els éssers vius són les organometàl·liques. Entre elles destaca la presència d'arsenats metilats a les plantes, l'arsenobetaïna als animals marins i els arsenosucres a les algues. De totes formes, aquests organismes poden contenir arsènic inorgànic i d'altres organometàl·lics.[4]

## 1.3 Exposició

L'activitat humana està modificant de forma evident el cicle dels elements tòxics com l'arsènic, el plom, el cadmi o el mercuri.[14] Les fonts d'exposició humana a l'arsènic són l'ambiental, l'alimentària i en alguns casos el fàrmacs i d'altres preparats que es fan servir amb finalitats medicinals. La principal font d'exposició humana és l'aigua. Les espècies predominants a l'aigua són les inorgàniques, As(III) i As(V), que es classifiquen com a carcinògens de classe I.[26] La majoria de països han adoptat legislació per l'aigua de beguda fixant la concentració màxima d'arsènic en 10 µg As $l^{-1}$.[27] Es pot considerar que l'exposició humana a l'arsènic deguda a l'aire és negligible, fent excepció d'algunes zones mineres.[28] L'exposició mitjana als EE.UU segons la USEPA és de 6 ng As $m^{-3}$ i la seva eficàcia d'assimilació és del 30-85 %, per tant la dosi és de 40 – 90 ng As $dia^{-1}$.[29] A la Unió Europea, l'exposició estimada és de 0,21 – 1,5 ng As $m^{-3}$ en zones rurals i de 0,5 – 3 ng As $m^{-3}$ en zones urbanes i superior a 50 ng As $m^{-3}$ en zones industrials.[30]

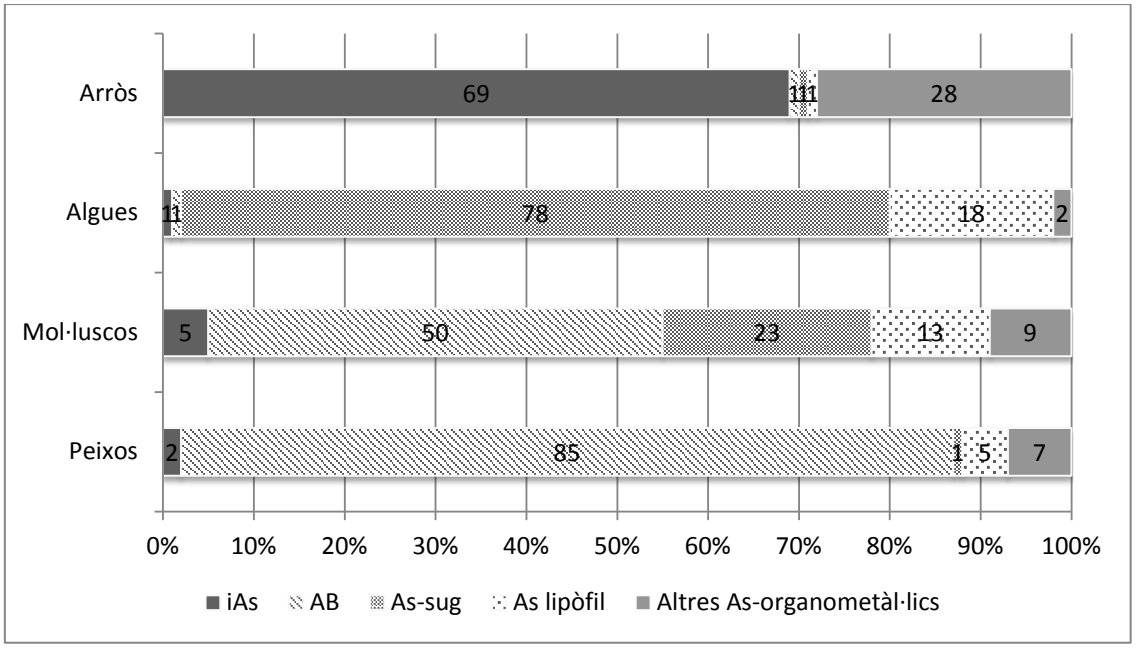



**Figura 3: Proporció de les fraccions d'arsènic en peixos, mol·luscos, algues i arròs destinats al consum humà. Adaptat de Feldmann i Krupp.**[4]

L'alimentació juga també un paper important respecte a l'exposició a l'arsènic. El principal problema respecte als aliments al que s'enfronten els Organismes Reguladors és la falta de dades, tal com la Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) va indicar a la publicació "Scientific Opinion on Arsenic in Food" al 2009. Es van reunir de l'ordre de 100.000 dades de concentració d'arsènic en aliments, de les quals dos terços eren inferiors al límit de quantificació assolibles amb les tècniques analítiques disponibles per a anàlisis de rutina. La principal mancança de les dades era que el 98 % expressava la concentració d'arsènic total, sense considerar les espècies d'arsènic. Els aliments amb concentracions d'arsènic més elevades van ser: peixos i mariscos, suplements alimentaris a base d'algues (en especial *hiziki*), productes provinents de cereals (en especial els de segó i germen, i d'arròs). El processament de l'aliment pot influir en el contingut d'arsènic total i de les espècies en particular. Pel que fa l'arròs, les principals espècies que s'hi troben són les inorgàniques, tot i que també hi ha MA i DMA. La EFSA està treballant per elaborar legislació per al contingut màxim d'arsènic inorgànic en arròs (Figura 3).[31] El cas dels productes d'origen marí és molt diferent. Els productes de la pesca poden arribar a tenir una concentració d'arsènic total uns 100 cops superiors a la de l'arròs, el cereal més consumit a nivell mundial. Tanmateix, la proporció d'arsènic inorgànic és molt baixa i presenten una gran diversitat de compostos organometàl·lics, essent l'arsenobetaïna el majoritari.[4] Aquest compost és conegut per la seva manca de toxicitat. Un altre grup de compostos a destacar són els

As-sug, que es troben principalment a les algues i mol·luscos, i compostos d'arsènic solubles en lípids, que es troben en peixos i mol·luscos.

## 1.4 Toxicitat

La toxicitat dels compostos d'arsènic és molt variable (veure Taula 2) i les dades no són completes. A grans trets, a menor estat d'oxidació, més toxicitat, i a més metilació, menys toxicitat. Hi ha diversitat d'opinions en l'orde de toxicitat de les espècies. Com a exemple, a la Taula 2 es poden veure els $LC_{50}$ proposat per Naranmandura, *et al.*[32] La seqüència resultant no coincideix amb la que van proposar Vega, *et al.*[33] en un estudi de citotoxicitat en queratinòcids ($iAs^{III} > MA^{III} > DMA^{III} > DMA^{V} > MA^{V} > iAs^{V}$). La AB té l'àtom d'arsènic oxidat i està enllaçat a quatre carbonis, aquest enllaços són molt estables tèrmicament i difícils de trencar enzimàticament,[34] per tant es pot considerar un compost inert bioquímicament que s'excreta inalterat de forma completa en poques hores després de la seva ingestió.[35] Altres molècules on l'àtom d'arsènic està enllaçat a quatre carbonis tampoc presenten toxicitat, TETRA i AC.[36] D'altra banda, hi ha pocs estudis *in vitro* sobre la toxicitat dels arsenosucres. Aquest indiquen que el gly-sug no presenta toxicitat a concentració micromolar, i per tant el seu impacte a través de l'alimentació és semblant al de la AB.[37,38]

**Taula 2: Valors de $LC_{50}$ en cèl·lules humanes per a algunes espècies d'arsènic i LD50 per a ratolins (administració oral).**

| Espècie | $LC_{50}$[32] | $LD_{50}$[36,39] | Espècie | $LC_{50}$[32] | $LD_{50}$[36,39] |
|---|---|---|---|---|---|
| $DMA^{III}$ | 2,16 µM | - | $MA^{V}$ | - | 700-1.800 mg $kg^{-1}$ |
| As(III) | 5,49 µM | 15-42 mg $kg^{-1}$ | AC | - | 6.500 mg $kg^{-1}$ |
| As(V) | 571 µM | 20-800 mg $kg^{-1}$ | AB | - | >10.000 mg $kg^{-1}$ |
| $DMA^{V}$ | 843 µM | 1.200-2.600 mg $kg^{-1}$ | TETRA | - | 890 mg $kg^{-1}$ |

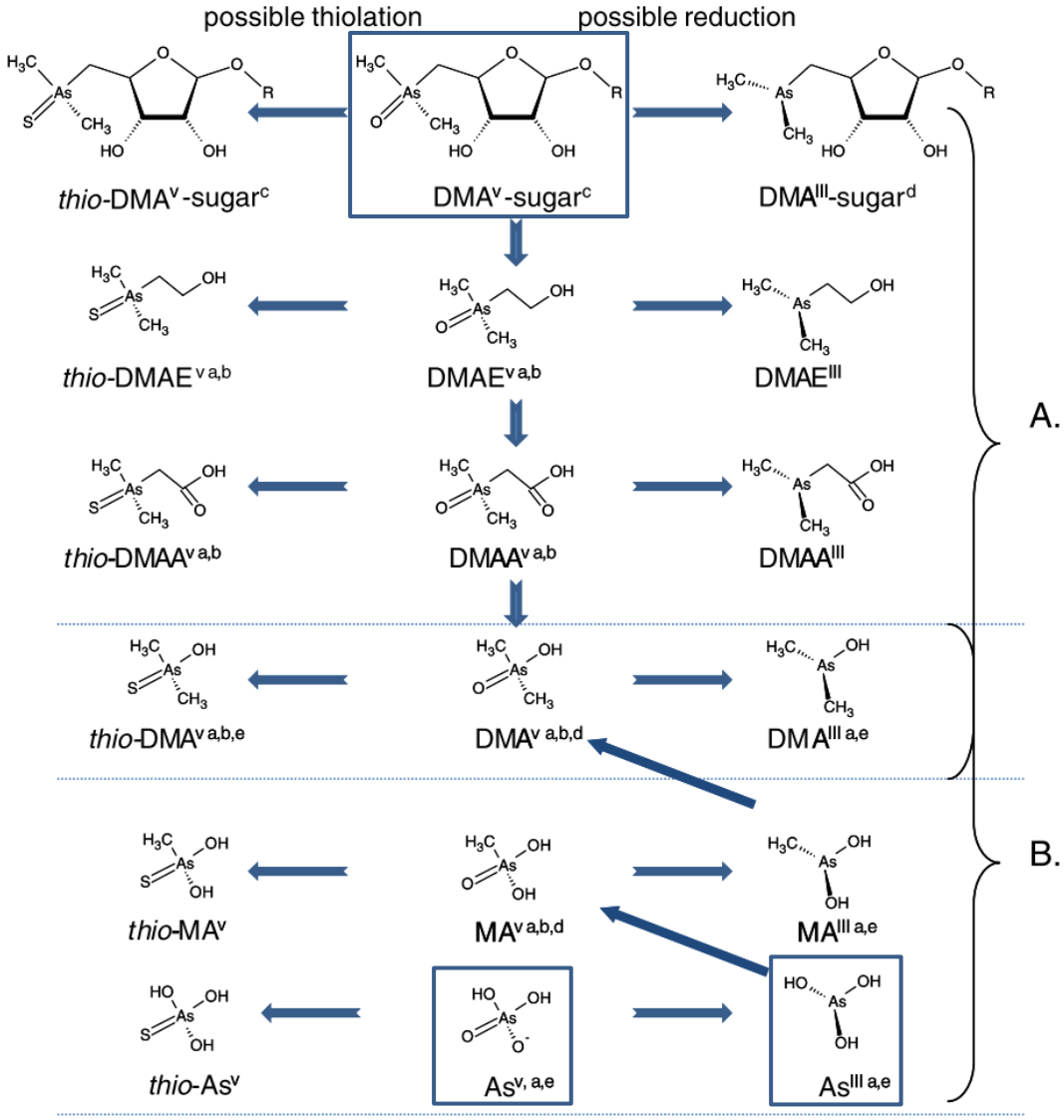
## 1.5 Metabolisme dels compostos d'arsènic

L'arsènic no presenta cap mena d'utilitat nutricional pels animals i el seu metabolisme se centra en la seva conversió en espècies menys tòxiques i fàcils d'excretar o d'acumular a les cèl·lules. A diferència d'altres metalls que presenten toxicitat com el Cd i el Hg, l'arsènic no es biomagnifica en la cadena alimentaria.[40,41]
Els compostos d'arsènic quaternari sembla que no presenten toxicitat. El TETRA i la AC no presenten cap signe de ser citotòxics[36] i sembla que en el cas de la AB és el mateix.[4] La AB és un compost que s'ingereix en grans quantitats en zones amb dieta

rica en productes de la pesca, però no es transforma en altres metabòlits i s'excreta amb rapidesa.[42]

La ingesta de iAs activa mecanismes de reducció i metilació amb l'objectiu d'obtenir $MA^V$ i $DMA^V$. Aquest mecanisme es dóna en organismes molt diversos, com ara llevats, fongs, algues, plantes i animals.[41,43–45] Les espècies resultants d'aquest procés són menys tòxiques que el iAs, tenen un efecte mutagènic inferior a aquest i poden ser excretades en pocs dies desprès de la ingesta. En organismes superiors, el iAs es metila a $MA^V$ i a $DMA^V$ mitjançant el donador de grup metil S-adenosilmetionina (SAM), catalitzat per metil-transferases en presència de glutatió.[46] Els compostos d'arsènic (III) són millors substrats per a la metilació i per tant l'etapa prèvia de reducció marca la velocitat del metabolisme de l'arsènic.[47] La ADN-metiltransferasa fa servir SAM com a donant de grup metil, per tant, l'exposició a arsènic pot causar una metilació deficient del ADN que resultaria en una expressió de gens aberrant que provocaria carcinogènesi.[40,48] Tot indica que l'exposició a iAs fa que disminueixi l'efectivitat de la metilació de la SAM, una de les possibles explicacions és l'afinitat del $iAs^{III}$ pels grups tiols de les proteïnes. La formació de complexos As-S inhibeix l'activitat d'uns 200 enzims, i és possible que també la SAM.[49] És clar que la toxicitat dels compostos finals és inferior a la del iAs inicial, però els intermedis d'aquesta ruta metabòlica, $DMA^{III}$ i $MA^{III}$, són extremadament tòxics.[32,36,39] A la Figura 4 es representen les possibles transformacions que els compostos d'arsènic segueixen dins del metabolisme humà, essent els compostos de partida els As-sug i el iAs.

Els arsenosucres es troben en molts productes d'origen marí i en algunes regions la seva ingesta és elevada. Les rutes metabòliques que segueixen no són massa clares, però tot sembla indicar que un dels metabòlits finals és el $DMA^V$.[35,50,51] Altres metabòlits identificats són el $DMAA^V$ i el $DMAE^V$, i en orina, els anàlegs tiolats tio-$DMA^V$, tio-$DMAA^V$, tio-$DMAE^V$ i tio-As-sug.[52–54] Malgrat que hi ha poques dades sobre la toxicitat d'aquest metabòlits, se sap que la toxicitat del $DMA^V$ és superior a la dels As-sug i té efectes co-carcinògens en rosegadors.[55] Estudis inicials de toxicitat en els anàlegs tiolats indiquen que la seva toxicitat és superior a de les formes amb oxigen.[56] Com s'ha indicat en el cas del iAs, les etapes de reduccions prèvies a la metilació en milloren el rendiment, i per tant la formació de compostos trivalents és possible. Cal estudiar a fons el metabolisme dels As-sug que es consideren potencialment tòxics.[4]




Productes de transformació metabòlica procedents de
A: ingestió d'arsenosucres
B: ingestió de iAs

a) Identificat en orina humana
b) Identificat en orina d'ovella
c) Identificat en teixits animals
d) Citotòxic a concentració mM
e) Citotòxic a concentració µM

**Figura 4: Transformació metabòlica dels As-sug i del iAs$^{V}$ a DMA$^{V}$. Tots els intermedis es poden trobar tiolats o bé reduïts. Extret de Feldmann i Krupp, 2011.[4]**

## 1.6 Cicle biogeoquímic de l'arsènic en el medi aquàtic

El dipòsit més important d'arsènic es troba a la geosfera, i és el seu alliberament i la seva mobilització la principal font natural d'arsènic disponible al sòl, aigua i aire en diferents formes químiques. Una altra font destacable d'arsènic als sòls i aigües són els compostos d'arsènic que s'han emprat en agricultura com a pesticida, parasiticida i herbicida, que s'han acumulat de forma gradual. A més, no és l'única font antropogènica que pot elevar el nivell ambiental d'arsènic, altres són la mineria o les foneries. El cicle global de l'arsènic s'esquematitza a la Figura 5.

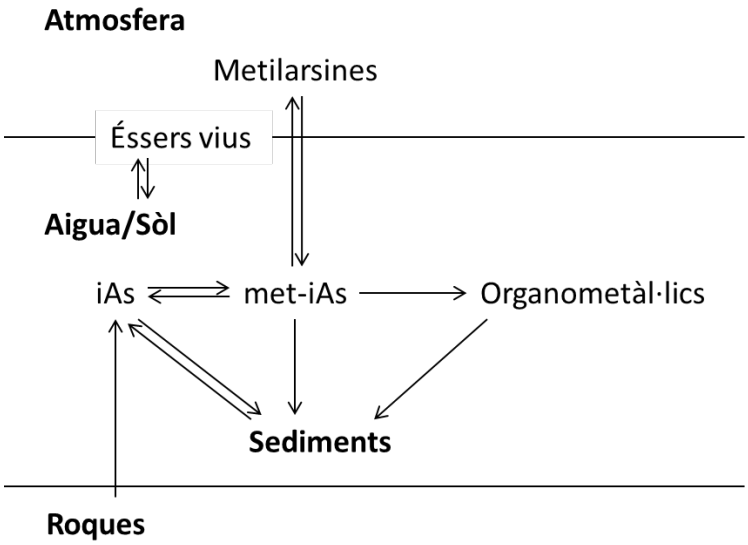



**Figura 5: Cicle de l'arsènic al medi ambient. Extret de Pradosh i Saha.**[14]

A grans trets, l'arsènic que s'allibera i es mobilitza des de les fonts entra al medi aquàtic i als sòls. En subseqüents estadis del cicle, l'equilibri entre les diverses formes químiques depèn de les condicions del medi. L'equilibri redox es veu afectat per la disponibilitat d'oxigen, la presència de precipitants (sulfur) i absorbents (hidròxids) per immobilitzar-lo, la metilació del As(III) a MA i a DMA és el punt de partida d'altres compostos metilats. A l'atmosfera, la presència d'arsènic es limita als compostos volàtils, les arsines metilades, i a les partícules en suspensió.[14,16]

A l'aigua marina, l'arsènic es troba principalment en forma inorgànica. En aigües oxigenades i biològicament productives, el As(V) n'és la forma predominant. El perfil de l'arsènic en una columna d'aigua tendeix a presentar una distribució vertical amb esgotament a la zona eufòtica, sota la qual no té lloc la fotosíntesi, que indica que el fitoplàncton absorbeix l'arsènic a través del mecanisme de transport del fosfat.[43] La presència de compostos metilats augmenta amb la temperatura de l'aigua i dels

nutrients que aquesta presenta.[57–60] Per tant, la proporció de MA i DMA respecte l'arsènic total pot reflectir l'activitat biològica de l'aigua, és a dir, la metilació de iAs per fitoplàncton i altres organismes d'aigües superficials.[61]

Segurament el punt de partida en el camp de la metilació de l'arsènic és la proposta de Challenger:[45] un mecanisme segons el que transformava el iAs en $(CH_3)_3As$ en etapes successives de metilació i reducció (Figura 6).

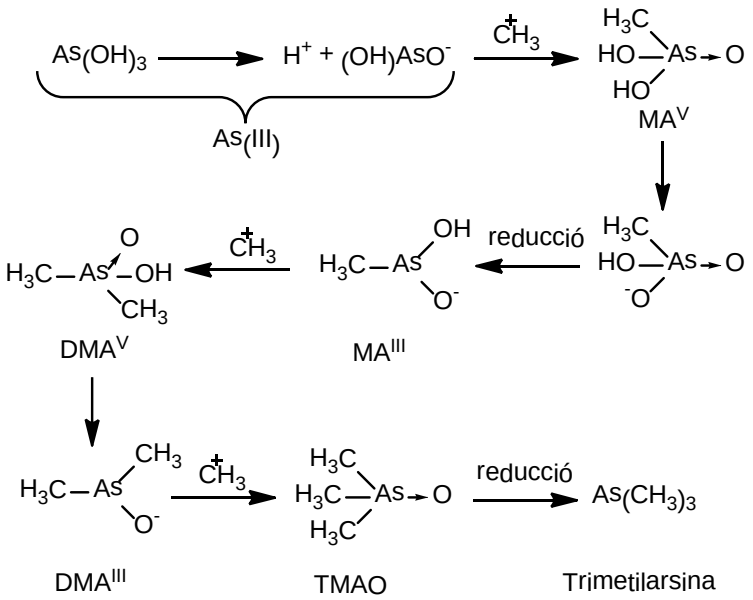



**Figura 6: Esquema de la biometilació de l'arsènic proposar per Challenger.[45]**

L'aïllament de la AB a la dècada dels 70 en teixits de crustaci i la troballa dels As-sug donà peu a noves teories pel que fa a la transformació de l'arsènic al medi marí. Al 1987, Edmons i Francesconi[62] proposaren una possible ruta de transformació de l'arsènic inorgànic de l'aigua de mar en arsenobetaïna en la fauna marina (veure Figura 7). Aquesta ruta té com a punt de partida la biometilació del As(V) proposada per Challenger però la metilació del $DMA^{III}$ implicaria la transferència del grup adenosil de la SAM, la subseqüent hidròlisi enzimàtica de l'adenina i reacció amb metabòlits (intermedis 1 i 2). Els As-sug es prenen com a punt de partida dels arsenolípids per a la seva incorporació a les membranes cel·lulars i la seva eventual eliminació. Un estudi *in vitro* de la degradació de l'alga bruna *Ecklonia radiata* en condicions anaeròbiques al laboratori va reportar la conversió quantitativa dels arsenosucres en DMAE.[63] En base a aquesta troballa, es proposa la transformació dels As-sug en DMAE i la conseqüent transformació a DMAA o AC en els sediments marins, i la seva transformació i incorporació com AB a la fauna marina.

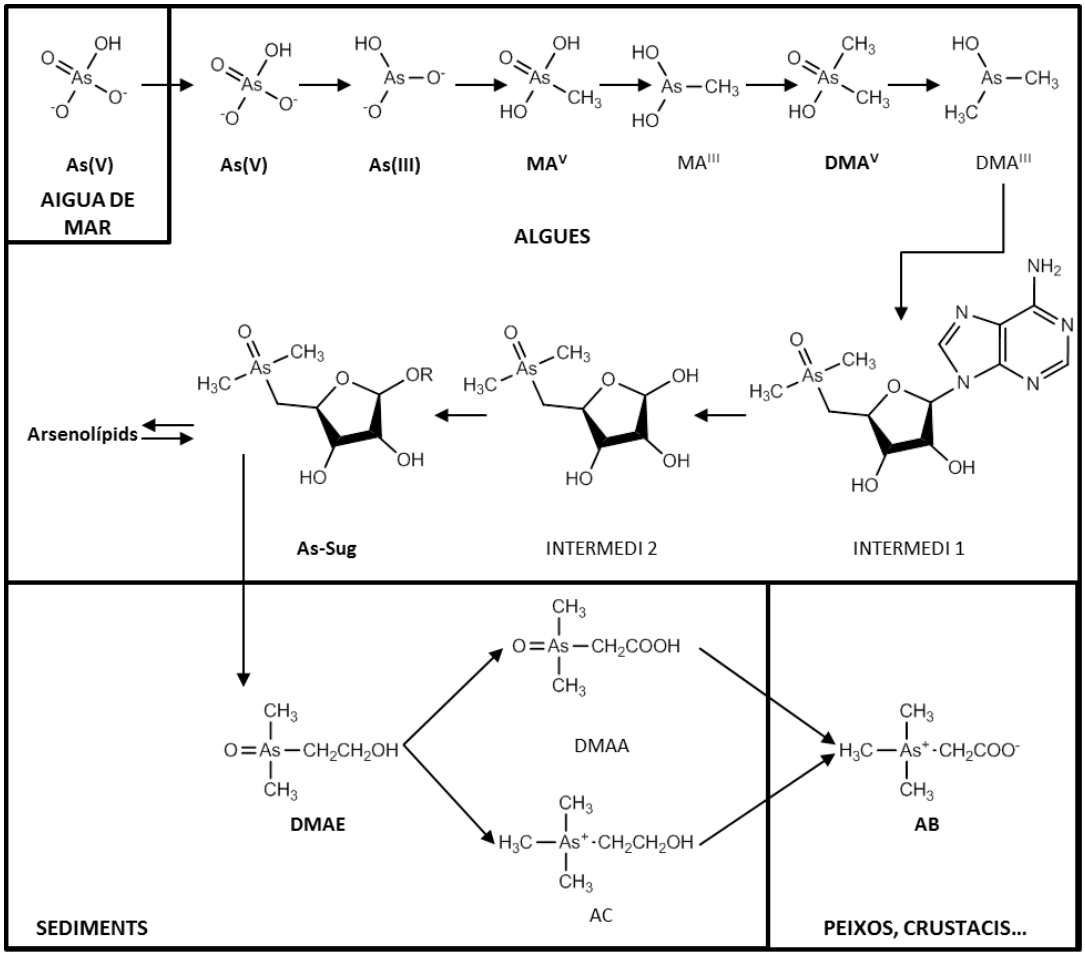



**Figura 7: Esquema proposat per Edmons i Francesconi[62] de les transformacions dels compostos d'arsènic al medi marí que portarien a l'obtenció d'arsenobetaïna a partir d'arsenat. El compostos aïllats al 1987 es remarquem amb tipografia negreta.**

La hipòtesi d'Edmons i Francesconi té com a punt feble la poca quantitat de As-sug en comparació amb la de AB, tot i que hi ha estudis que hi donen suport,[64,65] d'altres autors aposten per un origen microbià de la AB ja que troben el compost en mostres d'algues sense epífits animals.[66]

Una revisió bibliogràfica recent aborda la formació de la AB al plàncton, l'inici de la cadena tròfica.[67] Les dades recollides revelen una distribució diferent dels compostos d'arsènic entre els diferents nivells de la cadena tròfica. Així doncs, el iAs és la fracció majoritària en el fitoplàncton, i els met-iAs i els As-sug (gly-sug i $PO_4$-sug principalment) els organometàl·lics més importants, mentre que cap dels estudis hi troba arsenobetaïna. El zooplàncton marí sempre conté AB, essent minoritari en l'herbívor i majoritari en el carnívor.[68,69] Sorprenentment, els herbívors tenen un contingut elevat de As-sug. Aquesta distribució podria indicar que la AB es forma pels organismes heteròtrofs de la base de la cadena tròfica.[67]

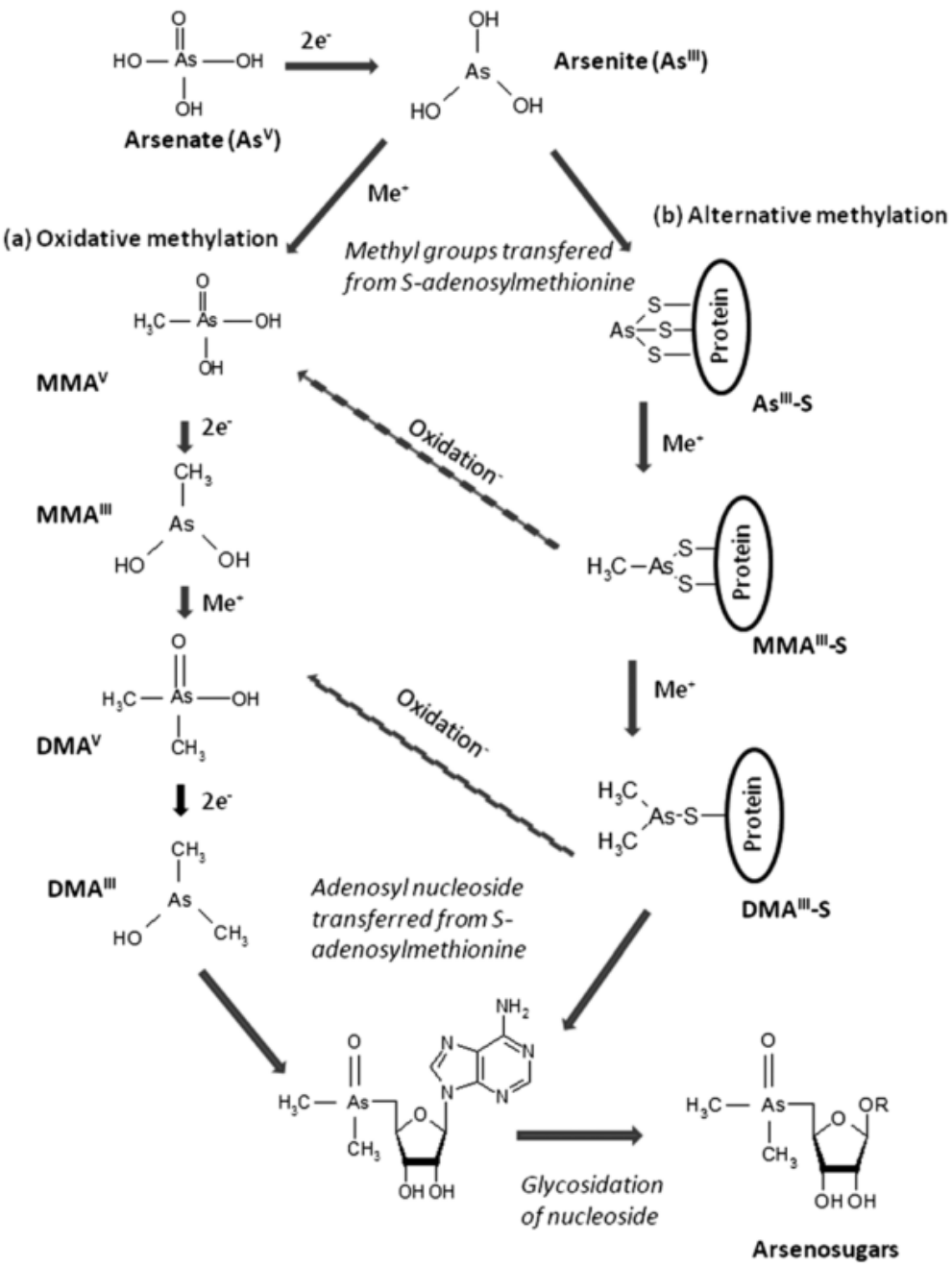



**Figura 8: Esquema proposat per Caumette, *et al.*[67] en el qual s'engoblen els mecanismes de metilació proposats per Challenger[45] i Hayakawa, *et al.*[70]**

Tot i que no es qüestiona el mecanisme proposat per Edmons i Francesoconi,[62] s'introdueixen algunes rutes alternatives on participen proteïnes (veure Figura 8) i s'apunta que la formació de la AB es pot atribuir a com a punt de partida els As-sug trimetilats i dimetilats, respectivament, mentre que la ruta 3 té com a punt de partida el $DMA^{III}$. L'esquema proposat és, en certa manera, una ampliació de la visió d'Edmonds i Francesoni,[62] que correspondria a la ruta 2. La ruta 1 es proposa a partir d'estudis on es troben As-sug trimetilats en teixit intestinal de l'orella de mar, *Haliotis rubra,* (28 % de

l'arsènic total)[71] i en gastròpodes de manglars (6-8 % de l'arsènic total).[72] De totes formes, no són un grup de compostos molt abundant al medi marí, el que indica que la ruta 1, probablement, no sigui la principal font de AB de la fauna marina.[67] La ruta 2 es veu suportada per estudis que han trobat els intermedis en diferents nivells tròfics: DMAE en fitoplàncton,[73] DMAA[69] i AC[74] en zooplàncton. La ruta 3, en la qual es forma DMAA per la reacció entre el $DMA^{III}$ y el piruvat,[75] podria explicar la presència de AB en ecosistemes terrestres. De totes maneres, l'origen de la AB no és clar i podria venir per altres rutes metabòliques, ja que les rutes proposades només contemplen els intermedis identificats fins a la preparació de la revisió de Caumette, *et al.*[67] (veure Figura 9).

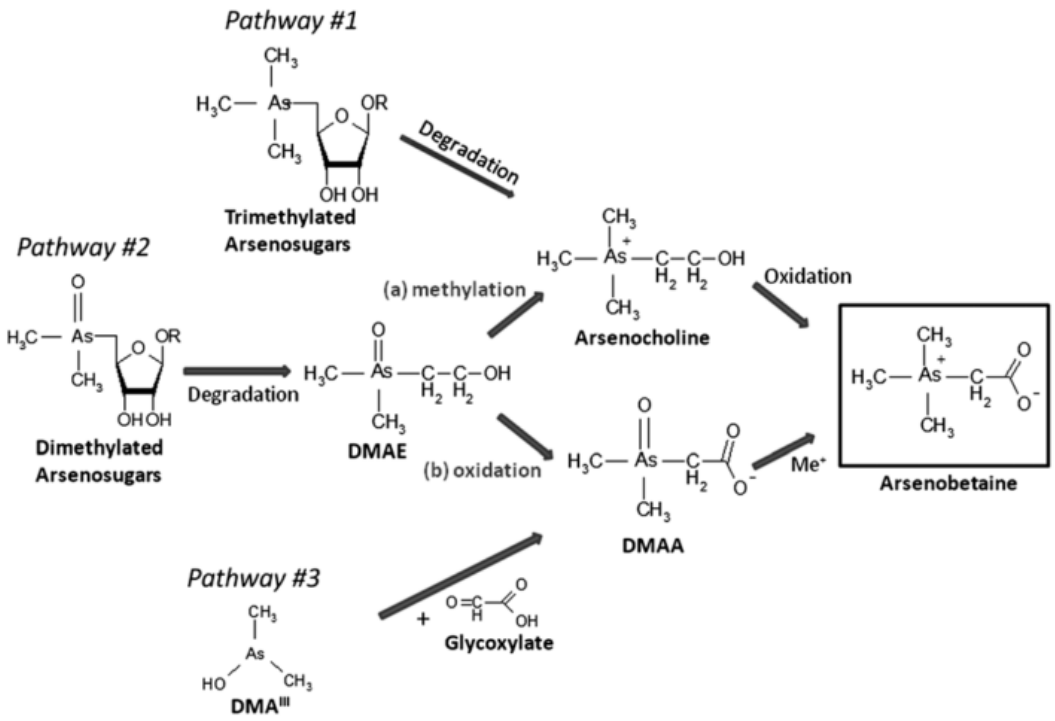



**Figura 9: Rutes per a la formació de l'arsenobetaïna al medi marí. Extret de Caumette, el al., 2012.[67]**

La degradació dels organometàl·lics a iAs en condicions aeròbiques no ha estat tant estudiada com la seva biosíntesi. Es troben pocs estudis a la bibliografia que hagin abordat l'oxidació dels As-sug i tot i que el compost final és el As(V) no se'n coneix del cert la ruta que se segueix.[76–78] A la Figura 10 es pot veure la ruta de degradació dels As-sug proposada per Castlehouse, *et al.*,[79] en un primer moment els As-sug perdrien la cadena lateral transformant-se en gly-sug, en pocs dies s'alliberaria DMA i en qüestió de mesos es trencarien els enllaços As-C tot obtenint iAs.

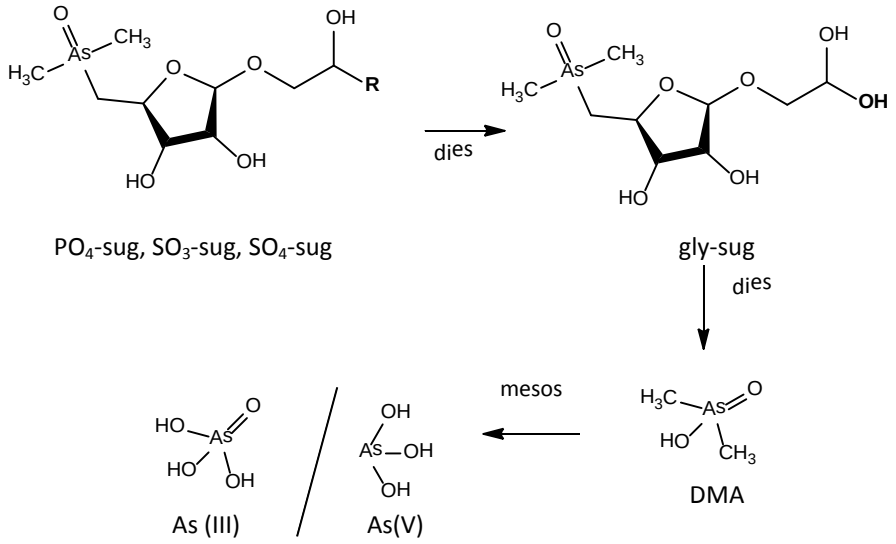



**Figura 10: Esquema proposat per Castlehouse, *et al.*[79] de la degradació dels arsenosucres.**

Un altre punt que no queda massa clar és el paper que juguen els compostos sofrats d'arsènic en el seu cicle. S'han identificat en diversos organismes: tio-DMA en orina humana,[54] tio-As-sug en musclos i algues.[80,81] Són compostos que no es van identificar a fins mitjans de la dècada anterior, gràcies a diversos estudis analítics, a través dels quals es va observar la seva elevada retenció en fases estacionàries de bescanvi aniònic. Actualment no es disposa de gaire informació d'aquests compostos.

## 1.7 Arsènic i Algues

La denominació d'alga s'empra per a referir-se a un grup d'organismes autòtrofs molt divers. Sota l'aixopluc de la paraula "alga" s'hi poden trobar éssers unicel·lulars, tant eucariotes com procariotes, i pluricel·lulars, que pertanyen a diferents regnes: cromistes, fongs, plantes i protozous. En aquesta tesi s'ha treballat amb algues dels fílums dels cloròfits, rodòfits i ocròfits, els dos primers es classifiquen com a plantes i el darrer com a cromistes.[82,83] Totes elles són algues pluricel·lulars macroscòpiques. A més, també s'han analitzat faneròganes aquàtiques, principalment les que formen pastures marines.

L'interès d'estudiar l'arsènic en les algues ve donat per diversos factors: l'acumulació d'aquest element per part d'elles, la varietat i distribució de compostos que s'hi pot trobar i l'ús que se'n dóna a les algues. La capacitat que tenen aquests organismes per acumular arsènic és molt elevada, per exemple l'aigua de mar de la Mediterrània presenta una concentració d'arsènic aproximada de 1,1 – 1,9 μg As $l^{-1}$, i la concentració que trobem a les algues és de varis ordres de magnitud superior: 1-350 mg As $kg^{-1}$.[84–86]

Algunes de les zones estudiades són la costa d'Austràlia (aigua: 1,10 – 1,61 μg As $l^{-1}$; algues: 0,11 – 173 mg As $kg^{-1}$ )[85,87] i l'Atlàntic Nord-oriental (aigua superficial:1,0-1,3 μg As $l^{-1}$; algues destinades al consum humà: 5,8 – 56,8 mg As $kg^{-1}$).[85,88] En el cas de les algues d'aigües continentals s'han estudiat en diverses zones entre elles a Hongria (5,06 – 9,33 mg As $kg^{-1}$),[77] el Japó (18,0 mg As $kg^{-1}$),[89] el Canadà (249 mg As $kg^{-1}$)[90] i l'Iran (13,3 – 661 mg As $kg^{-1}$).[91]

Aquesta capacitat tan elevada d'acumulació d'arsènic fa que s'hagin realitzat estudis de bioindicació de pol·lució i de bioremediació.[92,93] Un exemple de l'ús de les algues com a bioindicadors es pot trobar a la Directiva Marc de l'Aigua de la Comissió Europea, la qual té com a objectiu que les aigües dels països membres es trobin en un bon estat físic, químic i biològic.[94] L'avaluació de diferents comunitats d'organismes indicadors serveix per a establir l'estatus biològic de les aigües; aquestes comunitats varien entre zones geogràfiques i algunes de les proposades són les de *Cystoseira* spp.[95] i de *Zostera marina*.[96] Pel que fa la bioremediació, es troben estudis d'absorció amb algues directament[91,97] i amb carbó actiu provinent de la combustió de flora aquàtica.[92]

S'han donat diferents usos a les algues en diferents regions geogràfiques. A les illes de l'Europa Occidental, el varec (*kelp*) es fa servir com a fertilitzant i aliment de bestiar.[79,98] L'interès pel contingut d'arsènic de les algues va iniciar-se a l'observar l'elevat contingut d'arsènic que tenien les ovelles de les illes Orkney que s'alimentaven amb varec, que era cent cops superior al d'ovelles amb una dieta normal.[99] També cal destacar l'ús extens de les algues com a part de la dieta en diverses zones del món, en especial en països de l'Extrem Orient.

Els principals compostos d'arsènic identificats en algues són els arsenosucres, unes riboses que tenen enllaçat al carboni 5 un àtom d'arsènic. Aquest àtom pot presentar diferents substitucions; les més comunes són les anàlogues al DMA i les que tenen l'àtom d'arsènic enllaçat amb tres metils. En el cas de que l'àtom d'arsènic estigui enllaçat a un àtom d'oxigen, es poden formar homòlegs amb sofre; aquests compostos es coneixen com a tioarsenosucres. A més dels arsenosucres, les algues també poden contenir les dues formes d'arsènic inorgànic i arsenats metilats. En algunes algues destinades al consum humà, com ara la *hiziki* (*Sargassum fusiforme*) el contingut elevat d'arsènic inorgànic ha fet que en alguns països se n'hagi prohibit la seva comercialització. Altres compostos d'arsènic identificats en algues són els arsenolípids,

entre ells els arsenosucresfosfolípids identificats al 1988 per Morita i Shibata (Figura 11).[100]

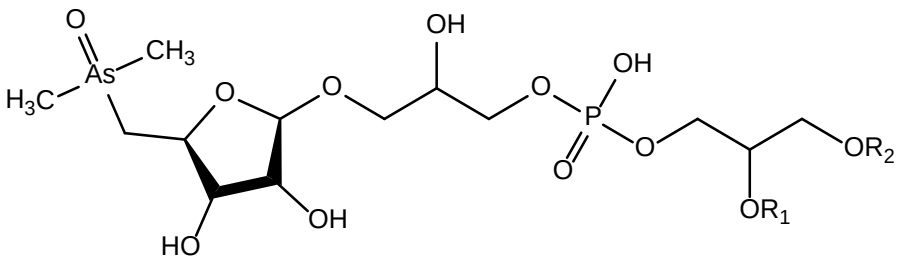



**Figura 11: Arsenosucrefosfolípids identificats en *Undaria pinnatifida* i *Sargassum fusiforme* on $R_1$ i $R_2$ són cadenes lipídiques.[101] El primer arsenosucre-fosfolípid (As-PL958) trobat a la bibliografia té com a cadenes laterals $R_1$=$R_2$= -C(O)$(CH_2)_{14}CH_3$.[100]**

## 1.8 Especiació analítica d'arsènic

L'especiació analítica és l'activitat d'identificar i mesurar la quantitat d'una o més espècies químiques individuals d'una mostra.[102] Per a aconseguir-ho, els mètodes emprats han de considerar i garantir la identitat de les espècies en les diferents etapes: preparació de mostra, extracció, separació i quantificació de les espècies.

### 1.8.1 PRE-TRACTAMENT I EXTRACCIÓ D'ESPÈCIES DE LA MOSTRA

Les etapes prèvies a l'especiació analítica són de crucial importància per tal d'obtenir uns resultats que corresponguin al contingut de la mostra, per tant les etapes prèvies han d'evitar la pèrdua o transformació de les espècies originals de la mostra. No hi ha establert un mètode estàndard i, com recalca la revisió bibliogràfica feta per Rubio, *et al.*,[103] aquestes etapes no són comparables entre els diferents laboratoris. Normalment el pre-tractament de la mostra consisteix en neteja, assecament i polvorització de les mostres.

*Neteja de les mostres*

L'eliminació de substàncies i organismes epífits (fauna o flora) aliens a la mostra és una etapa molt important ja que si no es duu a terme pot causar resultats erronis. Per exemple, la determinació de AB es pot deure a la presència de bacteris o epífits animals no eliminats correctament.[66,104,105] Alguns dels procediments més freqüents són: raspat amb fulles d'afaitar,[106,107] neteja amb raspall de niló[81] o eliminació manual amb pinces.[108] A més, també s'incorporen etapes de rentat ja sigui amb aigua marina,[108] de

xarxa,[109] desionitzada[106] o solucions salines anàlogues a l'aigua de mar.[86] Hi ha estudis bibliogràfics que han relacionat la formació d'artefactes durant procés d'especiació amb els epífits no eliminats de la mostra.[66,104,105]

*Assecament, polvorització i homogeneïtzació de la mostra*

L'assecament i polvorització de la mostra són etapes habituals en la majoria d'estudis d'especiació. Ara bé, aquestes etapes també presenten diferències entre els diferents laboratoris. La liofilització i el tractament tèrmic són les opcions més comunes pel que fa l'assecament de la mostra. Les condicions d'assecament tèrmic oscil·len entre la temperatura ambient i 60°C i les 18 i 24 h. Respecte la liofilització, també trobem variabilitat entre el temps del procediment, de 24 a 48 h. La polvorització és una etapa d'especial importància, ja que s'ha d'assolir un compromís entre la preservació de les espècies i l'homogeneïtat de la mostra. També és possible aplicar procediments d'homogeneïtzació com el tamisat o la centrifugació.[86,105,108,110–114]

*Extracció de les espècies d'arsènic*

Els procediments d'extracció, com els pre-tractaments, també presenten certa variabilitat, normalment l'extractant és $H_2O$ o $H_2O$:MeOH en diferents proporcions i alguns estudis fan servir l'assistència de microones o de sonda d'ultrasons.[103] També s'ha descrit l'ús de solucions diluïdes de $HNO_3$ i d'extraccions seqüencials.[115] Per extreure els fosfolípids sol fer-se servir cloroform, modificat o no amb metanol.[101] Donada la diferent polaritat de les espècies d'arsènic i la dificultat experimental de les extraccions seqüencials, hi ha autors que qüestionen l'extracció quantitativa de compostos.[116]

### 1.8.2 Tècniques de Separació

La naturalesa de les mostres marines requereix de sistemes cromatogràfics que permetin identificar les espècies. Els mètodes desenvolupats per separar els As-sug fan servir mecanismes com el parell iònic en fase inversa, l'exclusió molecular o la cromatografia de bescanvi aniònic o catiònic. Els compostos presenten propietats tan diferents que per analitzar-los cal fer servir dues o tres tècniques complementàries per a poder separar-los completament. En la present tesi s'ha optat per la cromatografia de bescanvi iònic com a tècnica de separació. Quan es calcula la recuperació de columna (relació entre la summa d'espècies quantificades i arsènic total a l'extracte) es veu que

sovint és llunyana al 100 %. Això es pot atribuir a compostos no cromatografiables o a pèrdues degudes a l'enllaçament de compostos a la fase estacionària de la columna.[117]

*Cromatografia de bescanvi iònic*

La cromatografia de bescanvi iònic és el mètode més emprat per a la separació d'espècies, en especial la de bescanvi aniònic. Els arsenosucres poden trobar-se com a espècies carregades segons el pH; a més poden separar-se correctament amb bescanvi aniònic i bescanvi catiònic, tot i que l'ús del darrer es limita a poques espècies com el gly-sug, la AB, la AC, el TMAO i l'ió TETRA. Els mètodes aplicats de bescanvi aniònic solen ser en mode isocràtic, tot i que hi ha algun estudi amb gradient de pH, de concentració o la utilització modificador orgànic (MeOH). Les fases mòbils més freqüents són $NH_4H_2PO_4$ pH 5,1-6 i $NH_4HCO_3$ pH 9-10,5).[77,111,118–122] Per bescanvi catiònic, es fa servir un mètode isocràtic i la fase mòbil és formiat de piridoni (pH 2-3).[66]

### 1.8.3 MÈTODES DE DETECCIÓ

Les tècniques principals per a la detecció de compostos d'arsènic són l'espectrometria atòmica i l'espectrometria de masses molecular. Les característiques de cada tipus de tècnica les fa complementàries ja que l'espectrometria atòmica presenta una elevada sensibilitat i selectivitat, mentre que l'espectrometria de masses molecular dóna informació estructural. La combinació de cromatografia líquida acoblada a una tècnica espectromètrica és el recurs analític més emprat en l'especiació d'arsènic.[117]

*Espectrometria atòmica*

Els principals avantatges de les tècniques d'espectrometria són l'alta sensibilitat i selectivitat que presenten. Tanmateix, durant l'etapa de mesura les molècules s'atomitzen o s'ionitzen i per tant només s'obté informació sobre la concentració total d'arsènic a la mostra. Per a poder quantificar les espècies de forma individual cal introduir la mostra mitjançant un sistema que permeti resoldre les molècules en el temps.[117] Com s'ha vist a l'apartat anterior, la tècnica de separació més emprada és la cromatografia iònica. Els instruments més emprats per a la detecció són el plasma induït per alta freqüència amb detecció d'espectrometria de masses (ICP-MS) i la generació d'hidrurs acoblada a espectrometria de fluorescència atòmica (HG-AFS) i l'espectrometria d'emissió atòmica de plasma induït per alta freqüència (ICP-AES).

El ICP-MS acoblat a cromatografia líquida presenta robustesa, límits de quantificació baixos (~1 μg As $l^{-1}$), un marge de linearitat ampli i detecció elemental (alta selectivitat). Així mateix, els efectes de matriu no solen ser importants. Per contra, la presència de d'àtoms de clor a la mostra pot interferir en la mesura ja que forma una interferència isobàrica amb l'arsènic que és un element monoisotòpic de massa 75 ($^{75}As^{+}$, $[^{40}Ar^{35}Cl]^{+}$). La comparació de temps de retenció és una de les estratègies més esteses per a la identificació dels compostos, juntament amb l'addició de patrons a la mostra. Donada la varietat de compostos d'arsènic i que no sempre són disponibles comercialment, moltes vegades la referència que es pren és una mostra en la qual s'hi ha identificat els compostos amb una altra tècnica, també s'ha descrit l'ús de compostos sintetitzats per a aquesta finalitat.[117] D'altra banda, la mesura es deu a la resposta selectiva de l'ICP-MS a l'arsènic que contenen les molècules; tot i que s'han descrit diferències en la velocitat de transport, la quantificació emprant rectes de calibratge de compostos, el patró dels quals no està disponible, és molt freqüent en la comunitat científica.[123]

L'altra tècnica d'espectrometria atòmica emprada en especiació d'arsènic és la HG-AFS. El seu principal avantatge és el seu baix cost d'operació. Per tal que les espècies arribin al detector aquestes han de trobar-se en fase gas i per tant cal una tècnica de derivatització dels anàlits. El rendiment de la generació d'hidrurs està lligat a la forma química de l'arsènic i per tant la sensibilitat de la tècnica no és independent de l'anàlit. En certs casos (AB) és necessari utilitzar sistemes d'oxidació *on-line* per a poder transformar el compost en un altre adient per a la mesura.[117] Els arsenosucres són compostos difícils d'analitzar per aquesta tècnica i fins fa poc es creia que no formaven cap espècie volàtil, tot i que algun estudi indica que són capaços de formar $(CH_3)_2AsH$, una espècie poc sensible en HG-AFS, fent servir un sistema de fotoxidació *on-line* .[124]

*Espectrometria de masses*

L'espectrometria de masses amb electrosprai (ESI-MS) és complementaria al ICP-MS ja que és capaç de donar informació estructural de l'anàlit. El primer estudi en el qual es feia servir el ESI-MS per a la identificació d'arsenosucres es va publicar al 1996.[125] Tot i que la tècnica permet la ionització total de la mostra i la detecció del $^{75}As$, aquesta no té la mateixa sensibilitat que el ICP-MS, la sensibilitat depèn de l'espècie analitzada, i és més propensa als efectes de matriu.[111]

A més del ions moleculars protonats ($[M+H]^+$), les fragmentacions característiques dels arsenosucres tenen m/z 237, 195 i 97 (Figura 12). Com que l'arsènic és monoisotòpic no presenta un patró de m/z característic.[126–128]

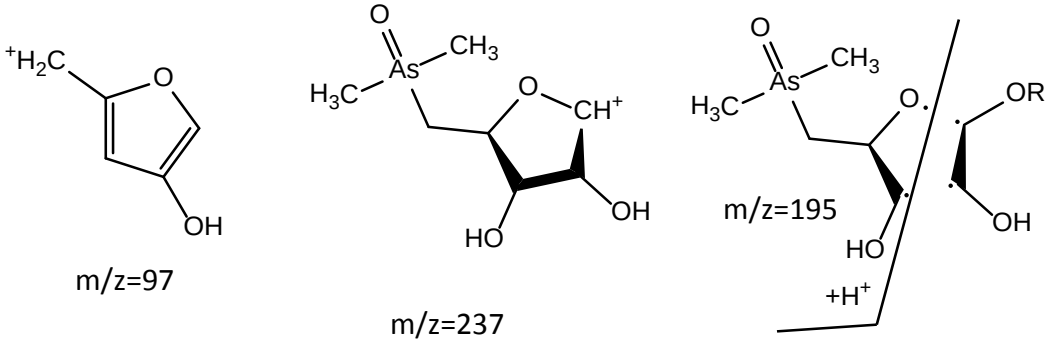



**Figura 12: Fragments típics del arsenosucres observats en ESI-MS.**[117]

**Taula 3: Recull d'alguns mètodes de pre-tractament, extracció, separació i detecció de compostos d'arsènic reportats a la literatura, 2006-2012 .**

| Referència | Mostra (flora aquàtica) | Pre-tractament | Mètode d'extracció | Sistema cromatogràfic | Detector |
|---|---|---|---|---|---|
| [129] | *Sargassum fulvellum*<br>*Sargassum piluliferum*<br>*Undaria pinnatifida*<br>*Hizika fusiformis*<br>*Pelvetia wrightii*<br>*Myelophycus símplex*<br>(Mostreig a la badia d'Hiroshima) | Neteja amb aigua de xarxa<br>Liofilització<br>Polvorització amb mesclador | Extractant: $H_2O$<br>Extracció assistida amb ultrasons<br>15 min | Bescanvi aniònic<br>*Columna*:<br>Hamilton PRP-X100 (250×4,1mm, 10 µm)<br>*Fase mòbil*:<br>$NH_4HCO_3$ (20 mM, pH 8,4) | ICP-MS |
| [66] | *Cladophora prolifera*<br>*Enteromorpha compressa*<br>*Ulva rigida*<br>*Codium effusum*<br>*Codium vermilara*<br>*Halopteris filicina*<br>*Halopteris scoparia*<br>*Cystoseira mediterranea*<br>*Alsidium corallinum*<br>*Jania Rubens*<br>*Posidonia oceànica*<br>(Mostreig a Lloret de Mar) | Neteja amb aigua doblement desionitzada.<br>Eliminació manual dels epífits amb l'ajuda d'una lupa binocular.<br>Assecat en estufa a 40°C.<br>Polvoritzat en molí d'anelles de carbur de tungstè. | Extractant: $H_2O$<br>Extracció mecànica<br>16 h | Bescanvi aniònic<br>*Columna*:<br>Hamilton PRP-X100 (250×4,1mm, 10 µm)<br>*Fase mòbil*:<br>$NH_4H_2PO_4$ (20 mM, pH 5,8)<br>Bescanvi catiònic<br>*Columna*:<br>Zorbax 300-SCX (250mm x 4,6 mm, 5 µm)<br>*Fase mòbil*:<br>$C_5H_6N^+COO^-$ (20 mM, pH 2,6) | ICP-MS |

| Referència | Mostra (flora aquàtica) | Pre-tractament | Mètode d'extracció | Sistema cromatogràfic | Detector |
|---|---|---|---|---|---|
| [77] | Alga verda<br>*Cladophora* sp<br>(fresca i assecada pel sol)<br><br>Plantes<br>*Myriophyllum* sp.<br>*Ceratophyllum demersum*<br>*Salvinia natans*<br>*Limnobium spongia*<br>*Carex* sp.<br><br>(Mostreig al Danubi, Hongria) | Liofilització.<br>Homogeneïtzació.<br>Emmagatzematge a temperatura ambient. | Extractant: $H_2O$<br>Extracció assistida amb sonda d'ultrasons (30 s), seguida de agitació mecànica 16 h. | Bescanvi aniònic<br>*Columna*:<br>Hamilton PRP-X100 (250×4,1 mm, 10 µm)<br>*Fase mòbil:*<br>$NH_4H_2PO_4$ (20 mM, pH 5,8)<br>Bescanvi aniònic (tio-arsenosucres)<br>*Columna*:<br>Hamilton PRP-X100 (100×4,1 mm, 10 µm)<br>*Fase mòbil:*<br>$NH_4HCO_3$ (20 mM, 3 % MeOH, pH 10,3)<br>Bescanvi catiònic<br>*Columna*:<br>Zorbax 300-SCX (250x4,6 mm, 5 µm)<br>*Fase mòbil:*<br>$C_5H_6N^+COO^-$ (20 mM, pH 2,6) | ICP-MS |
| [108] | *Corallina officinalis*<br>*Laurencia obtusa*<br>*Laurencia sp.*<br>*Ulva rígida*<br>*Caulerpa flexilis*<br>*Cladophoropsis herpestica*<br>*Caulerpa cactoides*<br>*Rhizoclonium implexium*<br>*Cladophera subsimplex*<br>(mostreig a SE Australia) | Esbandit amb aigua desionitzada.<br>Eliminació manual d'epífits.<br>Liofilització.<br>Molturat en molí de malla. | Extracció seqüencial:<br>*Lipídica*<br>$CHCl_3$:MeOH<br>(2:1 v/v)<br>30 s vòrtex<br>4 h agitador rotatori<br><br>*Aquosa*<br>$H_2O$ 100°C 1 h | Bescanvi aniònic<br>*Columna*:<br>Hamilton PRP-X100 (250×4,1 mm, 10 µm)<br>*Fase mòbil:*<br>$NH_4H_2PO_4$ (20 mM, 1 % MeOH, pH 5,6)<br>Bescanvi catiònic<br>*Columna*:<br>Supelcosil LC-SCX (250x4,6 mm, 5 µm)<br>*Fase mòbil:*<br>$C_5H_6N^+COO^-$ (20 mM, pH 2,6) | ICP-MS |

| Referència | Mostra (flora aquàtica) | Pre-tractament | Mètode d'extracció | Sistema cromatogràfic | Detector |
|---|---|---|---|---|---|
| [113] | *Iridaea cordata*<br>*Ascoseira mirabilis*<br>*Adenocystis utricularis*<br>*Desmarestia menziesii*<br>*Gigartina skottbergii*<br>(mostreig a King George Island, Antàrtida) | Esbandit amb aigua ultrapura.<br>Congelació prèvia al transport.<br>Assecat en estufa a 60°C<br>Polvorització en molí centrífug. | *Extractant:*<br>$H_2O$ : MeOH<br>(1:1 v/v)<br><br>30 s vòrtex<br>4 h bany d'ultrasons a 30°C | <u>*Bescanvi aniònic*</u><br>*Columna:*<br>IonPac AS7 (250×4,0mm, 10 µm)<br>*Fase mòbil:*<br>A: $NH_4HCO_3$ (25 mM, 1 % MeOH, pH 10)<br>B: $H_2O$<br><u>*Bescanvi catiònic*</u><br>*Columna:*<br>Hamilton PRP-X200 (150×4,1 mm, 10 µm)<br>*Fase mòbil:*<br>4mM $C_5H_6N^+COO^-$ (pH 2,4) | ICP-MS<br>ESI-IT-MS |
| [130] | *Undaria pinnatífida*<br>*Laminaria japonica*<br>*Sargassum cristaefolium*<br>*Porphyra dentata*<br>(Taiwan) | Sense informació | Extractant:<br>Fase mòbil A:MeOH (1:1 v/v)<br>Assistida per microones<br>60°C 20 min | <u>Bescanvi aniònic</u><br>*Columna*:<br>Hamilton PRP-X100 (250×4,1mm, 10 µm)<br>*Fase mòbil (gradient):*<br>A: $NH_4HCO_3$ (0,5 mM, 1 % MeOH, pH 8,5)<br>B: $NH_4HCO_3$ (50 mM 1 % MeOH pH 8,5) | ICP-MS<br>ESI-MS-MS |
| [89] | *Cladophora glomerata*<br>(mostreig al riu Hayakawa, Japó) | Esbandit amb aigua.<br>Liofilització.<br>Polvorització amb morter. | Extractant:<br>$H_2O$:MeOH (1:1 v/v)<br>Extracció assistida amb ultrasons<br>10 min | <u>Parell iònic</u><br>*Columna*:<br>Shiseido CAPCELL PAK C18 MGII<br>(250×4,1mm, 5 µm)<br>*Fase mòbil:*<br>butasulfonat de sodi (10 mM)<br>hidròxid de tetrametil amoni (4 mM)<br>àcid malònic (4 mM)<br>(MeOH 0.5 %, pH 3,0 ajustat amb $HNO_3$) | ICP-MS |

### 1.8.4 MATERIALS DE REFERÈNCIA CERTIFICATS

La finalitat dels Materials de Referència Certificats (CRM) és la d'avaluar l'exactitud d'un mètode analític. En el camp de l'especiació, hi ha una mancança de CRM amb les espècies certificades. Les estratègies més usuals consisteixen en fer servir materials de teixit animal amb les espècies certificades, com el DORM-2 (*Squalus acanthias*); o bé, fer servir materials que tenen un valor certificat d'arsènic total, però no les espècies,[103] i comparar-les amb dades de la bibliografia, veure Taula 5. Recentment el National Metrology Institute of Japan (NMIJ) ha preparat un CRM de l'alga comestible *hiziki* (*Sargassum fusiforme)* amb valor certificat de la concentració d'arsenat.[131]

Un material de referència que cal destacar és un extracte liofilitzat de l'alga *Fucus serratus*.[132] Tot i que no és un material certificat i donada la falta d'aquests, el seu ús per a la identificació dels As-Sug i el control de la quantificació és força estès. A més, aquest material conté els quatre arsenosucres més comuns. El Prof. Francesconi de la Universitat de Graz, Austria, proporciona aquest material desinteressadament des de la seva preparació. La Taula 4 recull alguns dels valors donats a la bibliografia de l'extracte de *F. serratus*, on es pot veure que els valors donats concorden entre ells. Excepte el valor de $SO_4$-sug quan es fa servir ESI-MS com a detector.

**Taula 4: Valors donats a la bibliografia per als compostos d'arsènic de l'extracte de *F. serratus* (en µg As, mitjana ± desviació estàndard (CV %) )**

| Referència | Tècnica | DMA | gly-sug | $PO_4$-sug | $SO_3$-sug | $SO_4$-sug |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Madsen, *et al.*[132]** | ICP-MS | 0,005 (20 %) | 0,10 (3,6 %) | 0,086 (2,9 %) | 0,62 (3,8 %) | 0,40 (3,1 %) |
| | ESI-MS | | 0,088 (21 %) | 0,075 (2,7 %) | 0,57 (2,2 %) | 0,10 (2,6 %) |
| **Almela, *et al.*[133]** | ICP-MS | | 0,098 (1,6 %) | 0,084 (0,4 %) | 0,65 (3,4 %) | 0,39 (2,5 % |
| **Schmeisser, *et al.*[134]** | ICP-MS | | 0,098 (4,1 %) | 0,082 (6,5 %) | 0,58 (5,3 %) | 0,39 (5,9 %) |
| **Kohlmeyer, *et al.*[135]** | ICP-MS | | 0,088 (4,7 %) | 0,089 (4,1 %) | 0,60 (3,2 %) | 0,40 (2,9 %) |
| **Llorente, et al.[66]** | ICP-MS | 0,01 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,64 ± 0,02 | 0,40 ± 0,01 |
| **Ruíz-Chancho, *et al.*[136]** | ICP-MS | | 0,10 ± 0,03 | 0,09 ± 0,01 | 0,69 ± 0,13 | 0,45 ± 0,08 |

**Taula 5: Recull d'alguns materials de referència certificats (CRM) de plantes, algues i animals marins emprats en estudis d'especiació. Valors en mg As $kg^{-1}$.**

| Material de referència | Valors Certificats | Disponibilitat | Referència | Valors reportats | Mètode extracció |
|---|---|---|---|---|---|
| **NIES n°9**<br>***Sargassum fulvellum*** | As: 115 ± 9 | No disponible | [137] | As: 115 ± 9 mg As $kg^{-1}$<br>As(V): 38 ± 2 mg As $kg^{-1}$<br>As Extret: 65 % | $H_2O$<br>Ultrasonificació |
| | | | [137] | As(V): 72 ± 3 mg As $kg^{-1}$<br>As Extret: 65 % | $H_2O$<br>90°C 5 min (MW assistit) |
| | | | [110] | As(V): 38 ± 2 mg As $kg^{-1}$<br>As Extret: 65 % | $H_2O$<br>90°C 5 min (MW assistit) |
| **BCR 279**<br>***Ulva lactuca*** | As: 3,01 ± 0,2 | Disponible | [115] | As: 2,89 ± 0,3<br>As Extret: 77 %<br>As(V): 0,52 ± 0,03<br>DMA: 0,08 ± 0,01<br>MA: 0,07 ±0,01<br>TETRA: 0,04 ± 0,01<br>gly-sug: 0,05 ± 0,01<br>$PO_4$-sug: 0,21 ± 0,03<br>n.i.: 0,01 ± 0,01 | MeOH:$H_2O$ (1:1, v/v)<br>70°C 15 min<br>Assistit amb microones |
| | | | [115] | As Extret: 57 %<br>As(V): 1,2 ± 0,06<br>DMA: 0,04 ± 0,01<br>MA: 0,03 ±0,01<br>gly-sug: 0,24 ± 0,02<br>n.i.: 0,16 ± 0,02 | 2 % $HNO_3$<br>95°C 6 min<br>Assistit amb microones |
| | | | [138] | As: 3,5<br>As Extret: 53 %<br>As(V): 0,7<br>TETRA: Traces<br>AB: 0,2<br>gly-sug: 0,2<br>$SO_3$-sug: 0,2 | $H_2O$<br>60°C 4 h<br>Ultrasons 15 min |

| Material de referència | Valors Certificats | Disponibilitat | Referència | Valors reportats | Mètode extracció |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | [130] | As: 3,02 ± 0,12<br>As Extret: 84 %<br>AB + gly-sug + TETRA 1,07 ± 0,012<br>As(III) 0,065 ± 0,003<br>DMA 0,200 ± 0,004<br>$PO_4$-sug 0,302 ± 0,008<br>MA 0,234 ± 0,010<br>As(V) 0,674 ± 0,022 | $NH_4HCO_3$ (0,5 mM, 1 % MeOH, pH 8,5)<br>: MeOH (1:1 v/v)<br>Assistida per micro-ones<br>60°C 20 min |
| **IAEA-140/TM *Fucus* sp. Homogenat de plantes** | As T: 44,3 ± 2,2 | Disponible Valors actualitzats al 2007 | [139] | As Extret: 40-70 %<br>As(V) n.d. – 0,40<br>DMA 1,01 – 1,90<br>Gly-sug 6,97 – 8,94<br>$PO_4$-sug 0,32 – 0,82<br>$SO_3$-sug 4,00 – 8,20<br>$SO_4$-sug 5,85 – 10,13 | $H_2O$:MeOH (0-100 %)<br>20°C 16h<br>Agitació mecànica |
| | | | [86] | As: 43,1 ± 2,2<br>As Extret: 23,9<br>gly-sug: 7,27<br>$PO_4$-sug: 0,57<br>$SO_3$-sug: 6,74<br>$SO_4$-sug: 7,91<br>As(V) 0,24<br>DMA 1,15 | $H_2O$<br>Temperatura ambient<br>Agitació mecànica 16 h |
| | | | [79] | As: 40,4 ± 2,2<br>As Extret: 82 %<br>As(V) 1,1 ± 0,5<br>DMA: 3,7 ± 0,5<br>gly-sug: 1 9,9 ± 0,4<br>$PO_4$-sug: 0,8 ± 0,4<br>$SO_3$-sug: 9,6 ± 0,3<br>$SO_4$-sug: 11,6 ± 0,4 | MeOH:$H_2O$ (1:10, v/v)<br>Ultrasons 10 min |
| | | | [133] | DMA: 1,09 ± 0,06<br>gly-sug: 7,67 ± 0,07<br>$PO_4$-sug: 0,75 ± 0,04<br>$SO_3$-sug 8,76 ± 0,33<br>$SO_4$-sug 10,7 ± 0,4 | Enzimàtica |

| Material de referència | Valors Certificats | Disponibilitat | Referència | Valors reportats | Mètode extracció |
|---|---|---|---|---|---|
| **NIST SRM 1566b Teixit d'ostra** | As: 7,65 ± 0,65 | Disponible Valors actualitzats al 2011 | [140] | DMA: 0,70 ± 0,01<br>AB: 1,61 ± 0,02 | 0,25 M $H_3PO_4$<br>Agitació mecànica 12 h |
| **NRC-CNRC DORM-2 Teixit muscular d'agullat** | As: 18,1 ± 1,1<br>AB: 16,4 ± 1,1<br>TETRA: 0,248 ± 0,054 | Archivat<br>Nou material: DORM-4 | [115] | As:18 ± 1,1<br>As Extret: 98 %<br>As(V): 0,02 ± 0,01<br>DMA: 0,34 ± 0,03<br>MA: 0,05 ± 0,01<br>n.i.: 0,02 ± 0,01<br>AB: 16,2 ± 0,2<br>TMAP: 0,16 ± 0,01<br>AC: 0,01 ± 0,01<br>TETRA: 0,25 ± 0,02 | MeOH:H2O (1:1, v/v)<br>70°C 15 min<br>Assistit amb microones |
| **NRC-CNRC TORT-2 Hepatopàncrees de llagosta** | As: 21,4 ± 0,5 | No disponible temporalment | [115] | As: 21,6 ± 1,8<br>As Extret: 88 %<br>As(V): 0,32 ± 0,02<br>DMA: 1,04 ± 0,01<br>$PO_4$: 0,56 ± 0,08<br>AB: 13,9 ± 0,1<br>gly-sug: 0,35 ± 0,01<br>TMAP: 1,2 ± 0,1<br>AC: 0,01 ± 0,01<br>TETRA: 0,05 ± 0,01 | MeOH:$H_2O$ (1:1, v/v)<br>70°C 15 min<br>Assistit amb microones |
| | | | [115] | As Extret: 102 %<br>As(V): 0,78 ± 0,01<br>DMA: 1,7 ± 0,2<br>$PO_4$: 0,74 ± 0,11<br>AB: 14,4 ± 0,2<br>gly-sug: 0,66 ± 0,06<br>TMAP: 1,4 ± 0,1<br>AC: 0,06 ± 0,01<br>TETRA: 0,05 ± 0,01 | 2 % $HNO_3$<br>95°C 6 min<br>Assistit amb microones |

| Material de referència | Valors Certificats | Disponibilitat | Referència | Valors reportats | Mètode extracció |
|---|---|---|---|---|---|
| **NRC-CNRC DORM-2 Teixit muscular d'agullat** | As: 18,1 ± 1,1<br>AB: 16,4 ± 1,1<br>TETRA: 0,248 ± 0,054 | Archivat<br>Nou material: DORM-4 | [115] | As:18 ± 1,1<br>As Extret: 98 %<br>As(V): 0,02 ± 0,01<br>DMA: 0,34 ± 0,03<br>MA: 0,05 ± 0,01<br>n.i.: 0,02 ± 0,01<br>AB: 16,2 ± 0,2<br>TMAP: 0,16 ± 0,01<br>AC: 0,01 ± 0,01<br>TETRA: 0,25 ± 0,02 | MeOH:H2O (1:1, v/v)<br>70°C 15 min<br>Assistit amb microones |
| | | | [115] | As Extret: 102 %<br>As(V): 0,02 ± 0,01<br>DMA: 0,32 ± 0,03<br>MA: 0,07 ± 0,01<br>AB: 17,1 ± 0,2<br>TMAP: 0,16 ± 0,01<br>TETRA: 0,27 ± 0,02 | 2 % $HNO_3$<br>95°C 6 min<br>Assistit amb microones |
| **NMIJ CRM 7405-a** ***Sargassum fusiforme*** | As: 35,8 ± 0,9<br>As(V): 10,1 ± 0,5 | Disponible | - | - | - |

## 1.9 Objectius

L'objectiu general de la present tesi és estudiar els compostos d'arsènic i la seva distribució en algues i plantes aquàtiques per obtenir informació de zones no estudiades; comparar diverses localitats, i observar la distribució dels compostos d'arsènic en parts diferenciades de les algues i també segons el cicle de vida. Aquest objectiu general inclou els següents objectius específics:

En referència als estudis metodològics:

- estudiar els efectes del processament de la mostra sobre l'especiació d'arsènic en macroalgues.
- posar a punt un mètode cromatogràfic per a l'anàlisi d'extractes d'algues amb un cromatografia de bescanvi aniònic i catiònic acoblades a espectrometria de masses
- posar a punt un mètode d'obtenció d'arsenosucres a partir d'una mostra d'alga.
- estudiar la viabilitat d'un material de referència preparat amb l'alga bruna *Undaria pinnatifida* per a espècies d'arsènic.

En referència als estudis sobre la distribució de l'arsènic en algues continentals i marines:

- estudiar de l'impacte de l'arsènic, d'origen natural i antropogènic, en algues del golf Termaic, Egeu Nord (Grècia)
- estudiar de la presència d'arsènic en algues procedents de la Costa Caribenya de Panamà
- estudiar la distribució d'arsènic i espècies d'arsènic en diferents parts de l'estructura de les algues brunes *Cystoseira mediterranea*, *Padina pavonica* i *Macrocystis pyrifera*
- estudiar l'impacte de l'arsènic, d'origen natural i antropogènic, en algues i plantes aquàtiques de la Conca del Riu Loa, Xile.
- contribuir al l'estudi del cicle biogeoquímic de l'arsènic en una zona amb activitat hidrotermal submarina, Santorí, Grècia

# CAPÍTOL 2

# Capítol 2
## METODOLOGIA ANALÍTICA

A continuació es descriurà la metodologia analítica emprada durant la present tesi.

## 2.1 Presa de mostra i descripció de les zones de mostreig

Les mostres estudiades durant el desenvolupament de la tesi provenen de diferents preses de mostra en els següents llocs: Costa Brava, costa Caribenya (Panamà), la Terra del Foc (Argentina), golf Termaic (Grècia), Santorí (Grècia) i conca del riu Loa (Xile). Donada la diversitat de les zones de mostreig, s'ha trobat convenient que al començament de cada estudi hi hagi la descripció corresponent. La Taula 6 recull informació sobre el tipus d'estudi, la taxonomia de les espècies estudiades, i el lloc i la data de mostreig. Els símbols que precedeixen els noms binomials de les mostres indiquen la divisió a la que pertanyen i es troben durant la tesi com a recordatori per al lector. La Figura 13 mostra la localització geogràfica del llocs de mostreig.

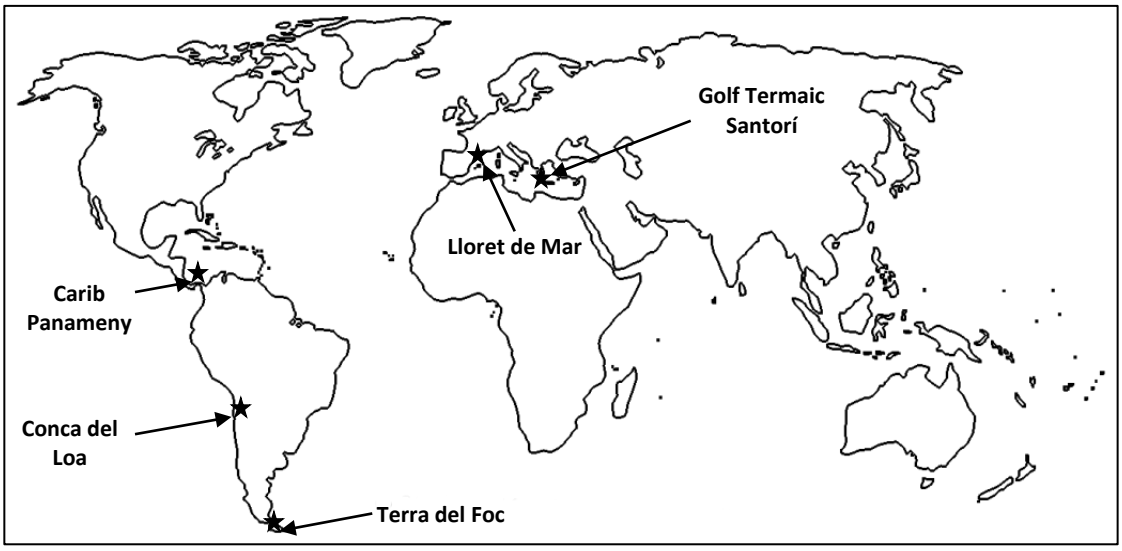



**Figura 13: Localització de les zones de presa de mostra.**

Taula 6: Tipus d'estudi, taxonomia, lloc i data de mostreig.

| Estudi | Nom binomial[A] | Divisió | Phyllum | Familia | Lloc de Mostreig[B] | Data de mostreig |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Golf Termaic** | ■ *Cystoseira barbata* | Alga bruna | Ochrophyta | Sargassaceae | Agia Triada (GR) | Desembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ■ *Cystoseira spinosa* | Alga bruna | Ochrophyta | Sargassaceae | Agia Triada (GR) | Setembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ■ *Padina pavonica* | Alga bruna | Ochrophyta | Dictyotaceae | Agia Triada (GR) | Juny 2007 |
| **Golf Termaic** | ■ *Padina pavonica* | Alga bruna | Ochrophyta | Dictyotaceae | Agia Triada (GR) | Setembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ▲ *Gracilaria* sp. | Alga roja | Rhodophyta | Gracilariaceae | Viamyl (GR) | Desembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ▲ *Gracilaria verrucosa* | Alga roja | Rhodophyta | Gracilariaceae | Kalohori (GR) | Desembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ▲ *Gracilaria verrucosa* | Alga roja | Rhodophyta | Gracilariaceae | Viamyl (GR) | Desembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ▲ *Gracilaria verrucosa* | Alga roja | Rhodophyta | Gracilariaceae | Viamyl (GR) | Juny 2007 |
| **Golf Termaic** | ▲ *Gracilaria verrucosa* | Alga roja | Rhodophyta | Gracilariaceae | Viamyl (GR) | Setembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ▲ *Gracilaria verrucosa* | Alga roja | Rhodophyta | Gracilariaceae | Kalohori (GR) | Setembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ▲ *Hypnea musciformis* | Alga roja | Rhodophyta | Cystocloniaceae | Agia Triada (GR) | Juny 2007 |
| **Golf Termaic** | ▲ *Hypnea musciformis* | Alga roja | Rhodophyta | Cystocloniaceae | Viamyl (GR) | Juny 2007 |
| **Golf Termaic** | ♦ *Codium fragile* | Alga verda | Chlorophyta | Codiaceae | Agia Triada (GR) | Juny 2007 |
| **Golf Termaic** | ♦ *Codium fragile* | Alga verda | Chlorophyta | Codiaceae | Viamyl (GR) | Juny 2007 |
| **Golf Termaic** | ♦ *Codium fragile* | Alga verda | Chlorophyta | Codiaceae | Viamyl (GR) | Desembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ♦ *Ulva intestinalis* | Alga verda | Chlorophyta | Ulvaceae | Agia Triada (GR) | Juny 2007 |
| **Golf Termaic** | ♦ *Ulva intestinalis* | Alga verda | Chlorophyta | Ulvaceae | Viamyl (GR) | Desembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ♦ *Ulva rigida* | Alga verda | Chlorophyta | Ulvaceae | Agia Triada (GR) | Setembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ♦ *Ulva rigida* | Alga verda | Chlorophyta | Ulvaceae | Kalohori (GR) | Setembre 2007 |
| **Golf Termaic** | ♦ *Ulva lactuca* | Alga verda | Chlorophyta | Ulvaceae | Viamyl (GR) | Desembre 2007 |
| **Morfologia i degradació** | ■ *Cystoseira mediterranea* | Alga bruna | Ochrophyta | Sargassaceae | Santa Cristina (GI) | Setembre 2010 |
| **Morfologia i degradació** | ■ *Padina pavonica* | Alga bruna | Ochrophyta | Dictyotaceae | Santa Cristina (GI) | Setembre 2010 |
| **Santorí** | | ● Fanerògama | Magnoliophyta | | Santorí (GR) | Octubre 2010 |
| **Santorí** | | ● Fanerògama | Magnoliophyta | | Santorí (GR) | Octubre 2010 |
| **Santorí** | | ● Fanerògama | Magnoliophyta | | Santorí (GR) | Octubre 2010 |
| **Santorí** | | ♦ Alga verda | Clorophyta | | Santorí (GR) | Octubre 2010 |
| **Santorí** | | ● Fanerògama | Magnoliophyta | | Santorí (GR) | Octubre 2010 |
| **Santorí** | | ● Fanerògama | Magnoliophyta | | Santorí (GR) | Octubre 2010 |
| **Santorí** | | | | | Santorí (GR) | Octubre 2010 |
| **Costa caribenya** | ■ *Sargassum* cf. *acinarum* | Alga bruna | Ochrophyta | Sargassaceae | Playa del Istmito (PA) | Abril 2011 |
| **Costa caribenya** | ■ *Sargassum* cf. *acinarum* | Alga bruna | Ochrophyta | Sargassaceae | Cayo Zapatilla (PA) | Abril 2011 |
| **Costa caribenya** | ■ *Sargassum* cf. *acinarum* | Alga bruna | Ochrophyta | Sargassaceae | Playa Sherman (PA) | Abril 2011 |
| **Costa caribenya** | ♦ *Udotea* cf. *flabellum* | Alga verda | Chlorophyta | Udoteaceae | Cayo Zapatilla (PA) | Abril 2011 |

| Estudi | Nom binomial[A] | Divisió | Phyllum | Familia | Lloc de Mostreig[B] | Data de mostreig |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Costa caribenya** | ♦ *Halimeda* cf. *incressata* | Alga verda | Chlorophyta | Halimedaceae | Cayo Zapatilla (PA) | Abril 2011 |
| **Costa caribenya** | ■ *Padina* cf. *santae-crucis* | Alga bruna | Ochrophyta | Dictyotaceae | Cayo Zapatilla (PA) | Abril 2011 |
| **Costa caribenya** | ● *Thalassia tertudinu* | Fanerògama | Magnoliophyta | Hydrocharitaceae | Playa del Istmito (PA) | Abril 2011 |
| **Costa caribenya** | ● *Thalassia tertudinum* | Fanerògama | Magnoliophyta | Hydrocharitaceae | Playa Sherman (PA) | Abril 2011 |
| **Costa caribenya** | ● *Thalassia tertudinum* | Fanerògama | Magnoliophyta | Hydrocharitaceae | Cayo Zapatilla (PA) | Abril 2011 |
| **Costa caribenya** | ♦ *Pencillus capitatus* | Alga verda | Chlorophyta | Udoteaceae | Cayo Zapatilla (PA) | Abril 2011 |
| **Processament de mostra** | ■ *Cystoseira mediterranea* | Alga bruna | Ochrophyta | Sargassaceae | Santa Cristina (GI) | Juny 2011 |
| **Morfologia i degradació** | ■ *Macrocystis pyrifera* | Alga bruna | Ochrophyta | Laminariaceae | Estancia Harberton (AR) | Novembre 2011 |
| **Morfologia i degradació** | ■ *Macrocystis pyrifera* | Alga bruna | Ochrophyta | Laminariaceae | Fin del Mundo (AR) | Novembre 2011 |
| **Riu Loa** | ● *Zannichellia palustris* | Fanerògama | Magnoliophyta | Zannichelliaceae | Loa-1 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | *Azolla* sp. | Falgueres | Pteridopsida | Azollaceae | Loa-1 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | ● *Myriophyllum aquaticum* | Fanerògama | Magnoliophyta | Haloragaceae | San Pedro-1 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | ● *Potamogeton pectinatu* | Fanerògama | Magnoliophyta | Potamogetonaceae | Toconce-1 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | ● *Ruppia filifolia* | Fanerògama | Magnoliophyta | Ruppiaceae | Toconce-1 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | ● *Phylloscirpus* cf. *deserticola* | Fanerògama | Magnoliophyta | Cyperaceae | Salado-1 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | ♦ *Cladophora* sp. | Alga verda | Chlorophyta | Cladophoraceae | Salado-1 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | ♦ *Chara* sp. | Alga verda | Charophyta | Characeae | Loa-2 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | ● *Potamogeton pectinatus* | Fanerògama | Magnoliophyta | Potamogetonaceae | Loa-3 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | ♦ *Cladophora* sp. | Alga verda | Chlorophyta | Cladophoraceae | San Salvador-1 (CL) | Juny 2010 |
| **Riu Loa** | ● *Potamogeton pectinatus* | Fanerògama | Magnoliophyta | Potamogetonaceae | Loa-4 (CL) | Juny 2010 |

[A] Símbols de la divisió de les algues: ■ bruna (ocròfits), ▲ roja (rodòfits), ◆ verda (cloròfits), ● fanerògames.
[B] Lloc de mostreig: Grècia (GR), Girona (GI), Panamà (PA), Argentina (AR), Xile (CL)

## 2.2 Pre-tractament de la mostra

Les mostres analitzades pertanyen al medi aquàtic, i per tant, tenen un contingut d'aigua elevat. Per a poder realitzar les anàlisis és recomanable seguir procediments d'assecatge. En termes generals, el procediment consta d'etapes de neteja, identificació taxonòmica, emmagatzematge, assecatge i polvorització. El pretractament de mostra ha anat variant entre els diferents estudis que s'engloben a la present tesi, pel que s'ha trobat convenient que al començament de cadascun hi hagi la descripció corresponent. *Grosso modo*, les mostres ambientals que s'han estudiat durant el treball experimental de la tesi s'han preparat seguint procediments similars que comprenen les etapes següents:

- Congelació: La mostra eixuta es conserva a baixa temperatura (-18°C) fins a poder realitzar la resta del pre-tractament. El període de congelació varia en funció de les condiciones en les quals s'ha dut a terme l'estudi: des d'unes poques hores fins a dos anys.
- Assecament: Per conveniència a l'hora de realitzar l'estudi, les mostres s'assequen amb diferents procediments segons l'objectiu de l'estudi i les condicions del mostreig. Els procediments seguits són: assecament en estufa a 40°C, liofilització, i assecament sota flux d'aire.
- Neteja: Les algues i plantes aquàtiques poden retenir sorra i certs epífits que viuen a la seva superfície, tots aquests elements s'han d'eliminar acuradament abans de molturar la mostra. La neteja, normalment, consisteix en un rentat amb aigua, en eliminar els materials adherits amb unes pinces amb l'ajuda d'una lupa binocular, i un esbandit final amb aigua doblement desionitzada.
- Mòlta: Les mostres s'han homogeneïtzat amb un morter de vidre o d'àgata segons la duresa d'aquestes. Quan la quantitat de mostra ha estat l'adequada, s'ha emprat molí de boles i anelles de carbur de tungstè en cicles breus (<10s).
- Conservació: Les mostres molturades es conserven en ampolles de poli-(tereftalat d'etilè) (PET) o de vidre ambre amb obturador, a temperatura ambient.

## 2.3 Instrumentació i aparells

*Universitat de Barcelona*

- Espectrofotòmetre de fluorescència atòmica AFS Millenium Excallibur (PSAnalytical, Regne Unit).
- Espectròmetre de masses LC/MSD TOF (Agilent, Alemanya) acoblat a sistema HPLC Agilent 1100
- Plasma induït per alta freqüència acoblat a espectrometria de masses ICP-MS Agilent 7500ce (Alemanya) amb cel·la de col·lisió, octopol i nebulitzador AriMist HP (Burgener, Canadà)
- Bomba quaternària de HPLC amb automostrejador i desgasificador Agilent 1200LC (Alemanya)
- Liofilitzador LyoQuest -80 (Telstar, Terrassa)
- Ultracongelador CVF 220/86 (VidraFoc, Barcelona)
- Congelador Economy GT3602 (Liebherr, Suïssa)
- Estufa Digiheat 52l (J.P. Selecta, Arbrera)
- Microones Milestone Ethos Touch Control (Itàlia)

*Universität Bremen, Alemanya*

- Plasma induït per alta freqüència acoblat a espectrometria de masses amb sector magnètic de doble enfocament ICP-SF-MS Element 2* (ThermoScientific, Alemanya)
- Plasma induït per alta freqüència acoblat a espectrometria de masses iCAP Q ICP-MS (Thermo, Alemanya) amb cel·la de col·lisió i anàlisi amb quadrupol iCAP
- Bomba quaternària de HPLC amb automostrejador i desgasificador Thermo (Alemanya)

*Universidad Católica del Norte, Chile*

- Espectrofotòmetre d'absorció atòmica amb injecció de flux AAS Aanalyst 700 i FIAS 400 (Perkin Elmer, EUA).

## 2.4 Reactius

Tots els reactius que s'han fet servir són de grau analític o d'alta puresa.

- Aigua doblement desionitzada (18,2 MΩ cm, Millipore Milli-Q Plus)

*Preparació de fases mòbils*

- Hidrogencarbonat amònic ($NH_4HCO_3$, Fluka, Biochemika
- Dihidrogenfosfat amònic ($NH_4H_2PO_4$, Panreac, p.a.)
- Amoníac (solució aquosa 30 % $NH_3$, Panreac, p.a.)
- Piridina ($C_5H_5N$, Sharlau, p.a.)
- Àcid fòrmic (98 % HCOOH, Panreac, p.a.)

*Digestió de mostres*

- Àcid nítric (69 % $HNO_3$, Panreac, Hiperpur)
- Àcid nítric (65 % $HNO_3$, Panreac, p.a.) per a neteja
- Peròxid d'hidrogen (31 % $H_2O_2$, Merk, Selectipur)

*Mesura amb HG-AFS*

- Àcid clorhídric (37 % HCl, Panreac, p.a.)
- Borohidrur sòdic ($NaBH_4$,Sigma Aldrich, purum, comprimits)
- Hidròxid sòdic (NaOH, Millipore, Emsure)
- Iodur potàssic (KI, Panreac, p.a.)
- Àcid ascòrbic ($C_6H_8O_6$, Panreac, p.a.)

## 2.5 Patrons i materials de referència

*Mesura d'arsènic total (ICP-MS)*

- As: Solució d'arsenat (1000 ± 2 mg As $l^{-1}$, *NIST,* High-Purity Standards)
- Patró intern: 20 µg $l^{-1}$ de $^{9}Be$, $^{103}Rh$ i $^{205}Tl$ a partir de solució estàndard de 1000 mg $l^{-1}$ (NIST, High-Purity Standards)

*Especiació d'arsènic. Concentració nominal: 1000 mg As $l^{-1}$.*

Les solucions patrons es preparen a base de compostos comercials i s'estandarditzen en front a la solució d'arsenat de concentració certificada (1000 ± 2 mg As $l^{-1}$, *NIST,* High-Purity Standards).

- As(III): arsenit a partir de $As_2O_3$ (NIST, EUA, Patró primari oxidimètric) dissolt amb 4 g NaOH $l^{-1}$.
- As(V): arsenat a partir de $Na_2H_2AsO_4 \cdot 7H_2O$ (Carlo Erba)
- MA: àcid metilarsònic a partir de $CH_3AsNaO(ONa) \cdot 6H_2O$ (Carlo Erba)
- DMA: àcid dimetilarsínic a partir de $(CH_3)_2AsNaO_2 \cdot 3H_2O$ (Fluka)
- AC: arsenocolina a partir de $(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OHBr^-$ (Service Central d'Analyse, CNRS Vernaison, França)
- TMAO: Òxid de trimetilarsina a patir de $(CH_3)_3AsO$ (Argus Chemicals srl).
- AB: BCR CRM 626 solució patró d'arsenobetaïna (concentració: 10,28 mg As $l^{-1}$)

*Materials de Referència*

- BCR CRM 279 Sea Lettuce (*Ulva lactuca*) del IRMM (3,09 ± 0,20 mg As $kg^{-1}$)
- NIES CRM 09 Sargasso (*Sargassum fulvellum*) (115 ± 9,2 mg As $kg^{-1}$)
- Extracte de *Fucus serratus* per a identificació d'arsenosucres: fosfat ($PO_4$-sug), sulfonat ($SO_3$-sug), sulfat ($SO_4$-sug) i glicerol (gly-sug)[132]. Donat pel Professor Kevin A. Francesconi de la Universitat de Graz (Austria).

## 2.6 Determinació d'arsènic total per tècniques espectroscòpiques

En la present tesi s'han emprat tècniques molt diferents per a la determinació d'arsènic total en les mostres. Totes elles són tècniques espectroscòpiques. Es disposa de diferents tècniques analítiques per a realitzar la mesura d'arsènic total. Els extractes i els productes de digestió de les mostres s'han analitzat mitjançant ICP-MS equipat amb cel·la de col·lisió, mentre que l'aigua de mar s'ha optat per realitzar la mesura per HG-AFS per evitar la interferència deguda al clorur.

### 2.6.1 MINERALITZACIÓ DE LA MOSTRA

La determinació d'arsènic total a nivell de traça amb les tècniques espectroscòpiques requereix d'una mostra en dissolució per poder realitzar la mesura;

per tant, és necessari obtenir una dissolució que contingui la totalitat de l'arsènic de la mostra. En la present tesi s'ha optat per la digestió àcida en recipient tancat assistida per microones. El programa de digestió emprat es va optimitzar per a mostres amb alt contingut de matèria orgànica. La mostra (50 – 200 mg) es digereix amb $HNO_3$ (69 %, 8 ml) i $H_2O_2$ (31 %, 2 ml) seguint el següent programa de temperatures: rampa de 10 min per assolir 90°C, 5 min a 90°C, rampa de 10 min per assolir 120°C, rampa de 10 min per assolir 190°C i 10 min a 190°C. Els productes de digestió es filtren a través d'un paper de filtre sense cendres (Whatman 40) i s'arrasen a 20 ml. Les mostres es conserven a 4°C fins la mesura d'arsènic.

### 2.6.2 MESURA D'ARSÈNIC TOTAL MITJANÇANT ICP-MS

La mesura dels extractes es realitza mitjançant ICP-MS. Les mostres es dilueixen amb $HNO_3$ (1 %) per tal que la seva concentració estigui dins de l'interval de treball (1 – 100 µg As $l^{-1}$) i la concentració de $HNO_3$ en mostres i patrons sigui del mateix ordre de magnitud. Durant la mesura es fa servir heli com a gas de col·lisió i, com a patró intern, una solució de $^{9}Be$, $^{103}Rh$ i $^{205}Tl$ (20 µg $l^{-1}$). La mesura es realitza per triplicat, en les condiciones indicades a la Taula 7.

**Taula 7: Condicions de treball per a la determinació d'arsènic total en aigua de mar per ICP-MS.**

| Paràmetre | |
|---|---|
| **Potència RF** | 1555 W |
| **Cabal de gas auxiliar (Ar)** | 0,32 l $min^{-1}$ |
| **Cabal de gas portador (Ar)** | 0,85 l $min^{-1}$ |
| **Nebulitzador** | Burgener Arimist HP |
| **Cel·la de col·lisió** | He |
| **Diferència potencial Quadrupol - Octupol** | 3 V |

### 2.6.3 MESURA D'ARSÈNIC TOTAL EN AIGUA DE MAR MITJANÇANT HG-AFS

La mesura de l'arsènic en aigua de mar es realitza amb HG-AFS i es quantifica pel mètode d'addicions estàndard. S'escull aquesta tècnica ja que l'aigua de mar té un contingut elevat de clorur i el ICP-MS és susceptible a la interferència isobàrica entre el $^{75}As$ i el $^{40}Ar^{35}Cl$. Prèviament a la mesura, es realitza un procés de pre-reducció de l'arsènic de la mostra i dels patrons amb KI (1 %) i àcid ascòrbic (0,2 %) en medi àcid (HCl 2M) per garantir que l'hidrur que es forma prové en la seva totalitat del l'arsènic, reduït prèviament a As(III) i, d'aquesta manera, augmentar el senyal en el detector. El procediment es detalla a continuació: 19 ml de mostra es porten a un volum de 25 ml amb una solució de KI, àcid ascòrbic i HCl en la concentració adequada per a que la

mescla final contingui KI al 1 %, àcid ascòrbic al 0,2 % i HCl 2M. La solució resultant es manté a temperatura ambient durant una hora per assegurar que la reacció sigui quantitativa. La mesura es realitza per triplicat, en les condiciones indicades a la Taula 8.

**Taula 8: Condicions de treball per a la determinació d'arsènic total en aigua de mar per HG-AFS.**

| **Generació d'hidrurs** | **Cabal (ml min$^{-1}$)** |
|---|---|
| **HCl 2M** | 8 |
| **$NaBH_4$ 1,5% en NaOH 0,4%** | 4 |
| **Mostra i patrons** | 4 |
| **Cabal d'argó** | 300 |
| **Cabal de nitrogen** | 2500 |
| **Programa d'injecció** | **Temps (s)** |
| **Període de retard** | 10 |
| **Període d'anàlisi** | 30 |
| **Període de memòria** | 40 |
| **Detector de fluorescència atòmica** | |
| **Longitud d'ona** | 193,7 nm |
| **Intensitat primària** | 27,5 mA |
| **Intensitat de *boost*** | 35 mA |

## 2.7 Especiació analítica d'arsènic

El procés d'especiació comprèn les etapes d'extracció de les espècies, la seva separació i mesura.

### 2.7.1 EXTRACCIÓ DE LES ESPÈCIES D'ARSÈNIC

La diversitat d'espècies d'arsènic fa difícil trobar un mètode que permeti extreure-les totes sense que les alteri. És crucial evitar la interconversió i la degradació de les mateixes. El procediment escollit en la present tesi és l'extracció amb aigua i agitació mecànica ja que la majoria de compostos característics de les algues són polars. Així mateix, cal recordar que els compostos no extraïbles amb aigua inclouen els arsenolípids i compostos units a les estructures cel·lulars.

### 2.7.2 SEPARACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE LES ESPÈCIES D'ARSÈNIC PER TÈCNIQUES ACOBLADES

La separació de les espècies d'arsènic s'ha dut a terme mitjançant cromatografia de bescanvi iònic. Tanmateix, cal dos sistemes de bescanvi diferent, un per a espècies aniòniques i un altre per a catiòniques. A la Taula 9 es poden veure les fases mòbils, columnes i espècies que és capaç de separar cada sistema. La quantificació directa de l'As(III) no és possible ja que coelueix amb el front de cations, per tant la seva

concentració es calcula com la diferència entre la concentració del front de cations i la concentració de les espècies catiòniques quantificades mitjançant bescanvi catiònic.

**Taula 9: Condicions cromatogràfiques emprades en l'especiació d'arsènic**

| | Bescanvi aniònic | Bescanvi catiònic |
|---|---|---|
| **Columna** | PRP-X100<br>(250 mm x 4,1 mm, 10 µm)<br>(Hamilton, Reno, EUA) | Zorbax SCX300<br>(250 mm x 4,6 mm, 5 µm)<br>(Agilent, Waldbronn, Alemanya) |
| **Precolumna** | PRP-X100<br>(20 mm x 2,0 mm, 10 µm) | Zorbax SCX300<br>(12.5 mm x 4,6 mm, 5 µm) |
| **Fase mòbil** | $NH_4H_2PO_4$ 20 mM pH 5,8 | $C_5H_6N^+COO^-$ 20 mM pH 2,6 |
| **Volum d'injecció** | 20 – 50 µl | 20 – 50 µl |
| **Cabal** | 1,5 ml $min^{-1}$ | 1,5 ml $min^{-1}$ |
| **Temperatura** | Ambient | Ambient |
| **Espècies As** | As(III), DMA, MA, As(V)<br>$PO_4$-sug, $SO_3$-sug i $SO_4$-sug | AB, TMAO, AC i gly-sug |

La combinació de la cromatografia de líquids (LC) amb ICP-MS permet mesurar de forma contínua, amb una bona sensibilitat i amb una resposta independent del compost. D'aquesta manera, la combinació LC-ICP-MS és la tècnica més adient per treballar amb mostres del medi marí ja que podem treballar amb espècies que no generen hidrur volàtil o de les quals no es disposa patró (arsenosucres). A més, gairebé no presenta interferències de matriu. És per aquest motiu que LC-ICP-MS s'ha emprat com a tècnica d'especiació en la present tesi. El sistema cromatogràfic havia estat desenvolupat pel grup de recerca en estudis anteriors.[136] Per a avaluar la possible interferència isobàrica $^{40}Ar^{35}Cl$ sobre $^{75}As$ es va monitorar la m/z 77 corresponent a $^{40}As^{37}Cl$. També s'ha fet servir un ICP-SF-MS en mode HRMS per evitar interferències de $^{40}Ar^{35}Cl$, ja que en aquest mode és possible diferenciar-lo del $^{75}As$.

Per a poder acoblar la cromatografia líquida a l'espectròmetre de masses cal una interfase que ionitzi la mostra, normalment electroesprai en mode positiu o negatiu, segons correspongui, que requereix d'una fase mòbil volàtil ($NH_4HCO_3$, NaOH, $NH_4NO_3$). En la present tesi, s'ha emprat un espectròmetre de masses amb analitzador de temps de vol (TOF). Per a establir les condicions cromatogràfiques s'ha emprat detecció de fluorescència atòmica amb interfase de generació d'hidrurs.

*Test per a descartar la presència de tio-arsenosucres*

Els tio-arsenosucres presenten una retenció molt elevada en la columna de bescanvi aniònic i cal una fase mòbil amb un poder d'elució més elevat que la de $NH_4H_2PO_4$ (20 mM, pH 5,8) per eluir-los en un temps raonable; tanmateix aquesta fase mòbil no

permet separar correctament els altres compostos aniònics. El test que es realitza per comprovar la presència dels tio-arsenosucres es basa en la seva capacitat d'oxidació elevada.[141] A 500 µl de extracte fresc de l'alga (acabat de preparar) s'hi afegeixen 5 µl de $H_2O_2$ (31 %), d'aquesta manera el enllaç S=As s'oxida a O=As, el que faria augmentar la quantitat d'oxo-arsenosucres a l'extracte fresc no oxidat. Aquest test només permet comprovar la no presència de tio-arsenosucres, i en cas de ser positiu cal realitzar la cromatografia adient per a separar-los i identificar-los (Columna: Hamilton PRP-X100 10 cm x 4,1 µm, 5 µm; Fase mòbil: $NH_4HCO_3$, 20 mM, pH 10,3, MeOH 3%).

## 2.8 Paràmetres de Control de Qualitat

Els instruments de mesura i els aparells utilitzats al llarg de l'estudi es troben en laboratoris dins d'un sistema de qualitat, i per tant estan sotmesos als calibratges i el manteniment corresponents.

La qualitat dels resultats es va avaluar en cadascun dels estudis segons els paràmetres següents:

### 2.8.1 EXACTITUD

S'han fet servir els materials de referència BCR 279 Sea lettuce (*Ulva lactuca*) i el NIES nº9 (Sargasso) per comprovar l'exactitud de la determinació d'arsènic total, els valors certificats dels qual són 3,09 ± 0,20 mg As $kg^{-1}$ i 115 ± 9,2 mg As $kg^{-1}$, respectivament. Malgrat que les espècies d'arsènic no estan certificades al CRM BCR 279, s'han emprat extractes aquosos d'aquest per a avaluar l'exactitud de l'especiació tot comparant els resultats obtinguts amb els valors trobats a la bibliografia.

### 2.8.2 PRECISIÓ

La precisió es va avaluar mitjançant el coeficient de variació entre tres replicats de cada preparació de mostra. Les mesures d'anàlisi d'arsènic total es van realitzar per triplicat.

### 2.8.3 EFICIÈNCIA D'EXTRACCIÓ

L'eficiència d'extracció es calcula com la relació entre l'arsènic total present a l'extracte respecte a l'arsènic total present als productes de digestió de les mostres. Aquest paràmetre avalua la quantitat d'arsènic hidrosoluble a la mostra i, per tant, la fracció d'aquest que és susceptible de ser quantificada.

### 2.8.4 RECUPERACIÓ DE COLUMNA

La recuperació de columna es calcula com la relació entre la suma d'espècies quantificades respecte a concentració d'arsènic a l'extracte. Aquest paràmetre permet comprovar si es quantifiquen tots els compostos extrets.

### 2.8.5 IDENTIFICACIÓ DELS ARSENOSUCRES

Un extracte de l'alga bruna *Fucus serratus* es va fer servir per a la identificació dels arsenosucres. Aquest extracte, que es va preparar amb aquesta finalitat[132] i àmpliament analitzat per la comunitat científica, es fa servir per a avaluar la quantificació d'aquests compostos en LC-ICP-MS en comparar els valors obtinguts en cada estudi amb la publicació original i altres valors donats a la bibliografia.[66,133–136]

### 2.8.6 LÍMIT DE DETECCIÓ I LÍMIT DE QUANTIFICACIÓ

Es defineix el límit de detecció d'un compost com aquella concentració a partir de la qual el seu senyal és tres cops superior a la del senyal de fons. Es considera que un compost és quantificable quan la relació entre el senyal del pic i el fons és igual o superior a 10.

Per estimar aquest límits, es va calcular la desviació del senyal durant el primer minut de cromatograma i aquest valor es va multiplicar per 3 i 10, respectivament, i es va interpolar a la recta de calibratge construïda amb les alçades de pic de cadascun del compostos. La concentració obtinguda és la que es dóna com a límit.

En el cas de la determinació d'arsènic total, es va calcular la desviació de mesures del blanc (> 18) i aquest valor es va multiplicar per 3 i 10, respectivament, i es va interpolar a la recta de calibratge. La concentració obtinguda és la que es dóna com a límit. Els valors obtinguts es van comprovar experimentalment.

# CAPÍTOL 3

# Capítol 3
## ESTUDIS METODOLÒGICS

En aquest capítol es recullen els resultats per tal d'investigar els efectes del tractament de la mostra en l'especiació. També es va posar a punt un mètode cromatogràfic compatible amb ESI-MSD-TOF i un procediment que permet l'obtenció d'extractes d'algues que contenen arsenosucres, per a fer-los servir com a referència a les anàlisis. Així mateix, es va col·laborar amb la preparació d'un material de referència d'algues per a l'especiació d'arsènic en aquesta matriu.

## 3.1 Efectes del processament i l'emmagatzematge sobre l'especiació d'arsènic en mostres de *Cystoseira mediterranea*

La preparació de la mostra i el seu pretractament és un punt que genera controvèrsia ja que són unes etapes crucials sobre les quals es basa la resta de l'anàlisi. Els estudis que es poden trobar a la bibliografia presenten una gran varietat de mètodes de pretractament, emmagatzematge i extracció de les espècies d'arsènic. La majoria d'aquests procediments es poden trobar recollits en la revisió bibliografia feta per Rubio, *et al.*[103] que il·lustra la dispersió de mètodes que es fan servir durant les etapes prèvies a l'anàlisi.

Les mostres que s'han analitzat a la present tesi tenen un origen molt divers, i tant les dificultats del mostreig com l'equipament disponible ha implicat la necessitat de fer servir mètodes diferents entre estudis. Amb la finalitat d'estudiar la influència dels mètodes de processament i d'emmagatzematge es va proposar un estudi comparatiu dels efectes que aquestes etapes prèvies puguin tenir.

### 3.1.1 DESCRIPCIÓ DE LA ZONA DE MOSTREIG: COSTA BRAVA

El paratge de Santa Cristina es troba al terme municipal de Lloret de Mar (Figura 14) prop del límit amb el Pla d'Espais d'Interès Natural (PEIN) del Paratge de Pinya de Rosa (Blanes). El paratge comprèn els territoris gestionats per l'Obreria de Santa Cristina i les platges de Santa Cristina i Treumal. El cor del paratge és el santuari de Santa Cristina, patrona de Lloret de Mar, i seu de la festa major d'estiu. La platja de Santa Cristina compta amb el distintiu "Bandera Blava" i "Q de Qualitat". Val a dir que

les platges de Lloret de Mar són pioneres en la integració de sistemes de qualitat mediambiental (ISO 14001).

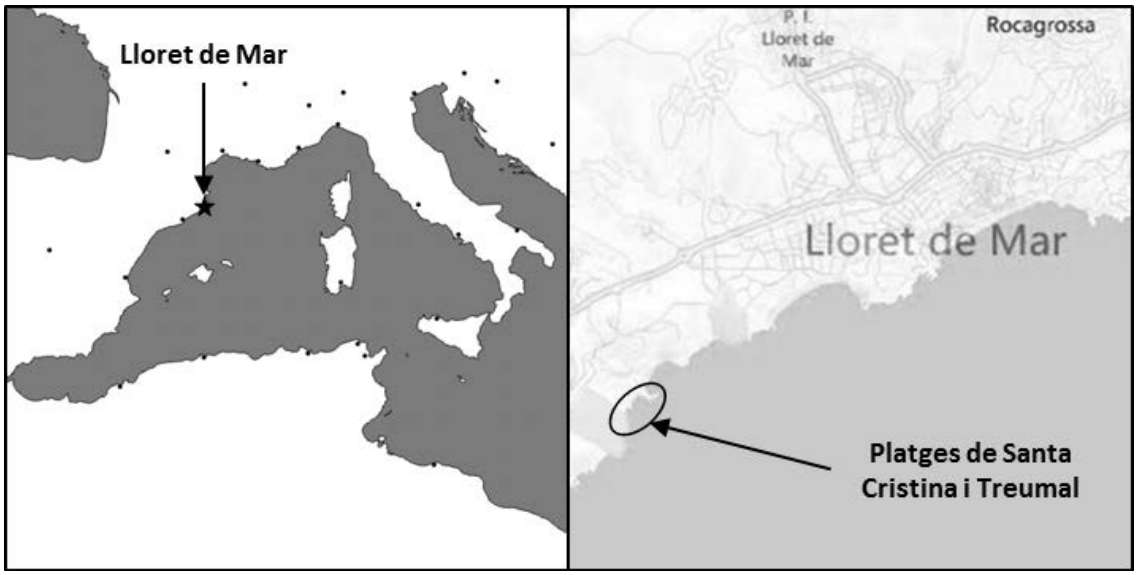



Figura 14: Zona de mostreig a Lloret de Mar

El 18 de juliol de 2011 es va realitzar el mostreig a les roques que separen les platges de Santa Cristina i Treumal, i es van recollir uns 2 kg de branques de *C. mediterranea* respectant les morfologies perennes capaces de regenerar l'alga en la seva totalitat (disc de fixació i estípit). També es va recollir aigua de mar en flascons de PET de 1 l de capacitat. Les mostres es van dur al laboratori on el mateix dia es van fraccionar en cinc submostres: una es va tractar immediatament, dues es van congelar a -18ºC i dues a -80ºC. Independentment del mètode de conservació, el tractament consistí en una neteja amb aigua de mar, eliminació d'epífits amb pinces metàl·liques i esbandit amb aigua doblement desionitzada. Cada submostra es va tornar a dividir en cinc i va seguir els processos següents (esquema a la Figura 15):

- Tallat amb un ganivet d'acer inoxidable i extracció immediata de les espècies d'arsènic.
- Molturació sota $N_2$(l) i extracció immediata.
- Assecatge sota flux d'aire a temperatura ambient; molturació en morter d'àgata; conservació a temperatura ambient en recipients de vidre amb obturador, i extracció el dia anterior a l'anàlisi.
- Assecatge en estufa a 40°C; molturació en morter d'àgata; conservació a temperatura ambient en recipients de vidre amb obturador, i extracció el dia anterior a l'anàlisi.

- Liofilització; molturació en morter d'àgata; conservació a temperatura ambient en recipients de vidre amb obturador, i extracció el dia anterior a l'anàlisi.

Aquest plantejament experimental condueix a 25 tractaments de mostra en total. Les mostres resultants es van analitzar per triplicat, essent així el nombre total de mesures per a arsènic total i per a espècies de 75.

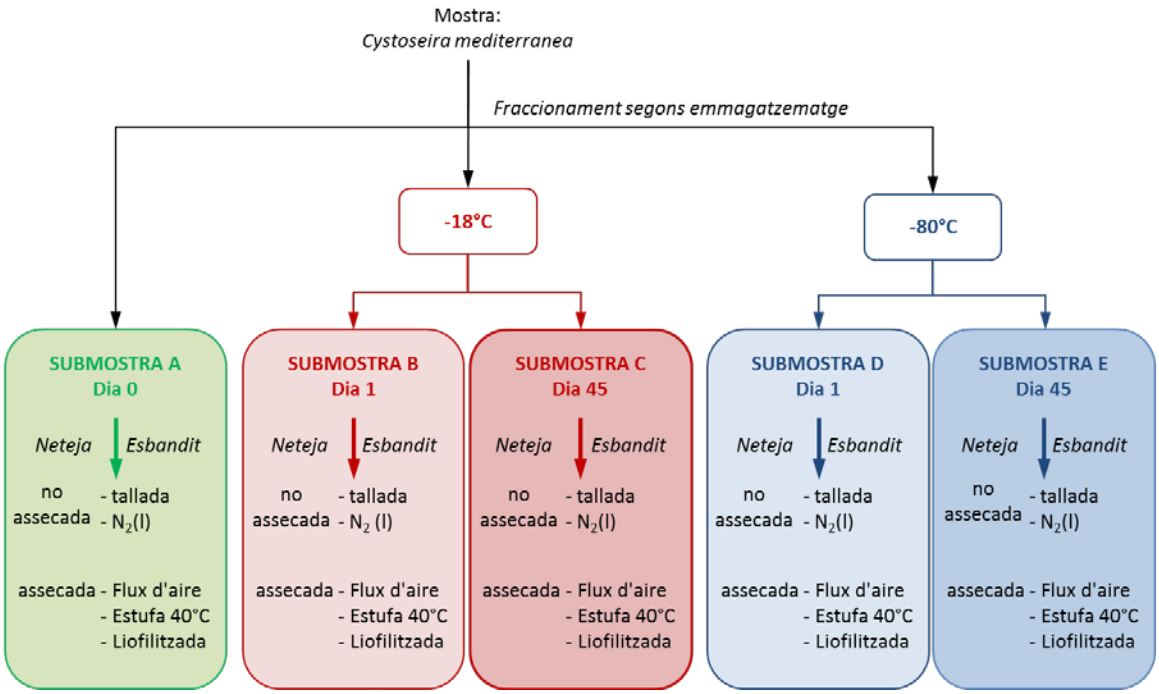



**Figura 15: Esquema dels processaments aplicats a la mostra a diferents temperatures de congelació i temps d'emmagatzematge.**

### 3.1.2 Resultats

*Aigua de mar*

La concentració en l'aigua de mar és de 1,4 ± 0,2 µg As $l^{-1}$, valor que es troba dins de l'interval que normalment es dóna per la mar Mediterrània (1,1-1,9 µg $l^{-1}$).[85,142,143]

*Cystoseira mediterranea*

Tots els resultats es donen en pes sec i es recullen a la Taula 10 (pàgina 50). La humitat es va estimar com la pèrdua de pes a 105±5°C fins a pes constant. El valors mitjos d'arsènic total oscil·len entre 76 mg As $kg^{-1}$ i 163 mg As $kg^{-1}$. Es va construir un histograma considerant tots els resultats individuals (Figura 16) per fer una primera anàlisi de les dades. Com es pot veure es distingeixen clarament dues poblacions: les mostres no congelades, amb valor mig de 150 mg As $kg^{-1}$, i les congelades, amb valor

mig de 92 mg As $kg^{-1}$. La distribució de les mostres congelades no es veu afectada per la temperatura de congelació (-18°C i -80°C).

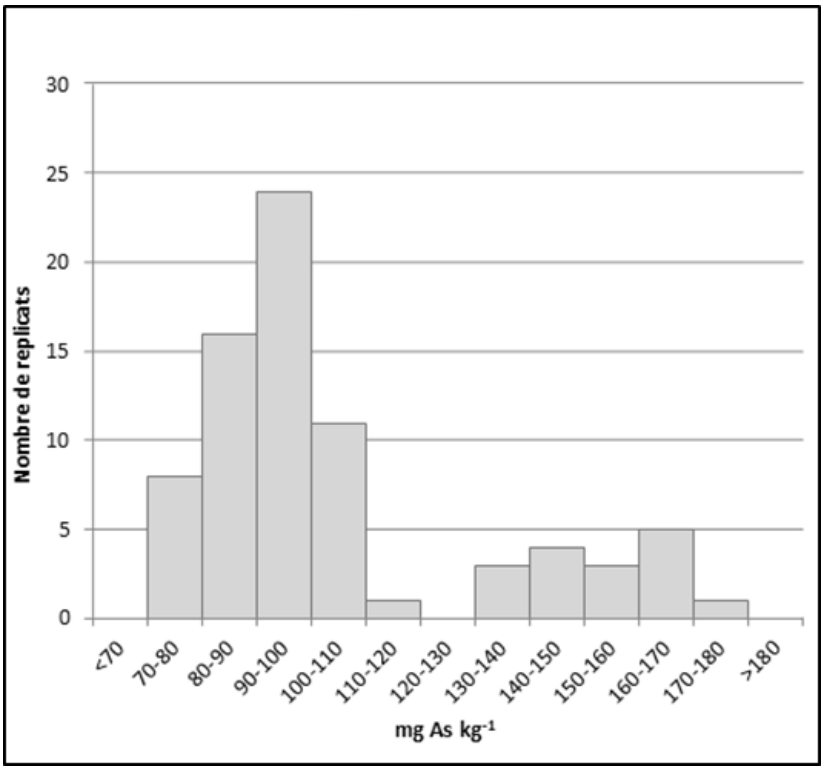



**Figura 16: Distribució d'arsènic total de tots els valors individuals obtingut en fer els replicats amb pretractaments de mostra diferents.**

Una ANOVA de dos factors (congelació i tipus de processament) aplicada a les dades va revelar que ambdós factors són significatius ($\alpha$=0,05). Seguidament, es va aplicar una anàlisi post-hoc (DHS Turkey, $\alpha$=0,05) que va agrupar en dos blocs els tipus de processament. D'una banda, les mostres assecades a 40°C, amb valor mig de 110 mg As $kg^{-1}$, i les assecades a l'aire, amb valor mig de 113 mg As $kg^{-1}$; de l'altra, les mostres no assecades (T, N) i les liofilitzades amb valors migs de 94 (N) i 100 (T i L) mg As $kg^{-1}$.

Respecte l'especiació, l'eficiència d'extracció varia entre el 89,5 % i el 105,9 %, menys per la mostra no congelada i tallada que presenta una eficiència del 57,0 % (Taula 10). Totes les submostres tenen As(V), $SO_3$-sug i gly-sug en la mateixa proporció en relació a la suma d'espècies (Figura 17).

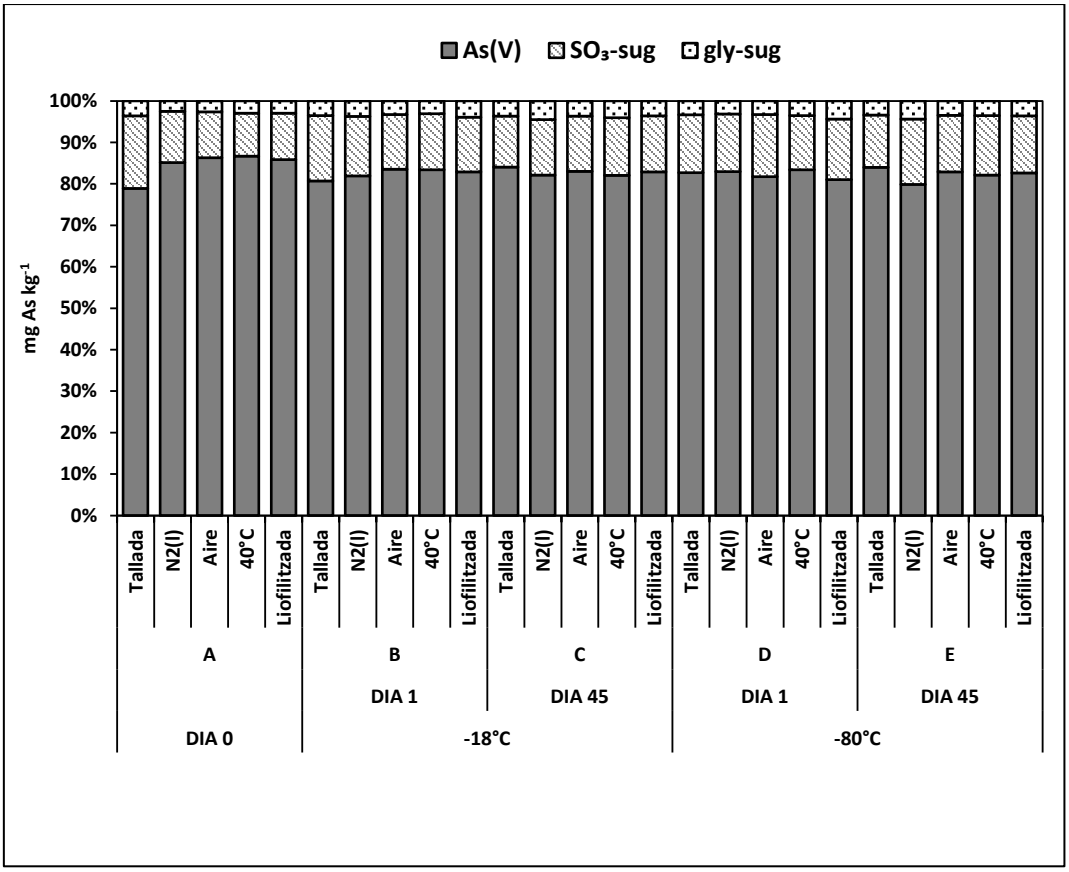



**Figura 17: Percentatge de compostos d'arsènic en una mostra de *C. mediterranea* sotmesa a diferents processaments.**

A tall d'exemple, els cromatogrames de la submostra A processada amb $N_2$(l) es mostren a la Figura 18. Es pot veure un pic que elueix entre la AB i el gly-sug, que no es pot atribuir a la AB (Figura 18b). Aquest pic és més marcat en extractes que porten més temps preparats, per tant es podria atribuir a algun producte de degradació d'algun compost d'arsènic.

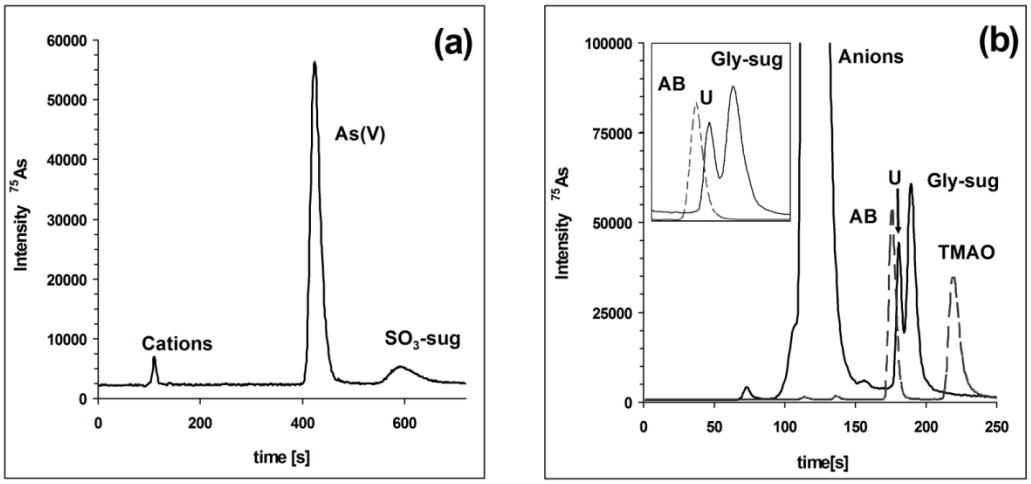



**Figura 18: Cromatogrames amb columnes de bescanvi aniònic (a) i catiònic (b) de la mostra no congelada i molturada en presència de $N_2$(l)**

**Taula 10: Resultats d'arsènic total i espècies d'arsènic per als diferents tractaments (en mg As $kg^{-1}$, mitjana ± desviació estàndard, n=3, resultats expressats en pes sec). També es presenta l'eficiència d'extracció, la recuperació de columna, i els límits de detecció i quantificació.**

| | Submostra | Emmagatzematge | Processament[a] | Total As | As(V) | $SO_3$-sug | gly-sug | Ef. Extracció | Rec. Columna |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DIA 0 | A | - | T | 140 ± 10 | 47 ± 3 | 11 ± 1 | 2,16 ± 0,08 | 57 % ± 8 % | 78 % ± 15 % |
| | | | N | 150 ± 20 | 105 ± 2 | 15,3 ± 0,6 | 3,1 ± 0,2 | 97 % ± 14 % | 87 % ± 15 % |
| | | | A | 163 ± 2 | 110 ± 10 | 14,1 ± 0,8 | 3,37 ± 0,07 | 94 % ± 6 % | 83 % ± 2 % |
| | | | E | 160 ± 10 | 112 ± 4 | 13,5 ± 0,4 | 3,8 ± 0,2 | 97 % ± 6 % | 82 % ± 2 % |
| | | | L | 140 ± 3 | 101 ± 4 | 13,2 ± 0,3 | 3,5 ± 0,2 | 104 % ± 4 % | 81 % ± 2 % |
| DIA 1 | B | -18°C | T | 82 ± 5 | 53 ± 3 | 10,4 ± 0,6 | 2,3 ± 0,2 | 91 % ± 10 % | 90 % ± 9 % |
| | | | N | 83 ± 5 | 52,3 ± 0,5 | 9,18 ± 0,05 | 2,36 ± 0,02 | 97 % ± 12 % | 80 % ± 3 % |
| | | | A | 101 ± 5 | 67 ± 2 | 10,5 ± 1 | 2,6 ± 0,1 | 99 % ± 1 % | 80 % ± 4 % |
| | | | E | 103 ± 3 | 65 ± 6 | 10,5 ± 0,7 | 2,4 ± 0,1 | 94 % ± 8 % | 80 % ± 2 % |
| | | | L | 97 ± 5 | 64,75 ± 0,01 | 10,3 ± 0,4 | 3,05 ± 0,08 | 102 % ± 4 % | 79 % ± 1 % |
| | C | -80°C | T | 100 ± 10 | 61 ± 0.3 | 10,3 ± 0,8 | 2,47 ± 0,09 | 90 % ± 11 % | 82 % ± 3 % |
| | | | N | 85 ± 1 | 65 ± 4 | 11 ± 0,3 | 2,5 ± 0,1 | 104 % ± 12 % | 89 % ± 3 % |
| | | | A | 100 ± 2 | 61 ± 2 | 11,2 ± 0,3 | 2,45 ± 0,01 | 92 % ± 4 % | 82 % ± 3 % |
| | | | E | 105,2 ± 0,4 | 67,1 ± 0,7 | 10,5 ± 0,5 | 2,9 ± 0,1 | 92 % ± 5 % | 83 % ± 4 % |
| | | | L | 91 ± 1 | 55 ± 2 | 9,9 ± 0,1 | 3 ± 0,2 | 96 % ± 1 % | 77 % ± 2 % |
| DIA 45 | D | -18°C | T | 89 ± 6 | 66 ± 3 | 9,7 ± 0,6 | 2,9 ± 0,2 | 99 % ± 4 % | 91 % ± 1 % |
| | | | N | 79 ± 3 | 54,6 ± 0,5 | 8,9 ± 0,1 | 3 ± 0,2 | 96 % ± 3 % | 88 % ± 3 % |
| | | | A | 95,8 ± 0,5 | 58 ± 1 | 9,3 ± 0,3 | 2,6 ± 0,2 | 90 % ± 1 % | 81 % ± 1 % |
| | | | E | 93,6 ± 0,5 | 59 ± 1 | 10 ± 0,1 | 2,9 ± 0,1 | 93 % ± 4 % | 82 % ± 4 % |
| | | | L | 84 ± 8 | 57 ± 1 | 9,3 ± 0,6 | 2,47 ± 0,08 | 95 % ± 10 % | 86 % ± 2 % |
| | E | -80°C | T | 94 ± 10 | 77 ± 3 | 11,6 ± 0,6 | 3,1 ± 0,3 | 106 % ± 11 % | 93 % ± 1 % |
| | | | N | 76 ± 4 | 50 ± 1 | 10 ± 0,6 | 2,7 ± 0,1 | 91 % ± 3 % | 91 % ± 1 % |
| | | | A | 94 ± 5 | 63,8 ± 0,4 | 10,5 ± 0,5 | 2,68 ± 0,03 | 99 % ± 6 % | 83 % ± 2 % |
| | | | E | 101 ± 7 | 65 ± 1 | 11,3 ± 0,3 | 2,8 ± 0,1 | 93 % ± 6 % | 84 % ± 3 % |
| | | | L | 90 ± 2 | 62 ± 1 | 10,4 ± 0,5 | 2,73 ± 0,04 | 99 % ± 1 % | 85 % ± 3 % |
| **Límit de detecció** | | | | 0,003 | 0,08 | 0,41 | 0,016 | | |
| **Límit de quantificació** | | | | 0,01 | 0,22 | 1,36 | 0,05 | | |

[a] Es fan servir les següents abreviacions: T(no assecada i tallada), N (no assecada i molturada amb $N_2$(l)), A (assecada sota flux d'aire), E (assecada en estufa a 40°C) i L (liofilitzada).

*Paràmetres de control de qualitat del resultats.*

S'han avaluat els paràmetres de qualitat que s'han exposat al Capítol 2 (pàg. 43)

*Recuperació de Columna*

La recuperació de columna es troba entre el 77,3 % i el 92,9 % (Taula 10), uns valors elevats que indiquen que la majoria dels compostos presents a la mostra s'han quantificat.

*Exactitud*

En aquest estudi es va fer servir el CRM BCR 279 Sea lettuce (*Ulva lactuca*) per comprovar l'exactitud de la mesura d'arsènic total. El resultat obtingut (2,9 ± 0,3 mg As $kg^{-1}$) es troba dins de l'interval del valor certificat (3,09 ± 0,20 mg As $kg^{-1}$).[144] Els valors obtinguts per a la seva especiació es recullen en la Table 37 (Capítol 5, pàgina 130) juntament amb valors trobats a la bibliografia.

*Identificació dels arsenosucres*

L'extracte de l'alga bruna *F. serratus* es va fer servir per a la identificació dels arsenosucres. Es va dur a terme la quantificació de les espècies d'arsènic i els resultats obtingut així com valors trobats a la bibliografia es troben a la Taula 38 (Capítol 5, pàgina 131).

*Límit de detecció i límit de quantificació*

El van estimar els límits de detecció i quantificació per a les espècies analitzades i es recullen a la Taula 10.

### 3.1.3 Discussió

L'arsènic total a les branques de *C. mediterranea* és de 150 ± 10 (n=15) mg As $kg^{-1}$. Aquest valor correspon a la mitjana de 15 replicats de la submostra A que inclou els cinc sistemes de processament. Aquests sistemes es van iniciar poques hores després del mostreig. Es considera que el valor mig indicat es pot prendre com valor de referència en aquest estudi. El contingut d'arsènic en totes les mostres congelades és aproximadament un 40 % inferior al de les mostres no congelades. Si considerem els mètodes de processament, cal remarcar que la humitat és un factor clau i petites

diferències en aquesta estimació poden generar àmplies variacions en el valor corregit per pes sec.

L'interval d'eficàcies d'extracció comprèn del 57 % al 106 % i són valors més alts que el que es troben a la literatura per a algues [103], el que indica que la major part de l'arsènic de la *C. mediterranea* es troba en espècies solubles en aigua; per tant, es conclou que l'aigua és un bon extractant per aquesta macroalga. Tanmateix, el baix rendiment d'extracció de la mostra fresca tallada, que es pot atribuir a la presència d'estructures cel·lulars no trencades que tenen la capacitat de retenir l'arsènic.[145]

La diferència de contingut d'arsènic en mostres congelades i no congelades indica que el fet que s'empri és un factor clau. Postulem que les estructures de l'alga es podrien haver trencat durant el procés i els compostos d'arsènic s'haurien perdut amb l'aigua del gebre. Això concordaria amb els resultats de Le, *et al.*[145] en un estudi sobre els efectes de la congelació en mostres. Els autors van observar pèrdues d'entre el 3 % i el 40 % en mostres descongelades. El mateix estudi demostra que les pèrdues d'arsènic afectaven a totes les espècies per igual. Aquests comportament s'observa en totes les mostres analitzades en aquesta tesi.

Cada processament té els seus punts forts i les seves mancances; és per això que l'elecció del mètode depèn del tipus de mostra que es vol processar, la quantitat de mostra, la disponibilitat d'equipament, el període d'emmagatzematge, entre altres factors. Els mètodes que no assequen la mostra són molt exigents pel que fa a la conservació de mostra, ja que requereix un mínim temps de transport al laboratori. A més, les mostres fresques no es poden conservar durant períodes llargs sense malmetre l'alga, produir variació en les espècies d'arsènic, i com s'ha descrit, la congelació provoca pèrdues importants d'arsènic. Amb aquestes premisses, les metodologies més adients per a estudis d'especiació són les d'assecatge. L'assecatge per flux d'aire és un mètode simple que requereix d'un equipament senzill, però les mostres assecades d'aquesta manera resulten difícils de polvoritzar. És un mètode adient quan les mostres no es poden transportar a un laboratori ja que permet l'assecament *in situ*, tot i que la neteja també ha de ser *in situ*. La liofilització i l'assecatge en estufa a 40°C faciliten la molturació de la mostra, tot i que alguns autors han detectat interconversió i pèrdua selectiva d'alguna espècie d'arsènic,[146] no s'han observat aquests efectes al llarg del present estudi.

La congelació no és un mètode adient per a emmagatzemar mostres ja que pot provocar pèrdues d'arsènic en l'etapa de descongelació. Aquestes pèrdues no s'observen en mètodes d'assecatge.

Els mètodes més adequats són els d'assecatge, d'entre els quals es recomana la liofilització. Tot i que aquest processament requereix dels equipaments apropiats, facilita enormement la polvorització de la mostra, que és un pas clau per assegurar-ne la representativitat. L'assecatge sota flux d'aire a temperatura ambient es recomana en preses de mostra en localitzacions remotes.

## 3.2 Adaptació del sistema cromatogràfic a l'acoblament LC-TOF-MS

Una de les principals carències del ICP-MS és la nul·la informació estructural que dóna. Per tant, la identificació dels compostos es limita a la comparació dels temps de retenció dels compostos amb els patrons corresponents o, alternativament, a la comparació amb una mostra on els compostos d'interès s'hagin identificat amb antelació. L'aplicació de l'espectrometria de masses molecular ens permet obtenir la informació estructural, tot i que presenta una menor sensibilitat.

Un dels punts crucials per a l'adaptació del sistema cromatogràfic és l'ús d'una fase mòbil compatible amb el detector. La volatilitat del $NH_4H_2PO_4$ no és massa elevada i, per això, es recomana la seva substitució per un altre electròlit. A tall d'exemple, dos estudis trobats a la bibliografia amb detecció d'espectrometria de masses, es decanten per una fase mòbil de $NH_4HCO_3$: 20 mM, amb mode iscocràtic, pH 9 [147] i gradient 0,5-50 mM, MeOH 1 %, pH 8,5.[130]

### 3.2.1 Disseny del mètode

Per a poder aconseguir una bona resolució dels compostos d'arsènic cal optimitzar la concentració i el pH de la fase mòbil.

*Separació de As(III), DMA, MA i As(V)*

El primer pas de l'optimització se centra en obtenir una elució diferenciada dels compostos As(III), DMA, MA i As(V), que són els quatre compostos dels quals se'n disposa patró. Les proves es realitzen amb detecció de HG-AFS. Durant la primera etapa es treballa en mode isocràtic; s'assaja amb diferents fases mòbils de pH entre 8 i 10, i

concentració entre 10 mM i 40 mM. A continuació, es fan proves introduint l'elució en gradient i la presència de metanol com a modificador orgànic.

*Separació d'arsenosucres, As(III), DMA, MA i As(V)*

Els millors resultats obtinguts en l'etapa anterior es proven amb mostres que contenen arsenosucres per tal de veure si la separació és correcta. El detector que es fa servir en aquesta etapa és el ICP-MS, ja que és una tècnica més adient que la HG-AFS per determinar arsenosucres. Primer es caracteritza una mostra comercial de *Fucus vesiculosus,* que es compara amb el material de referència *F. serratus,*[132] i s'hi identifiquen els quatre arsenosucres d'interès amb cromatografia de bescanvi aniònic ($NH_4H_2PO_4$ pH 5,8) i catiònic ($C_5H_6N^+COO^-$ pH 2,6).

*Acoblament del mètode cromatogràfic a espectrometria de masses*

La fase mòbil seleccionada al ICP-MS s'empra per a l'anàlisi de patrons i de mostres caracteritzades amb LC-MSD-TOF. La fase mòbil que es fa servir a la cromatografia de bescanvi catiònic és compatible amb el detector i també s'hi analitzen patrons i mostres per a la caracterització del pics cromatogràfics. Les condiciones del espectròmetre són:

- Voltatge capil·lar: +4 KV o -3,5 KV
- Fragmentador: +175 V o -215 V
- Temperatura del gas: 325C
- Gas nebulitzador: $N_2$ (15 psi)
- Gas assecat $N_2$ (7,0 l $min^{-1}$)
- Mode SCAN (m/z 83 i 800)

El sistema cromatogràfic acoblat té un cabal de fase mòbil de 1,5 ml $min^{-1}$ que és massa elevat pel detector i cal dividir el flux per a que només arribi 0,17 ml $min^{-1}$ al detector, mentre que la resta es condueix a un desguàs.

Les masses dels compostos d'interès són:

| | | |
|---|---|---|
| As(III):126 g $mol^{-1}$ | $PO_4$-sug: 482 g $mol^{-1}$ | AB: 178 g $mol^{-1}$ |
| DMA: 138 g $mol^{-1}$ | $SO_3$-sug: 392 g $mol^{-1}$ | AC: 164 g $mol^{-1}$ |
| MA: 140 g $mol^{-1}$ | $SO_4$-sug: 408 g $mol^{-1}$ | TMAO: 136 g $mol^{-1}$ |
| As(V): 142 g $mol^{-1}$ | | gly-sug: 328 g $mol^{-1}$ |

Fragments típics dels arsenosucres: 97, 195, 237 g $mol^{-1}$

### 3.2.2 RESULTATS I DISCUSSIÓ

A continuació es donen els resultats obtinguts i es discuteix l'elecció dels paràmetres per a la separació de les espècies d'arsènic en patrons i extractes d'algues.

En el cas de la separació dels compostos As(III), DMA, MA i As(V) es procedeix a determinar el seu ordre d'elució mitjançant la injecció dels patrons de cadascun d'ells per separat; aquest ordre d'elució és el mateix que s'obté amb la fase mòbil de fosfat. La injecció de patrons combinats de As(III), DMA, MA i As(V) ens permet avaluar com afecten els factors concentració d'electròlit i pH de la fase mòbil. El primer factor assajat és la concentració de l'electròlit, la qual es varia entre 10 i 40 mM a pH 9; es pot veure com els temps de retenció disminueixen a mesura que s'augmenta la concentració de l'electròlit (Figura 19). El pH escollit no permet l'elució diferenciada de As(III) i DMA.

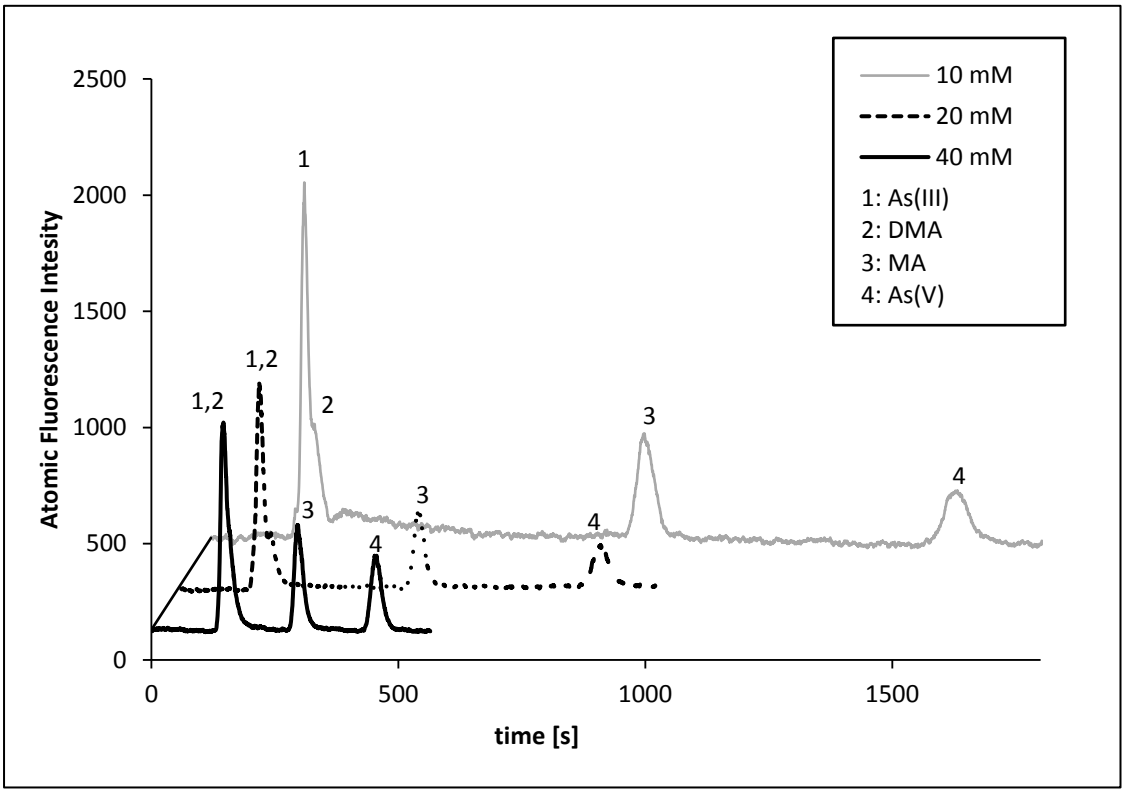



**Figura 19: Cromatogrames del patró de As(III), DMA, MA i As(V) (40 µg As $l^{-1}$) d'elució isocràtica a pH 9 amb fases mòbils amb concentració d'electròlit de 10, 20 i 40 mM.**

L'avaluació de l'efecte del pH es realitza a tres nivells (pH 8, 9 i 10) a una concentració fixa de 30 mM (Figura 20). A mesura que augmenta el pH, disminueixen els temps de retenció de les quatre espècies. Cal destacar que la combinació 30 mM pH 8 permet separar les quatre espècies correctament en un temps raonable (25 min).

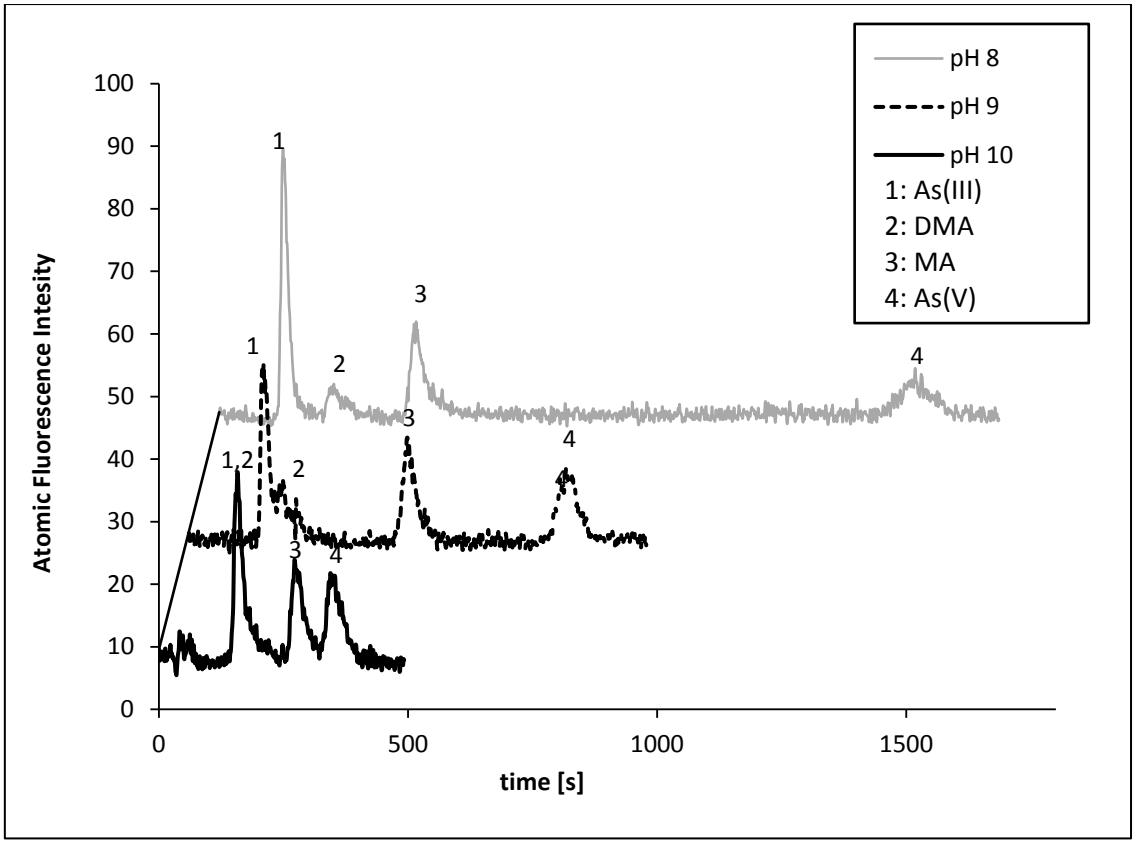



**Figura 20: Cromatogrames del patró de As(III), DMA, MA i As(V) d'elució isocràtica a pH 8 – 10 amb fases mòbils amb concentració d'electròlit de 30 mM.**

Considerant els resultats anteriors, es decideix estudiar l'elució amb canvi de fase mòbil per tal de disminuir el temps d'anàlisi. Es decideix treballar a concentració fixa i canviar el pH de 8 a 10 desprès de l'elució del DMA i, a més, provar l'efecte d'un modificador orgànic (MeOH 1 %). La Figura 21 mostra alguns dels cromatogrames obtinguts. S'observa que la separació és correcta, no hi ha derives de la fase mòbil i que l'efecte del MeOH és negligible.

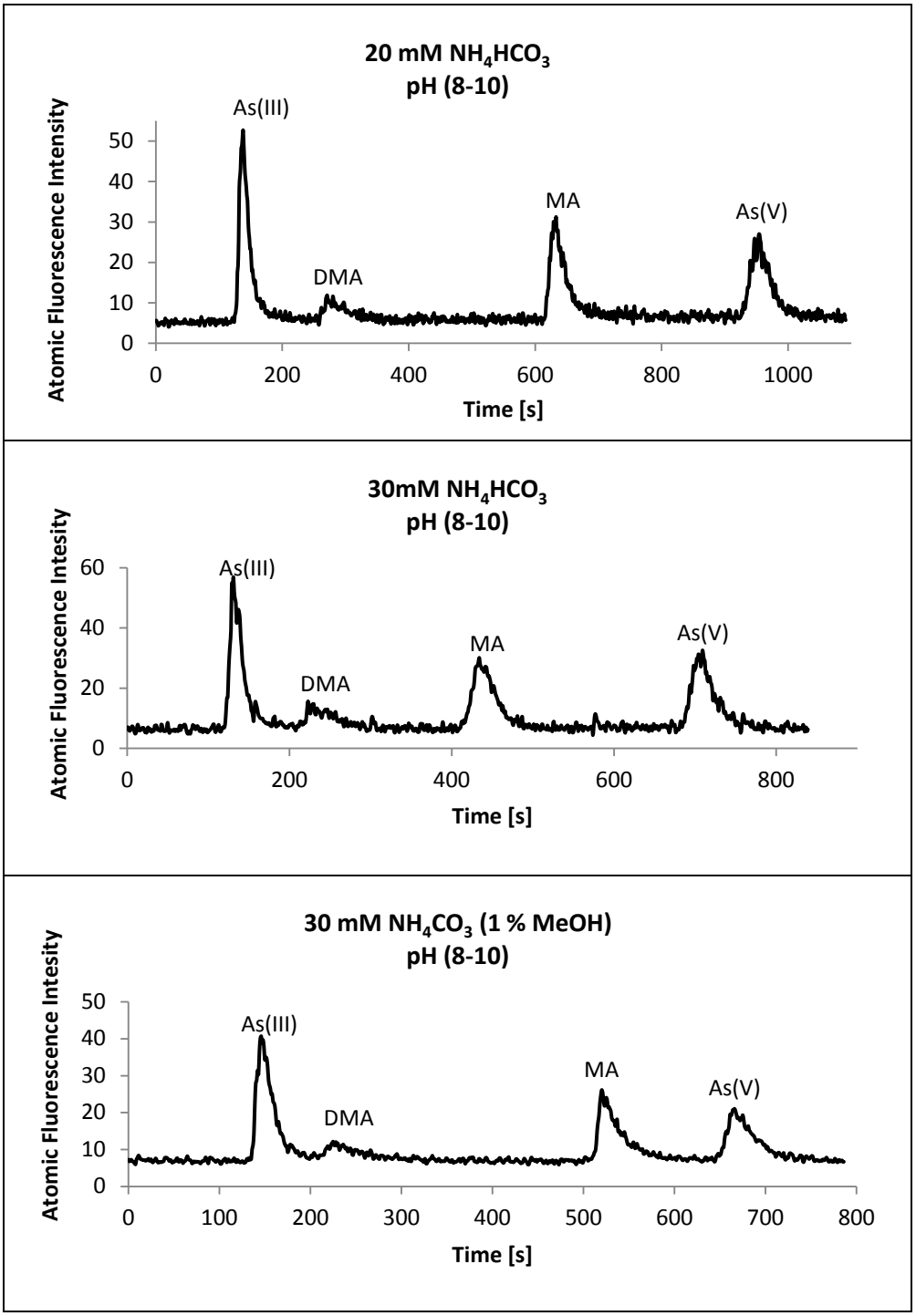



**Figura 21: Proves de canvi de pH i en presència de metanol a concentració d'electròlit constant.**

Un cop s'ha trobat una fase mòbil adequada per a la separació de As(III), DMA, MA i As(V), s'estudia l'elució dels arsenosucres. De les fases mòbils anteriors, se seleccionen les fases mòbils de 20 i 30 mM amb canvi de pH de 8 a 10 per a la prova a l'ICP-MS en la qual es consideraran els arsenosucres. Per aquesta part de l'optimització cromatogràfica es va treballar amb extractes de *Fucus vesiculosus* ja que en un estudi paral·lel de la present tesi es va comprovar que els extractes d'aquesta alga contenien els quatre

arsenosucres d'interès. A la Figura 22 es poden veure els cromatogrames del *F. vesiculosus* i del *F. serratus* sobreposats.

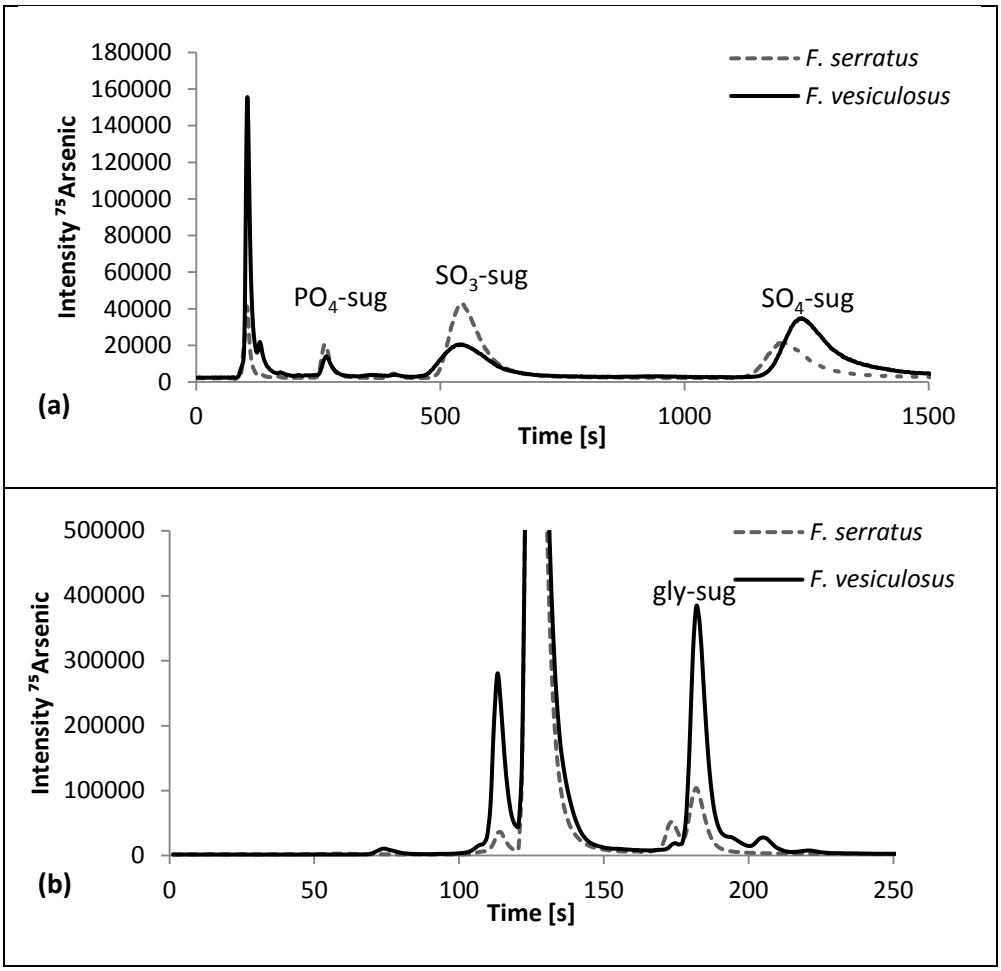



**Figura 22: Cromatogrames de bescanvi aniònic (a) i catiònic (b) del *F. vesisculosus*. La línia discontínua correspon al *F. serratus*. Les fases mòbils emprades són $NH_4H_2PO_4$ (20 mM pH 5,8) i $C_5H_6N^+COO^-$ (pH 2,6) per a bescanvi aniònic i catiònic, respectivament.**

Es prova la separació optimitzada per a patrons amb els extractes de *F. vesiculosus* i els resultats obtinguts desaconsellen el treball amb canvi de fase mòbil ja que en aquestes condicions es formen pics solapats (Figura 23). S'assaja l'elució isocràtica a pH 8 i concentracions de 20 i 30 mM (Figura 24).

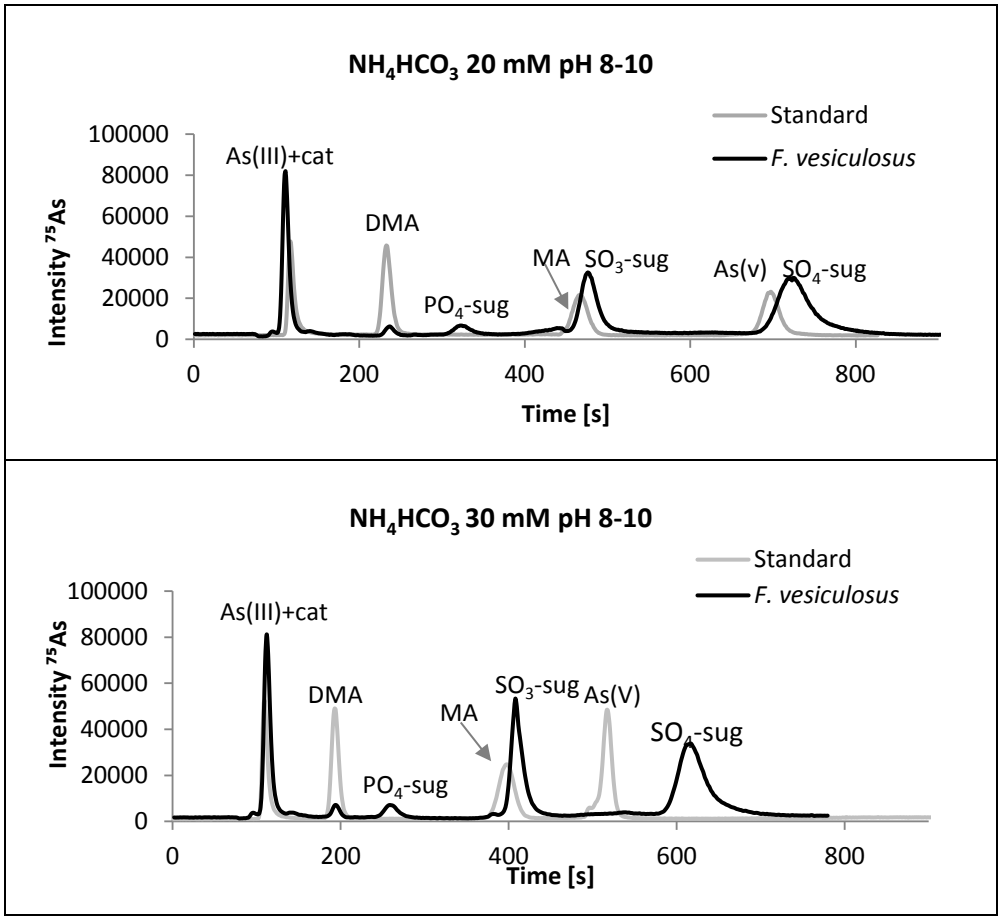



Figura 23: Cromatogrames amb canvi de pH obtinguts per al patró combinat i la mostra.

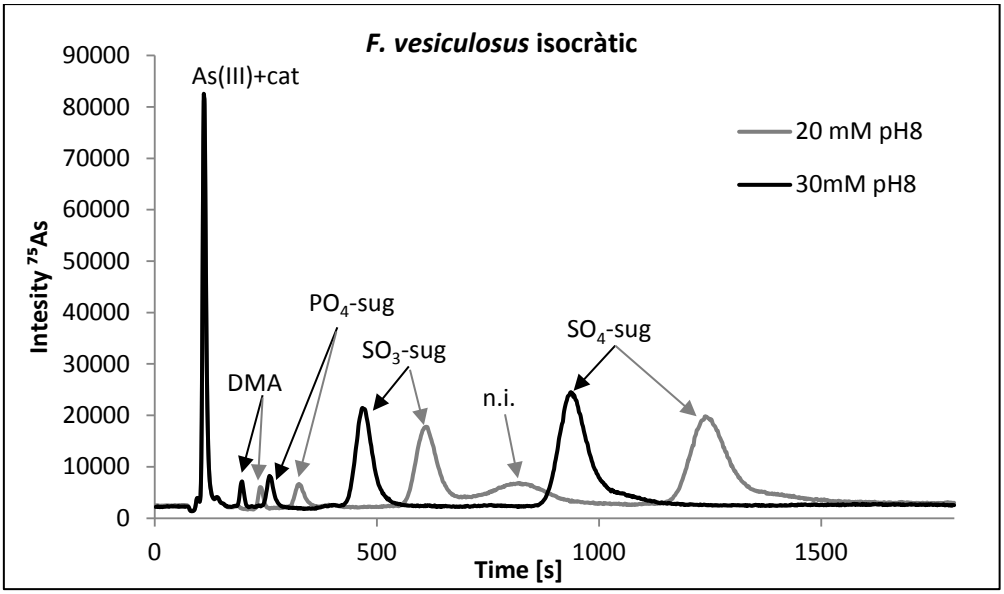



Figura 24: Cromatogrames de l'extracte de *F. vesiculosus* obtinguts amb LC-ICP-MS i a concentració de fase mòbil de 20 i 30 mM.

Els assajos amb detecció d'espectrometria de masses es realitzen amb la fase mòbil de $NH_4HCO_3$ de 20 mM. En primer lloc, els patrons de 50 µg As $l^{-1}$ de As(III), DMA, MA i As(V) s'analitzen directament a l'espectròmetre de masses (sense eluir en columna) per a verificar-ne les masses i que la sensibilitat de l'equip sigui l'adequada. Seguidament, el procedeix a injectat un patró combinat dels quatre compostos al sistema de HPLC acoblat al ESI-MSD-TOF. El cromatograma obtingut permet de distingir les m/z d'interès, segurament degut a la baixa quantitat de matèria que arriba al detector desprès de la divisió del cabal 1:7 necessària per a introduir la mostra al detector (Figura 25).

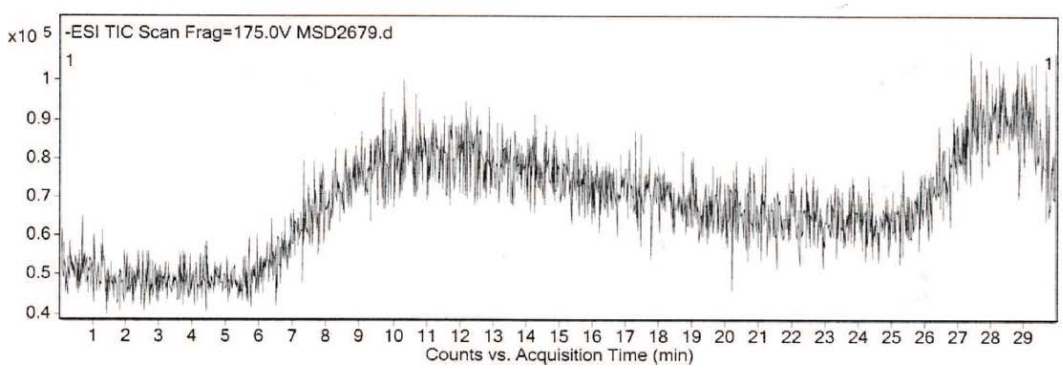



**Figura 25: Cromatograma de LC-MSD-TOF d'un patró combinat de 100 µg As $l^{-1}$ de As(III), DMA, MA, As(V).**

La mostra de *F. vesiculosus* dóna un cromatograma (Figura 26) on es distingeixen els pics de As(III), $PO_4$-sug, $SO_3$-sug i de pics no identificats (D) que s'associen a compostos que se separen amb el sistema cromatogràfic, però que no donen senyal a l'ICP-MS ja que no contenen arsènic. Si s'extreuen els espectres dels pics cromatogràfics per a comprovar la presència de les m/z dels compostos al quals s'atribueixen, es pot confirmar la presència de $PO_4$-sug, $SO_3$-sug i $SO_4$-sug, tot i que aquest darrer no dóna un pic definit al cromatograma TIC. La duració de l'anàlisi és de 17 minuts i la fase mòbil és adequada per a treballar amb HG-AFS i MSD-TOF.

En la part de l'estudi utilitzant cromatografia de bescanvi catiònic no és necessària l'adaptació de la fase mòbil per a l'acoblament LC-MSD-TOF perquè ja és compatible amb aquest detector. Es procedeix d'igual manera que en cromatografia de bescanvi aniònic. El cromatograma del patró combinat de AB, AC i TMAO permet la identificació del pics de cadascun dels compostos, per tant es considera que la fase mòbil és adequada per a la identificació dels compostos amb LC-MSD-TOF.

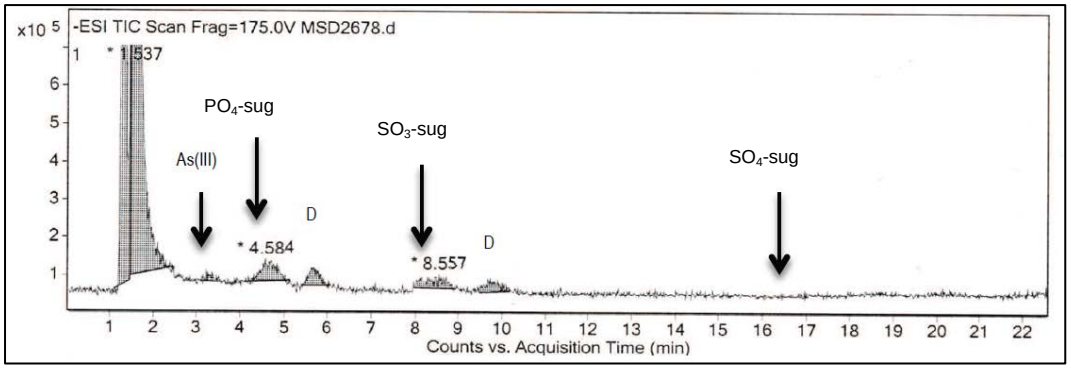



**Figura 26: Cromatograma de la mostra *F. vesiculosus* en LC-MSD-TOF. Destaca la presència de dos pics desconeguts (D).**

La fase mòbil de $NH_4HCO_3$ (20 mM pH 8) permet la correcta separació dels components, amb l'excepció de $SO_3$-sug i MA que coelueixen, en un temps de 17 minuts, permet caracteritzar els compostos separats mitjançant l'espectre de masses obtingut. L'aplicació a mostres d'algues per a comprovar la identitat de pics no identificats ha resultat satisfactòria amb la mostra de *F. vesiculosus.*

## 3.3 Posada a punt d'un mètode per a l'obtenció d'arsenosucres a partir d'una mostra d'alga

Una de les principals mancances que tenen els estudis d'especiació en el medi marí és la falta de patrons dels diferents As-sug. Les rutes sintètiques solen presentar un risc molt elevat degut a la toxicitat d'alguns compostos d'arsènic durant el procés. La ruta proposada per Traar i Francesoni[148] té aquest inconvenient, a més de ser un procés complicat. L'estratègia seguida per la majoria de grups de recerca és l'ús de mostres de referència caracteritzades per a la identificació dels As-sug i aprofitar el fet que la sensibilitat del ICP-MS és independent al compost analitzat.[123] Aquest és el cas d'aquest treball on s'empra l'extracte de *Fucus serratus* amb aquesta finalitat.

Amb aquestes premisses, l'opció més viable és la purificació dels As-sug a partir de mostres que compleixen els següents requisits: facilitat de treball i d'obtenció, i presència del compostos en una concentració adequada. Les primeres estratègies descrites a la literatura tenen com a finalitat l'obtenció del compost per a la seva caracterització i segueixen procediments diferents per a cadascun dels compostos.[149,150] Actualment, s'ha descrit un procediment menys laboriós que treballa amb cromatografia preparativa de bescanvi aniònic.[151]

L'objectiu d'aquest estudi és posar a punt un mètode que permeti l'obtenció d'arsenosucres a partir d'una mostra d'alga que els contingui, mitjançant cromatografia preparativa de bescanvi aniònic.

### 3.3.1 DISSENY OPERACIONAL

*Selecció i preparació de la mostra*

En primer lloc, cal seleccionar la mostra a partir de la qual es vol purificar els As-sug. Les algues del gènere *Fucus* semblen unes candidates adequades ja que estudis reportats a la bibliografia indiquen que contenen els quatre As-sug d'interès per a la present tesi.[139,152,153]

Es va seleccionar el *Fucus vesiculosus* ja que es troba disponible al mercat local en bosses de 100 g i assecat. Es van polvoritzar 100 g de mostra amb un molí d'anelles de carbur de tungstè i es van emmagatzermar en ampolles de PET. La mostra es va analitzar mitjançant els procediments estàndards descrits al Capítol 2.

*Selecció de l'extractant*

Es decideix assajar tres extractants diferents per a poder obtenir la màxima eficiència en aquest procés. Es comparen els resultats i se selecciona el més adient d'entre els següents extractants: $H_2O$, $H_2O$:MeOH (9:1) i $H_2O$:MeOH (1:1).

*Selecció de la fase mòbil*

La metodologia seguida per a la purificació dels As-sug es basa en el procediment descrit per Gamble, *et al.*[151,154] La selecció d'una fase mòbil que permeti de separar els As-sug amb la resolució adequada en el mínim temps possible és un punt crucial. La columna preparativa escollida és la següent: Hamilton PRP-X100 (21,5x250 mm, mida de partícula 12 – 20 μm). Les fases mòbils assajades (veure Taula 11) són de $NH_4H_2PO_4$ i de $NH_4HCO_3$ a diferents concentracions d'electròlit i pH. El cabal de treball és de 5 ml $min^{-1}$. També es va provar la separació amb gradient de concentració i la presència d'un modificador orgànic (MeOH 1 %). Es va fer servir un bucle d'injecció de 2 ml. Durant tot el procés es va aplicar una divisió del cabal de sortida de la columna dirigint 1 ml $min^{-1}$ al nebulitzador del ICP-MS i recollint el restant en recipients adients.

Taula 11: Fases mòbils assajades per al fraccionament del arsenosucres.

| Electròlit | Concentració 1 | Concentració 2 | pH | MeOH |
|---|---|---|---|---|
| $NH_4PO_4$ | 20 mM | - | 5,8 | 0 % |
| $NH_4PO_4$ | 20 mM | - | 5,8 | 1 % |
| $NH_4HCO_3$ | 20 mM | - | 8,0 | 0 % |
| $NH_4HCO_3$ | 20 mM | - | 8,0 | 1 % |
| $NH_4HCO_3$ | 20 mM | 40 mM | 8,0 | 1 % |
| $NH_4HCO_3$ | 40 mM | - | 8,0 | 1 % |

*Obtenció dels arsenosucres*

Els extractes de *F. vesiculosus* es filtren (PET; 0,45 µm i 0,20 µm) i es netegen amb cartutxos d'extracció en fase sòlida (SPE, C-18). Es procedeix a realitzar la cromatografia preparativa de bescanvi aniònic amb una divisió de flux per tal de poder monitoritzar la sortida de la columna amb ICP-MS. Es recullen les fraccions corresponents als arsenosucres en recipients de PET. Els extractes es liofilitzen. El procés es realitza per duplicat.

*Caracterització dels arsenosucres*

Les fraccions liofitlitzades es van dissoldre amb 2 ml de $H_2O$. Es va realitzar una cromatografia analítica de bescanvi aniònic amb $NH_4H_2PO_4$ (20 mM, pH 5,8) i l'addició dels arsenosucres purificats a l'extracte de *Fucus serratus* que es fa servir com a material de referència.[132] Es va comprovar la identificació amb MSD-TOF segons els procediments descrits a l'apartat 3.2.1.

### 3.3.2 RESULTATS I DISCUSSIÓ

*Selecció de la mostra*

L'alga seleccionada per aquest estudi havia de satisfer les següents característiques: contenir els quatre arsenosucres d'interès d'aquesta tesi i ser fàcil d'obtenir al mercat local. La selecció del *F. vesiculosus* com a primera alga candidata va resultar adient i es va pendre segons les dades de la literatura sobre les algues del gènere *Fucus* que presenten els quatre arsenosucres.[84,86,132] El contingut d'arsènic total és de 40,0 ± 0,8 mg As $kg^{-1}$, representant la fracció extractable amb aigua el 79 %. Pel que fa les espècies (veure cromatogrames a la Figura 27), l'alga conté els quatre As-sug d'interès a més de As(III), DMA i un compost catiònic no identificat (n.i).

La concentració de les espècies (As(III): 0,9 ± 0,3 mg As $kg^{-1}$; DMA: 0,53 ± 0,06 mg As $kg^{-1}$; $PO_4$-sug: 0,63 ± 0,03 mg As $kg^{-1}$; $SO_3$-sug: 4,8 ± 0,2 mg As $kg^{-1}$; $SO_4$-sug: 9,2 ± 0,7 mg As $kg^{-1}$; gly-sug: 4,6 ± 0,3 mg As $kg^{-1}$; n,i,: 0,22 ± 0,01 mg As $kg^{-1}$), evidencia que l'alga és un bon material per a poder purificar els As-sug. Tot i que la concentració de $PO_4$-sug és relativament baixa, això no impedeix poder optimitzar el mètode de purificació.

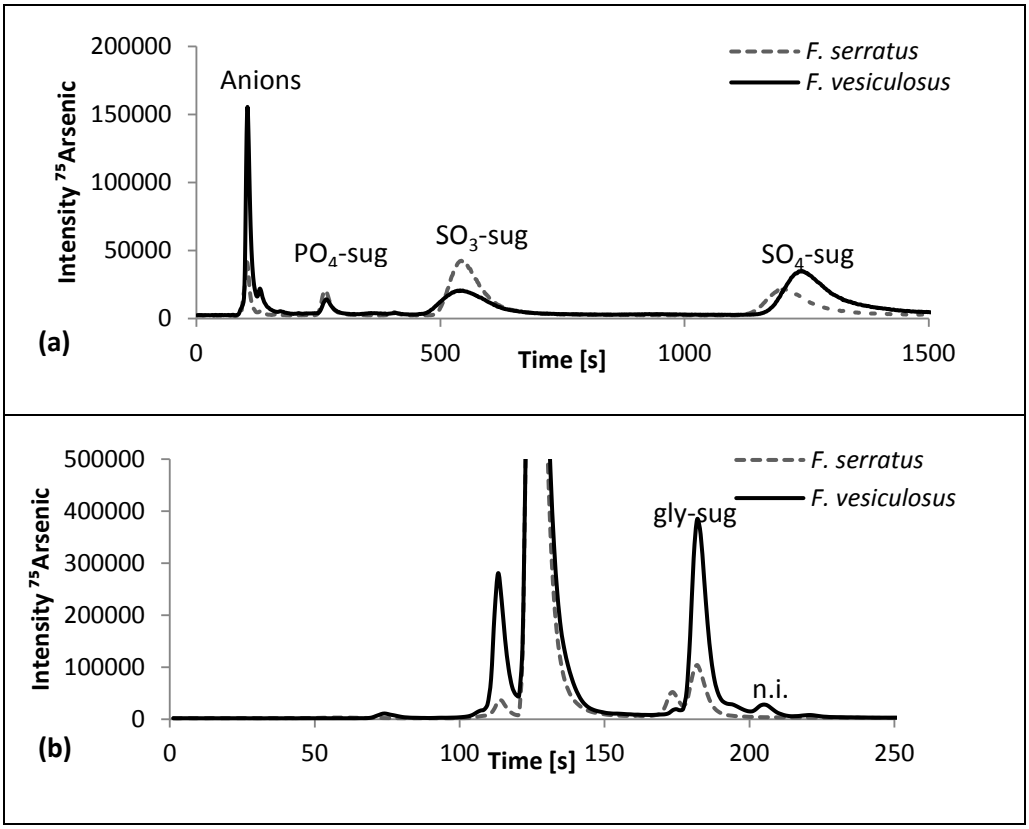



**Figura 27: Cromatogrames de bescanvi aniònic (a) i catiònic (b) per a la mostra de *F. vesiculosus* (Columna analítica).**

*Selecció de l'agent extractant*

Es va comparar l'extracció dels arsenosucres amb aigua i aigua:metanol a dues proporcions. En els cromatogrames de la Figura 28 s'observa un nivell de quantificació similar dels compostos en els tres tipus d'extractants indicant un rendiment d'extracció semblant. Es va optar per l'aigua ja que és l'extractant més senzill i els extractes que contenen metanol són difícils de congelar i de liofilitzar, fet que en dificulta la seva conservació.

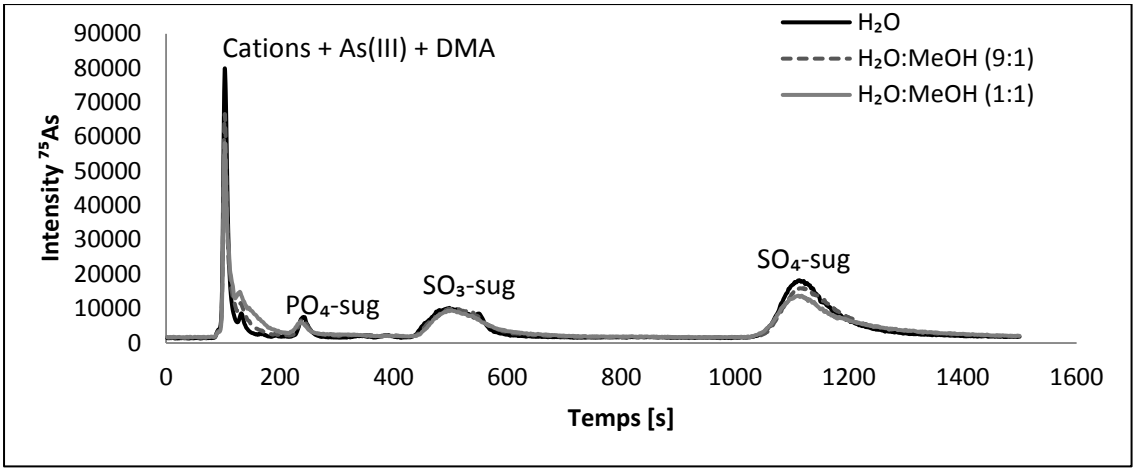



**Figura 28: Cromatograma de bescanvi aniònic per a diferents agents extractants (Columna analítica).**

*Selecció de la fase mòbil*

En un primer moment, es va assajar la fase mòbil de fosfat amònic, que es fa servir per separar els compostos en cromatografia amb columna analítica de bescanvi aniònic amb una resolució adequada en un temps raonable. Com es pot veure a la Figura 29, el temps de separació és molt elevat. Es va afegir MeOH (1 %) a la fase mòbil per millorar l'elució dels composts, però el procés era excessivament lent. D'altra banda, el $PO_4$-sug no quedava completament resolt.

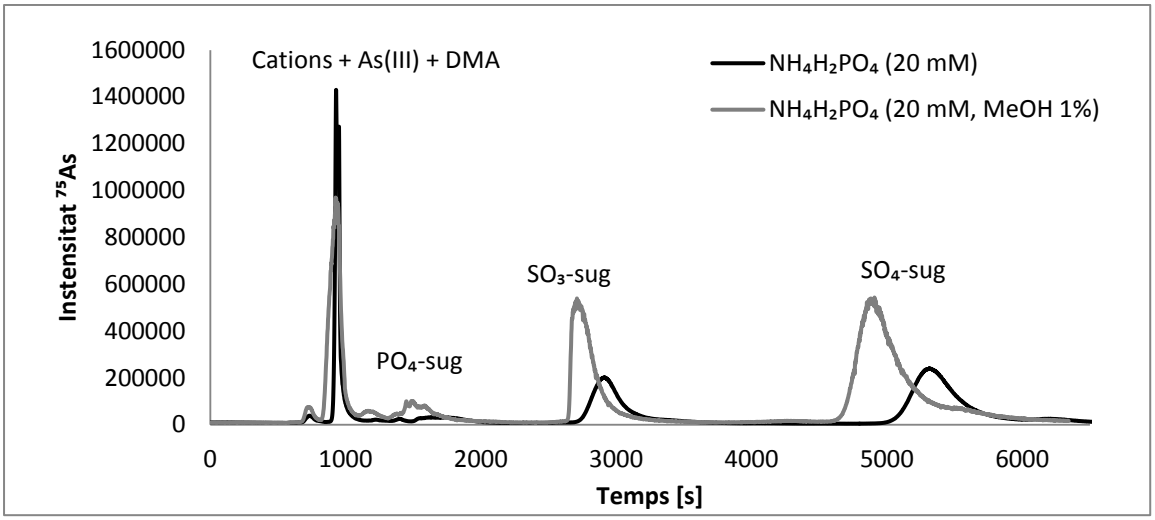



**Figura 29: Cromatogrames de bescanvi aniònic de *F. vesiculosus* per a cromatografia preparativa emprant fase mòbil de fosfat amònic en mode isocràtic.**

Es va decidir canviar l'electròlit per $NH_4HCO_3$ a pH 8, ja que havia donat uns bons resultats en l'acoblament a la espectrometria molecular de masses. En un primer moment, es va optar per una elució en mode isocràtic considerant la presència de MeOH (1 %). Els cromatogrames obtinguts amb la fase mòbil de $NH_4HCO_3$ (pH 8, 20 mM) es representen a la Figura 30. Es pot veure que la resolució de tots els compostos és l'adequada però el temps d'anàlisi és elevat, 6600 s (110 min) per a la fase mòbil sense modificador orgànic i 5400 s (90 min) per a la fase mòbil amb un 1 % de MeOH com a modificador orgànic.

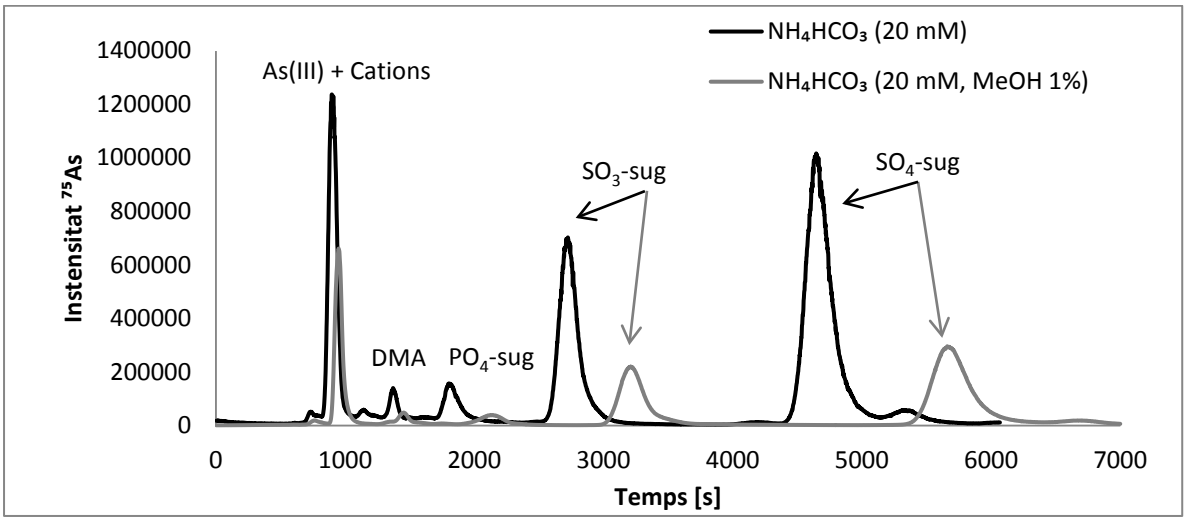



**Figura 30: Cromatogrames de bescanvi aniònic de *F. vesiculosus* per a cromatografia preparativa emprant fase mòbil de carbonat amònic en mode isocràtic.**

Entre l'elució dels arsenosucres $SO_3$-sug i $SO_4$-sug hi ha un interval d'un 2000 s en els qual no s'elueix cap compost. Per reduir aquest temps, es va decidir fer un canvi de fase mòbil als 1000 s per una de més concentrada (40 mM) amb poder d'elució superior a la de 20 mM. El cromatograma amb elució amb canvi de fase mòbil 20 – 40 mM es mostra a la Figura 31, i es pot veure com aquest mode d'elució, els compostos es resolen es uns 3600 s.

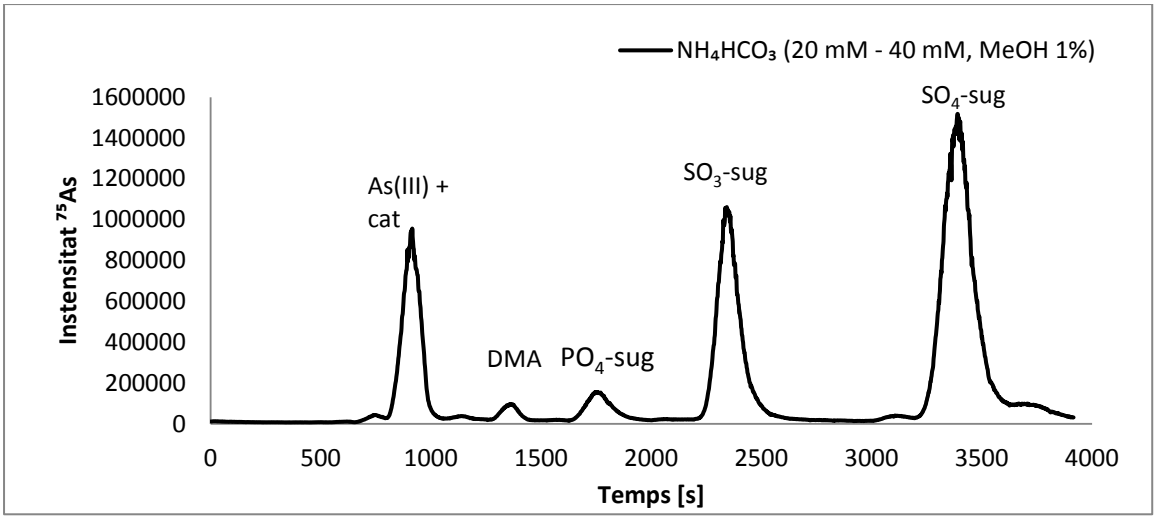



**Figura 31: Cromatogrames de bescanvi aniònic de *F. vesiculosus* per a cromatografia preparativa emprant fase mòbil de carbonat amònic amb canvi de concentració de 20 a 40 mM.**

*Obtenció dels arsenosucres*

La concentració final de les solucions un cop resuspeses (2 ml), la massa obtinguda i el rendiment del procés de purificació es troben a la Taula 12. El rendiment es calcula com la relació entre les masses d'un compost determinat a l'inici i al final del procediment de purificació expressada en percentatge. La massa inicial es calcula a partir de la concentració de l'extracte i del volum d'injecció, i la final a partir de la concentració de la fracció i el volum de la mateixa. Es pot veure que els rendiments varien entre els diferents compostos, essent superior pel $PO_4$-sug (99 %) que els altres dos sucres ($SO_3$-sug: 51 % i $SO_4$-sug: 81 %)

**Taula 12: Resultats del fraccionament del *F. vesiculosus*.**

| | Concentració | massa de compost | Rendiment mig |
|---|---|---|---|
| **PO4-sug** | 14,6 ± 0,4 µg As $l^{-1}$ | 29,4 ± 0,7 ng As | 99 % |
| **SO3-sug** | 58 ± 2 µg As $l^{-1}$ | 117 ± 4 ng As | 51 % |
| **SO4-sug** | 277 ± 2 µg As $l^{-1}$ | 354 ± 4 ng As | 81 % |

Els cromatogrames de les fraccions revelen la presència de petites impureses (Figura 32). Per tal d'identificar els pics cromatogràfics es realitza l'addició dels arsenosucres purificats a l'extracte de *F. serratus* preparat per Madsen, et al.[132], els compostos s'addicionen als corresponents pics cromatogràfics, a tall d'exemple es mostra el cromatograma de l'addició del $SO_4$-sug a la Figura 33.

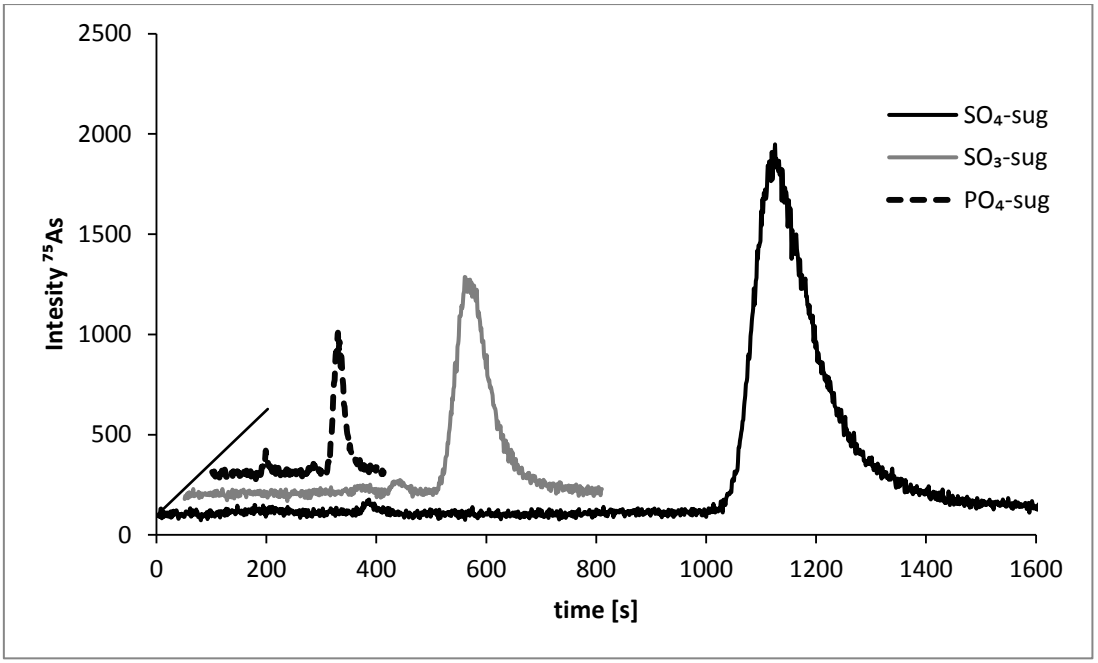



Figura 32: Cromatogrames de les fraccions corresponents al arsenosucres.

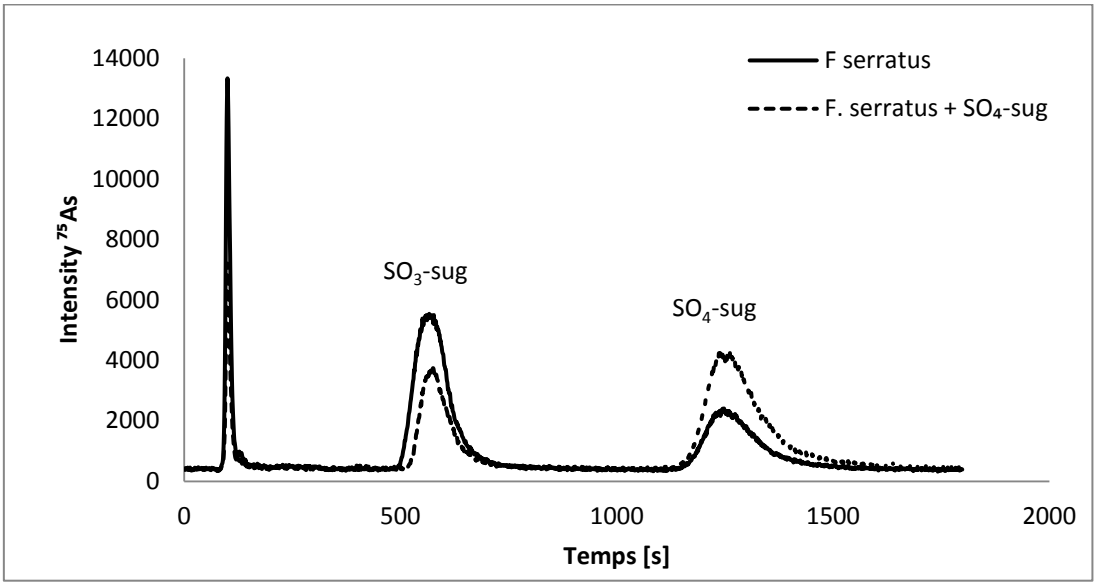



Figura 33: Addició del $SO_4$-sug sobre l'extracte de *F. serratus.*

Els espectres de masses moleculars realitzats mitjançant ESI-MSD-TOF mostren la presència dels ions moleculars dels arsenosucres corresponents a cada fracció (veure Figura 34, Figura 35 i Figura 36), d'aquesta manera se'n confirma la seva presència. Tanmateix, es poden observar m/z que no corresponen al compost o als seus possibles productes de fraccionament, el que indica que la fracció conté altres compostos que no contenen arsènic. Donada l'alta selectivitat del ICP-MS això no suposa un problema a l'hora de fer servir els extractes purificats com a solució de referència.

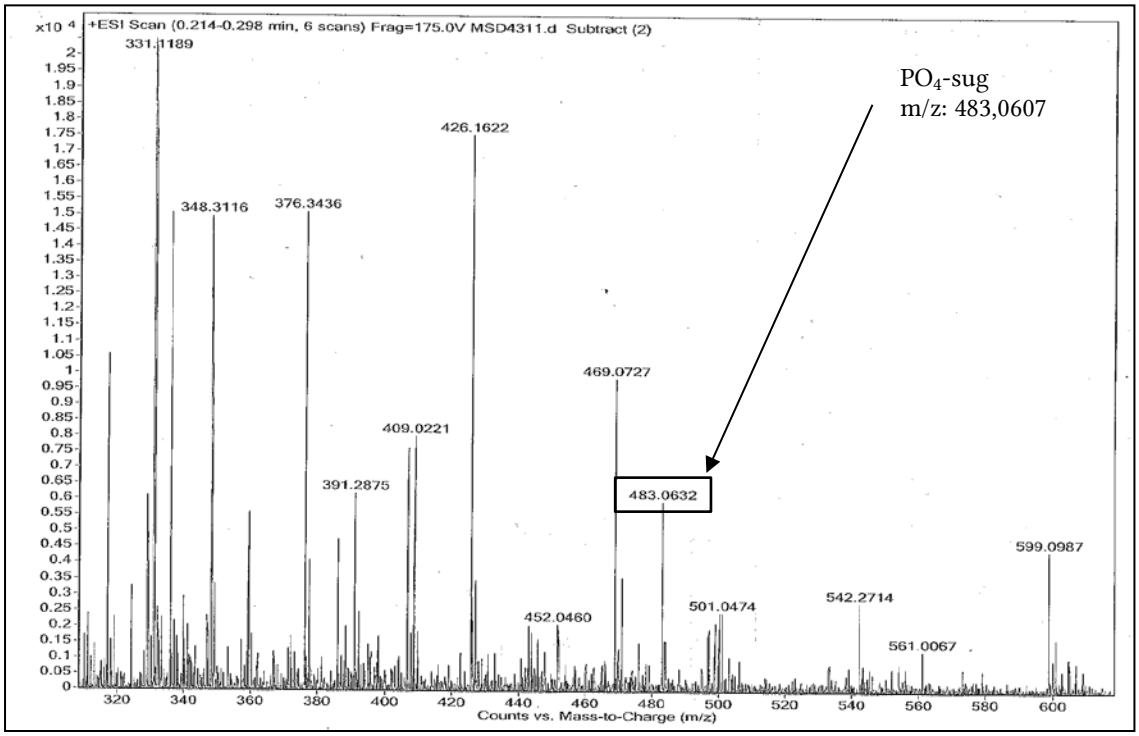



Figura 34: Espectres de MSD-TOF de la fracció purificada de $PO_4$-sug.

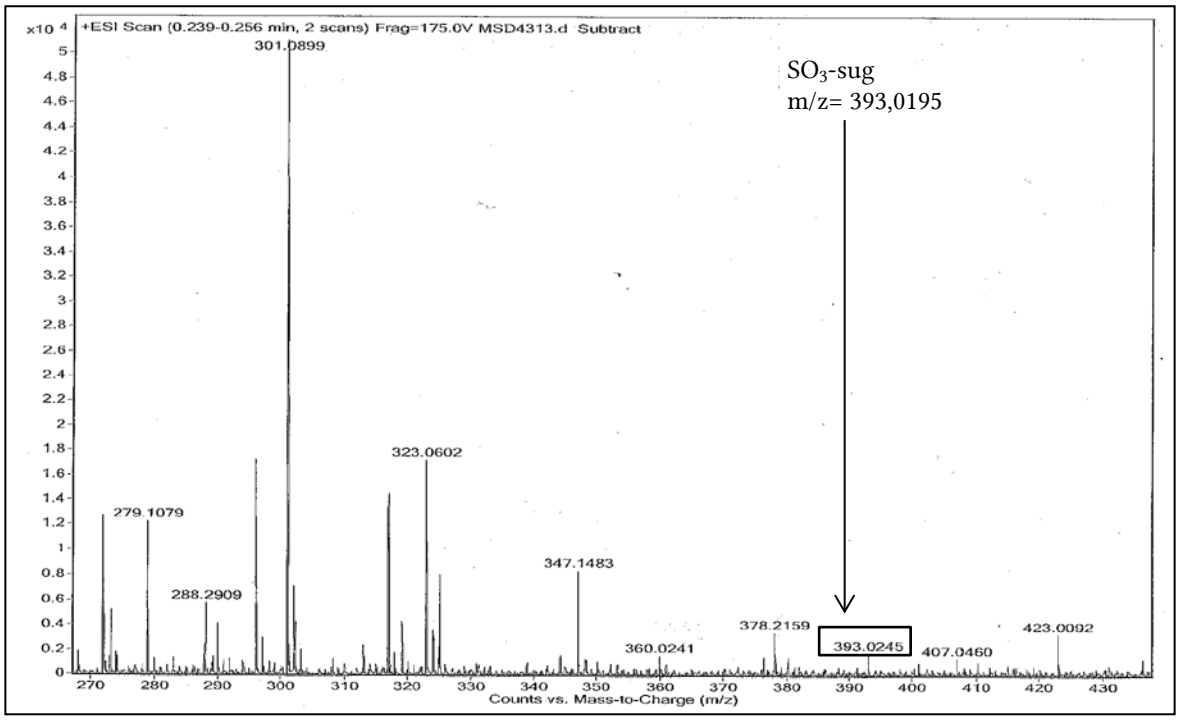



Figura 35: Espectres de MSD-TOF de la fracció purificada de $SO_3$-sug.

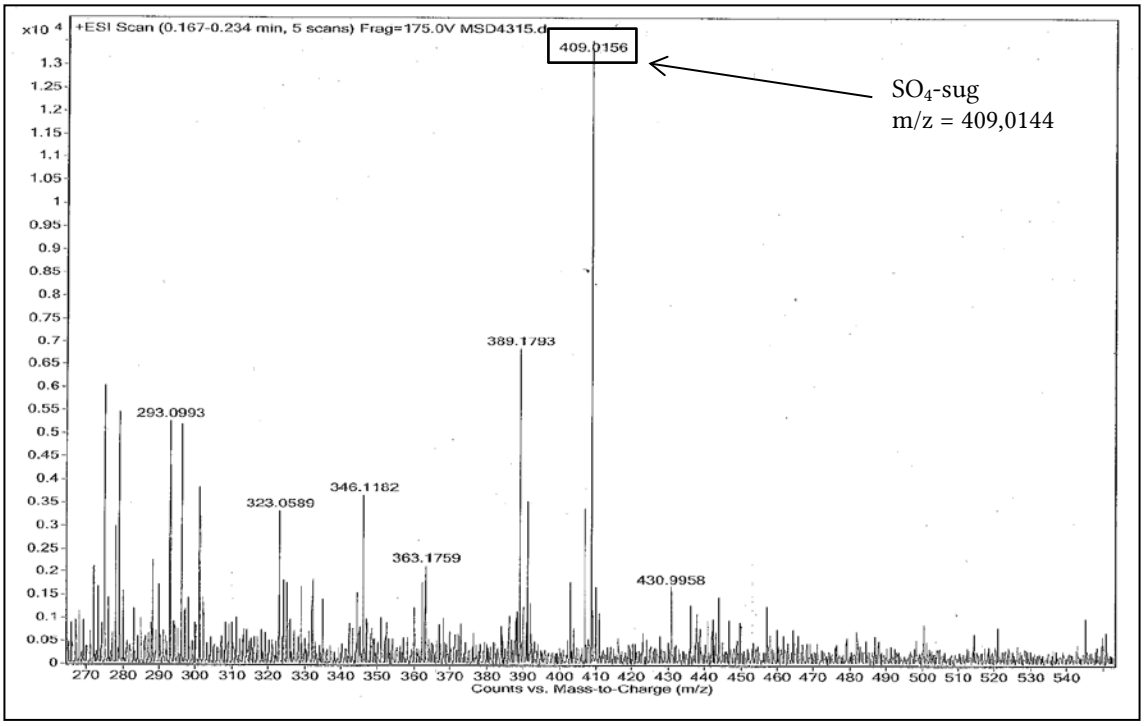



**Figura 36:: Espectres de MSD-TOF de la fracció purificada de $SO_4$-sug.**

S'ha desenvolupat un mètode amb cromatografia preparativa de bescanvi aniònic que permet l'obtenció de fraccions que contenen un únic compost que contingui arsènic. El mètode es pot aplicar per a l'obtenció de solucions dels arsenosucres $PO_4$-sug, $SO_3$-sug i $SO_4$-sug de manera ràpida i fàcil. Aquestes fraccions contenen altres compostos que no presenten arsènic, tot i que aquest no impedeixen l'ús d'aquestes solucions en LC-ICP-MS com a solucions de referència. A més de la feina feta, cal posar a punt un procediment que permeti l'obtenció del gly-sug a partir dels extractes de *F. vesiculosus.* A més, també serà important comprovar l'estabilitat dels compostos aïllats tant del liofilitzat com de la solució, per a poder ser considerats solucions de referència.

## 3.4 Viabilitat d'un material per al control de la qualitat per espècies d'arsènic: *Undaria pinnatífida*

Donada la manca de materials de referència per a l'especiació d'arsènic en algues marines, es va pensar a nivell de grup de recerca en la preparació d'un material intern per al control de la qualitat durant l'hivern de 2010, caracteritzar-lo i comprovar-ne la viabilitat. La part del treball desenvolupada correspon al contingut d'arsènic total i d'espècies d'arsènic.

### 3.4.1 PREPARACIÓ D'UN MATERIAL DE REFERÈNCIA

El material de referència per al control de la qualitat va ser preparat pel laboratori de Mat Control del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, el qual té la missió de preparar materials per al control de la qualitat i organitzar probes d'aptitud tècnica. Per dur a terme aquesta part de l'estudi, es van adquirir 5 kg d'alga wakame (*Undaria pinnatifida*) procedent de la costa atlàntica de Galícia; l'empresa productora va ser Algamar la qual cultiva, tracta, envasa i comercialitza algues comestibles.

Sobre la mostra sense processar es va determinar la humitat, pesant 5 g per triplicat i es van assecar a 105°C fins a pes constant. El contingut d'arsènic de la mostra també es va determinar per tal de saber si era adequat per a la preparació del material.

La mostra es va sotmetre a un cisallament inicial i a una trituració mecànica mitjançant un sistema de ganivetes. Seguidament, la mostra es va col·locar en safates d'acer inoxidable en una estufa a 40ºC durant una setmana. Es va determinar la humitat de la mostra seca amb alíquotes de 4 g que es van assecar a 105°C fins a pes constant.

La mostra seca es va molturar amb un molí de rotor d'impacte amb una malla de 0,5 mm. Seguidament, es va tamisar amb una malla de 0,125 mm i es va introduir en un recipient de polietilè de 2 l, essent la massa de material de 1950 g. El material es va homogeneïtzar durant una setmana en un sistema de rotació.

### 3.4.2 ESTUDI DE L'HOMOGENEÏTAT DEL MATERIAL

L'homogeneïtat preliminar del material de referència es va realitzar mitjançant la determinació d'arsènic total a submostres preses a diferent nivells del contenidor i als resultats obtinguts s'hi va aplicar una ANOVA per tal d'avaluar l'homogeneïtat del material.

Un cop es va comprovar l'homogeneïtat del material, es va envasar en ampolles de vidre ambre de 60 ml amb obturador introduint-hi 30 g controlats amb granetari. El material es va emmagatzemar a temperatura ambient. Tres ampolles seleccionades a l'atzar es van fer servir pels estudis finals d'homogeneïtat: anàlisi elemental orgànica; anàlisi elemental inorgànica semiquantitativa amb ICP-AES i ICP-MS; i determinació d'arsènic total i de les espècies d'arsènic per LC-ICP-MS amb cromatografia de bescanvi aniònic i catiònic. A la Taula 13 es recullen els resultats finals per a l'anàlisis elemental orgànica i a la Taula 14 els resultats de les anàlisis inorgàniques semiquantitatives.

**Taula 13: Resultats de l'anàlisis elemental orgànica (Analitzador de combustió amb HRGC).**

| | % | CV % |
|---|---|---|
| **N** | 2,67 | 0,7 |
| **C** | 26,6 | 0,6 |
| **H** | 4,2 | 4 |
| **S** | 0,79 | 4 |
| **O** | 30,9 | 2 |

**Taula 14: Resultats de les anàlisis inorgàniques semiquantitatives (ICP-AES i ICP-MS).**

| | Valor mig mg $kg^{-1}$ | CV % | | Valor mig mg $kg^{-1}$ | CV % |
|---|---|---|---|---|---|
| **Ca** | 7900 | 5 | **Ni** | 2,5 | 10 |
| **Mg** | 10300 | 4 | **Cu** | 5 | 20 |
| **Sr** | 670 | 2 | **Zn** | 37 | 5 |
| **K** | 69000 | 2 | **As** | 29 | 7 |
| **Fe** | 123 | 8 | **Rb** | 21 | 7 |
| **Na** | 74000 | 2 | **Mo** | 0,21 | 9 |
| **P** | 7700 | 7 | **Ag** | 0,04 | 64 |
| **Li** | 1,3 | 12 | **Cd** | 0,10 | 21 |
| **Al** | 45 | 20 | **Sn** | 1 | 58 |
| **Ti** | 19 | 11 | **Ba** | 7,8 | 8 |
| **Cr** | 5,2 | 8 | **Hg** | 0,2 | 37 |
| **Mn** | 8,7 | 8 | **Pb** | 3 | 68 |
| **Co** | 0,19 | 13 | **U** | 0,31 | 9 |

La *Undaria pinnatifida* (Material de referència: MR) té una concentració d'arsènic total de 29 ± 1 mg As $kg^{-1}$, del qual se n'extreuen 23,9 ± 1 mg As $kg^{-1}$ amb aigua que representa un rendiment d'extracció del 84 %. Les espècies presents a la mostra són DMA (0,40 ± 0,01 mg As $kg^{-1}$), $PO_4$-sug (4,55 ± 0,02 mg As $kg^{-1}$) i un compost aniònic no identificat (UA: 5,24 ± 0,18 mg As $kg^{-1}$) i un altre de catiònic no identificat (UC: 8,46 ± 0,06 mg As $kg^{-1}$ catió no identificat). Els compostos no identificats representen el 73 % de les espècies quantificades. Els cromatogrames corresponents es poden veure a la Figura 37. La recuperació de columna aniònica és del 78,1 %.

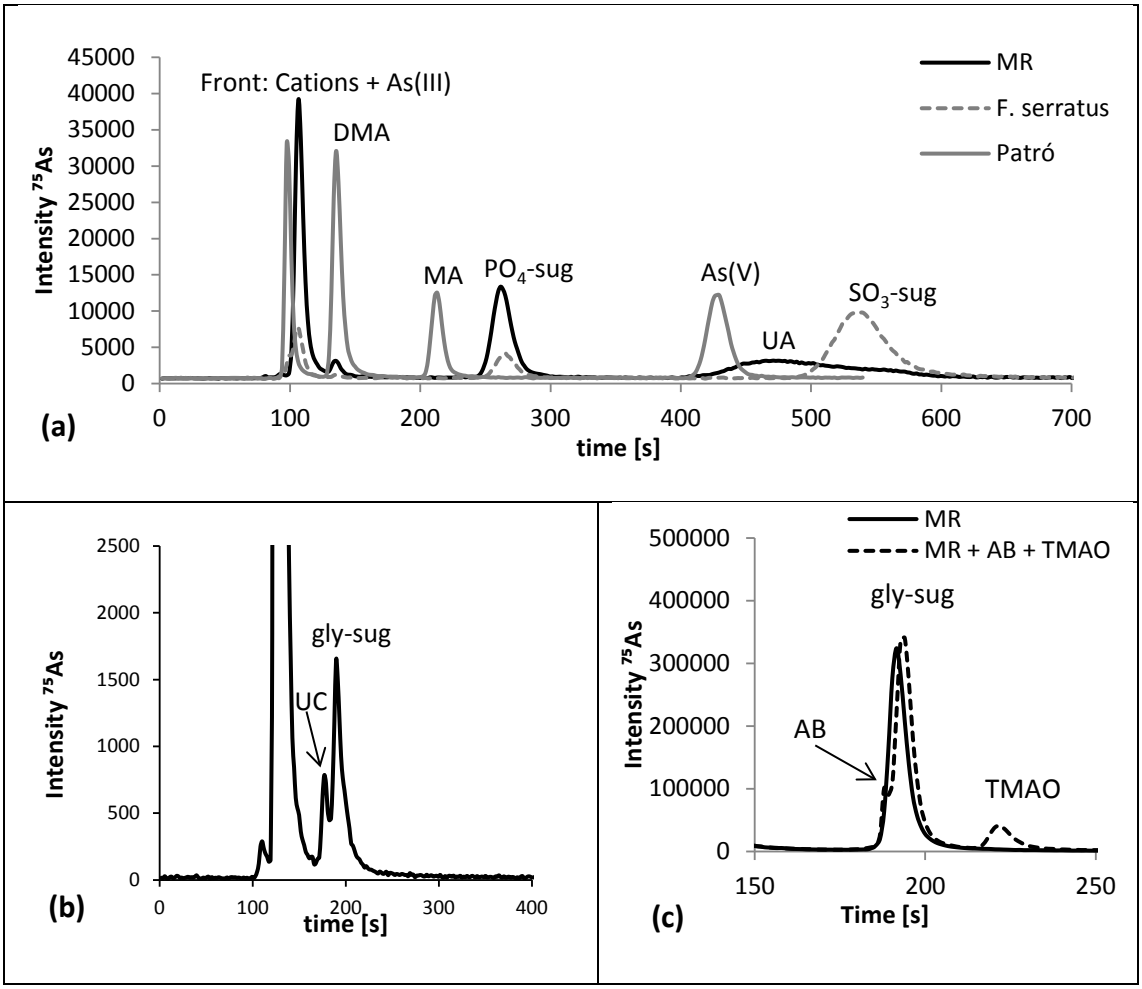



**Figura 37: Cromatogrames de bescanvi aniònic (a) i catiònic (b) del MR abans de l'estudi d'estabilitat. Els cromatogrames de la figura c corresponen al MR i a l'addició de patró (10 µg As $l^{-1}$) de AB i TMAO (realitzats en dies diferents); es poden veure dos pics solapats.**

Les estratègies seguides per a la identificació dels compostos són l'elució de mostres addicionades amb patró i l'espectrometria de masses. La manca de patrons d'arsenosucres dificulta la primera estratègia com a sistema de confirmació, però permet descartar altres compostos com la AB. El compost UA elueix entre el As(V) i el $SO_3$-sug. El pic deixa intuir la presència de dos compostos, el segon dels quals en ordre d'elució podria correspondre a $SO_3$-sug, malauradament els dos compostos no estarien resolts adequadament. La Figura 37c il·lustra la cromatografia catiònica realitzada en una altra sessió de treball. L'addició de patró de AB resulta en l'aparició de dos pics nous a la mostra (AB i TMAO). Per tant, es descarta la presència de AB a la mostra. Per tal d'identificar el compost, l'extracte de material de referència es va purificar amb mitjançant SPE (C-18) i es va procedir al seva anàlisis amb LC-ESI-TOF-MS. Del cromatograma obtingut amb mode SCAN (Figura 38) se n'extreuen els corresponents a les m/z 97, 135, 237 (fragmentacions típiques del arsenosucres) i 328 (ió molecular

$[M+H]^+$ del gly-sug). S'observa la presència de les masses 97 a $t_R$ lleugerament superior a l'AB ($t_R$ 3.5 min), per tant el compost UC s'atribueix al gly-sug i a productes de degradació del mateix que poden presentar fragments de la mateixa massa que ell.

La ANOVA ($\alpha$=0,05) indica que la mostra és homogènia per a As total, $PO_4$-sug, UA i gly-sug; però no per DMA. Aquest darrer compost no presenta una bona resolució respecte el front de cations, el que en dificulta la correcta quantificació i per tant es descarta per a avaluar l'homogeneïtat del material.

### 3.4.3 DISCUSSIÓ I RECOMANACIONS

L'homogeneïtat del material de referència és adequada pel que fa als paràmetres estudiats; tanmateix, el compost o compostos eluïts entre el As(V) i el $SO_3$-sug no s'han pogut separar correctament ni identificar. A més, cal afegir que la finalitat del material és el control de qualitat en especiació d'arsènic en algues i per això seria més a dient si contingués els quatre arsenosucres que les algues presenten normalment ($PO_4$-sug, $SO_3$-sug, $SO_4$-sug, gly-sug). Aquest fet, juntament amb la presència de compostos no identificats, pot dificultar l'ús del material com a control en l'especiació d'arsènic en algues. Es proposa la preparació d'un material amb l'alga *F. vessiculosus*, ja que compleix següents requeriments: concentració adequada d'arsènic, presència dels quatre arsenosucres d'interès i és fàcil d'obtenir al mercat local.

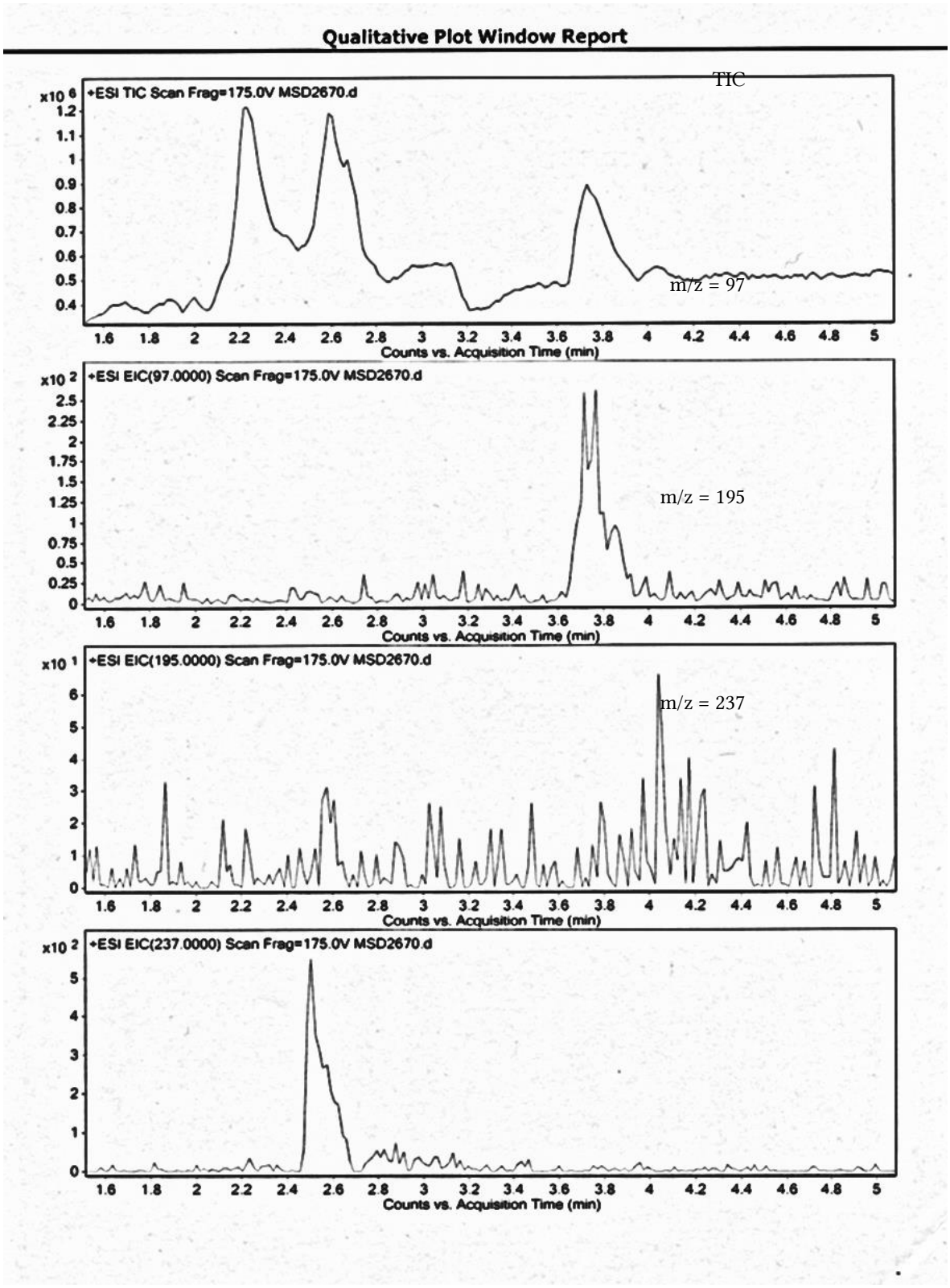



**Figura 38: Cromatograma de LC-MSD-TOF de bescanvi catiònic on es pot veure l'elució d'un compost de m/z 97 que correspon a una fragmentació d'un arsenosucre.**

# CAPÍTOL 4

# Capítol 4

## ESTUDIS DE CAIRE AMBIENTAL I CONTRIBUCIÓ AL CONEIXEMENT DEL BIOGEOCICLE DE L'ARSÈNIC

Aquest capítol se centra en l'obtenció d'informació del contingut d'arsènic i d'espècies d'arsènic en algues i plantes aquàtiques de diverses zones geogràfiques d'especial interès ambiental no estudiades anteriorment, com és el golf Termaic (Grècia), la costa caribenya de Panamà, la Terra del Foc (Argentina) i l'arxipèlag de Santorí (Grècia). També s'han analitzat mostres provinents d'aigües continentals, en concret de la conca del riu Loa (Xile). D'altra banda, la informació obtinguda en alguns estudis contribueix a la comprensió del biogeocicle de l'arsènic, local i globalment.

### 4.1 Estudi de l'impacte de l'arsènic, d'origen natural i antropogènic, en algues del golf Termaic, Egeu Nord (Grècia)

En aquest estudi es determina la concentració d'arsènic i d'espècies d'arsènic algues recollides en tres punts de mostreig del golf Termaic (Grècia). Les algues estudiades són: *Cystoseira barbata, Cystoseira spinosa, Padina pavonica, Gracilaria* sp., *Gracilaria verrucosa, Hypnea musciformis, Codium fragile, Ulva intestinalis.* Aquesta zona s'ha seleccionat pel seu interès ambiental, ja que està afectada per contaminació urbana i industrial. Els únics estudis que es troben a la bibliografia sobre algues d'aquesta zona estan enfocats a la bioacumulació de metalls (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb i Zn) en tres espècies d'algues (*Ulva linza*, *U. rigida* i *G. verrucosa*).[155–161] Així mateix, també existeixen estudis de l'acumulació de Ca, Cd, Cu, K, Mg, Na, Pd i Zn en algues de la mateixa espècie o gènere que les del estudi que es presenta (*P. pavonica, Cystoseira zosteroides, Codium bursa, Gracilaria bursa-pastoris* i *U. rigida*) en altres zones de les costes gregues.[162–164]

L'objectiu d'aquest estudi és el de proporcionar dades de l'especiació d'arsènic en algues del golf Termaic per a contribuir als estudis sobre la interacció entre arsènic i algues en aquest hàbitat marí. Val a dir que és el primer estudi d'aquesta naturalesa que es realitza en algues d'aquesta zona.

### 4.1.1 DESCRIPCIÓ DE LA ZONA D'ESTUDI

El golf Termaic es troba al nord-oest del mar Egeu (Figura 39) i la seva àrea, volum i profunditat màxima són de 518 $km^2$, 11,33 $km^3$ i 36 m. Els rius Axios, Aliakmon, Loudias i Galikos desemboquen al golf aportant una quantitat de 3 – $4 \cdot 10^6$ $m^3$ anuals de sediments.[165] Al nord, el golf es fa estret i té continuïtat al golf de Tessalònica, on es troba la ciutat homònima. Dins del golf de Tessalònica, hi ha un corrent circular de sentit horari.[166] El golf rep efluents industrials, agrícoles i urbans parcialment tractats.[167–169] Al nord-oest del golf de Tessalònica hi descarreguen efluents provinents d'indústries alimentàries, d'adoberia de pell, de pintures en base crom, destil·leries petroquímiques i fàbriques de producció electrolítica de diòxid de manganés.[170] El port de Tessalònica suporta un trànsit elevat de vaixells de càrrega que aboquen olis i lubricants al mar.

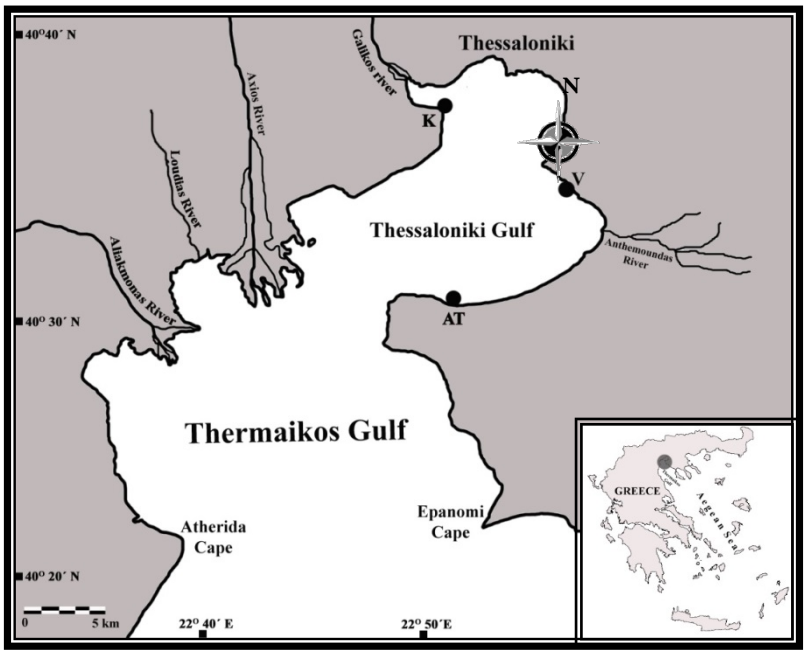



**Figura 39: Localització geogràfica del golf Termaic a l'Egeu nord amb les zones de mostreig (K, V i AT) indicades.**

Es van escollir tres punts estratègics del golf per a mostrejar les algues. La zona de Kalochori (K) està situada a prop d'una zona industrial, el port i la sala de bombes de la principal estació depuradora d'aigües residuals (EDAR) de Tessalònica. La zona costera de Viamyl (V) rep efluents d'una EDAR i d'una petita fàbrica de processament de midó, descàrregues urbanes sense tractar i aigua dolça del torrent Anthemoundas; aquesta zona es considerada altament contaminada.[171] Agia Triada (AT) és un complex turístic situat relativament lluny del port, de l'activitat industrial i d'efluents domèstics.[167] Els

paràmetres fisicoquímics de l'aigua i dels sediments, i la localització geogràfica dels tres punts de mostreig es troben a la Taula 15.

**Taula 15: Localització i propietats fisicoquímiques dels punts de mostreig del golf Termaic.**

| Zona de mostreig | Kalochori | Viamyl | Agia Triada |
|---|---|---|---|
| **Codi** | K | V | AT |
| **Coordenades** | 40° 36'N, 22° 51'E | 40° 33'N, 22° 58'E | 40° 30'N, 22 ° 52'E |
| **Temperatura** | 10,4 – 22,0°C | 12.3 – 26.6°C | 12,7 – 26,6°C |
| **Salinitat** | 35,5 – 35,6 psu | 33,4 – 36,6 psu | 34,1 – 36,9 psu |
| **pH** | 7,8 – 8,5 | 7,6 – 9,1 | 7,4-9,4 |
| **Diàmetre mig del sediment** | 710 µm | 150 – 168 µm | 225 – 637 µm |
| **Matèria orgànica mitja del sediment** | 2,5 % | 0,85 – 1,49 % | 0,55 – 1,25 % |

### 4.1.2 PRESA, PRETRACTAMENT I ANÀLISI DE LES MOSTRES

Es van realitzar tres mostrejos estacionals (juny, setembre i desembre de 2007) en els tres punts de mostreig on es van recollir les espècies dominants en cada presa de mostra. Les algues es van tallar arran del nivell del sediment, es van rentar amb aigua de mar *in situ*, es van segellar en bosses de plàstic amb aigua de mar. Les mostres es van identificar al laboratori i es van congelar a -18°C fins el seu transport a Barcelona en un recipient refrigerat amb $CO_2$(s). Al laboratori del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, les mostres es van descongelar, els epífits i altres impureses es van eliminar amb pinces amb l'ajuda d'una lupa binocular, es van assecar a 40°C a l'estufa, es van polvoritzar amb un morter d'àgata i es van emmagatzemar en ampolles de PET fins a la seva anàlisi. Donada la poca quantitat de mostra, en algunes anàlisis es va estimar el contingut total d'arsènic com la suma de l'arsènic de l'extracte aquós fet servir en els estudis d'especiació i la de l'arsènic total en la digestió oxidant del pèl·let.

### 4.1.3 RESULTATS

*Contingut d'arsènic total*

El contingut d'arsènic en teixits de les algues varia entre 1,4 i 55,0 mg As $kg^{-1}$ (Taula 16). La mostra que presenta una concentració més elevada d'arsènic és la *Cystoseira barbata* (AT, hivern), seguides de *Codium fragile* (V, hivern; AT, estiu), *Cystoseira spinosa* (AT, Tardor), *Padina pavonica*, *C. fragile* (V, estiu) *Gracilaria* spp. i *Ulva* spp. Si es considera l'època de l'any, els intervals del contingut d'arsènic a les

mostres analitzades són de 1,9 – 23,0 mg As $kg^{-1}$ al juny, 1,4 – 16,8 mg As $kg^{-1}$ al setembre i 2,2 – 55,0 mg As $kg^{-1}$ al desembre.

**Taula 16: Contingut d'arsènic total de les algues del golf Termaic (en mg As $kg^{-1}$, mitjana ± desviació estàndard, n=3).**

| Espècie | Mes | AT | K | V |
|---|---|---|---|---|
| ***Cystoseira barbata*** | Des | 55 ± 2 [A] | - | - |
| ***Cystoseira spinosa*** | Set | 16,8 ± 0,8 | - | - |
| ***Padina pavonica*** | Jun | 11,5 ± 0,8 [A] | - | - |
| | Set | 11,3 ± 0,5 [A] | - | - |
| ***Gracilaria* sp.** | Des | - | - | 7,1 ± 0,4 |
| ***Gracilaria verrucosa*** | Des | - | 9,0 ± 0,2 | 12,2 ± 0,5 |
| | Jun | - | - | 5,7 ± 0,2 [A] |
| | Set | - | 7,2 ± 0,5 | 6,2 ± 0,2 |
| ***Hypnea musciformis*** | Jun | 4,6 ± 0,4 | - | 5,0 ± 0,2 [A] |
| ***Codium fragile*** | Jun | 23 ± 1 | - | 7,4 ± 0,3 [A] |
| | Des | - | - | 39,0 ± 0,4 [A] |
| ***Ulva intestinalis*** | Jun | 1,9 ± 0,1 | - | - |
| | Des | - | - | 4,3 ± 0,2 |
| ***Ulva rígida*** | Set | 1,4 ± 0,1 | 2,7 ± 0,3 | - |
| ***Ulva lactuca*** | Des | - | - | 2,2 ± 0,2 |

[A]: As total com la suma de l'arsènic contingut a l'extracte aquós i al pèl·let.

*Especiació d'arsènic*

L'eficiència de l'extracció oscil·la entre el 9 % (*C. fragile*, AT, estiu) i el 69 % (*C. barbata*, AT, hivern) (Taula 17). Els resultats de l'especiació es troben a la Taula 18. Les principals espècies determinades són els arsenosucres, en totes s'ha determinat gly-sug i cap d'elles s'ha detectat $SO_4$-sug. Respecte a les algues verdes, cap d'elles presenta $SO_3$-sug i només una mostra presenta $PO_4$-sug (*C. fragile,* V, estiu). L'arsenosucre $SO_3$-sug està present en totes les algues brunes i $PO_4$-sug es detecta en una mostra de *P. pavonica* (AT, tardor).

**Taula 17: Eficiències d'extracció i recuperacions de columna de les mostres del golf Termaic.**

| Espècies | Lloc-Data | Eficiència d'extracció | Rec. de Columna | Espècies | Lloc-Data | Eficiència d'extracció | Rec. de Columna |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Cystoseira barbata*** | **AT – DES** | 69 % | 76 % | ***Hypnea musciformis*** | **AT – JUN** | 25 % | 16 % |
| ***Cystoseira compressa*** | **AT – SET** | 30 % | 66 % | | **V - JUN** | 18 % | 11 % |
| ***Padina pavonica*** | **AT – JUN** | 30 % | 38 % | ***Codium fragile*** | **AT – JUN** | 14 % | 19 % |
| | **AT – SET** | 48 % | 22 % | | **V – JUN** | 47 % | 44 % |
| ***Gracilaria* sp.** | **K – DES** | 45 % | 68 % | | **V – DES** | 30 % | 46 % |
| ***Gracilaria verrucosa*** | **V – JUN** | 17 % | 36 % | ***Ulva intestinalis*** | **AT – JUN** | 30 % | 27 % |
| | **V – DEC** | 48 % | 75 % | | **V – DES** | 21 % | 103 % |
| | **K – SET** | 9 % | 70 % | ***Ulva lactuca*** | **AT – SET** | 26 % | 24 % |
| | **V - DES** | 41 % | 17 % | | **K – SET** | 65 % | 28 % |
| | **V – SET** | 20 % | 40 % | ***Ulva rigida*** | **V – DES** | 21 % | 35 % |

**Taula 18: Resultats per a l'especiació de les algues del golf Termaic (en mg As $kg^{-1}$, mitjana desviació estàndard, n=3).**

| Espècie [A] | Mostreig lloc - data | As (III) | DMA | MA | As (V) | AB | TMAO | $PO_4$-sug | $SO_3$-sug | gly-sug | Catió no identificat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ■ *Cystoseira barbata* | AT – Des | - | - | - | 27,0 ± 0,8 | 0,020 ± 0,003 | - | - | 1,43 ± 0,08 | 0,40 ± 0,06 | - |
| ■ *Cystoseira compresa* | AT – Sep | - | 0,072 ± 0,004 | - | 3,27 ± 0,07 | - | - | - | 1,3 ± 0,1 | 0,35 ± 0,01 | - |
| ■ *Padina pavonica* | AT – Jun | - | Detectat | 0,07 ± 0,01 | 0,164 ± 0,003 | - | - | - | 0,62 ± 0,01 | 0,388 ± 0,006 | - |
| | AT – Sep | - | Detectat | Detectat | 0,38 ± 0,02 | - | - | Detectat | 0,52 ± 0,04 | 0,197 ± 0,005 | - |
| ▲ *Gracilaria* sp. | K – Des | 0,05 ± 0,01 | - | - | 0,50 ± 0,02 | - | - | - | 1,21 ± 0,05 | 1,27 ± 0,07 | - |
| ▲ *Gracilaria verrucosa* | V – Jun | - | - | - | Detectat | - | - | 0,12 ± 0,01 | - | 0,253 ± 0,002 | - |
| | V – Des | Detectat | - | Detectat | Detectat | - | - | Detectat | 1,26 ± 0,04 | 1,10 ± 0,02 | - |
| | K – Des | - | 0,052 ± 0,006 | - | Detectat | - | - | 0,28 ± 0,05 | Detectat | 0,164 ± 0,001 | - |
| | V – Des | - | - | - | 0,68 ± 0,007 | - | - | 0,53 ± 0,01 | Detectat | 0,232 ± 0,005 | - |
| | V – Sep | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,754 ± 0,009 | - |
| ▲ *Hypnea musciformis* | AT – Jun | 0,048 ± 0,009 | - | - | - | - | - | - | - | 0,155 ± 0,006 | 0.046 ± 0.008 |
| | V – Jun | - | - | Detectat | - | - | - | - | - | 0,103 ± 0,005 | - |
| ▲ *Codium fragile* | AT – Jun | - | 0,062 ± 0,002 | - | - | - | - | - | - | 0,70 ± 0,02 | - |
| | V – Jun | - | 0,059 ± 0,01 | - | - | - | - | 0,26 ± 0,04 | - | 1,20 ± 0,04 | - |
| | V – Des | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,0 ± 0,9 | 0.104 ± 0.045 |
| ◆ *Ulva intestinalis* | AT – Jun | 0,049 ± 0,02 | - | - | - | - | - | - | - | 0,044 ± 0,001 | 0.038 ± 0.004 |
| | V – Des | 0,041 ± 0,004 | - | - | - | - | 0,081 ± 0,004 | - | - | 0,068 ± 0,001 | - |
| ◆ *Ulva lactuca* | AT – Sep | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,075 ± 0,002 | 0.031 ± 0.006 |
| | K – Sep | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,433 ± 0,005 | - |
| ◆ *Ulva rígida* | V – Des | - | - | - | Detectat | - | - | - | - | 0,179 ± 0,007 | - |
| **Límit de detecció** | | 0.01 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,003 | 0,009 | 0,03 | 0,01 | 0,008 | |
| **Límit de quantificació** | | 0.04 | 0,05 | 0,06 | 0,1 | 0,01 | 0,03 | 0,1 | 0,3 | 0,03 | |

[A] Símbols de la divisió de les algues: ■ bruna (ocròfits), ▲ roja (rodòfits), ◆ verda (cloròfits).

La proporció d'arsenosucres en les *Gracilaria* spp. és superior a la de resta de mostres. Les mostres de *Cystoseira* spp. i la de *Ulva intestinalis* (V, hivern) tenen com a espècie majoritària el As(V) i el TMAO, respectivament. Els altres compostos quantificats o detectats són AB, DMA, MA i As(III). A tall d'exemple, es representen els cromatogrames de bescanvi aniònic i catiònic de la mostra *P. pavonica* (AT, estiu) a la Figura 40.

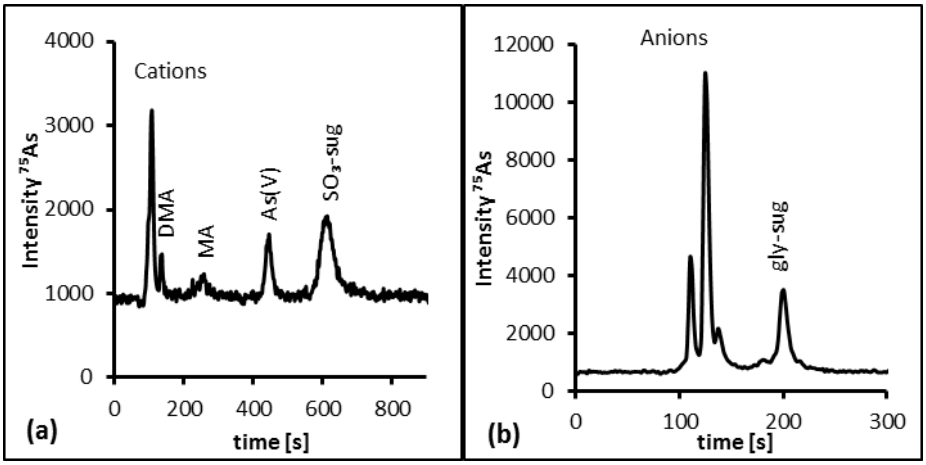



**Figura 40: Cromatogrames de bescanvi aniònic (a) i catiònic (b) de la mostra de *Padina pavonica* de l'estació de mostreig Agia Triada de juny de 2007**

*Paràmetres de qualitat avaluats*

*Recuperació de columna*

La recuperació de columna oscil·la entre el 11 % i el 103 % (Taula 17). Algunes mostres presenten valors de recuperació baixos que es poden atribuir a la presència de compostos d'arsènic que no es poden analitzar amb el mètode de separació emprat.

*Exactitud*

L'exactitud del mètode es va comprovar analitzant el CRM NIES nº9 (Sargasso). El valor obtingut, 99 ± 9 mg As $kg^{-1}$, concorda amb el valor certificat (115 ± 9,2 mg As $kg^{-1}$) si es consideren les incerteses corresponents. Donada la falta de CRM per a espècies d'arsènic, es va especiar l'extracte de *F. serratus*,[132] els resultats i els recollits a la bibliografia es troben a la Taula 38 (Capítol 5, pàgina 131).

*Límit de detecció i límit de quantificació*

Es van estimar els límits de detecció i quantificació, els quals es recullen a la Taula 18.

### 4.1.4 DISCUSSIÓ

*Arsènic total*

El contingut d'arsènic de les algues s'ha intentat relacionar amb la seva classificació taxonòmica. Així trobem diferents estudis que intenten definir seqüències. Morita i Shibata,[172] Almela, *et al.*[173,174] van proposar la seqüència bruna > vermella > verda, mentre que Tukai, *et al.*[87] postulava bruna > verda > vermella. Un estudi publicat a la dècada dels 80 ja indicava el major contingut de As en algues brunes.[175] En aquesta tesi, les mostres del golf Termaic no presenten una seqüència definida, ja que el *Codium fragile* té una concentració més elevada que algunes algues brunes, la morfologia filamentosa que té el seu tal·lus[176] en podria ser l'explicació, ja que les partícules retingudes pels filaments presenten una afinitat per l'arsènic superior a la dels teixits de les algues.[177]

El contingut total d'arsènic de les algues sembla que varïi en funció de l'estació en la qual es recullin. L'augment de la biomassa que l'alga experimenta a l'estiu comporta una disminució del contingut d'elements traça ja que l'absorció es dóna a un ritme inferior al creixement de l'alga.[159,178,179] Aquest efecte va ser descrit per Lai, *et al.* [152] per a l'arsènic i les dades obtingudes en el present estudi mostrarien un paral·lelisme amb aquestes hipòtesis, ja que la concentració a l'hivern (2,2 – 55,0 mg $kg^{-1}$) és lleugerament superior a la de l'estiu (1,9 – 23,0 mg $kg^{-1}$) i la tardor (1,4 – 16,8 mg $kg^{-1}$)

Els resultats que s'han obtingut no permeten fer una comparació consistent entre les tres zones de mostreig ja que no es disposa de les dades suficients. Si es compara el contingut de les algues d'aquests punts de mostreig, es pot veure que a Agia Triada (1,4 – 55,0 mg $kg^{-1}$) és superior al trobat a Viamyl (2,2 – 39,0 mg $kg^{-1}$) i Kalohori (2,7 – 9,0 mg $kg^{-1}$). Els corrents del golf podrien ser les responsables del transport del efluents urbans i industrials fins a la zona de Agia Triada, el que explicaria aquesta distribució de l'arsènic al golf.[161,166]

Els valors obtinguts es van comparar amb els valors d'altres zones geogràfiques per a algues de la mateixa espècie o gènere (veure Taula 19). El contingut d'arsènic total en *Cystoseira barbata* i *C. compresa* a la zona d'estudi és de l'ordre dels valors que es disposa per a altres àrees geogràfiques. Les mostres de *Padina pavonica*, *Gracialia* spp. i *Ulva* spp. tenen un contingut més baix que el d'altres zones descrites a la bibliografia. Tanmateix, el *Codium fragile* té una concentració superior al *C. vermilara* procedent de

la Costa Brava.[66] Aquestes diferències es poden atribuir al nivell ambiental de la zona d'origen, a diferències en l'absorció i l'acumulació d'arsènic entre espècies, l'època de mostreig, l'edat de l'alga i estadi de creixement.[162] En el cas de la *C. barbata*, els resultats concorden amb estudis anteriors que indicaven que té una concentració d'arsènic elevada en comparació amb altres algues.[180]

*Especiació*

La concentració d'arsènic total a les mostres és baixa i, en conseqüència, també la de les espècies. A més, cal considerar que les eficiències d'extracció i les recuperacions de columna tenen un interval de valors molt ampli, fet que s'ha descrit a la bibliografia per a algues i plantes aquàtiques.[103,118] Si considerem que els composts d'interès a la present tesi, en especial els arsenosucres, tenen un caràcter polar molt fort, l'aigua és un extractant adequat.[118] Tanmateix, una fracció important de l'arsènic no es va poder extreure, el que indica que hi ha una proporció elevada d'arsènic que es podria associar amb lípids, que poden arribar a representat el 50 % de l'arsènic total,[116] o a arsènic enllaçat a components cel·lulars o proteïnes no extractables amb aigua.[181,182]

Cal destacar que les mostres de *Cystoseira* spp. tenen el As(V) com a principal espècie d'arsènic, al contrari que la resta de mostres que presenten els arsenosucres com a espècies principals. D'altra banda, destaca la quantificació de AB en *C. barbata* (0,020 ± 0,003 mg As $kg^{-1}$), que en treballs anteriors del grup de recerca s'havia atribuït la presència d'aquest compost a l'acció de microorganismes,[66] mentre que altres autors, a epífits no eliminats a l'etapa de pretractament.[86] Algunes mostres presenten compostos no identificats, com es pot veure al cromatograma de la Figura 41 (*Ulva rigida*, AT, Setembre), on es pot veure la presència d'un pic que elueix entre la AB i el gly-sug.

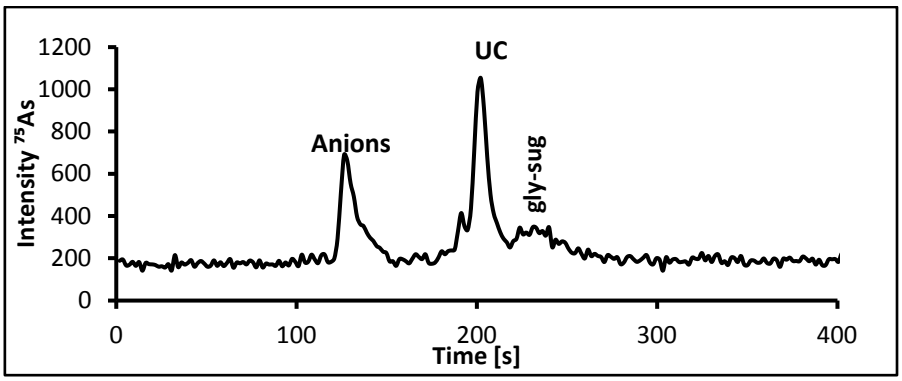



**Figura 41: Cromatograma obtingut per bescanvi catiònic a la mostra *Ulva* rígida (AT, tardor).**

**Taula 19: Valors d'arsènic total (mg As $kg^{-1}$) trobats a la literatura per a espècies dels gèneres *Cystoseira, Padina, Gracilaria, Hypnea, Codium* i *Ulva*.**

| Espècie [A] | Zona de mostreig | As Total | Referència |
|---|---|---|---|
| ■ ***Cystoseira barbata*** | Tartous (Síria) | 131 ± 1 | [183] |
| | Llacuna de Venècia (Itàlia) | 360 ± 50 | [84] |
| | Golf Termaic | 55,0 | Aquesta tesi |
| ■ ***Cystoseira compressa*** | Piran (Eslovènia) | 17,6 ± 0,9 | [86] |
| | Black sea | 28,0 – 48,4 | [180] |
| ■ ***Cystoseira mediterranea*** | Lloret de Mar (Girona) | 39,0 | [66] |
| ■ ***Cystoseira spinosa*** | Golf Termaic | 16,8 | Aquesta tesi |
| ■ ***Cystoseira* sp.** | Lattakia (Síria) | 4,20 ± 0,14 | [183] |
| | Tartous (Síria) | 5,95 ± 0,20 | [183] |
| ■ ***Padina pavonica*** | Piran (Eslovènia) | 1,89 ± 0,09 | [86] |
| | Tartous (Síria) 05/99 | 18,3 ± 0,2 | [183] |
| | Tartous (Síria) 06/00 | 20,9 ± 0,7 | [183] |
| | Golf Termaic | 1,3 – 1,5 | Aquesta tesi |
| ■ ***Padina fraseri*** | Sydney (Australia) | 13 | [87] |
| ▲ ***Gracilaria chilensis*** | Coquimbo (Xile) | 6,6 ± 1,6 | [184] |
| ▲ ***Gracilaria gracilis*** | Llacuna de Venècia (Itàlia) | 32 ± 1 | [84] |
| ▲ ***Gracilaria verrucosa*** | Mar Negre | 12,3 – 17,7 | [180] |
| | Golf Termaic | 5,7 – 12,2 | Aquesta tesi |
| ▲ ***Gracilaria* sp.** | Golf Termaic | 7,1 | Aquesta tesi |
| ▲ ***Hypnea musciformis*** | Golf Termaic | 4,6 – 5,0 | Aquesta tesi |
| ▲ ***Hypnea pannosa*** | Baixa Califòrnia (Mèxic) | 0,28 | [185] |
| ◆ ***Codium vermilara*** | Lloret de Mar (Girona) | 27 | [66] |
| ◆ ***Codium fragile*** | Golf Termaic | 7,4 – 39 | Aquesta tesi |
| ◆ ***Ulva lactuca*** | Golf Termaic | 2,2 | Aquesta tesi |
| ◆ ***Ulva intestinalis*** | Golf Termaic | 1,9 – 4,3 | Aquesta tesi |
| ◆ ***Ulva lactuca*** | Sydney (Australia) | 2,9 | [87] |
| ◆ ***Ulva rigida*** | Tartous (Síria) | 5,03 ± 0,04 | [183] |
| | Lloret de Mar (Girona) | 5,3 | [66] |
| | Llacuna de Venècia (Itàlia) | 12 ± 2 | [84] |
| | Piran (Eslovenia) | 1,35 ± 0,07 | [86] |
| | Mar Negre | 3,2 – 6,4 | [180] |
| | Golf Termaic | 1,39 – 2,7 | Taula 16 |
| | Talcahuano (Xile) | 3,1 ± 0,8 | [184] |

[A] Símbols de la divisió de les algues: bruna (ocròfits)■, (rodòfits) roja ▲, (cloròfits) verda ◆

Aquest estudi és el primer en obtenir resultats en l'especiació d'arsènic en algues del golf Termaic, aquesta contribució pot ser d'utilitat per a la comprensió de comportament i el cicle de l'arsènic al medi marí. La concentració d'arsènic total a les algues dominants del golf Termaic varien entre espècies, època de l'any i zones de mostreig; les concentracions d'arsènic en teixits d'algues a l'inici de l'estiu i de la tardor eren generalment inferiors al de les mostres recollides a l'inici de l'hivern. *Cystoseira* spp. i *Codium fragile* mostren les concentracions més altes, mentre que les *Ulva* spp. les més baixes. Les mostres analitzades tenen una concentració d'arsènic total de l'ordre de les d'altres estudis en algues del mateix gènere (Taula 19). Respecte l'especiació, els arsenosucres són la família de compostos predominants excepte per les mostres de *Cystoseira* spp., les quals presenten l'arsenat com a compost predominant.

## 4.2 Estudi de la presència d'arsènic en algues procedents de la Costa Caribenya de Panamà

El mar Carib és una de les zones amb una biodiversitat més elevada. Tanmateix, una revisió de la bibliografia revela una manca d'estudis pel que fa a la presència d'arsènic i de les serves espècies en els diversos compartiments ambientals de la zona.

La costa de Panamà presenta platges de sorra blanca i aigües cristal·lines, amb praderies marines importants que són l'hàbitat d'una gran varietat d'espècies. Un dels principals usos que se'n dóna és el turisme, en especial, el destinat a esports d'aigua (surf) i el de motxilla. Així mateix, el Canal de Panamà comunica les ribes caribenya (atlàntica) i pacífica d'aquest país, escurçant el temps i la distància que han de recórrer els vaixells i les mercaderies per canviar d'oceà.

L'objectiu parcial d'aquest estudi és l'obtenció de les primeres dades de concentració d'arsènic total i d'espècies en algues i plantes aquàtiques, aprofitant l'oportunitat de comparar mostres provinents de tres localitzacions amb característiques molt diferents (zona del Canal, zona turística i parc marítim).

### 4.2.1 DESCRIPCIÓ DE LES ZONES DE MOSTREIG

Es van seleccionar tres zones de mostreig considerant facilitat d'accés i facilitat per prendre la mostra. Les zones escollides (Figura 42) corresponen a les platges caribenyes d'El Istmito (Bocas del Toro), cai Zapatilla (Bocas del Toro) i platja Sherman (Colón). La presa de mostra es va duu a terme durant el mes d'abril de 2010. Veure Taula 6 (Capítol 2, pàgina 42) per a informació taxonòmica completa. La platja d'El Istmito i cai Zapatilla es troben al nord-est del país, en l'arxipèlag homònim a la província i ciutat de Bocas del Toro (capital provincial). Bocas del Toro és una població d'uns 7.000 habitants[186] i un centre turístic important. El trànsit de llanxes és elevat en tota la zona. La platja més propera és la d'El Istmito, freqüentada principalment per residents i surfistes. A la platja s'hi troben establiments d'oci i restauració. Les algues recollides en aquest punt es trobaven completament immerses en l'aigua. Els cais Zapatilla són els dos cais més occidentals de l'arxipèlag i formen part del Parc Nacional Marítim d'Isla Bastimentos. L'única forma d'accedir als cais és amb llanxa privada i és necessari un permís especial. Els turistes tenen un temps limitat d'estada d'unes dues hores. Les mostres es van recollir a la platja nord-est del cai nord. Les mostres es trobaven completament submergides a l'aigua.

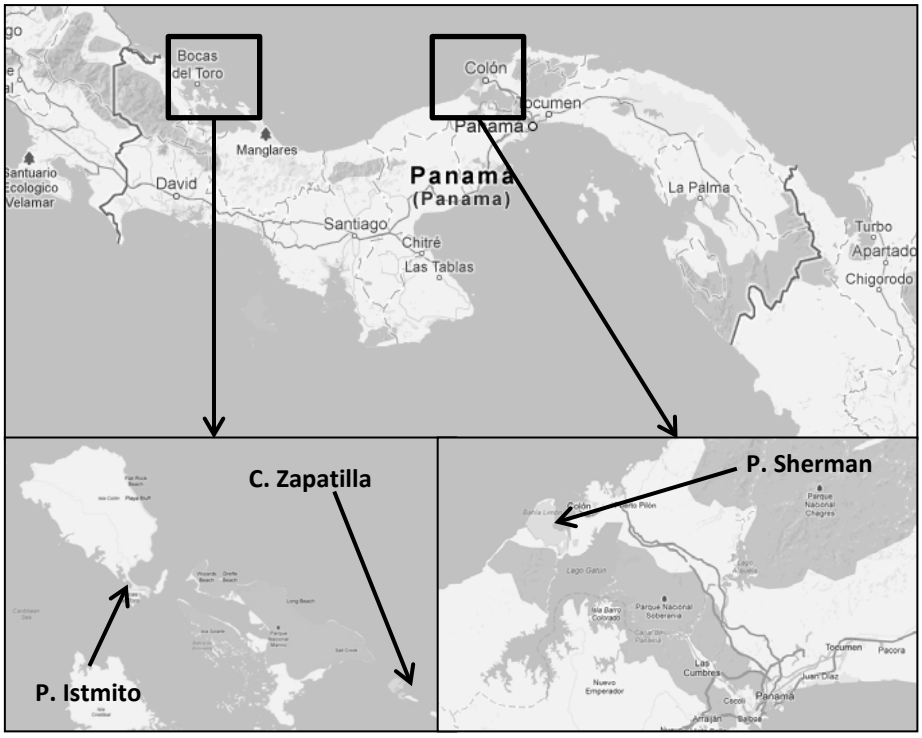



Figura 42: Zones de mostreig de la Costa Caribenya

Platja Sherman es troba a la riba oest de la badia Limón i es troba dins els límits de l'antiga base militar de Fort Sherman (EUA) a punta d'El Toro. A l'altra riba de la badia hi ha la ciutat de Colón. La badia Limón és l'extrem atlàntic (nord) del Canal de Panamà i per tant, per davant la platja hi passa un elevat trànsit de vaixells pesats (a uns 2 km de la platja). En el moment del mostreig, la platja estava tancada degut a l'enfonsament d'un vaixell de càrrega a aproximadament 1 km de la platja (Figura 43). Les mostres es van recollir per sota de la línia de plenamar.

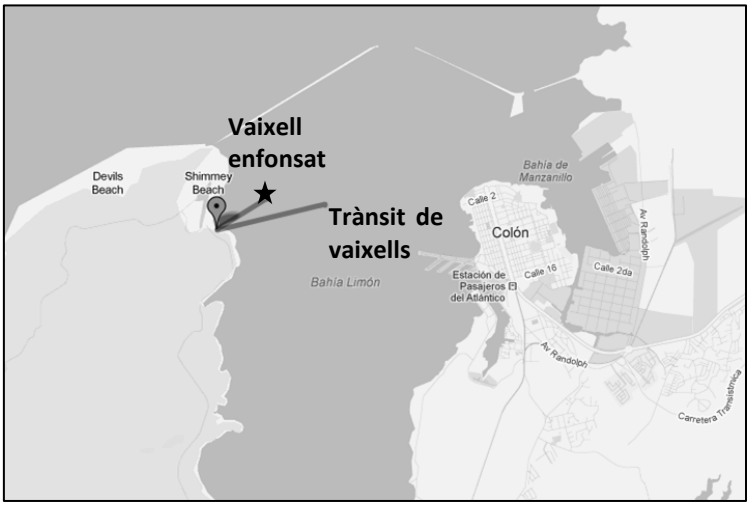



Figura 43: Posició relativa del trànsit marítim a la Platja Sherman.

### 4.2.2 PRESA I PRETRACTAMENT DE LES MOSTRES

Les mostres es van recollir al mes d'abril de 2011. Es van agafar espècimens enters amb totes les parts estructurals, es van netejar *in situ* amb aigua de mar i es van assecar a l'aire durant 36 h. Les mostres es van posar en bosses de plàstic protegides amb paper i es van transportar a Barcelona. Al laboratori, les mostres es van esbandir amb aigua doblement desionitzada i es van assecar durant 24 h més. Les mostres es van identificar, molturar i emmagatzemar en ampolles de PET fins a la seva anàlisi.

### 4.2.3 RESULTATS

Els resultats per a l'arsènic total es poden veure a la Taula 20. L'interval de concentracions comprèn des de 1,69 mg As $kg^{-1}$ fins als 78,45 mg As $kg^{-1}$. Les mostres amb un contingut més elevat corresponen a les de l'espècie *Sargasso* cf. *acinarum* (26 mg As $kg^{-1}$; 67 mg As $kg^{-1}$ i 78 mg As $kg^{-1}$). El valor més baix per a aquesta espècie es dóna a la playa Sherman que *a priori* és la més contaminada, però cal recordar que aquesta mostra es va recollir a la platja i no a l'aigua.

Els resultats de l'especiació es presenten a la Taula 21, que ve acompanyada dels límits de detecció (LD) i quantificació (LQ) per als compostos determinats. Totes les mostres presenten arsènic inorgànic, majoritàriament com a As(V) i totes menys el *Penicillus capitatus* tenen gly-sug. A la majoria de mostres que contenen arsenosucres, el gly-sug és l'únic compost d'aquest grup que hi és present. Destaca el contingut d'arsènic inorgànic de les mostres de *S.* cf. *acinarum*m, així mateix són les úniques mostres que presenten els quatre arsenosucres analitzats (gly-sug, $PO_4$-sug, $SO_3$-sug i $SO_4$-sug). La presència de compostos metilats es dóna en la majoria de mostres. També s'ha trobat un compost que se separa en la cromatografia de bescanvi catiònic, el qual no s'ha pogut identificar (UC).

**Taula 20: Arsènic total en algues i plantes aquàtiques del Carib (mitjana desviació estàndard, n=3, en mg As $kg^{-1}$).**

| Espècie [A] | Lloc | Comentaris | As Total |
|---|---|---|---|
| ● ***Thalassia testudinum*** | Platja Sherman | Epífits calcificats | 1,69 ± 0,06 |
| | Platja Zapatilla | Epífits calcificats | 2,28 ± 0,06 |
| | Platja del Istmito | Epífits calcificats | 1,9 ± 0,1 |
| ■ ***Sargassum* cf. *acinarum*** | Platja Sherman | Rodòfits calcificats, sorra | 26 ± 3 |
| | Cai Zapatilla | Rodòfits calcificats | 67 ± 3 |
| | Platja del Istmito | Rodòfits calcificats | 78 ± 4 |
| ◆ ***Pencillus capitatus*** | Cai Zapatilla | Sorra | 3,5 ± 0,1 |
| ◆ ***Udotea* cf. *flabellum*** | Cai Zapatilla | Sorra | 9,2 ± 0,5 |
| ◆ ***Halimeda* cf. *incressata*** | Cai Zapatilla | Sorra | 1,79 ± 0,06 |
| ■ ***Padina* cf. *sanctae-crucis*** | Cai Zapatilla | Rodòfits calcificats | 10,0 ± 0,3 |

[A] Símbols de la divisió de les algues: bruna (ocròfits) ■, verda (cloròfits) ◆, fanerògames ●.

**Taula 21: Concentració d'espècies d'arsènic en plantes i algues del mar Carib (mitjana ± desviació estàndard, n=3, valors en mg As $kg^{-1}$)**

| Espècie | Lloc | As(V) | As(III) | MA | DMA | TMAO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Thalassia testudinum*** | Platja Sherman | 0,53 ± 0,04 | - | - | - | - |
| | Cai Zapatilla | 0,22 ± 0,03 | detectat | - | detectat | - |
| | Platja del Istmito | 0,54 ± 0,02 | - | - | - | - |
| ***Sargassum* cf. *acinarum*** | Platja Sherman | detectat | 8,7 ± 0,9 | detectat | 0,27 ± 0,01 | - |
| | Cai Zapatilla | 27,8 ± 0,7 | 1,0 ± 0,6 | - | 1,6 ± 0,3 | - |
| | Platja del Istmito | 43 ± 1 | - | detectat | 0,42 ± 0,02 | - |
| ***Pencillus capitatus*** | Cai Zapatilla | 0,18 ± 0,02 | - | - | - | - |
| ***Udotea* cf. *flabellum*** | Cai Zapatilla | 0,54 ± 0,03 | - | 0,16 ± 0,03 | 0,93 ± 0,05 | 0,47 ± 0,09 |
| ***Halimeda* cf. *incressata*** | Cai Zapatilla | 0,11 ±0,01 | - | - | 0,04 ± 0,00 | detectat |
| ***Padina* cf. *sanctae-crucis*** | Cai Zapatilla | 0,96 ± 0,04 | detectat | - | - | - |
| **Límit de detecció** | | 0,027 | 0,008 | 0,015 | 0,012 | 0,008 |
| **Límit de quantificació** | | 0,09 | 0,03 | 0,05 | 0,04 | 0,03 |
| **Espècie** | **Lloc** | **gly-sug** | **$PO_4$-sug** | **$SO_3$-sug** | **$SO_4$-sug** | **UC** |
| ***Thalassia testudinum*** | Platja Sherman | 0,64 ± 0,02 | - | - | - | |
| | Cai Zapatilla | 0,18 ± 0,01 | detectat | - | - | |
| | Platja del Istmito | 0,18 ± 0,00 | - | - | - | |
| ***Sargassum* cf. *acinarum*** | Platja Sherman | 1,31 ± 0,16 | 0,15 ± 0,02 | 0,68 ± 0,06 | 1,6 ± 0,1 | |
| | Cai Zapatilla | 0,70 ± 0,04 | 1,3 ± 0,3 | 0,35 ± 0,07 | 0,8 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| | Platja del Istmito | 0,66 ± 0,07 | 0,21 ± 0,01 | 0,48 ± 0,02 | 1,49 ± 0,09 | |
| ***Pencillus capitatus*** | Cai Zapatilla | - | - | - | - | 0,18 ± 0,01 |
| ***Udotea* cf. *flabellum*** | Cai Zapatilla | 1,51 ± 0,07 | 0,134 ± 0,004 | 2,31 ± 0,07 | - | 0,15 ± 0,02 |
| ***Halimeda* cf. *incressata*** | Cai Zapatilla | detectat | - | - | - | - |
| ***Padina* cf. *sanctae-crucis*** | Cai Zapatilla | 0,14 ± 0,02 | detectat | 1,17 ± 0,07 | - | 0,05 ± 0,01 |
| **Límit de detecció** | | 0,016 | 0,032 | 0,07 | 0,16 | |
| **Límit de quantificació** | | 0,05 | 0,11 | 0,23 | 0,54 | |

Les eficiències d'extracció estan dins dels següent valors: 16 % - 73 % (Taula 22). Les espècies que presenten una eficiència més elevada són les que corresponen als *S.* cf. *acinarum* (62 % - 73 %) i a la *Udotea* cf. *flabellum* (73 %). La *Thalassia tertudium* presenta unes eficiències que oscil·len entre el 45 % i el 67 %, essent la superior la de la mostra de la platja Sherman, que es trobava embarrancada a la sorra, mentre que les d'altres localitats es trobaven al seu hàbitat, és a dir, immerses. La *Padina* cf. *sanctae-crucis* va presentar una eficiència d'extracció del 51 %, de l'ordre de la *T. tertudium*. Els valors més baixos són els del cloròfits *P. capitatus* (16 %) i la *Halimeda* cf. *incressata* (39 %).

**Taula 22: Eficiència d'extracció i recuperacions de columna de les algues i plantes aquàtiques del Carib.**

| Identificació | Lloc | Eficiència d'extracció | Recuperació de columna | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Aniònica | Catiònica |
| ***Thalassia testudinum*** | Platja Sherman | 67 % | 68 % | 91 % |
| | Cai Zapatilla | 45 % | 40 % | 80 % |
| | Platja del Istmito | 57 % | 65 % | 95 % |
| ***Sargassum* cf. *acinarum*** | Platja Sherman | 66 % | 75 % | 90 % |
| | Cai Zapatilla | 62 % | 82 % | 102 % |
| | Platja del Istmito | 73 % | 81 % | 101 % |
| ***Pencillus capitatus*** | Cai Zapatilla | 16 % | 40 % | 75 % |
| ***Udotea* cf. *flabellum*** | Cai Zapatilla | 73 % | 81 % | 105 % |
| ***Halimeda* cf. *incressata*** | Cai Zapatilla | 39 % | 28 % | 68 % |
| ***Padina* cf. *sanctae-crucis*** | Cai Zapatilla | 51 % | 49 % | 84 % |

*Control de qualitat*

Els paràmetres de qualitat es van controlar de forma habitual. L'avaluació de l'exactitud es va fer mitjançant l'anàlisi del CRM BCR 269 Sea lettuce (*Ulva lactuca*), el valor obtingut per a l'arsènic total és de 2,8 ± 0,1 mg As $kg^{-1}$ que se solapa amb l'interval certificat (3,09 ± 0,20 mg As $kg^{-1}$). La quantificació de l'especiació es va avaluar mitjançant la determinació d'espècies d'arsènic en el CRM BCR 269 i l'extracte de *Fucus serratus*[132], i es troba recollida a la Taula 37 (Capítol 5, pàgina 130) i a la Taula 38 (Capítol 5, pàgina 131) juntament amb els valors trobats a la literatura.

Pel que fa a la recuperació de columna, els valors habituals obtinguts varien en funció del tipus de bescanvi i de mostra (Taula 22). Les mostres de *S.* cf. *acinarum* presenten percentatges elevats (> 75 %). La resta de valors de recuperació de columna catiònica són superiors al 75 %, excepte la *H.* cf. *incressata* que només té un 68 %. Els valors de recuperació de columna aniònica de la resta de les mostres són inferiors al 75 % excepte la mostra de *U.* cf. *flabellum* que és del 81 %. El que indica la presència de compostos no quantificables amb aquest sistema cromatogràfic.

### 4.2.4 Discussió

Les mostres analitzades són de sis espècies diferents, que inclouen dues algues brunes (ocròfits), tres de verdes (cloròfits) i una fanerògama marina. El contingut d'arsènic més baix es troba a les mostres de la planta *Thalassia testudinum*, seguida de les algues verdes *Halimeda* cf. *incressata*, *Penicillus capitatus*, *Udotea* cf. *flabellum*, i de l'alga bruna *Padina* cf. *santae crucis*. Les mostres amb una concentració més elevada són les de *Sargassum* cf. *acinarum*, una alga bruna. El fet que les algues brunes tinguin una

concentració superior a la resta de divisions d'algues es troba repetidament a la literatura des dels primers estudis realitzats en aquest camp.[66,87,172–175]

La zona de mostreig no sembla tenir un impacte molt elevat, ja que les algues de zones amb trànsit marítim com pot ser la platja del Istmito presenten nivells de concentració de l'ordre de les provinents del Parc Marítim de Bastimentos (Cais Zapatilla). Desafortunadament, les mostres de la platja Sherman es van recollir de la sorra i no es pot conèixer el moment en el qual l'alga va quedar varada sobre la platja; els possibles efectes que això pot implicar són pèrdues d'arsènic degut al rentat constant del mar, processos de descomposició de l'alga i de degradació de les espècies d'arsènic. La falta de mostra d'alga recollida al seu hàbitat natural impossibilita realitzar comparacions de les quals se'n podria extreure informació interesant del cicle de l'arsènic en algues que no es troben al seu lloc d'origen. Així mateix cal recordar que les estructures macroscòpiques de l'alga no s'havien deteriorat i l'alga es trobava en bon estat.

L'extracció de les espècies d'arsènic amb aigua té un rendiment moderat comparat amb altres mostres, però com indicava Rubio, *et al.*[103] en una revisió bibliogràfica, el mètode d'extracció és crucial en especiació analítica. Considerant que els compostos d'interès en aquest estudi són polars i s'extreuen bé amb aigua, es va decidir fer servir aquest extractant amb un sistema suau per intentar preservar les espècies originals a la mostra. Les recuperacions de columna obtingudes indiquen que, en algunes mostres, molts dels compostos extrets no s'han pogut determinar. Per exemple, només el 28 % de l'arsènic injectat s'ha pogut quantificar amb les columnes bescanvi iònic a la mostra de *H.* cf. *incressata.* Així mateix, cal remarcar la distribució d'arsènic; la presència de la fracció inorgànica i la metilada és destacable per a la majoria de mostres, tot i que els arsenosucres també hi són presents i, en alguns casos, com a majoritaris. Les mostres de *S.* cf. *acinarum* presenten els quatre arsenosucres, mentre que la mostra de *P. capitatus* no presenta arsenosucres. Es pot veure com el gly-sug es troba en les mostres de *T. testudinum*, presència del qual en plantes n'hi havia constància a la literatura.[136]

Les comparacions amb estudis realitzats en altres zones es limiten a les algues brunes i a la *Thalasia*, ja que no s'ha trobat informació de les algues verdes analitzades. Hi ha poques referències que donin valors per a *Thalasia* spp.; els valors típics per a la *Thalasia testudinum* (1,04 – 2,20 mg As $kg^{-1}$) a Laguna Madre, Texas,[187] són de l'odre dels que presenten la mostra del Carib (1,69 – 2,28 mg As $kg^{-1}$). En canvi, la mateixa

espècie a Florida, EUA, té un contingut lleugerament superior (2,0 – 8,2 mg As $kg^{-1}$).[188] Les mostres de *Padina* spp. tenen uns valors de l'ordre dels reportats (1,3 – 20,8 mg As $kg^{-1}$, veure Taula 19 a la secció 4.1.4) en la zona de mostreig (9,98 mg As $kg^{-1}$) en el present estudi.

Les algues del gènere *Sargassum* desperten molt interès degut a que moltes d'elles formen part de la dietes tradicionals. El contingut d'arsènic d'aquestes algues és molt elevat, en especial de la fracció inorgànica i és un tema que genera controvèrsia. L'alga coneguda com a *hiziki* (*Sargassum fusiforme*) és una espècie d'aquest gènere i el seu contingut d'arsènic fa que hi hagi actualment un debat intens sobre la seva seguretat alimentària. A la Taula 23 es recull informació de mostres de sargassos, tots ells destinats al consum del mercat japonès.

**Taula 23:Alguns valors de contingut de As(III), As(V), iAs i As total (mg As $kg^{-1}$)per a diferents espècies de sargassos provinents de Japó.**

| Nom binomial | As(III) | As(V) | iAs | As Total | Referència |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Sargassum fulvellum*** | - | 72 | 72 | 113 | [189] |
| ***Sargassum fusiforme*** | – | – | 73 | 107 | [190] |
| | – | – | 67 – 83 | 95 – 116 | [191] |
| | – | – | 22 – 34 | 45 – 54 | [192] |
| | – | – | 41,6 – 91,2 | 68,3 – 146 | [174] |
| | 1,5 – 10,3 | 29,0 – 32,0 | 33,5 – 39,3 | 41,7 – 44,4 | [193] |
| | – | – | – | 91,2 – 231,0 | [194] |
| ***Sargassum horneri*** | – | – | – | 114,3 – 144,8 | [195] |
| | – | – | – | 51,4 – 59,7 | [195] |
| | – | – | – | 92,1 | [196] |
| ***Sargassum* cf. *acinarum*** | 1,0 – 8,7 | < 0,027 – 43 | 8,7 – 43 | 26 – 78 | Present tesi |

Destaca l'elevat contingut d'arsènic inorgànic, que és superior al 50 % de l'arsènic total en totes les mostres que es reporten. El *S.* cf. *acinarum* presenta una concentració inferior a la de les bibliografia. D'altra banda, els *Sargassum* spp. són unes de les algues que poden presentar els quatre arsenosucres, com revela l'anàlisi del NIES CRM 09 Sargasso (*S. fullvellum*) realitzat per Ruiz-Chancho, *et al.*[136] on es van trobar les següents espècies: DMA (1,69 mg As $kg^{-1}$), As(V) (68,5 mg As $kg^{-1}$), $PO_4$-sug (2,22 mg As $kg^{-1}$), $SO_3$-sug (1,96 mg As $kg^{-1}$), $SO_4$.sug (8,29 mg As $kg^{-1}$) i gly-sug (1,48 mg As $kg^{-1}$). Els resultats de les mostres de *S.* cf. *acinarum* concorden amb aquesta suposició, ja que contenen els quatre arsenosucres analitzats

Aquest estudi és el primer d'aquestes característiques que es realitza en algues de la zona de Panamà. Cal destacar que les mostres de *Sargassum* cf. *acinarum* són les que tenen un contingut superior d'arsènic, seguides de l'altre ocròfit (*Padina* cf. *sanctae-*

*crucis*) i del cloròfit *Udotea* cf. *flabellum*. Els altres cloròfits i la planta *Thalassia testudinum* tenen un contingut baix. El contingut d'arsènic més baix es dóna a les mostres de la platja Sherman, que són les que es van recollir de la sorra. Les mostres recollides en els altres punts de mostreig tenen un contingut semblant. Totes les mostres presenten arsènic inorgànic i totes menys una, *P. capitatus*, contenen arsenosucres; destaca la presència dels quatre arsenosucres a les mostres de *S.* cf. *acinarum*.

## 4.3 Estudi sobre la distribució d'arsènic i espècies d'arsènic en *Cystoseira mediterranea*, *Padina pavonica* i *Macrocystis pyrifera*

Les algues presenten una capacitat molt elevada d'acumular arsènic en ambients amb una concentració baixa d'aquest element.[84–86] Alguns dels factors que poden intervenir en la bioacumulació són: tipus de teixit de l'alga, moment del cicle de vida i factors ambientals.[197] Pel que fa a altres elements en algues, s'ha vist que la distribució d'aquests presenta més d'un comportament.[198] Respecte la distribució de l'arsènic en faneròganes marines, s'ha vist que diferents morfologies presenten una concentració i una distribució d'espècies d'arsènic diferent.[73]

En aquest estudi, s'escull l'alga bruna *Cystoseira*, que presenta una morfologia complexa i diferenciada, per a estudiar les diferències entre les seves parts estructurals (Figura 44a). Aquestes es poden classificar en estructures perennes, disc de fixació, estípit proximal; i en estructures caduques, estípit distal i branques.[176,199] Hi ha poca informació bibliogràfica sobre l'especiació d'arsènic en aquestes morfologies.[66,107,200] Cal destacar la importància biològica d'aquests gènere d'algues, ja que les seves comunitats són candidates a bioindicadors de la qualitat de l'aigua a la Mediterrània Nord-Occidental.[95]

El paper de les algues en el cicle de l'arsènic s'ha estudiat principalment des del punt de vista de la incorporació de l'element en aquests organismes i alguns s'han centrat en la pèrdua progressiva del mateix al llarg del final del cicle de vida de l'espècimen.[73,78,107,201] Atenent a aquest objectiu s'han seleccionat dues algues: la *Padina pavonica* i la *Macrocystis pyrifera*. L'alga *Padina pavonica* és molt abundant a tota la conca del Mediterrani formant estores. El tal·lus està format per fulles calcificades en

forma de vano unides al substrat mitjançant rizoides (Figura 44b).[176,199] S'estudiaran les diferències de concentració d'arsènic total i arsenosucres entre algues recollides al seu hàbitat i les embarrancades a la sorra.

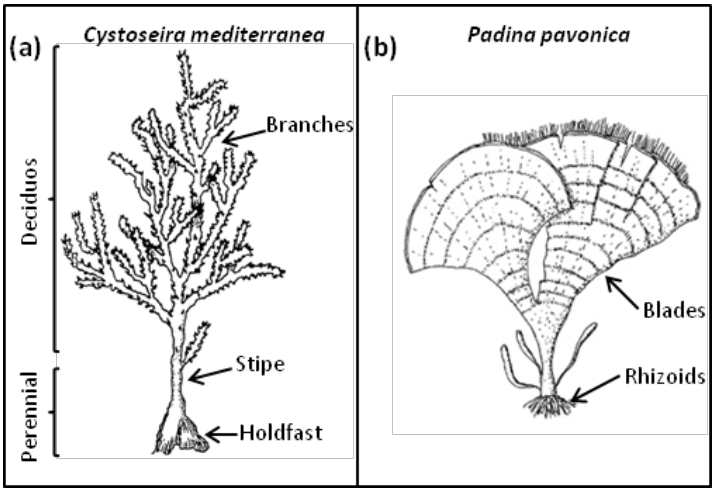



**Figura 44: Esquema de la *C. mediterranea* (a) i de la *P. pavonica* (b). Adaptat de Rodríguez Prieto, 1989.[199]**

L'alga *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh (Laminariales, Ocrophyta) és l'alga coneguda de major mida, fins a 50 m, i té una estructura molt definida. Donades les condicions del mostreig, es diposa de diferents seccions estructurals de *M. pyrifera* provinent de dues localitats recollides en el seu hàbitat i embarrancades a la platja, el que permet comparar les diferències entre la concentració d'arsènic total i l'especiació entre diferents morfologies i etapes del cicles de vida de l'alga. L'estructura de l'alga comprén un disc de fixació, des del qual neix un estípit ramificat del qual neixen les fulles laminars a la base de les quals s'hi troba una vesícula plena d'aire que fa les funcions de flotador (Figura 45).[202] La seva distribució comprèn les costes del Pacífic Nord-Est (d'Alaska a Califòrnia) i les aigües fredes de l'hemisferi sud, T < 21°C (Sud-Amèrica, Nova Zelanda, Sudàfrica i sud d'Austràlia) [203]. Donada la seva mida i la capacitat de formar boscos submarins té una gran importància ecològica ja que serveix com a refugi, hàbitat i zona de caça d'una varietat d'espècies, i a causa de la seva mida i densitat de població és capaç de modificar els corrents oceànics, la quantitat de llum i la química de l'ecosistema.[204]

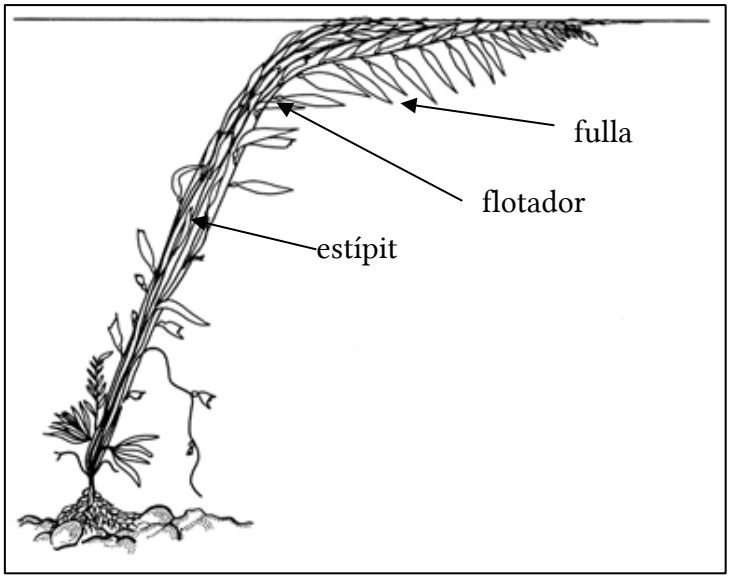



**Figura 45: Esquema de la *M. pyirifera*. Aadaptat de North i Hubbs, 1968.**[208]

### 4.3.1 DESCRIPCIÓ DE LES ZONES DE MOSTREIG

La *Cystoseira mediterranea* i la *Padina pavonica* es van mostrejar a la Platja de Santa Cristina, la descripció del qual es troba a la secció 3.1.1.

La *M. pyrifera* prové de la riba argentina (nord) del canal de Beagle a l'Illa Gran de Terra del Foc (veure Figura 46). El canal és un estret entre l'Illa Gran i les illes australs de l'arxipèlag. Té una longitud de 240 km i una amplada d'entre 5 i 50 km. Va ser descobert al 1830 en una expedició hidrogràfica del bergantí HMS Beagle, el vaixell del qual pren el nom. Aquest canal és un dels tres passos naturals entre els oceans Atlàntic i Pacífic, tot i que és navegable per vaixells de grans dimensions, aquest solen optar per l'estret de Magallanes, al nord, o el pas de Drake, al sud, essent el darrer el pas principal entre ambdós oceans. El vaixells de vela eviten els dos estrets ja que sovint la seva falta d'espai evita que puguin maniobrar correctament. Hi ha molts pocs estudis que hagin estudiat el contingut d'arsènic total i d'espècies d'arsènic en algues d'aquesta regió austral.[205–207] Els punts de mostreig són Estancia Harberton i Fin del Mundo (Argentina) a la província de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur (veure Figura 47). Ambdues zones de mostreig es troben a prop de la ciutat Ushuaia (capital provincial) i són punts d'interès turístics als quals s'arriba en embarcacions destinades a aquesta finalitat.

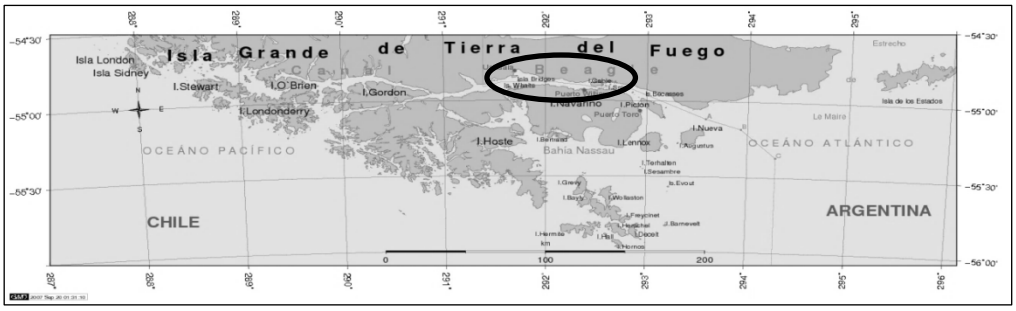



**Figura 46: Mapa del canal de Beagle a la Terra del Foc on s'indica la ubicació de les zones de mostreig.**

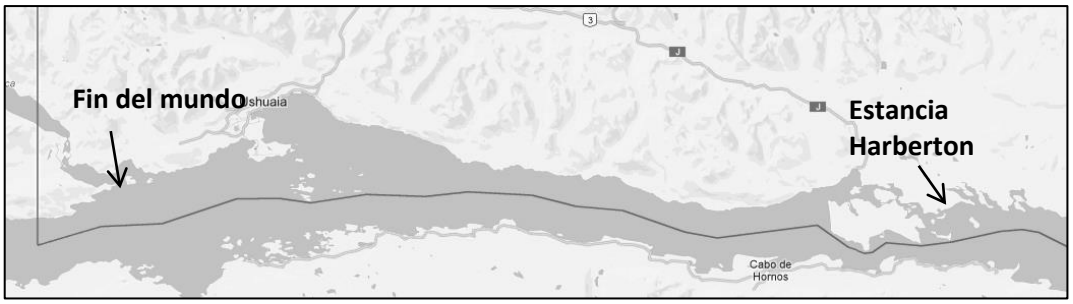



**Figura 47: Zones de mostreig al Departamento de Ushuaia.**

### 4.3.2 PRESA I PRE-TRACTAMENT DE LES MOSTRES

El mostreig a Lloret de Mar es va realitzar el 7 de setembre de 2010. Deu individus de *C. mediterranea* es van recollir de les roques amb cura per tal d'obtenir el disc de fixació d'algun d'ells. La *P. pavonica* es va recollir de la roca on estava unida formant una estora i de la sorra de la platja. Probablement, l'alga va ser arrancada durant una llevantada el 4-5 de setembre. Aquesta mostra es trobava completament fora de l'aigua, en condicions aeròbiques i exposada a la radiació solar i a canvis de temperatura. Així mateix es va recollir una mostra d'aigua en un envàs de PET. Les mostres es van dipositar en bosses de plàstic i es van traslladar al laboratori en nevera, on es van guardar en aigua de mar fins al seu pre-tractament el dia següent, que consistí en eliminar els epífits amb unes pinces de laboratori i una neteja amb aigua doblement desionitzada per eliminar sorra i altre material de la superfície. Les mostres de *C. mediterranea* es van fraccionar amb l'ajuda d'un bisturí en disc de fixació, estípit i branques. L'estípit es va decorticar, separant-ne l'escorça de la medul·la amb una fulla d'afaitar. Les mostres es van assecar a 40°C, molturar amb un morter d'àgata i emmagatzemar en ampolles de vidre ambre amb obturador fins a la seva anàlisi.

La *M. pyrifera* es va recollir en els dos llocs de mostreig indicats anteriorment. Les mostres es van recollir directament tant dins de l'aigua i com embarrancades a la sorra.

Les mostres del Fin del Mundo es van recollir amb una forca des d'una passarel·la d'amarratge d'embarcacions de pesca. Les mostres recollides a l'aigua a la Estancia Harberton es van recollir des de la vora. L'aspecte de les mostres recollides a la platja era molt diferent a les dues localitats; les mostres del Fin del Mundo estaven assecades i portaven dies a la platja, en canvi les mostres de la Estancia Harberton no duien gaire hores a la vora. Es van deixar assecar a l'aire i es van transportar en bosses de plàstic. Al laboratori es van netejar, esbandir i assecar completament sota flux d'aire. Es van separar les morfologies flotador, fulla i estípit (que no es va poder decorticar degut a la seva duresa); es van molturar amb morter d'àgata o molí de boles de carbur de tungstè segons la quantitat de mostra, i es van emmagatzemar en ampolles de PET fins la seva anàlisi.

### 4.3.3 Resultats

Els resultats per a la *C. mediterranea* i la *P. pavonica* s'expressen en pes sec (humitat estimada a 105 ± 5°C fins a pes constant). La humitat en la mostra de *M. pyrifera* no ha estat estimada degut a la poca quantitat de mostra.

*Aigua de mar a Santa Cristina*

La concentració d'arsènic estimada en l'aigua de mar de la platja de Santa Cristina al moment del mostreig és de 1,4 ± 0,2 μg As $l^{-1}$, i es troba dins dels valors que normalment es donen per al Mediterrani (1,1 – 1,9 μg As $l^{-1}$).[85]

*Cystoseira mediterranea*

La concentració d'arsènic varia considerablement entre les diferents estructures de l'alga que segueixen el següent ordre de concentració: branques (75 mg As $kg^{-1}$) > còrtex de l'estípit (60 mg As $kg^{-1}$) > medul·la de l'estípit (34 mg As $kg^{-1}$) > disc de fixació (24 mg As $kg^{-1}$) (Taula 24). S'observa una major desviació estàndard pel disc de fixació que es pot deure a una baixa homogeneïtat de la mostra, ja que el disc de fixació conté, a més, un residu que prové de roca present a la mostra que estava fortament adherida a aquesta morfologia i no es va poder eliminar amb el tractament físic de neteja.

Taula 24: Concentració d'arsènic total i espècies d'arsènic en mostres de *C. mediterranea* i *P. pavonica* (en mg As $kg^{-1}$, mitjana ± desviació estàndard, n=3)

| | | Total As | As(V) | As(III) | MA | DMA |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Cystoseira mediterranea* | Branques | 75 ± 4 | 35 ± 1 | 0,7 ± 0,2 | < 0,15 | 0,99 ± 0,05 |
| | Còrtex | 60 ± 4 | 13,7 ± 0,7 | 2,3 ± 0,8 | 0,74 ± 0,07 | 7,3 ± 0,3 |
| | Medul·la | 34 ± 5 | 1,29 ± 0,08 | 0,66 ± 0,05 | - | 0,25 ± 0,01 |
| | Disc | 24 ± 4 | 1,1 ± 0,2 | 0,23 ± 0,01 | < 0,15 | 0,33 ± 0,02 |
| *Padina pavonica* | Viva | 9 ± 1 | 1,4 ± 0,1 | 0,09 ± 0,08 | < 0,15 | 0,9 ± 0,1 |
| | Embarrancada | 7,7 ± 0,5 | 2,5 ± 0,2 | 0,23 ± 0,05 | 0,23 ± 0,01 | 0,13 ± 0,02 |
| Límit de detecció | | 0,003 | 0,08 | 0,02 | 0,05 | 0,03 |
| Límit de quantificació | | 0,01 | 0,22 | 0,07 | 0,15 | 0,11 |
| | | gly-sug | $PO_4$-sug | $SO_3$-sug | AB | Anió no identificat |
| *Cystoseira mediterranea* | Branques | 2,99 ± 0,01 | 0,31 ± 0,01 | 8,9 ± 0,6 | 0,26 ± 0,01 | 0,17 ± 0,01 |
| | Còrtex | 3,7 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1 | 6,6 ± 0,2 | 0,64 ± 0,09 | 0,76 ± 0,03 |
| | Medul·la | 2,9 ± 0,2 | - | 19 ± 1 | - | - |
| | Disc | 1,51 ± 0,01 | < 0,29 | 13 ± 2 | 0,22 ± 0,02 | 0,15 ± 0,03 |
| *Padina pavonica* | Viva | 0,53 ± 0,03 | 0,3 ± 0,03 | 1,7 ± 0,2 | < 0,07 | 0,20 ± 0,02 |
| | Embarrancada | < 0,49 | - | < 1,36 | < 0,07 | - |
| Límit de detecció | | 0,15 | 0,09 | 0,41 | 0,02 | |
| Límit de quantificació | | 0,49 | 0,29 | 1,36 | 0,07 | |

Les eficiències d'extracció es troben dins de l'interval 80 % – 106% (Taula 25). L'eficiència d'extracció més baixa es dóna al còrtex de l'estípit. Es van determinar 9 espècies d'arsènic a l'alga, les quals es troben en totes les morfologies excepte la medul·la de l'estípit que no presenta MA, $PO_4$-sug, AB i un compost aniònic no identificat

Taula 25: Eficiències d'extracció i recuperacions de columna de les mostres de *C. mediterranea* i *P. pavonica.*

| | | Ef. Ext. | Rec. Col An. | Rec. Col Cat. |
|---|---|---|---|---|
| *Cystoseira mediterranea* | Branques | 93 % | 71 % | 95 % |
| | Còrtex | 80 % | 77 % | 82 % |
| | Medul·la | 106 % | 70 % | 99 % |
| | Disc | 95 % | 74 % | 99 % |
| *Padina pavonica* | Viva | 76 % | 72 % | 81 % |
| | Embarrancada | 68 % | 60 % | 83 % |

Els cromatogrames per a cadascuna de les morfologies revelen que el compost majoritari en el còrtex i les branques és el As(V) mentre que a la medul·la i al disc de fixació ho és el $SO_3$-sug (Figura 48). El còrtex de l'estípit presenta una fracció elevada de DMA.

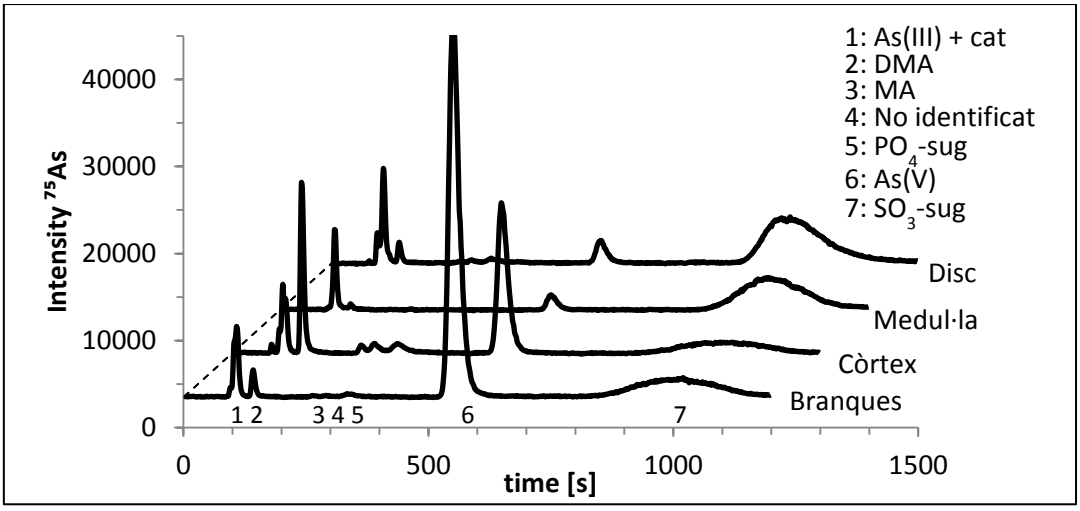



**Figura 48: Cromatogrames de bescanvi aniònic de les diferents parts morfològiques de la *C. mediterranea*.**

*Padina pavonica*

No es van detectar diferències significatives entre la concentració total d'arsènic entre la *P. pavonica* recollida de l'aigua (9 ± 1 mg As $kg^{-1}$) i l'embarrancada a la sorra (7,7 ± 0,5 mg As $kg^{-1}$) (veure Taula 24). Es van detectar un total de 9 compostos d'arsènic en la mostra provinent de l'aigua mentre que només 7 en la mostra arrossegada per la llevantada, la qual no presenta $PO_4$-sug ni l'anió desconegut. L'arsenobetaïna es va detectar, però no quantificar, en ambdues mostres. En comparar els cromatogrames de bescanvi aniònic (Figura 49) s'observa la desaparició dels arsenosucres en la mostra embarrancada; una disminució del As(III) i del DMA, i un augment del As(V) i del MA. Els arsenosucres $SO_3$-sug i gly-sug també es van detectar a nivells molt baixos en la mostra arrancada per la tempesta. L'eficiència d'extracció va ser lleugerament inferior a les mostres recollides a la sorra que a la recollida al seu hàbitat (68 % i 78 % respectivament). Es va descartar la presència de tioarsenosucres segons el test descrit al capítol 2.

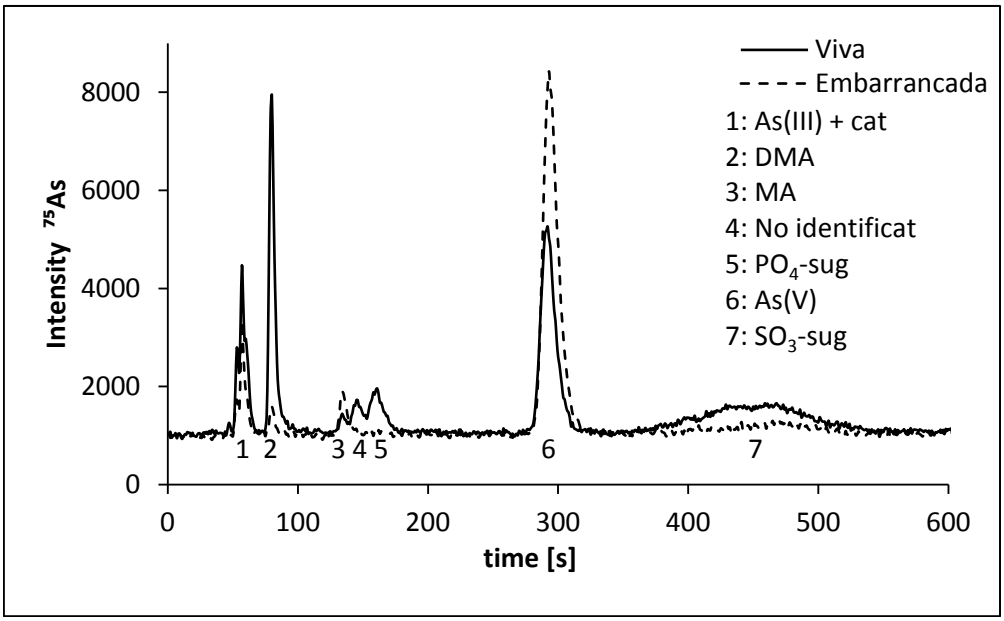



**Figura 49: Cromatogrames de bescanvi aniònic de dues mostres de *P. pavonica*, una d'elles recollida a la sorra, i l'altra viva i al seu hàbitat.**

### *4.3.4 MACROCYSTIS PYRIFERA*

Els resultats per a l'arsènic total en les mostres de *M. pyrifera* es recullen a la Taula 26. Es pot observar que les mostres recollides a la platja presenten un contingut d'arsènic més baix a les recollides a l'aigua, aquesta pèrdua representa entre el 6 % i el 19 % per les mostres de la Estancia Harberton i del 49 % i el 58 % en mostres provinents del Fin del Mundo. L'estructura morfològica amb un contingut més elevat d'arsènic en ambdues zones de mostreig són els flotadors. En les mostres de l'Estancia Harberton no hi ha grans diferències entre fulles i flotadors (109 ± 4 mg As $kg^{-1}$ i 106 mg As $kg^{-1}$, respectivament), mentre que a les mostres del Fin del Mundo les fulles tenen una contingut molt inferior (62,8 ± 0,4 mg As $kg^{-1}$) a la dels flotadors (106 ± 1 mg As $kg^{-1}$). La branca presenta la mateixa concentració en ambdues localitats (92 ± 2mg As $kg^{-1}$). L'únic valor que s'ha trobat a la bibliografia per a aquesta alga és de 68,0 ± 20,6 mg As $kg^{-1}$, que prové d'una zona propera de la Terra del Foc: Punta Arenas, Chile.[184] Aquest valor és del mateix ordre que els trobats al present estudi.

Taula 26: Arsènic total en *M. pyirifera* (en mg As $kg^{-1}$, mitjana ± desviació estàndard, n=3).

| | | Aigua | Platja | Pèrdua As |
|---|---|---|---|---|
| **Fin del mundo** | Estípit | 92 ± 2 | 39 ± 2 | 58 % |
| | Flotador | 106 ± 1 | 54 ± 3 | 49 % |
| | Fulla | 62,8 ± 0,4 | 30 ± 2 | 52 % |
| **Estancia Harberton** | Estípit | 92 ± 2 | 87 ± 2 | 6 % |
| | Flotador | 109 ± 4 | 94 (n=1) | 13 % |
| | Fulla | 106 ± 1 | 86 ± 4 | 19 % |

Un total de 9 compostos d'arsènic s'han pogut identificar i quantificar, a més de compostos no identificats, un de catiònic i un d'aniònic (Taula 27). Totes les mostres presenten els arsenosucres gly-sug, $PO_4$-sug i $SO_3$-sug, i cap d'elles el $SO_4$-sug. Totes les mostres presenten arsenats metilats i arsènic inorgànic, excepte una mostra (FEA) que no presenta iAs. Destaca la presència de AB en cinc mostres. L'interval habitual d'eficàcies d'extracció és de 58 %-93 %, menys per la mostra FFP on només un 28 % de l'arsènic es pot extreure amb aigua. Els cromatogrames de la mostra HXA es mostren a continuació a tall d'exemple (Figura 50).

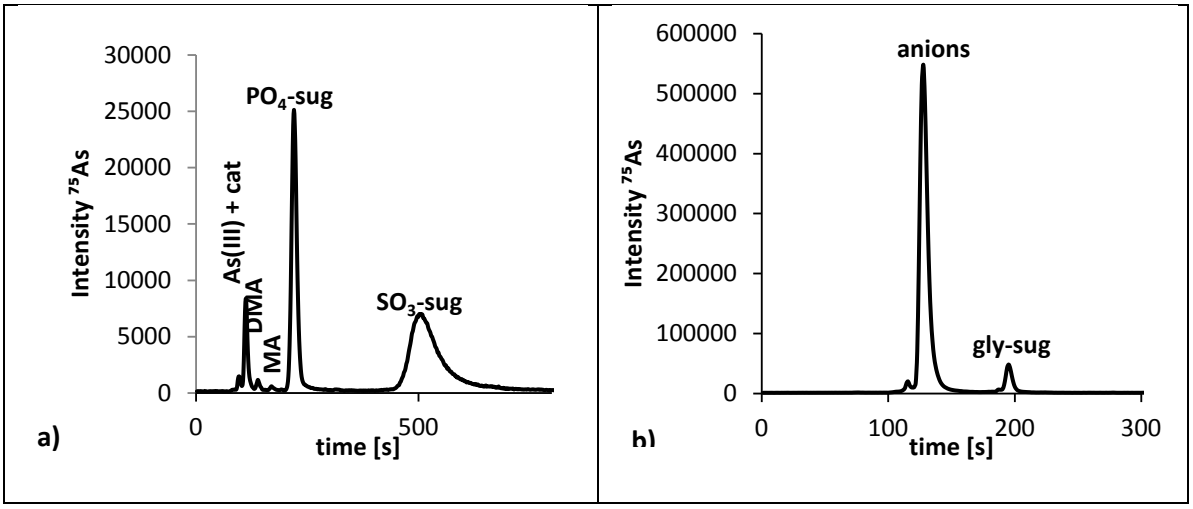



Figura 50: Cromatogrames de bescanvi aniònic (a) i catiònic (b) dels flotadors de la de *M. pyrifera* recollida de l'aigua de la Estancia Harberton (HXA).

**Taula 27: Concentració del compostos d'arsènic d'interès de les mostres de *M. pyrifera* (en mg As $kg^{-1}$, mitjana ± desviació estàndard, n=3). Els límits de detecció i quantificació; l'eficiència d'extracció, i les recuperacions de columna aniònica i catiònica acompanyen els resultats.**

| | | | Codi[A] | As(V) | As(III) | MA | DMA | TMAO | UA | UC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fin del Mundo | Estípit | Aigua | FEA | | | 0,17 ± 0,02 | 0,43 ± 0,04 | | | |
| | | Platja | FEP | < 0,09 | 0,51 ± 0,05 | 0,050 ± 0,002 | 0,10 ± 0,02 | | | 0,29 ± 0,09 |
| | Flotadors | Aigua | FXA | | 0,42 ± 0,04 | < 0,04 | 0,8 ± 0,1 | | | |
| | | Platja | FXP | | 0,27 ± 0,03 | | 0,11 ± 0,04 | | | |
| | Fulla | Aigua | FFA | < 0,09 | | < 0,04 | 0,232 ± 0,001 | | | |
| | | Platja | FFP | 0,55 ± 0,02 | | | 0,11 ± 0,03 | | | |
| Estancia Harberton | Estípit | Aigua | HEA | 1,0 ± 0,2 | | 0,20 ± 0,01 | 0,41 ± 0,03 | | | 0,6 ± 0,2 |
| | | Platja | HEP | 0,72± 0,06 | 1,1 ± 0,1 | | 0,49 ± 0,04 | 0,073 ± 0,003 | | 0,8 ± 0,3 |
| | Flotadors | Aigua | HXA | | 1,1 ± 0,1 | 0,14 ± 0,03 | 0,52 ± 0,08 | | | |
| | | Platja | HXP | | 1,0 ± 0,1 | 0,13 ± 0,04 | 0,46 ± 0,04 | < 0,03 | | 0,4 ±0,1 |
| | Fulla | Aigua | HFA | 0,38 ± 0,05 | 0,8 ± 0,1 | 0,59 ± 0,07 | 1,0 ± 0,1 | | | 2,0 ± 0,4 |
| | | Platja | HFP | 0,38 ± 0,07 | 0,38 ± 0,04 | 0,012 ± 0,007 | 0,79 ± 0,02 | | 0,54 ± 0,06 | |
| **Límit de quantificació** | | | | 0,09 | 0,03 | 0,05 | 0,04 | 0,03 | | |
| **Límit de detecció** | | | | 0,03 | 0,09 | 0,01 | 0,01 | 0,008 | | |

| | | | Codi | gly-sug | $PO_4$-sug | $SO_3$-sug | AB | Eficiència extracció | Rec. Col. Aniònica | Rec. Col. Catiònica |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fin del Mundo | Estípit | Aigua | FEA | 6,6 ± 0,4 | 39,0 ± 0,8 | 37,5 ± 0,7 | | 93,7 % | 97 % | 98 % |
| | | Platja | FEP | 10,2 ± 1,0 | 1,95 ± 0,08 | 10,4 ± 0,8 | | 71,7 % | 83 % | 91 % |
| | Flotadors | Aigua | FXA | 6,2 ± 0,6 | 32,3 ± 0,8 | 46 ± 1 | | 95,4 % | 84 % | 93 % |
| | | Platja | FXP | 14,1 ± 0,6 | 4,4 ± 0,5 | 17 ± 2 | 0,04 ± 0,01 | 68 % | 96 % | 105 % |
| | Fulla | Aigua | FFA | 4,7 ± 0,4 | 9,7 ± 0,4 | 14 ± 1 | 7,8 ± 0,7 | 58,8 % | 77 % | 109 % |
| | | Platja | FFP | 2,65 ± 0,05 | 0,33 ± 0,05 | 2,46 ± 0,02 | | 28 % | 72 % | 76 % |
| Estancia Harberton | Estípit | Aigua | HEA | 4,72 ± 0,07 | 29,1 ± 0,3 | 32,7 ± 0,5 | | 86,1 % | 86 % | 92 % |
| | | Platja | HEP | 5,5 ± 0,2 | 30,0 ± 0,9 | 32 ± 2 | 0,022 ± 0,001 | 83 % | 97 % | 103 % |
| | Flotadors | Aigua | HXA | 6,1 ± 0,2 | 48,1 ± 0,7 | 0,45 ± 0,03 | 0,04 | 65,3 % | 73 % | 84 % |
| | | Platja | HXP | 5,0 ± 0,2 | 34, ± 2 | 0,47 ± 0,05 | 0,04 | 66,8 % | 64 % | 89 % |
| | Fulla | Aigua | HFA | 1,8 ± 0,2 | 19 ± 3 | 27 ± 4 | | 88 % | 59 % | 109 % |
| | | Platja | HFP | 1,7 ± 0,1 | 12,9 ± 0,5 | 19,9 ± 0,8 | | 83 % | 53 % | 106 % |
| **Límit de quantificació** | | | | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,02 | | | |
| **Límit de detecció** | | | | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,007 | | | |

[A]El codi trinomial dóna infomació de la zona de mostreig (F: Fin del mundo; H: Harberton), la morfología (E: estípit; X: flotadors; F: fulla) i la condició de la mostra (P: platja; A:aigua)

### 4.3.5 PARÀMETRES DE QUALITAT

Els paràmetres de qualitat es van controlar de forma rutinària en les dues sessions de mesura. L'avaluació de l'exactitud es va fer mitjançant l'anàlisi del CRM BCR 269 *Sea lettuce* (*Ulva lactuca*), els valors obtinguts per a l'arsènic total són de 2,9 ± 0,3 mg As $kg^{-1}$ i de 3,1 ± 0,1 mg As $kg^{-1}$ que se solapen amb l'interval certificat (3,09 ± 0,20 mg As $kg^{-1}$). La quantificació de l'especiació es va avaluar mitjançant la determinació d'espècies d'arsènic en el CRM BCR 269 i l'extracte de *Fucus serratus,*[132] i es troba recollida a la Taula 37 (Capítol 5, pàgina 130) i a la Taula 38 (Capítol 5, pàgina 131) juntament amb els valors trobats a la literatura.

Com es pot veure a la Taula 25 i a la Taula 27, els valors obtinguts per a la recuperació de columna són relativament elevats (60 %-109 %) fet que indica que el sistema cromatogràfic és capaç de detectar la majoria dels compostos d'arsènic extrets.

### 4.3.6 DISCUSSIÓ

*Cystoseira mediterranea*

Cadascuna de les quatre parts estructurals considerades en aquest estudi tenen un contingut diferent d'arsènic com es pot veure al gràfic de la Figura 51. Aquest resultats suggereixen que les estructures que tenen un contacte elevat amb l'aigua, branques i còrtex de l'estípit, presenten una concentració més elevada que les estructures internes, com ara la medul·la. Així mateix, quan major és la superfície exposada, més elevat és el contingut d'arsènic. Cal recordar que el disc de fixació és una estructura perenne que no només serveix per a fixar el tal·lus als substrat, sinó que a més participa en la regeneració d'aquest.[209]

Cada part morfològica presenta un patró de distribució de compostos d'arsènic diferent; la medul·la de l'estípit i el disc de fixació presenten una proporció d'arsenosucres superior que el les branques i el còrtex de l'estípit, on la fracció dominant és la inorgànica i els arsenats metilats (Figura 52). Aquest resultats es poden relacionar amb l'esquema biosintètic dels arsenosucres proposat per Edmons i Francesconi.[62] La *C. mediterranea* tendeix a acumular l'arsènic com a $SO_3$-sug, com es pot veure al disc de fixació. Aquesta estructura presenta la major proporció de $SO_3$-sug, fet que es pot relacionar amb un possible mecanisme de desintoxicació relacionat amb la protecció de les cèl·lules regeneratives de l'alga.

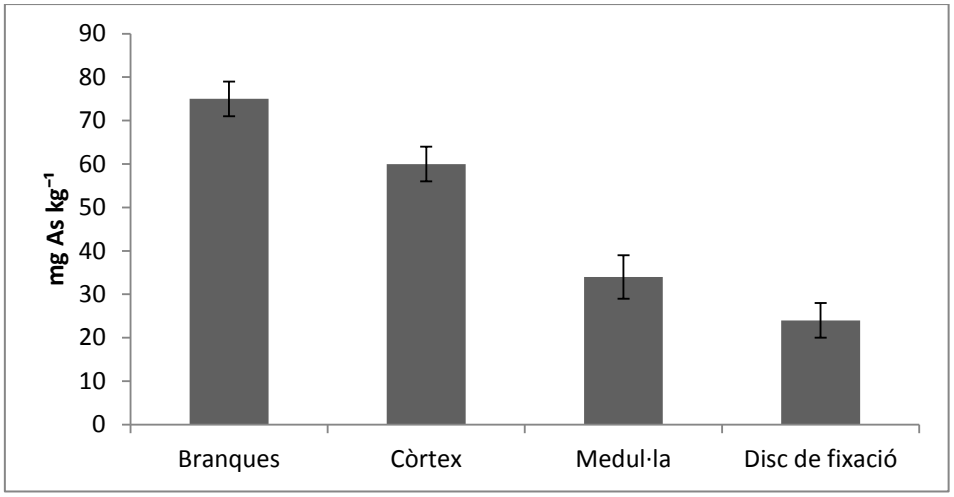



Figura 51: Contingut d'arsènic en diferents morfologies de l'alga bruna *C. mediterranea.*

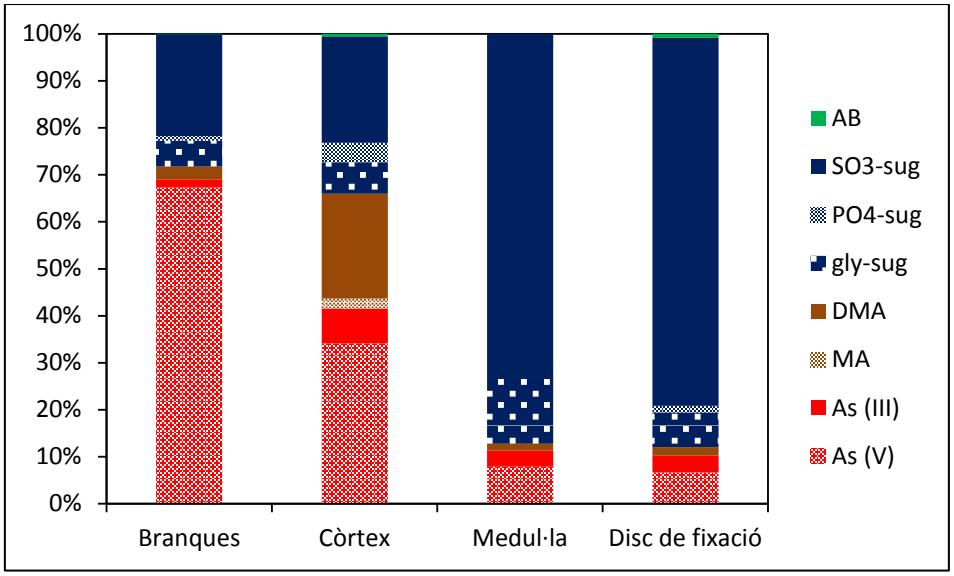



Figura 52: Distribució d'espècies d'arsènic en diferents parts morfològiques de *C. mediterranea.*

Es va trobar arsenobetaïna en les parts de l'alga en contacte directe amb l'aigua de mar; tanmateix, no es va detectar en la medul·la de l'estípit. que va ser completament decorticada. L'origen de l'arsenobetaïna és un assumpte que genera controvèrsia; el grup de recerca va postular en un treball anterior a la tesi que la presència d'aquest compost es pot atribuir a l'activitat microbiana,[66] mentre que altres autors l'atribueixen a epífits no eliminats en el procés de neteja.[86] L'arsenobetaïna s'ha trobat en estructures que contenen epífits (disc de fixació i còrtex de l'estípit) i en estructures que no en tenien (branques); la concentració en totes aquestes estructures té el mateix ordre de magnitud, per tant s'atribueix l'origen d'aquest compost a ambdues causes.

*Padina pavonica*

Com s'ha pogut veure a la secció de resultats, hi ha diferències en l'especiació entre mostres recollides a l'aigua i les embarrancades a la sorra. No es va quantificar cap arsenosucre a la mostra recollida a la platja, tot i que es van detectar $SO_3$-sug i gly-sug, i hi ha un augment en el contingut de MA i As(V). Segons Pengrecha, *et al.*[76] i Castlehouse, *et al.*,[79] aquest arsenosucres són més estables que $PO_4$-sug. Així mateix, el gly-sug podria ser un intermedi en la ruta de degradació del $SO_3$-sug i del $SO_4$-sug; el MA també és un possible intermedi en la descomposició dels arsenosucres durant les etapes de desmetilació. L'oxidació dels extractes d'ambdues mostres va revelar l'absència de compostos sulfurats (tio-arsenosucres), tot i que aquests compostos es poden trobar en algues en descomposició.[78] Una explicació plausible a la no presència d'aquests compostos és el fet que la mostra de *P. pavonica* embarrancada a la sorra es trobava en condicions aeròbiques i els tio-arsenosucres es relacionen majoritàriament amb processos anaeròbics. La disminució de la fracció extractable també s'havia observat en altres estudis que postulaven que l'exposició a la radiació ultraviolada i l'activitat microbiana associada a les vores n'eren la causa.[77] Navratilova, *et al.*[78] postula que els arsenosucres queden atrapats en el procés de contracció dels teixits de l'alga durant el seu assecament.

*Macrocystis pyrifera*

Les mostres fresques de *Macrocystis pyrifera* presenten una concentració d'arsènic total d'entre 92 i 109 mg As $kg^{-1}$, excepte per les fulles de la zona de Fin del Mundo (FFA) que només tenen 62,8 mg As $kg^{-1}$ (Figura 53). Tot indica que no hi ha diferències importants entre les dues localitats ni entre l'estípit ni el flotador. Això es pot relacionar amb què totes les morfologies analitzades estan en contacte directe amb l'aigua. L'efecte de l'embarrancament i subseqüent degradació de l'alga implica una pèrdua d'arsènic, que és més marcada en algues del Fin del Mundo que estaven més deteriorades degut al temps que duien a la vora (diferència d'arsènic: 49 % – 58 %); la pèrdua en les algues de la Estancia Harberton és del 6 % – 19 %.

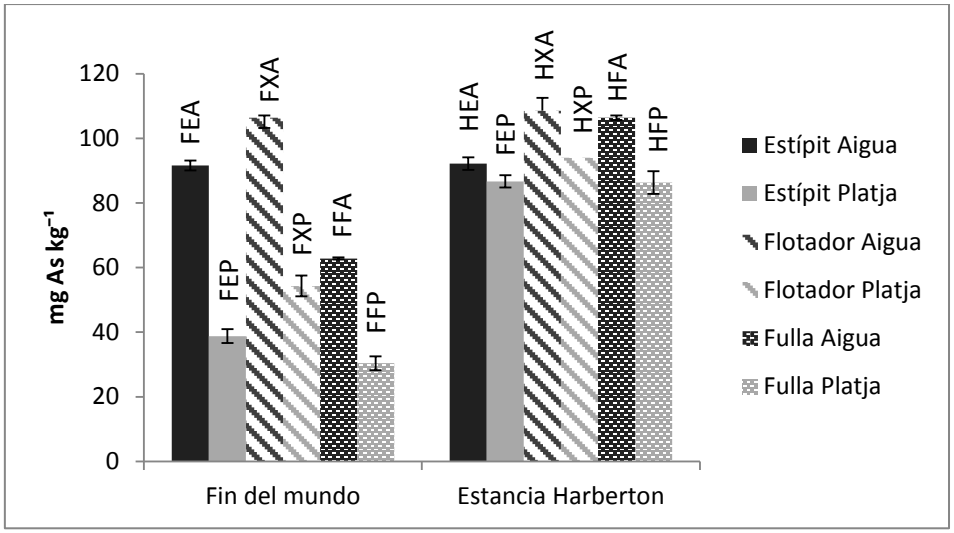



**Figura 53: Representació del contingut d'arsènic total de les mostres de *M. pyrifera*.**

L'especiació està marcada per l'elevada presència d'arsenosucres en les mostres fresques, en especial de $PO_4$-sug i $SO_3$-sug (veure Figura 54), i la presència testimonial de iAs i arsenats metilats. Destaca la presència de AB en la mostra FFA el baix contingut de $SO_3$-sug en la mostra de HXA. La mostra FFA és la mostra fresca que té un contingut inferior d'arsènic total (62,8 mg As $kg^{-1}$) i una distribució d'espècies diferent a la resta de mostres fresques, el que podria indicar la presència d'epífits o una activitat microbiana superior a la de la resta de les mostres. El fet que aquesta mostra presenti un menor contingut d'arsènic es podria atribuir a diferències inter-individus; a les condicions ambientals, i/o a la presència de material aliè que no es va poder separar completament de la mostra. Els flotadors de les mostres recollides a l'Estancia Harberton presenten una distribució d'espècies diferent a les altres mostres; el $PO_4$-sug és el compost majoritari i representa de l'ordre del 80% de les especies d'arsènic quantificades.

De la mateixa manera que hi havia diferències en el contingut d'arsènic total entre les mostres recollides a l'aigua i a la platja, aquestes diferències també es troben a l'especiació. En termes generals, es produeix un augment de iAs i de gly-sug, i una disminució de $PO_4$-sug i $SO_3$-sug. Aquesta tendència es pot observar clarament a les mostres de Fin del Mundo, però és difícil d'observar en les mostres de la Estancia Harberton. Per tant, es repeteix allò observat amb l'arsènic total: hi ha poques diferències entre mostres recollides a l'aigua i a la platja. Aquests resultats concorden amb els obtinguts a la *P. pavonica* de la Costa Brava, quan es comparen els resultats en la platja i l'aigua.

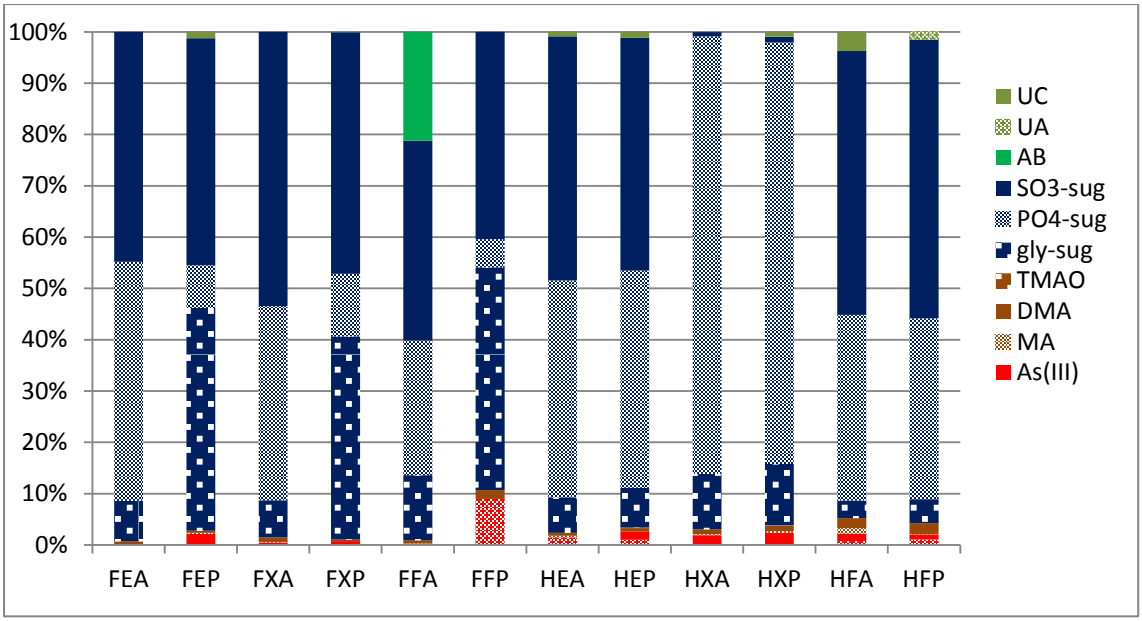



**Figura 54: Representació de l'especiació de les mostres de *M. pyrifera* com a percentatge respecte la suma d'espècies.**

*Aportacions de l'estudi*

La *C. mediterranea* presenta un contingut d'arsènic i una distribució d'espècies diferent entre les diferents parts estructurals. Les parts amb un contingut més elevat d'arsènic, branques i còrtex de l'estípit, estan en contacte directe amb l'aigua i presenten una proporció d'arsènic inorgànic superior a la de la resta de morfologies. La medul·la de l'estípit i el disc de fixació tenen un contingut d'arsènic molt inferir a les altres morfologies i la fracció més important és la dels arsenosucres; fet que es podria relacionar amb mecanismes de protecció d'aquestes estructures perennes que poden regenerar l'alga. La *M. pyrifera* no presenta diferències en l'especiació i el contingut d'arsènic pel que fa la majoria de parts. Tanmateix, dues de les morfologies tenen una distribució diferent. La *P. pavonica* no presenta diferències significants en el contingut d'arsènic entre les algues recollides a la platja i a l'aigua; tanmateix, sí que hi ha diferències en l'especiació. Els arsenosucres predominen a la mostra viva, que disminueixen a la mostra embarrancada a la platja en la qual predomina el iAs i els met-iAs. Destaca la presència d'arsenosucres a les mostres recollides a l'aigua i la disminució d'aquest i de l'arsènic total en les mostres recollides a la sorra. Aquest efectes són més marcats a les mostres de Fin del Mundo i només s'insinuen a les mostres de la Estancia Harberton.

## 4.4 Contribució a l'estudi del cicle biogeoquímic de l'arsènic en una zona amb activitat hidrotermal submarina, Santorí, Grècia.

Aquest treball forma part d'un estudi interdisciplinari que està desenvolupant al Departament de Ciències de la Terra de la Universität Bremen, i va implicar una estada de 4 mesos en aquesta universitat.

Santorí és un petit arxipèlag amb estructura d'anell amb illes que envolten una caldera volcànica formada cap a l'any 1400 AC. Està format per sis illes, la principal de les quals és la que dóna nom a l'arxipèlag, Santorí (Thera); l'altra illa habitada és Thirasia que amb Aspronisi i Christiana delimiten la caldera al centre de la qual es troben les illes Kameni (Pelea i Nea Kameni) que la separen en dues seccions.[210]

L'activitat hidrotermal al voltant de l'arxipèlag de Santorí s'ha descrit extensivament i és semblant a altres illes que es troben en arcs volcànics. Aquestes aigües amb alt contingut de ferro i manganès descarreguen i precipiten hidròxids de ferro principalment. Les parets de la caldera de l'illa de Santorí són molt escarpades, però consta d'una base plana a uns 290 – 390 m de profunditat. Les àrees hidrotermals a Santorí estan associades a les illes Kameni (Figura 55). A les dues illes s'hi poden trobar fonts hidrotermals submarines a poca profunditat. Les fonts hidrotermals de l'illa Nea Kameni, d'interès per aquest estudi, es troben principalment en la part interior del canal, amb temperatures entre 28 i 30°C.[211]

Els fluids hidrotermals presenten, aproximadament, una concentració de ferro de tres ordres de magnitud superior a la de l'aigua de mar (1000 – 7000 $\mu g\ l^{-1}$). Pel que fa l'arsènic, la concentració és de 6,5 – 16,5 $\mu g\ l^{-1}$, el que representa entre 5 i 14 vegades la concentració descrita per l'arsènic en aigües de la Mediterrània (1,2 $\mu g\ l^{-1}$). L'arsènic s'adsorbeix sobre els hidròxids de ferro i s'acumula als sediments de color vermellós; la relació As/Fe augmenta a mesura que ens allunyem de la font hidrotermal, ja que les condicions són favorables per a la incorporació d'arsènic al sediment. La capa roja que formen els sediments, hidròxid de ferro dipositat o unit al bacteri *Gallionella ferruginea* principalment, pot arribar a tenir una concentració d'arsènic de 900 mg As $kg^{-1}$.

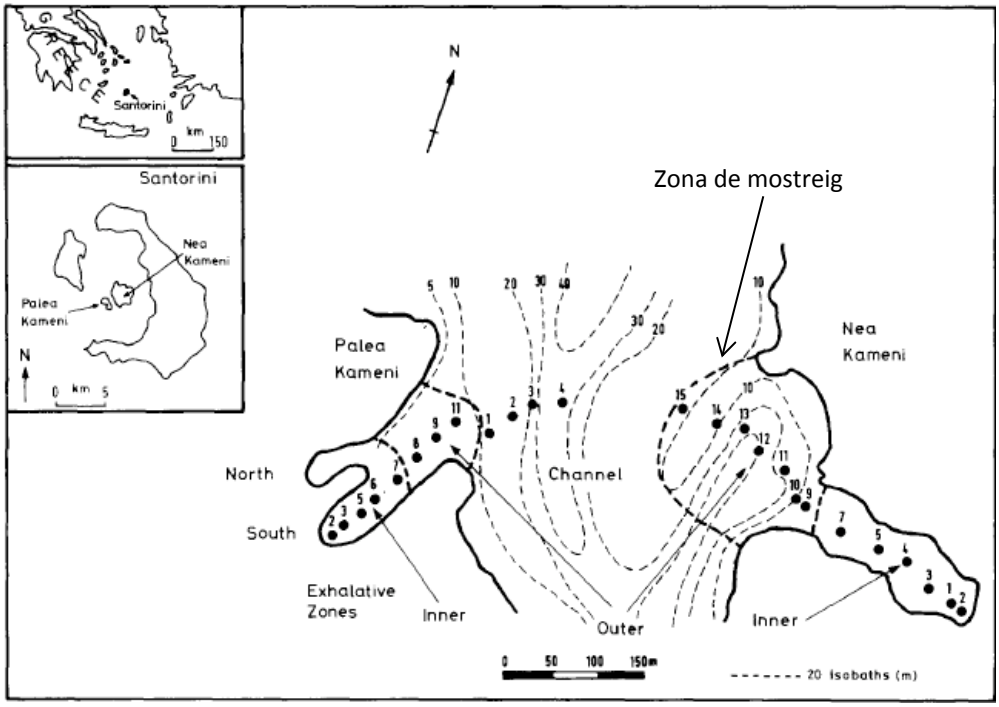



**Figura 55: Localització de les illes Pelea i Nea Kameni i situació dels canals amb activitat hidrotermal submarina. Extret de Varnavas i Cronan, 2005.**[211]

Les algues i plantes aquàtiques més properes es troben a 10 – 20 m del lloc de descàrrega de fluids hidrotermals, i presenten una capa vermellosa d'hidròxids de ferro i bacteris (Figura 56). Aquestes algues es troben exposades a nivells relativament elevats de diferents elements, entre ells l'arsènic. L'activitat microbiana és molt elevada en aquest sistema hidrotermal i pot tenir un paper important en el metabolisme d'aquest element per part dels organismes d'aquest hàbitat.

Aquest estudi forma part d'un altre molt més ampli i multidisciplinari que es realitza a l'illa Nea Kameni i engloba l'activitat microbiana, així com la geoquímica dels fluids i dels sediments acumulats. L'objectiu de la part realitzada del present estudi és determinar continguts totals ferro i arsènic i de compostos d'arsènic en les algues recollides. Amb la informació recollida de la zona amb anterioritat i l'obtinguda en el present estudi, s'aconseguirà una visió general aproximada sobre el biogeocicle de l'arsènic en aquest sistema hidrotermal. Aquests estudis són interessants a nivell geològic, metabòlic i toxicològic, i des del punt de vista mediambiental, es poden prendre com a exemples del possible comportament d'un ecosistema en cas de contaminació antropogènica del medi marí.

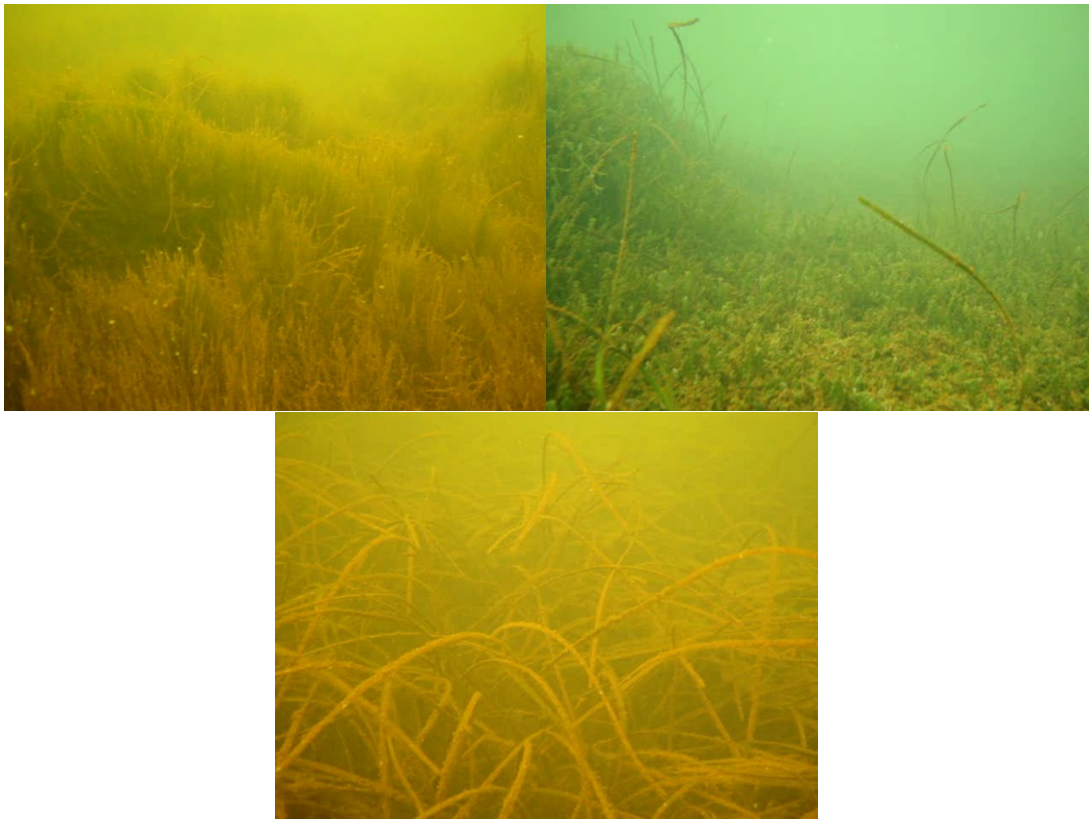


**Figura 56: Imatges de les algues recobertes d'hidròxids de ferro al canal de Nea Kameni (Imatges proporcionades per la Universität Bremen).**

### 4.4.1 METODOLOGIA

*Presa de mostra*

La presa de mostra es va realitzar a l'octubre de 2010. Es van recollir 8 mostres de 4 espècies diferents. Les mostres van ser netejades amb aigua de mar i posteriorment emmagatzemades en bosses de plàstic i congelades. Les mostres es van mantenir congelades i van ser enviades a la Universitat de Bremen. També es va disposar de mostra de sediment (mostrejador tipus *core*, segments de 0 – 5 cm i 10 – 15 cm).

*Descripció de les mostres*

Fanerògama marina (FM): d'una pastura marina amb fulles estretes de 0,5 – 1,5 mm de gruix i de longitud de 20 – 40 cm, tot i que la majoria eren fragments. Aquesta mostra presenta capes dipositades de sediment fàcils d'eliminar.

Alga verda (AV): Es tracta d'una alga verda amb un estípit de 0,5 mm de diàmetre amb vesícules.

Mostra no classificada (NC): Es tracta d'un cabdell filamentós amb gran quantitat de sediment, difícil d'eliminar ja que estava a l'interior de l'estructura.

*Pretractament de la mostra*

Tot i que les mostres van ser netejades *in situ* amb aigua de mar, en molts dels casos va ser difícil eliminar completament els hidròxids de ferro adherits a elles. Les mostres es van descongelar i es procedí a una neteja addicional que va consistir en l'eliminació de l'hidròxid de ferro amb un bisturí, l'observació amb una lupa binocular per a la detecció d'epífits i la separació d'aquests amb unes pinces de laboratori i l'esbandit amb aigua. En els casos que va ser possible es van recollir els sediments de la superfície de les algues per la seva anàlisi posterior. Les mostres es van liofilitzar i molturar en un morter d'àgata.

*Determinació del contingut total de ferro i arsènic*

Els continguts totals es van determinar amb un ICP-MS o amb un ICP-AES, segons la concentració de l'element a quantificar. La digestió prèvia a anàlisi es realitza amb un sistema a microones d'alta pressió amb $HNO_3$ i $H_2O_2$.

*Determinació de les espècies d'arsènic*

L'especiació dels extractes aquosos es va realitzar mitjançant l'acoblament LC-ICP-SE-MS. També es va comprovar la presència d'espècies sulfurades d'aquest element.

### 4.4.2 Resultats

El contingut d'arsènic i de ferro total de les mostres es dóna a la Taula 28. El contingut d'arsènic total en el sediment és de 580 ± 20 mg As $kg^{-1}$ (0-5 cm) i de 550 ± 20 mg As $kg^{-1}$ (10 – 15 cm), i els de ferro de 35 ± 1 g As $kg^{-1}$ (0 – 5 cm) i de 32,3 ± 0,8 g As $kg^{-1}$ (10 – 15 cm).

La neteja de les algues és un punt crucial en aquest estudi, ja que el sediment té un contingut molt elevat d'arsènic. En comparar la concentració d'arsènic entre les mostres netes i les sense netejar, es pot veure que el contingut augmenta des de 1,7 – 26,6 mg As $kg^{-1}$ a 80 – 244 mg As $kg^{-1}$. En el cas de les mostres no identificades, la seva morfologia filamentosa dificulta enormement la seva neteja. L'elevat contingut d'arsènic que presenten i la baixa eficiència d'extracció dels compostos d'arsènic (0,57 % – 0,65 %) podrien indicar una neteja deficient.

**Taula 28: Contingut d'arsènic i ferro total en plantes aquàtiques i algues de Santorí (mitjana ± desviació estàndard, n=3).**

| | Codi | Divisió | Phyllum | Estat de la mostra | As Total mg As $kg^{-1}$ | Fe Total g Fe $kg^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | **FM1** | Fanerògama marina | Magnoliophyta | Neta<br>Sense netejar | 26,6 ± 0,9<br>80 ± 20 | 18,8 ± 0,4<br>53 ± 2 |
| **2** | **FM2** | Fanerògama marina | Magnoliophyta | Neta | 1,7 ± 0,1 | 0,19 ± 0,01 |
| **3** | **FM3** | Fanerògama marina | Magnoliophyta | Neta | 2,48 ± 0,05 | 0,125 ± 0,12 |
| **5** | **AV** | Alga verda | Clorophyta | Neta<br>Sense netejar<br>Sediment | 9 ± 1<br>116 ± 6<br>346 ± 5 | 8,30 ± 0,06<br>6,1 ± 0,2<br>26,1 ± 0,5 |
| **6** | **FM4** | Fanerògama marina | Magnoliophyta | Neta<br>Sense netejar | 12,0 ± 0,4<br>244 ± 7 | 4,25 ± 0,07<br>16,1 ± 0,1 |
| **8** | **FM5** | Fanerògama marina | Magnoliophyta | Neta<br>Sense netejar | 13,7 ± 0,7<br>67 ± 4 | 8,75 ± 0,06<br>38,7 ± 0,9 |
| **9** | **NC1** | ? | ? | Neta<br>Sense netejar | 182 ± 6<br>390 ± 20 | 18,0 ± 0,9<br>29,7 ± 0,6 |
| **10** | **NC2** | ? | ? | Neta<br>Sense netejar | 189 ± 6<br>357 ± 4 | 17,1 ± 0,2<br>29 ± 1 |

S'han determinat un total de vuit espècies diferents d'arsènic en les mostres de flora del canal de Nea Kameni. Els resultats el mostren a la Taula 29. Totes les mostres tenen iAs i 6 tenen arsenats metilats. Només cinc mostres contenen arsenosucres i tres d'elles arsenobetaïna. Les eficiències d'extracció són baixes a la majoria de mostres d'algues i plantes (0,57 %-19 %) i només dues mostres presenten una fracció d'arsènic extractable de l'ordre del 75 % (FM2 i FM3, veure cromatograma a la Figura 57). Tanmateix, les recuperacions de columna indiquen que una gran part de l'arsènic extret es pot separar amb el mètode cromatogràfic (60 %-108 %). La quantificació de l'extracte de *F. serratus* (DMA: 0,005 ± 0,001 µg; gly-sug: 0,08 ± 0,02 µg; $PO_4$-sug: 0,087 ± 0,009 µg; $SO_3$-sug: 0,62 ± 0,06 µg; $SO_4$-sug: 0,40 ± 0,02 µg) correspon amb la referència original[132] i els valors donats en altres estudis.[66,135,136]

La majoria de mostres tenen un contingut baix d'arsenosucres i n'hi que no en tenen (FM1, FM4 i FM5) i en la majoria de casos és gly-sug. Les mostres NC1 i NC2 contenen $PO_4$-sug i $SO_3$-sug, a més de gly-sug i tenen com a principal compostos els arsenosucres.

Taula 29: Contingut de compostos d'arsènic en plantes aquàtiques i algues de Santorí (en mg As $kg^{-1}$, mitjana ± desviació estàndard, n=3).

| Codi | As(III) | DMA | MA | As(V) | AB |
|---|---|---|---|---|---|
| **FM1** | 0,59 ± 0,03 | 0,042 ± 0,005 | < 0,03 | 0,123 ± 0,009 | |
| **FM2** | 0,07 ± 0,03 | 0,036 ± 0,001 | < 0,03 | 0,93 ± 0,03 | 0,092 ± 0,003 |
| **FM3** | | 0,034 ± 0,005 | | 1,8 ± 0,1 | 0,054 ± 0,004 |
| **AV** | | 0,05 ± 0,01 | | 0,83 ± 0,04 | 0,21 ± 0,024 |
| **FM4** | 0,17 ± 0,02 | | | 0,45 ± 0,02 | |
| **FM5** | 0,06 ± 0,01 | | | 0,685 ± 0,008 | |
| **NC1** | 0,33 ± 0,06 | 0,02 ± 0,01 | | <LOQ | |
| **NC2** | 0,18 ± 0,04 | 0,04 ± 0,01 | | | |
| **Límit Detecció** | 0,001 | 0,003 | 0,008 | 0,02 | 0,01 |
| **Límit Quantificació** | 0,002 | 0,01 | 0,03 | 0,06 | 0,03 |
| **Codi** | **$PO_4$-sug** | **$SO_3$-sug** | **gly-sug** | **Eficiència d'extracció** | **Recuperació de columna** |
| **FM1** | | | | 3,2 % | 92 % |
| **FM2** | | | 0,11 ± 0,01 | 74 % | 98 % |
| **FM3** | | | 0,12 ± 0,02 | 76 % | 108 % |
| **AV** | | | 0,17 ± 0,02 | 19 % | 93 % |
| **FM4** | | | | 6,3 % | 60 % |
| **FM5** | | | | 5,2 % | 82 % |
| **NC1** | 0,090 ± 0,003 | | 0,25 ± 0,02 | 0,57 % | 108 % |
| **NC2** | 0,14 ± 0,01 | < 0,1 | 0,33 ± 0,02 | 0,65 % | 105 % |
| **Límit Detecció** | 0,008 | 0,04 | 0,1 | | |
| **Límit Quantificació** | 0,03 | 0,1 | 0,3 | | |

D'altra banda, s'observa la presència d'arsenobetaïna en algunes mostres. Donada la severitat de les condicions ambientals, es descarta la presència d'animals epífits i la presència d'aquest compost s'atribueix a l'elevada activitat microbiana, específica d'aquesta zona molt elevada.

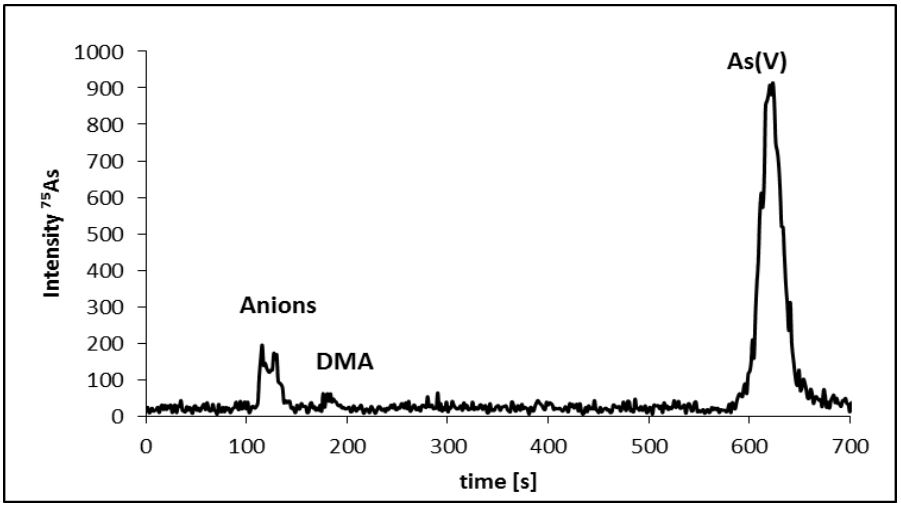



Figura 57: Cromatograma de bescanvi aniònic de la mostra FM3.

## 4.5 Estudi de l'impacte de l'arsènic, d'origen natural i antropogènic, en algues i plantes aquàtiques de la conca del riu Loa, Xile.

La regió d'Antofagasta (nord de Xile) té nivells ambientals d'arsènic d'origen natural molt elevats.[212] L'únic riu de la regió que desemboca al mar és el Loa, la salinitat del qual és molt elevada i la concentració d'arsènic en la seva aigua i la dels seus afluents oscil·la entre 0,2 i 4,4 mg As $l^{-1}$ (màxim estacional).[20] Els afluents tenen molta influència en la composició química del Loa, en especial el riu Salado que recull aigua del camp geotèrmic d'El Tatio on la concentració d'arsènic pot arribar a ser de 27 mg As $l^{-1}$.[213] La regió és extremadament àrida, el que implica una alta evaporació, per tant la concentració d'arsènic i d'altres components (Cu, B, $Cl^-$, $SO_4^{2-}$, entre d'altres) es manté elevada al llarg de tot el curs del riu. La manca d'afluents que puguin aportat aigua amb baix contingut d'arsènic potencia aquesta característica. Tot i que l'arsènic prové de fonts naturals, com l'activitat geotèrmica i la composició del llit rocós, l'arsènic també prové de fonts antropogèniques, com ara la mineria, les foneries i els efluents de les plantes de tractament d'aigües.[20]

La demanda d'aigua de la regió es satisfà amb l'aigua del Loa i dels seus afluents i es destina a l'abastament de ciutats, usos agrícoles i la indústria minera. Hi ha constància de problemes de salut deguts a l'elevada concentració d'arsènic en l'aigua potable des de 1962.[214] Actualment, les ciutats principals reben aigua que compleix la legislació xilena vigent (<10 μg As $l^{-1}$).[215]

La conca del riu Loa és un hàbitat adequat per a una gran diversitat de flora i fauna endèmica, que destaquen per haver-se adaptat a una regió tan àrida. La flora aquàtica, algues i plantes, són potencials bioinidicadors d'arsènic en sistemes aquàtics i la capacitat d'extraure l'arsènic inorgànic de l'aigua que presenten fa que en algunes espècies es puguin considerar adequades per a estudis de bioremediació.[92,216–218]

Els estudis publicats fins a la data no han considerat les espècies d'arsènic presents a la flora de la zona i donen valors d'arsènic total en hortalisses conreades a la conca[212,219,220] i plantes aquàtiques.[221] D'altra banda, la concentració d'arsènic en l'aigua es troba descrita en pocs treballs.[20,212,213] En general, les algues i plantes aquàtiques continentals estan menys estudiades que les marines i els estudis es limiten a poques zones geogràfiques.[77,89,222] Així mateix, tampoc hi ha gaire estudis que tractin l'especiació d'arsènic en algues marines de la costa xilena.[93,136,216]

L'objectiu d'aquest estudi és determinar la concentració d'arsènic total i d'espècies d'arsènic en algues i plantes aquàtiques de la conca del riu Loa i es va realitzar en col·laboració amb la Universidad Católica del Norte, Antofagasta, Xile.

### 4.5.1 DESCRIPCIÓ DE LA ZONA DE MOSTREIG

La zona d'estudi és el riu Loa al nord de Xile (Figura 58) i els principals afluents són els rius San Pedro, Salado i San Salvador. El Loa té una longitud de 440 km i l'àrea de la seva conca és de 33.750 $km^2$. El seu curs és sinusoïdal, neix als Andes, creua el desert d'Atacama i desemboca a l'oceà Pacífic. L'aigua a la conca té conductivitat elèctrica elevada i pH lleugerament alcalí (veure Taula 30), característiques han de ser tolerades per la vegetació local que, a més, està sotmesa diàriament a exposicions prolongades als radiació solar i a uns canvis dràstics de la temperatura.

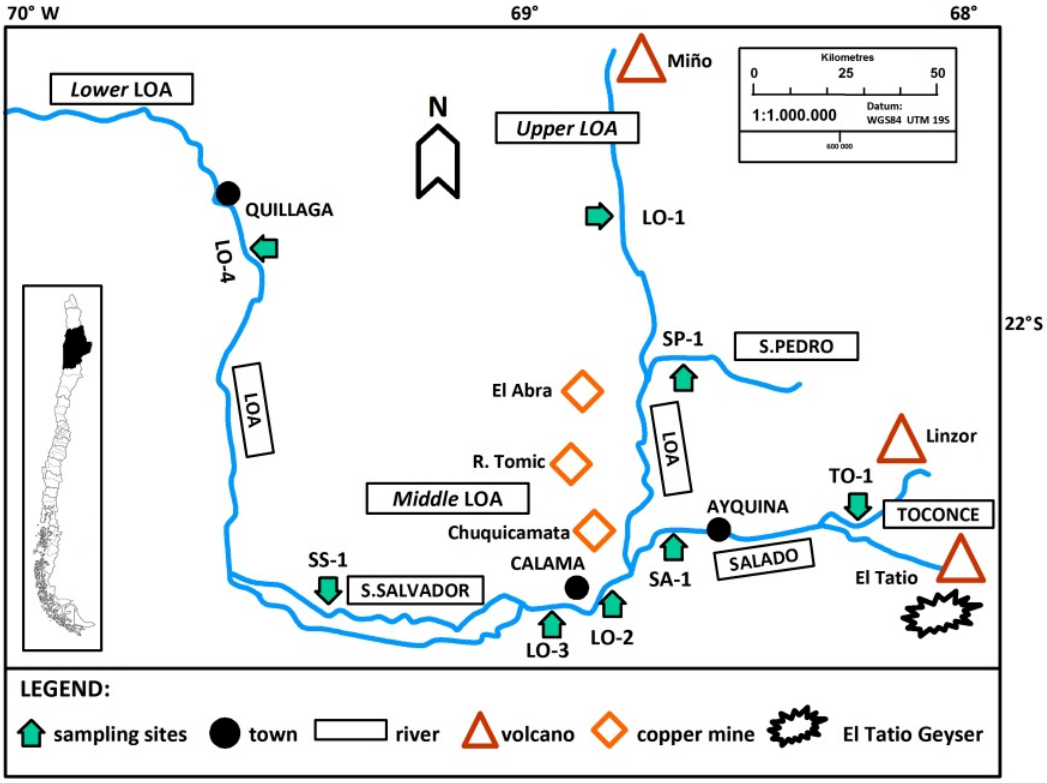



**Figura 58: Punts de mostreig al riu Loa i els seus afluents principals: San Pedro, Salado i San Savador.**

El règim hidrològic de la conca està dominat per la pluja: el cabal dels rius augmenta durant l'estiu austral, gener i febrer.[20] La regió és extremadament àrida, amb una precipitació acumulada de 300 mm anuals a 3.000 m sobre el nivell del mar i de 1 – 2 mm anuals a nivell del mar.[213] Degut a les condicions extremadament àrides de la zona, tots el rius són temporals o endorreics excepte el Loa, que és l'únic riu exorreic de la

regió. La zona té una activitat minera molt elevada localitzada en tres dipòsits de coure: Chuquicamata (la mina a cel obert més gran del món), Radomiro Tomic i El Abra. És important recalcar la presència de dues fonts d'arsènic a la conca: el riu Salado que en nodreix d'aigües d'origen geotèrmic de la zona d'El Tatio, i la foneria de Chuquicamata (2.850 MASL) que produeix concentrats de coure rics en arsènic i emet $SO_2$ i aerosols (principalment $As_2O_3$ amb petites proporcions de Cd, Cu, Pb i Zn), i és en part responsable de la pol·lució de cossos d'aigua, en particular de salines.[223]

Al llarg del Loa, es poden definir tres zones amb propietats fisicoquímiques diferenciades. L'*Alt Loa* correspon a la zona entre el naixement al peu del volcà Miño (coordenades UTM: 19S 541.002 7.657.055), i la unió amb el riu Salado a prop de Calama. Al sud de Lequena (LO-1), la major part del riu s'extreu i es destina a usos agrícoles i miners. El principal afluent del curs alt és el San Pedro i abans de la confluència d'ambdós rius, el Loa rep recàrregues d'aigua subterrànies. El *Mig Loa* correspon a la zona entre les confluències amb el Salado (abans de LO-2) i el San Salvador (desprès de SS-1). L'origen del Salado és proper al camp geotèrmic d'El Tatio i té el riu Toconce, que neix al peu del volcà Linzor, com afluent en la zona alta del curs (desprès de TO-1). El *Baix Loa* correspon a la zona entre la confluència del San Salvador, que neix a l'oest de Calama, i la desembocadura a l'oceà Pacífic. En aquesta secció destaca la zona agrícola de Quillagua (després de LO-4).

### 4.5.2 PRESA I PRETRACTAMENT DE LES MOSTRES

Durant el mes de juny de 2012, el grup de recerca en Química Analítica i Ambiental de la Universidad Católica del Norte (Antofagasta, Xile) va recollir mostres d'aigua i flora aquàtica (algues i plantes) a les zones de mostreig indicades a la Figura 58. La conductivitat elèctrica, l'oxigen dissolt, pH i temperatura de l'aigua es van mesurar *in situ* (Taula 30). Les mostres d'aigua es van acidificar amb $HNO_3$ (2 M) i es van mantenir a 5°C durant el transport al laboratori. Les mostres de plantes i algues es van emmagatzemar segellades en bosses de plàstic a -18°C fins la preparació pel transport. Les mostres es van descongelar en una campana de flux laminar, es van rentar amb aigua desionitzada per eliminar el fang, la sorra i la grava, es van assecar durant 4 dies a 45°C. Les algues i plantes es van transportar amb avió fins a Barcelona on es van netejar amb pinces de laboratori amb l'ajuda d'una lupa binocular. Les mostres es van esbandir amb aigua doblement desionitzada i es van assecar a 40°C, es van polvoritzar amb un morter de vidre i es van emmagatzemar en ampolles de PET fins a la seva anàlisi.

**Taula 30: Localització geogràfica del punts de mostreig. Caracterització fisicoquímica de les aigües de la conca.**

| Punt de mostreig | Codi | Coordenades UTM Zona 19S Est | Nord | Alçada m | Data | Temperatura °C | pH | Conductivitat elèctrica mS $cm^{-1}$ | Oxigen dissolt mg $l^{-1}$ | TDS g $l^{-1}$ | Duresa mg $CaCO_3$ $l^{-1}$ | As total mg $l^{-1}$ | $PO_4^{3-}$ mg $l^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **ALT LOA** | | | | | | | | | | | | | |
| Riu Loa a Lequena | LO-1 | 535.264 | 7.604.060 | 3.250 | 3/6/10 | 9,4 | 8,42 | 0,669 | 9,2 | 1,90 | 490 | 0,220 | <0,778 |
| Riu San Pedro a Parshall 1 | SP-1 | 565.449 | 7.570.727 | 3.700 | 3/6/10 | 20,4 | 7,41 | 0,850 | 12,6 | 2,58 | 610 | 0,456 | - |
| **RIU SALADO** | | | | | | | | | | | | | |
| Riu Toconce abans de la presa de Sendos | TO-1 | 588.204 | 7.536.667 | 3.445 | 4/6/10 | 7,7 | 8,30 | 0,438 | 9,6 | 1,84 | 504 | 0,670 | - |
| Riu Salado al Sifó d'Ayquina | SA-1 | 567.504 | 7.534.956 | 2.980 | 4/6/10 | 11,1 | 7,27 | 5,19 | 10,1 | 3,98 | 690 | 0,798 | <0,078 |
| **MIG LOA** | | | | | | | | | | | | | |
| Riu Loa a Escorial | LO-2 | 510.530 | 7.518.137 | 2.450 | 2/6/10 | 9,2 | 8,05 | 7,15 | 8,7 | 4,98 | 778 | 0,710 | 0,346 |
| Riu Loa a La Finca | LO-3 | 504.192 | 7.511.789 | 2.100 | 2/6/10 | 12,2 | 8,21 | 7,65 | 8,4 | 5,30 | 1.300 | 0,897 | 0,299 |
| Riu San Salvador abans de la confluència amb el Loa | SS-1 | 446.248 | 7.523.414 | 1.238 | 2/6/10 | 11,6 | 8,27 | 8,50 | 6,3 | 6,21 | 1.380 | 1,20 | 1,790 |
| **BAIX LOA** | | | | | | | | | | | | | |
| Riu Loa abans de la zona agrícola de Quillagua | LO-4 | 443.087 | 7.605.780 | 802 | 1/6/10 | 13,2 | 7,85 | 20,9 | 5,5 | 10,61 | 2.160 | 1,40 | 1,017 |

TDS= sòlids dissolts totals

### 4.5.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

*Característiques fisicoquímiques de l'aigua superficial*

La Taula 30 conté la localització geogràfica i les característiques fisicoquímiques de l'aigua dels punts de mostreig. El control de qualitat intern es va fer mitjançant l'anàlisi del SRM 1640 (Elements traça en aigües naturals) i els resultats obtinguts eren coherents amb el valor de referència (± 5 %). L'aigua es caracteritza per tenir un pH neutre o lleugerament alcalí (7,27 – 8,42). La conductivitat elèctrica (0,438 – 20,9 mS $cm^{-1}$) i els sòlids totals dissolts (1,84 – 10,61 g $l^{-1}$) tenen una gran variabilitat entre les diferents seccions del Loa i els seus valors són coherents amb la localització de les fonts antropogèniques de pol·lució (aigües residuals i activitat minera). El contingut d'arsènic es troba entre el 0,220 i 1,40 mg As $l^{-1}$ segons el punt de mostreig. Els resultats indiquen que les principals fonts són les antropogèniques, en concret els efluents propers a l'àrea minera de Chuquicamata i la ciutat de Calama. El principal risc ecològic degut a l'arsènic d'origen antropogènic de la zona es pot deure als sediments que tenen els efluents d'aquesta àrea. Un augment del contingut d'arsènic es pot observar aigües avall, i durant una distància considerable, des de la zona minera de Chuquicamata fins a la desembocadura. El major contingut d'arsènic es va determinar al baix Loa (LO-4).

*Arsènic total en algues i plantes aquàtiques*

Els resultats d'arsènic total de les mostres es donen a la Taula 31. El límits de quantificació, detecció, l'eficiència d'extracció i la recuperació de columna també es mostren en aquesta taula. Com es pot veure, el contingut d'arsènic total varia entre els 20 i els 341 mg As $kg^{-1}$, excepte per una mostra de *Cladophora* sp. (11.100 mg As $kg^{-1}$) del riu Salado (SA-1) que supera àmpliament aquest interval, i prové d'una de les zones més contaminades.[20] La diferència en el contingut de les algues es pot atribuir al riu Salado, la composició química de les seves aigües està fortament marcada pel seu origen al camp geotèrmic d'El Tatio. A diferència de la concentració d'arsènic de la *Cladophora* sp., la planta *Phylloscirpus* cf. *deserticola* recol·lectada al mateix punt de mostreig (SA-1) presenta un valor a la zona baixa de l'interval de les mostres (49 mg As $kg^{-1}$), una diferència que ja s'havia observat en altres zones.[77] El fet que el *P.* cf. *deserticola* sigui una planta vascular i que la *Cladophora* sp. sigui una alga filamentosa i que visquin en hàbitats diferents, pot ser la causa d'aquesta diferència. A més cal tenir en compte que es van analitzar espècimens complets de *Cladophora* sp. que viu completament

submergida a l'aigua, mentre que del *P.* cf. *deserticola* només es va analitzar una part de la tija que és completament aèria i no les zones submergides com les arrels.

**Taula 31: Contingut d'arsènic total en algues i plantes aquàtiques de la conca del Loa. (valor mig ± desviació estàndard, n=3, en mg As $kg^{-1}$). També es dóna la concentració d'arsènic en l'aigua del punt de mostreig (en mg As $l^{-1}$) i el BC.**

| Mostra | Lloc de mostreig | As Total mostra | As aigua | BC |
|---|---|---|---|---|
| ***Zannichellia palustris*** | LO-1 | 79 ± 5 | 0,220 | 359 |
| ***Azolla* sp.** | LO-1 | 199 ± 12 | 0,220 | 905 |
| ***Myriophyllum aquaticum*** | SP-1 | 209 ± 11 | 0,456 | 458 |
| ***Potamogeton pectinatus*** | TO-1 | 20 ± 2 | 0,670 | 30 |
| ***Ruppia filifolia*** | TO-1 | 23 ± 2 | 0,670 | 34 |
| ***Phylloscirpus* cf. *desertícola*** | SA-1 | 49 ± 3 | 0,798 | 61 |
| ***Cladophora* sp.** | SA-1 | 11.100 ± 300 | 0,798 | 13.910 |
| ***Chara* sp.** | LO-2 | 341 ± 6 | 0,710 | 480 |
| ***Potamogeton pectinatus*** | LO-3 | 134 ± 1 | 1,897 | 71 |
| ***Cladophora* sp.** | SS-1 | 182 ± 7 | 1,20 | 152 |
| ***Potamogeton pectinatus*** | LO-4 | 248 ± 2 | 1,40 | 177 |

Una planta hiperacumuladora és aquella capaç de concentrar en el seus teixits fins a un 1 % del seu pes sec de determinats elements i és ferma candidata per assajos de bioacumulació. Una de les mostres presenta aquesta característica, la *Cladophora* sp. que pot bioaccumular arsènic fins al 1,11 % del seu pes sec. Es van estimar els coeficients de bioacumulació (BC)[218] com la relació entre l'arsènic total a l'alga i a l'aigua (Taula 31), per a un futur estudi de la Universidad Católica del Norte. La *Cladophora* sp. presenta dos continguts d'arsènic molt diferent entre les dues zones a les quals es va mostrejar, SA-1 (11.100 mg As $kg^{-1}$) i SS-1 (182 mg As $kg^{-1}$). La concentració d'arsènic a l'aigua a SS-1 (1,20 mg As $l^{-1}$) és superior a la de SA-1 (0,798 mg As $l^{-1}$), aquesta diferència és més marcada en el cas del fosfat (1,790 mg $PO_4^{3-}$ $l^{-1}$ i <0,078 mg $PO_4^{3-}$ $l^{-1}$, respectivament). L'analogia química entre arsènic i fòsfor pot afectar a l'assimilació, la distribució i l'especiació d'aquests elements.[224] La diferència de contingut de fosfat en l'aigua dels dos punts de mostreig podria explicar el fet que el factor BC més elevat s'obtingui a la zona amb el menor contingut de fosfat, fet que sembla indicar que l'absorció d'arsènic disminueix en aigües amb un nivell elevat de fosfat.

La Taula 32 recull els valors de contingut d'arsènic d'algues del mateix gènere d'altres localitats a la per tal de comparar-lo amb els resultats d'aquest estudi. Les algues i les plantes aquàtiques de la conca del Loa viuen en un ambient amb un contingut d'arsènic elevat, per tant han desenvolupat mecanismes per a tolerar-lo (que poden ser diferents entre espècies). Val a dir, que el contingut d'arsènic en *Chara vulgaris* del riu Chelpa,

Iran, té un valor semblant al de la *Chara* sp. del Loa tot i que el contingut d'arsènic en el darrer és superior al de l'aigua del Chelpa.

**Taula 32: Valors bibliogràfics per a plantes d'aigua dolça similars.**

| Mostra | Lloc de mostreig | As (aigua) µg $l^{-1}$ | As (mostra) mg $kg^{-1}$ | Especiació A | Referència |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Cladophora* sp.** | Riu Danubi Hongria | 1,1 ± 0,2 | 5,06 – 9,33 | + | [77] |
| ***Myriophylum* sp.** | Riu Danubi Hongria | 1,1 ± 0,2 | 5,42 | + | [77] |
| ***Cladophora glomerata*** | Riyadh Aràbia Saudí | - | 0,45 – 18,48 | - | [225] |
| ***Myriophyllum aquaticum*** | Riu Loa Xile | - | 90 – 900 | - | [221] |
| ***Zannichellia palustris*** | Riu Loa Xile | - | 600 - 800 | - | [221] |
| ***Chara vulgaris*** | Riu Chelpa Iran | 150 | 212,5 ± 0,4 | - | [91] |
| ***Scirpus* sp.** | Riera Meager Canadà | 286 – 303 | 4,5 – 7,1 | + | [90] |
| ***Cladophora glomerata*** | Riu Hayakawa Japó | 17 | 18 | + | [89] |

A: (+) Disponible (-) No disponible

*Especiació d'arsènic*

Les eficiències d'extracció varien del 5 % al 117 % (Taula 33). Les eficiències d'extracció baixes es poden atribuir a la presència d'una fracció no polar com els arsenolípids o arsènic enllaçat a components estructurals de la cèl·lula.[116,182] Per exemple, la *Cladophora* sp. (SA-1) té una concentració d'arsènic total de 11.100 mg As $kg^{-1}$, però només el 5 % dels compostos d'arsènic es van extreure essent, bàsicament, els inorgànics (veure Taula 34).

**Taula 33: Balanços de matèria per a les mostres de la conca del riu Loa.**

| Mostra | Lloc de mostreig | Ef. Ext. | Rec. Col. An. | Rec. Col. Cat. |
|---|---|---|---|---|
| ***Zannichellia palustres*** | LO-1 | 32 % | 80 % | 94 % |
| ***Azolla* sp.** | LO-1 | | | |
| ***Myriophyllum aquaticum*** | SP-1 | 67 % | 96 % | 86 % |
| ***Potamogeton pectinatus*** | TO-1 | 80 % | 60 % | 97 % |
| ***Ruppia filifolia*** | TO-1 | 34 % | 73 % | 93 % |
| ***Phylloscirpus* cf. *deserticola*** | SA-1 | 127 % | 78 % | 80 % |
| ***Cladophora* sp.** | SA-1 | 5 % | 67 % | 75 % |
| ***Chara* sp.** | LO-2 | 13 % | 73 % | 97 % |
| ***Potamogeton pectinatus*** | LO-3 | 77 % | 71 % | 100 % |
| ***Cladophora* sp.** | SS-1 | 53 % | 73 % | 92 % |
| ***Potamogeton pectinatus*** | LO-4 | 58 % | 94 % | 92 % |

La Taula 34 recull els resultats d'especiació. L'arsènic inorgànic (iAs) és majoritari i representa entre el 82 % i el 100 % de la suma d'espècies. Els compostos minoritaris que es van trobar són el DMA, el MA i el gly-sug. La presència de gly-sug en plantes aquàtiques (*P. pectinatus* i *R. filifolia*) coincideix amb estudis recents que reporten resultats similars.[66,136] No es va detectar AB, el que indica que els epífits es van eliminar correctament. A més, l'activitat microbiana que podria ser una de les causes de la seva presència[66,136] no és significant a la conca del riu Loa. En alguns cromatogrames (Figura 59d), la presència d'un compost en gran quantitat podria dificultar la quantificació d'espècies minoritàries amb temps de retenció semblant.

**Taula 34: Espècies d'arsènic en algues i plantes aquàtiques de la conca del Loa. (valor mig ± desviació estàndard, n=3, en mg As $kg^{-1}$).**

| Mostra | Lloc de mostreig | As (III) | DMA | MA | As (V) | gly-sug | iAs |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Zannichellia palustres*** | **LO-1** | 13,5 ± 1,4 | - | - | 6,7 ± 0,8 | - | 20 ± 2 |
| ***Azolla* sp.** | **LO-1** | | | | | | |
| ***Myriophyllum aquaticum*** | **SP-1** | 56 ± 1 | - | - | 80 ± 1 | - | 136 ± 3 |
| ***Potamogeton pectinatus*** | **TO-1** | 0,9 ± 0,4 | 0,2 ± 0,01 | - | 7,5 ± 0,2 | 0,84 ± 0,04 | 8,4 ± 0,6 |
| ***Ruppia filifolia*** | **TO-1** | 0,6 ± 0,1 | 0,53 ± 0,05 | - | 4,1 ± 0,3 | 0,52 ± 0,04 | 4,7 ± 0,4 |
| ***Phylloscirpus* cf. *desertícola*** | **SA-1** | 12 ± 4 | - | - | 36 ± 6 | - | 49 ± 3 |
| ***Cladophora* sp.** | **SA-1** | 2 ± 1 | - | - | 389 ± 7 | - | 391 ± 8 |
| ***Chara* sp.** | **LO-2** | 3,88 ± 0,09 | 0,14 ± 0,01 | - | 28,2 ± 0,8 | 0,93 ± 0,02 | 31 ± 2 |
| ***Potamogeton pectinatus*** | **LO-3** | 15,7 ± 0,9 | 0,17 ± 0,01 | - | 57 ± 4 | <0,49 | 73 ± 4 |
| ***Cladophora* sp.** | **SS-1** | 4 ± 1 | < 0,11 | 0,31 ± 0,02 | 64 ± 4 | - | 68 ± 5 |
| ***Potamogeton pectinatus*** | **LO-4** | 4,6 ± 0,2 | - | - | 130 ± 2 | - | 135 ± 1 |
| **Límit de detecció** | | 0,02 | 0,03 | 0,05 | 0,08 | 0,15 | |
| **Límit de quantificació** | | 0,07 | 0,11 | 0,15 | 0,28 | 0,49 | |

A tall d'exemple es mostren els cromatogrames de bescanvi aniònic i catiònic del *P. pectinatus* (LO-4) i la *Chara* sp. (LO-2) en la Figura 59. Es pot veure com predomina l'arsènic inorgànic, essent menor la presència d'altres compostos (gly-sug i DMA).

Les mostres provinents de TO-1 i SA-1 presenten la mateixa distribució de compostos d'arsènic, encara que pertanyen a espècies biològiques diferents. Aquesta observació està d'acord amb la hipòtesi de Kabata-Pendias, *et al.* [226] segons la qual l'absorció, transformació i acumulació d'arsènic en algues que creixen sota estrès ambiental depèn més de les condicions ambientals que de les espècies biològiques.

Es va observar la presència de diatomees en les algues (*Chara* sp. i *Cladophora* sp.) i en la planta *P. pectinatus* (LO-3). No es va veure que aquestes tinguessin cap efecte en l'eficiència d'extracció, ni l'arsènic total, ni en l'especiació (veure Taula 31 i Taula 34).

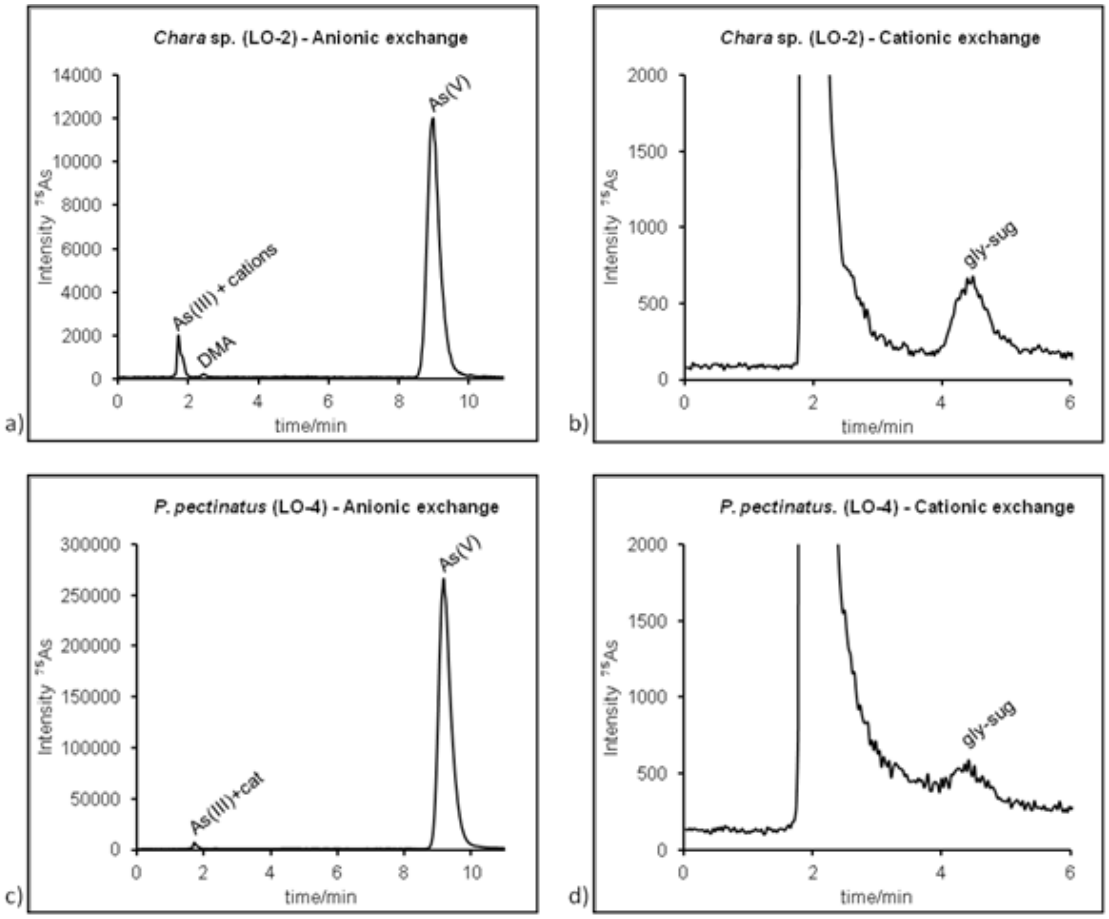



**Figura 59: Cromatogrames de bescanvi aniònic (a) i catiònic (b) d'una mostra de *Chara* sp. (LO-2) i de *P. pectinatus* (c i d, respectivament).**

*Paràmetres de qualitat avaluats*

*Exactitud*

L'exactitud del mètode es va comprovar analitzant el CRM BCR 279 Sea lettuce (*Ulva lactuca*). El valor obtingut, 2,9 ± 0.3 mg As $kg^{-1}$, concorda amb el valor certificat (3,09 ± 0.20 mg As $kg^{-1}$) si es consideren les incerteses corresponents. La quantificació de l'especiació es va avaluar mitjançant la determinació d'espècies d'arsènic en el CRM BCR 269 i l'extracte de *Fucus serratus*[132], i es troba recollida a la Taula 37 (Capítol 5, pàgina 130) i a la Taula 38 (Capítol 5, pàgina 131) juntament amb els valors trobats a la literatura.

*Límits de detecció i quantificació*

Els límit de detecció i de quantificació per a l'arsènic total és de 0,003 mg As $kg^{-1}$ i 0,01 mg As $kg^{-1}$, respectivament. Els límits de les espècies es donen a la Taula 34 i són del mateix ordre que els obtinguts en estudis previs.

*Comentaris finals*

Aquest estudi és el primer que considera la presència d'espècies d'arsènic en algues i plantes aquàtiques de la conca del riu Loa, Xile. Les mostres presenten un interval ampli de concentracions que abasta des de 20 fins a 341 mg As $kg^{-1}$, excepte una mostra, *Cladophora* sp. que amb una concentració de 11.000 mg As $kg^{-1}$ es pot classificar com a hiperacumuladora. L'arsènic inorgànic predomina en totes les mostres, i representa entre el 82 i el 100 % de les espècies d'arsènic mesurades. Varies mostres presenten petites quantitats de DMA, MA i gly-sug. La informació obtinguda pot resultat útil per a futurs estudis de bioremediació i en la selecció d'organismes amb finalitat de biomonitorització en aquesta zona.

# CAPÍTOL 5

# Capítol 5

## GLOBAL OVERVIEW OF THE RESULTS

The experimental results presented in the previous chapters are now discussed globally, merging the individual studies to achieve a complete overview of the thesis.

## 5.1 Analytical considerations

The challenge that environmental samples pose to analytical chemists lies in the changing nature of matrices. Method tuning is crucial to ensure a trusty result, so modifications of the processing procedure, the extracting method, the separation system and the detection capacity spring to mind. From sampling to data assessment, several key decision are to be selected on the basis of groups' know-how, available equipment and instruments, bibliographical information, availability of sample amount, among others.

### 5.1.1 ARSENIC SPECIATION METHODOLOGY

Arsenic speciation is far from a consensus in the procedures to be followed. A myriad of methods is reported in the literature and there are remerkable differences among research groups. The comparison and selection of the most suitable method is an herculean job that ought to be performed for each matrix. As long as the nature of environmental samples is disparate, methods have been adapted consequently. Another source of method variation is the aim of the study, for instance: biodisponibility, detection of toxic species (iAs), transformation of species, identification of metabolites, among others. In this study, the selection of the analytical method was strongly influenced by the conservation of the original arsenic species in the samples.

The first steps of a methodology are crucial in arsenic speciation and a study was performed in order to assess the effect of sample processing. The considered storage methods were drying and freezing under different conditions. Sample freezing resulted in a great loss of arsenic, that might be easily avoided by processing fresh samples. Working with non-dried samples was extremely difficult due to complex handling and led to poor result reproducibility, so drying the sample after collection is heavily recommended. The choice of the drying method will depend on factors such as

remoteness of the sampling site, availability of equipment, among others. However, there are some cases that freezing cannot be avoided due to the nature of the sampling (remoteness of the sites, long workdays), which is the case of the samples from the Loa River Basin, the Thermaikos Gulf and the Santorini Caldera performed by our partners in Chile, Greece and Germany, respectively. This is an example of the variety of methodologies that can be found in the field of speciation. They were aware that this procedure might led to an underestimation of arsenic content, but it was the most suitable with the resources available. To sum up, the sought objective was fulfil with this study and the main recommendation is to avoid freezing when other methods are suitable.

The extraction of the arsenicals is mandatory to perform the speciation, but the election of the method is vital. Using aggressive procedures and strong extracting agents may increase the yield; still, the integrity is not ensured. In the present study, water was selected as extracting agent, since is soft extracting agent, and samples were shacked in an end-over-end rotator overnight, as long as a gentle method minimises species inter-conversion. Extraction efficiencies for algal samples ranged broadly between algal division, 28 % - 106 % for ochrophyta (brown), 9 % - 48 % for rhodophyta (red) and 14 % - 73 % for chlorophyta (green), being the brown the phylum with a higher fraction of extractable arsenic. To our mind, further comparisons might be highly speculative. Extraction efficiencies reported in the literature are in agreement with our values (see Table 35). Column recoveries for algal samples ranged broadly between algal division, 22 % - 102 % for ochrophyta (brown), 11 % - 68 % for rhodophyta (red) and 19 % - 105 % for chlorophyta (green). The samples from the Thermaikos Gulf had lower recoveries. For instance, recoveries for ochrophyta ranged between 53 % and 102 % if we do not consider these samples. The results obtained are in the range or lower than those reported in the literature (see Table 35). Several studies do not give this quality parameter.

Table 35: Extraction efficiencies and column recoveries reported in the literature for algae.

| Reference | Extraction method | | Extraction efficiency | Column recovery |
|---|---|---|---|---|
| **Present thesis** | $H_2O$<br>End-over-end (16 h) | Chlorophyta:<br>Rhodophyta:<br>Ochrophyta: | 14 – 73 %<br>9 – 48 %<br>28 – 106 % | 19 – 105 %<br>11 – 68 %<br>22 – 102 % |
| **Hirata and Toshimitsu.**[129] | $H_2O$<br>Ultrasound assisted (15 min) | Ochrophyta: | 9.3 – 94.6 % | 51 – 72 % |
| **Llorente-Mirandes, et al.**[66] | $H_2O$<br>End-over-end (16 h) | Chlorophyta:<br>Rhodophyta:<br>Ochrophyta: | 45.6 – 69 %<br>77.4 – 86.9 %<br>55.6 – 88.6 % | 78.7 – 53.4 %<br>77.4 – 86.9 %<br>72.0 – 83.2 % |
| **Shaeffer, et al.**[77] | $H_2O$<br>Ultrasound assisted (30s)<br>End-over-end (16 h) | Chlorophyta:[a]<br>Aquatic plant:[a] | 10 – 38 %<br>26 – 53 % | 90 – 97 %<br>83 – 98 % |
| **Thomson, et al.**[108] | **Sequential** | | | |
| | Lipid fraction<br>$CHCl_3$:MeOH<br>(2:1 v/v)<br>Vortex (30s)<br>End-over-end (4h) | Chlorophyta:<br>Chlorophyta:[b]<br>Rhodophyta: | 19 – 44 %<br>5 – 21 %<br>21 – 24 % | Not reported |
| | Aqueous fraction<br>$H_2O$<br>1h 100°C | Chlorophyta:<br>Chlorophyta:[b]<br>Rhodophyta: | 23 – 35 %<br>17 – 30 %<br>45 – 46 % | Not reported |
| **Miyashita, et al.**[89] | $H_2O$:MeOH (1:1 v/v)<br>Ultrasound assisted (10 min) | Chlorophyta:[a] | 16 % | Not reported |

[a]: freshwater [b]:estuarine

The multispecies nature of the extracts is a nuisance that avoids the possibility to directly analyse them. A separation step previous to detection is required to quantify each compound. The most common technique used is the HPLC as it was described in page 19. The existing method was used in the majority of the studies: analytical anionic exchange column and using as mobile phase $NH_4H_2PO_4$ (20 mM, pH 5.8), and analytical cationic exchange column and using as mobile phase $C_5H_6N^+COO^-$ (20 mM, pH 2.6). The performance of the method was adequate for most samples and worked properly with the ICP-MS. However, the lack of structural information provided by the ICP-MS was an impairment and we set the objective of optimizing a chromatographic method compatible with a molecular mass spectrometer (MSD-TOF). The low volatility of $H_2PO_4^-$ discouraged the use of this electrolyte in coupling, so $NH_4HCO_3$ was selected due to its compatibility with the detector. Finally, we were able to optimize a LC-MSD-TOF method that provides structural information, but we did not consider quantification of arsenicals, and further work is required to be used with this aim.

It was not the objective of the thesis to improve the detection of arsenic, so most of the methods used were already optimized by previous work of the research group. Even thought, four different detectors were used with different aim:

- ICP-MS and ICP-SF-MS: We used the coupling of LC and ICP-MS for speciation of samples because of the high specificity and sensitivity of this technique at trace level concentrations. However, identification of peaks relies in retention time matching with standards and standard addition. ICP-SF-MS was used for arsenic speciation in samples from Santorini in a collaborative study with the Universität Bremen.
- MSD-TOF: The coupling of LC and MSD-TOF allowed to check the identity of a compound when the retention time matching and the standard addition were not enough for confirming their identity.
- HG-AFS: The optimization of mobile phases was carried out using this detector due to the low operation costs and adequate detection limits. However, only those species that form the hydride can be detected which makes this detector unsuitable for algae speciation, since arsenosugars cannot be detected. HG-AFS was used in the quantification of total arsenic in sea water, whose high concentration in chloride might cause interferences in the ICP-MS, but not in this technique.

### 5.1.2 Quality Control in Analytical Speciation

The main drawback in elemental speciation is the lack of Certificate Reference Materials. Few attempts have been done by some certification organisms and most of them empowered by the necessity of controlling food and feed. Regarding algae, there is only a CRM commercially available, so other materials were analysed to check accuracy relying in the comparison of the obtained results with those reported in the literature.

A feasibility study was conducted on a Reference Material prepared from the alga wakame for arsenic species. Despite its homogeneity, the material was not suitable for this purpose due to the presence of unknown chromatographic peaks, difficulties in the digestion and extraction procedures and the fact that the sample did nor had $SO_3$-sug neither $SO_4$-sug. We suggest the study of the suitability of a material prepared from the alga *Fucus vesiculosus*, that are commercially available[227] and has the four arsenosugars.

We developed a method for preparing solutions for some arsenosugars usually present in algae using anion exchange preparative chromatography. We obtained solutions containing $PO_4$-sug, $SO_3$-sug and $SO_4$-sug from the alga *Fucus vessiculosus*. The identity of each arsenosugar was confirmed by molecular mass spectrometry and the purity of the solution by analytical chromatography coupled to ICP-MS. Moreover, the purification of arsenosugars that might be used as an standard will allow the quantification of this compounds with their calibration curve.

The CRM 279 Sea lettuce (*Ulva lactuca*) is used by several research groups as a control in speciation studies, even though arsenic species are not certified. The extraction efficiency obtained by the used soft method (57-59 %) are in the order of the values reported in the literature using methods more aggressive (53-57 %, see Table 36). Foster, *et al.*[115], reported a 77 % using assisted microwave extraction MeOH:$H_2O$ (1:1, v/v) 70°C 15 min. The results obtained for the CRM speciation are shown in Figure 60 and Table 37. The different methods produce similar results, except for the 2 % $HNO_3$ extraction that had higher As(V) and no arsenosugars were found. On the other hand, the method that we used extracted more arsenosugars than the others and As(III) was quantified. It should be taken into account that the method used in the thesis is the simplest and it obtains results in the order of the most sophisticated methods. The extraction method used by Hsieh, et al.[130] had the highest extraction efficiency reported in the literature, 84 %. They used as extracting agent a mixture of mobile phase and methanol (1:1, v/v) at 60°C (20 min, MW assisted). The species extracted were iAs, As-Sug and Met-iAs, which suggest that the method preserves the original species.

**Table 36: Comparison of extraction efficiencies for CRM 279 reported in the literature.**

| Study | Extraction efficiency | Extraction method |
|---|---|---|
| **Present thesis** | 57 - 59% | $H_2O$<br>Room temperature 16 h<br>End-over-end |
| **Foster, *et al.*[115]** | 77 % | MeOH:$H_2O$ (1:1, v/v)<br>70°C 15 min<br>MW assisted |
| **Foster, *et al.*[115]** | 57 % | 2 % $HNO_3$<br>95°C 6 min<br>MW assisted |
| **Caumette, *et al.*[138]** | 53 % | $H_2O$<br>60°C 4 h<br>Ultrasounds 15 min |
| **Hsieh, *et al.*[130]** | 84 % | $NH_4HCO_3$ (0,5 mM, 1 %<br>MeOH, pH 8,5): MeOH (1:1 v/v)<br>MW assisted<br>60°C 20 min |

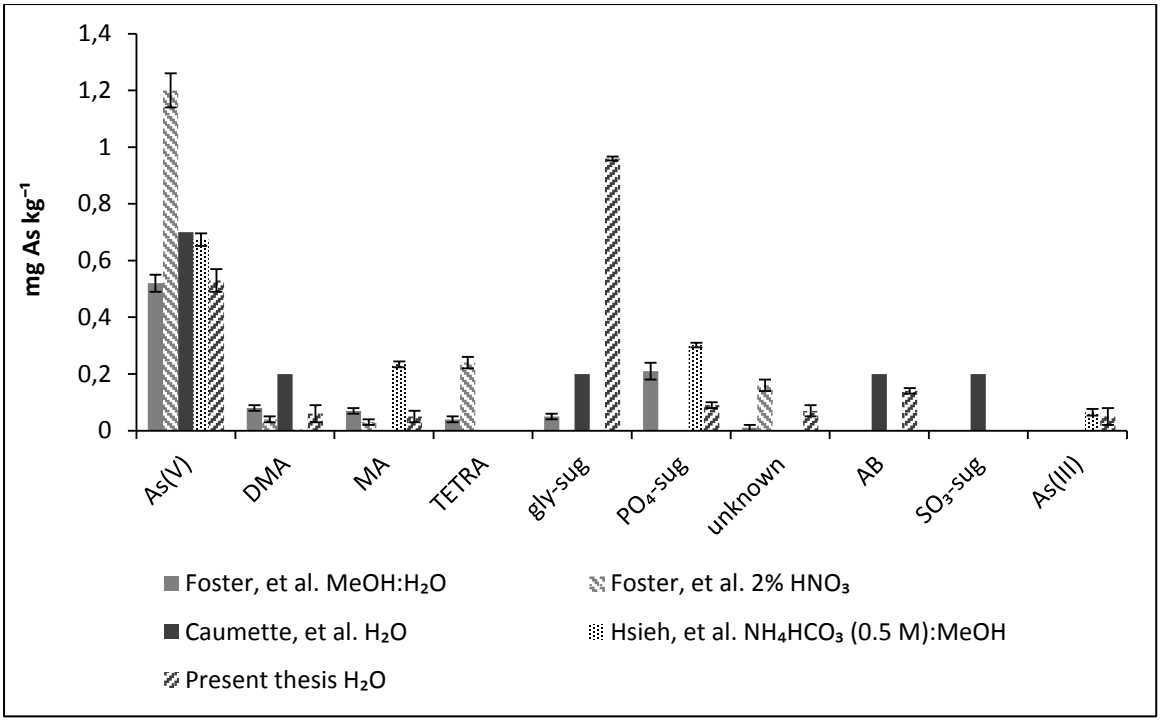



**Figure 60: Comparisson of extraction methodologies in the speciation of CRM 279.**

**Table 37: Species in the extracts of BCR CRM 279 Sea lettuse (*Ulva lactuca*). Reported data in the literature and obtained data during the experimental phase. Values are given in mg As kg$^{-1}$.**

| | As(V) | As(III) | DMA | MA | TETRA |
|---|---|---|---|---|---|
| **Foster, *et al.*[115]** | 0,52 ± 0,03 | | 0,08 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| | 1,2 ± 0,06 | | 0,04 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 | 0,24 ± 0,02 |
| **Caumette, *et al.*[138]** | 0,7 | | 0,2 | | |
| **Hsieh, *et al.*[130]** | 0,674 ± 0,022 | 0,065 | 0,004 | 0,234 | 0,01 |
| **Chapter 3.1 i 4.5** | 0,53 ± 0,04 | 0,06 ± 0,03 | 0,06 ± 0,03 | 0,04 ± 0,01 | |
| **Chapter 4.2** | 0,52 ±0,06 | 0,04 ± 0,03 | 0,07 ± 0,02 | 0,05 ± 0,02 | |
| **Chapter 4.3** | 0,53 ± 0,04 | 0,06 ± 0,03 | 0,06 ± 0,03 | 0,04 ± 0,01 | |
| | 0,37 ± 0,01 | | 0,045 ± 0,004 | 0,013 ± 0,003 | |
| | **gly-sug** | **$PO_4$-sug** | **$SO_3$-sug** | **AB** | **unknown** |
| **Foster, *et al.*[115]** | 0,05 ± 0,01 | 0,21 ± 0,03 | | | 0,01 ± 0,01 |
| | | | | | 0,16 ± 0,02 |
| **Caumette, *et al.*[138]** | 0,2 | | 0,2 | 0,2 | |
| **Hsieh, *et al.*[130]** | | 0,302 | | | 0,008 |
| **Chapter 3.1 i 4.5** | 0,096±0,004 | 0,08 ± 0,01 | | 0,14 ± 0,01 | 0,07 ± 0,02 |
| **Chapter 4.2** | 0,092 ±0,07 | 0,10 ± 0,01 | | 0,15 ± 0,01 | 0,081 ± 0,07 |
| **Chapter 4.3** | 0,096 ±0,004 | 0,08± 0,01 | | 0,14 ± 0,02 | 0,07 ± 0,02 |
| | 0,166 ± 0,07 | 0,051 ± 0,005 | | | 0,022 ± 0,001 |

The most widely used Reference Material in arsenic speciation in marine algae is the extract of *F. serratus*[132], even though species are not certified. The vast amount of data

reported in the literature is used as a reference values. In this thesis, the extract was analysed several times (Table 38). The values obtained are consistent with those reported in the literature.

**Table 38: Species in the extract of *F. serratus*. Reported data in the literature and obtained data during the experimental phase. Values are given in µg in the extract.**

| *Reference/Study* | DMA | gly-sug | $PO_4$-sug | $SO_3$-sug | $SO_4$-sug |
|---|---|---|---|---|---|
| **Madsen, *et al.*[132]** | 0,005 (20 %) | 0,10 (3,6 %) | 0,086 (2,9 %) | 0,62 (3,8 %) | 0,40 (3,1 %) |
| | | 0,088 (21 %) | 0,075 (2,7 %) | 0,57 (2,2 %) | 0,10 (2,6 %) |
| **Chapter 3.1** | 0,01 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,56 ± 0,04 | 0,37 ± 0,02 |
| **Chapter 4.1** | 0,01 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,56 ± 0,04 | 0,37 ± 0,02 |
| **Chapter 4.2** | 0,090 ± 0,006 | 0,08 ± 0,02 | 0,09 ± 0,01 | 0,58 ± 0,03 | 0,39 ± 0,01 |
| **Chapter 4.3** | 0,03 ± 0,02 | 0,099 ± 0,009 | 0,080 ± 0,002 | 0,55 ± 0,02 | 0,376 ± 0,005 |
| **Chapter 4.3** | 0,01 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,56 ± 0,04 | 0,37 ± 0,02 |
| **Chapter 4.4** | 0,01 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,56 ± 0,04 | 0,37 ± 0.,2 |
| **Almela, *et al.*[133]** | | 0,098 (1,6 %) | 0,084 (0,4 %) | 0,65 (3,4 %) | 0,39 (2,5 % |
| **Schmeisser, *et al.*[134]** | | 0,098 (4,1 %) | 0,082 (6,5 %) | 0,58 (5,3 %) | 0,39 (5,9 %) |
| **Kohlmeyer, *et al.*[135]** | | 0,088 (4,7 %) | 0,089 (4,1 %) | 0,60 (3,2 %) | 0,40 (2,9 %) |
| **Llorente, et al.[66]** | 0,01 ± 0,01 | 0,10 *± 0,01* | 0,09 *± 0,01* | 0,64 *± 0,02* | 0,40 ± 0,01 |
| **Ruíz-Chancho, *et al.*[136]** | | 0,10 ± 0,03 | 0,09 ± 0,01 | 0,69 ± 0,13 | 0,45 ± 0,08 |

Mass balances are used to assess the performance of different steps during the analysis. Extraction efficiency evaluates the percentage of arsenic extracted from the sample. Since we use water as extracting agent, it is the hidrosoluble fraction of the species. Column recovery allows to evaluate correctly the quantification of the species and to guarantee the correct chromatographic separation. These parameters were discussed in the previous section.

## 5.2 Environmental outlook

The generation of data from unstudied areas is one of the most important contributions of the thesis. Not only were total arsenic determined, but also content on arsenicals have been reported, which allows a deeper interpretation of the results. In the first place, only is total arsenic content taken into account in order to simplify discussion; then arsenicals will be considered.

### 5.2.1 ALGAE

Content of algal samples is displayed in Figure 61 grouped according to their phylum and families. At first glance, it can be seen that brown algae (a) accumulate more arsenic than the rest of phyla (29 – 150 mg As $kg^{-1}$), with the exception of *Padina* spp. which had 7.7 – 11.5 mg As $kg^{-1}$, irrespective of species and sampling site. Red (b) and green (c) algae had 4.6 – 12.0 mg As $kg^{-1}$ and 1.4 – 9.2 mg As $kg^{-1}$, except for two samples of *C. fragile* which had 23 and 30 mg As $kg^{-1}$.

The sampling locations, that are displayed with different patterns, seems to have no influence in the arsenic content. An ANOVA considering only brown algae ($\alpha$ = 0,05) confirms this hypothesis.

Arsenic content reported in the literature[66,86,87,174,180,183,185,189–196] for algae from different families seems to be irrespective of the sampling site except from some specific areas such as the Venice Lagoon.[84] Therefore; our values for Sargassaceae (4.2 – 150 mg As $kg^{-1}$), Laminareceae (68.0 ± 20.6 mg As $kg^{-1}$), Dictyotaceae (1.3 – 20.9 mg As $kg^{-1}$), Gracialariaceae (5.7 – 12.2 mg As $kg^{-1}$), Cystocloiniaceae (0.28 – 5.0 mg As $kg^{-1}$), Codiaceae (24 mg As $kg^{-1}$) and Ulvaceae (1.39 – 5.3 mg As $kg^{-1}$) are in the order of those reported.

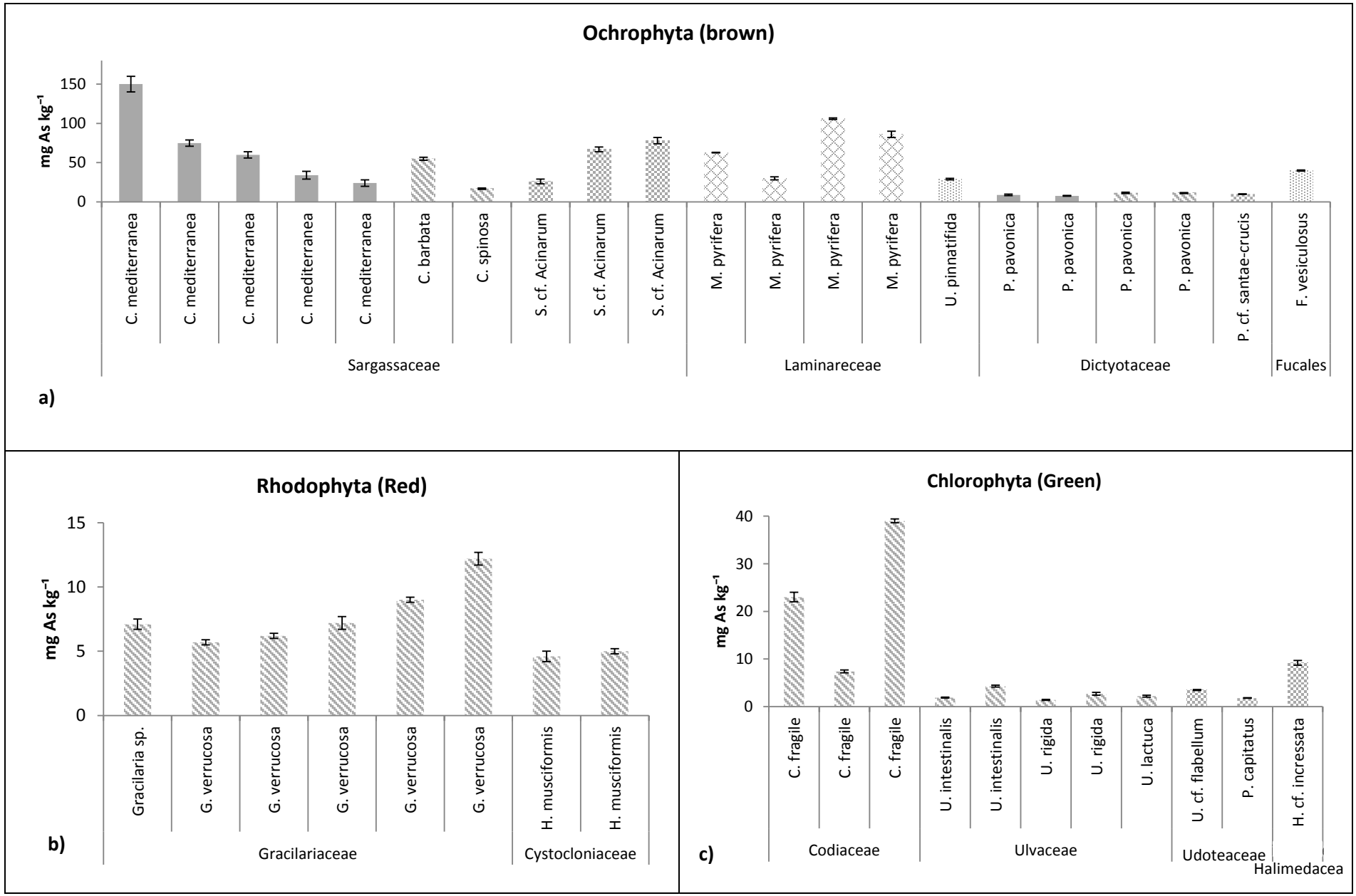



**Figure 61: Total arsenic content in analysed samples, data is grouped according the phylum, ochrophyta (a), rhodophyta (b) and chlorophyta (c) and family.**

The predominance of arsenosugars is overwhelming in most samples and, in some of them, only they are quantified (see Figure 62). Nonetheless, the arsenical distribution in Sargassaceae algae is at odds with the other families, since they present a large proportion of inorganic arsenic. Furthermore, *P. capitatus* and *H.* cf. *incressata* also had a high percentage of inorganic arsenic; however, only one sample was analysed, and biased conclusions might be drawn. In addition, *P. capitatus* did not have arsenosugars, which is an abnormal behaviour. The occurrence of arsenobetaine is not usual among sampled, mostly due to the thorough cleaning of algae. Further discussion considering sampling points will be anything but too speculative since not enough samples were analysed and not all genus were sampled in every location.

In view of the fact that arsenosugars are the most abundant arsenic fraction, the occurrence of individual arsenosugar is displayed in Table 39, with the exception of *P. capitatus*, that did not have arsenosugars. Gly-sug was present in all samples, being the most common arsenosugar. According to the metabolic routes discussed in Chapter 1, gly-sug is an intermediate in the synthesis to the rest of arsenosugars.[62,67] Moreover, the degradation of arsenosugars in marine environment converges in gly-sug, which may explain the presence of this arsenical in all samples.[76] $PO_4$-sug and $SO_3$-sug majorly occur in brown algae, whilst few green algae had those compounds. Regarding red algae, some Gracilariaceae had $PO_4$-sug and $SO_3$-sug while Cystocloniaceae did not; however, only algae from two families and one location were analysed. Literature reported the occurrence of $SO_4$-sug in *Sargassum* spp. and *Fucus* spp.,[66,86,110,132] which agrees with our results.

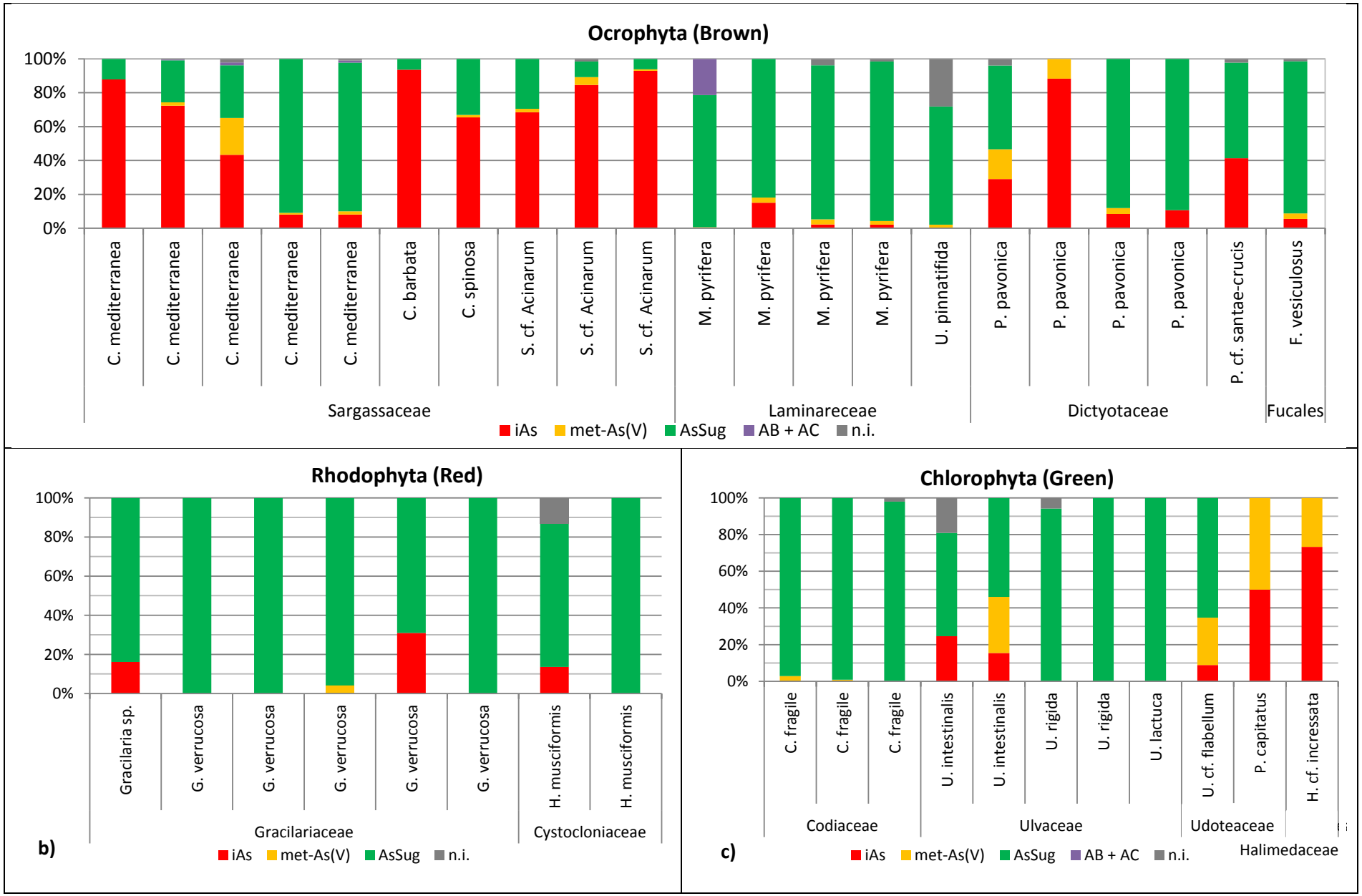



Figure 62: Distribution of arsenic species in analysed samples, data is grouped according the phylum, ochrophyta (a), rhodophyta (b) and chlorophyta (c), and family.

Table 39: Occurrence of arsenosugars in analysed algae

| Family[A] | Species | Site | $PO_4$-sug | $SO_3$-sug | $SO_4$-sug | gly-sug |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ■ Sargassaceae | *C. mediterranea* | Lloret de Mar (GI) | | 1 | | 1 |
| | *C. mediterranea* | Lloret de Mar (GI) | 1 | 1 | | 1 |
| | *C. barbata* | Agia triada (GR) | | 1 | | 1 |
| | *C. spinosa* | Agia triada (GR) | | 1 | | 1 |
| | *S.* cf. *Acinarum* | Panamà | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | *S.* cf. *Acinarum* | Cai Zapatilla (PA) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | *S.* cf. *Acinarum* | Platja del Istmito (PA) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ■ Laminareceae | *M. pyrifera* | Fin del Mundo (AR) | 1 | 1 | | 1 |
| | *M. pyrifera* | Estancia Harberton (AR) | 1 | 1 | | 1 |
| | *U. pinnatifida* | Rías Baixas (PO) | 1 | | | 1 |
| ■ Dictyotaceae | *P. pavonica* | Lloret de Mar (GI) | 1 | 1 | | 1 |
| | *P. pavonica* | Agia triada (GR) | | 1 | | 1 |
| | *P. pavonica* | Agia triada (GR) | 1 | 1 | | 1 |
| | *P. cf. santae-crucis* | Cai Zapatilla (PA) | 1 | 1 | | 1 |
| ■ Fucales | *F. vesiculosus* | - | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ▲ Gracilariaceae | *Gracilaria sp.* | Viamyl (GR) | | 1 | | 1 |
| | *G. verrucosa* | Viamyl (GR) | 1 | | | 1 |
| | *G. verrucosa* | Viamyl (GR) | 1 | 1 | | 1 |
| | *G. verrucosa* | Kalohori (GR) | 1 | 1 | | 1 |
| | *G. verrucosa* | Kalohori (GR) | 1 | 1 | | 1 |
| | *G. verrucosa* | Viamyl (GR) | | | | 1 |
| ▲ Cystocloniaceae | *H. musciformis* | Agia Triada (GR) | | | | 1 |
| | *H. musciformis* | Viamyl (GR) | | | | 1 |
| ◆ Codiaceae | *C. fragile* | Agia Triada (GR) | | | | 1 |
| | *C. fragile* | Viamyl (GR) | 1 | | | 1 |
| | *C. fragile* | Viamyl (GR) | | | | 1 |
| ◆ Ulvaceae | *U. intestinalis* | Agia Triada (GR) | | | | 1 |
| | *U. intestinalis* | Viamyl (GR) | | | | 1 |
| | *U. rigida* | Agia Triada (GR) | | | | 1 |
| | *U. rigida* | Kalohori (GR) | | | | 1 |
| | *U. lactuca* | Viamyl (GR) | | | | 1 |
| ◆ Udoteaceae | *U.* cf. *flabellum* | Cai Zapatilla (PA) | 1 | 1 | | 1 |
| ◆ Halimedaceae | *H.* cf. *incressata* | Cai Zapatilla (PA) | | | | 1 |

[A] Símbols de la divisió de les algues: bruna (ocròfits)■, (rodòfits) roja ▲, (cloròfits) verda ◆

### 5.2.2 MARINE PLANTS

A few aquatic plants were analysed during the work, namely: *T. testudinum* from Panama. Arsenic content in *T. testudinum* was in the order of 1 mg As $kg^{-1}$, which in slightly lower than the reported for red and green algae, still only three samples were analysed and no conclusion can be drawn. The quantified arsenicals were the inorganic forms and the arsenosugar gly-sug, as well as $PO_4$-sug in one sample (see Figure 63). Literature values for total arsenic in *Thalasia* spp. ranged from 1.04 to 8.2 mg As $kg^{-1}$.[187,188] The speciation data we give in this is the first one for this genus of aquatic plants.

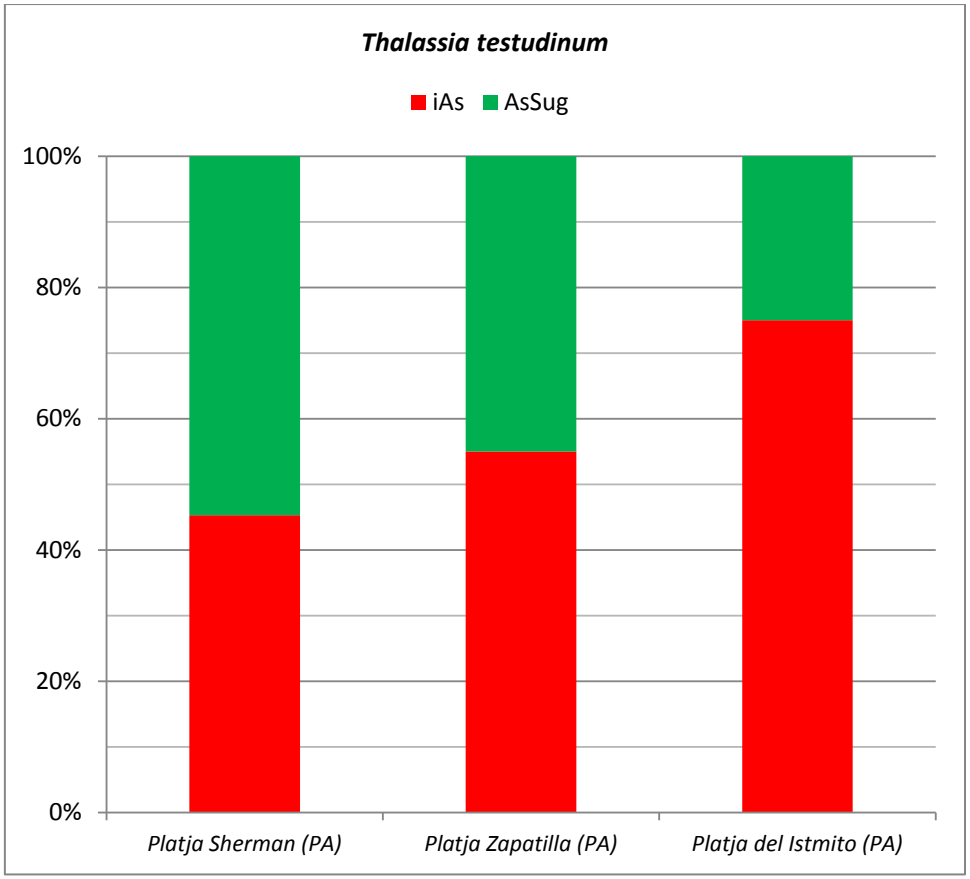



Figure 63: Distribution of arsenic in analysed *Thalassia testudinum*.

### 5.2.3 FRESHWATER ALGAE AND PLANTS

Marine flora has been widely studied in different sites around the world; however, there is few data from freshwater algae and plants. In the present thesis, arsenic speciation data from flora from the Loa River Basin (Chile) was generated and published. This study reports data on arsenic speciation in two green algae species (*Cladophora* sp. and *Chara* sp.) and in five aquatic plants (*Azolla* sp., *Myriophyllum aquaticum*, *Phylloscirpus* cf. *desserticola*, *Potamogeton pectinatus*, *Ruppia filifolia* and *Zannichellia palustris*) from the Loa River Basin in the Atacama Desert (northern Chile). The importance of this data lays in the nature of the sampling zone, since the samples were collected from an extreme habitat that had exceptionally high environmental arsenic levels, which occur naturally in the zone. Arsenic content in the Loa and its tributaries ranges from 200 to 4400 µg As $l^{-1}$ (seasonal maximum)[20]. Inorganic arsenic compounds were the main arsenic species measured in all samples. The main arsenic species in the extracts of freshwater algae and plants were arsenite and arsenate, whereas glycerol-arsenosugar (gly-sug), dimethylarsinic acid (DMA) and methylarsonic acid (MA) were present only as minor constituents (see Figura 64). Of the samples

studied, algae species accumulated more arsenic than aquatic plants. Total arsenic content ranged from 182 to 11,100 and from 20 to 248 mg As $kg^{-1}$ in algae and freshwater plants, respectively. In comparison with As concentration in water samples, there was hyper-accumulation (>0.1%) in *Cladophora* sp.

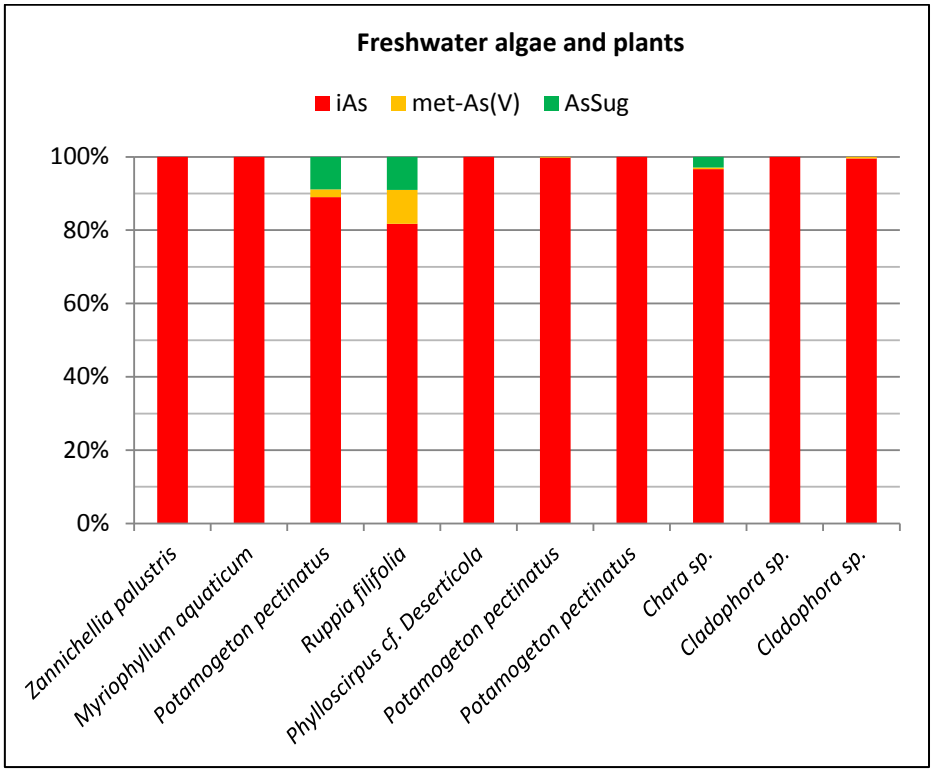



**Figura 64: Arsenic species distribution in freshwater algae and plants from the River Loa Basin.**

## 5.3 Final commentaries

The previous discussion of the results builds a general overview of the thesis. All in all, several contributions in the field of the arsenic speciation are described filling gaps in key analytical steps such as the pre-treatments and the storage of samples, the preparation of standards and the attempt of preparing a reference material. Moreover, the main contribution of the thesis to the field of arsenic speciation is the data generated in unstudied zones. The approach to the transformation of arsenic compounds in different algal morphologies and stages of the living cycle, can shed light into such an uninvestigated subject. All this data may contribute to further understanding of the role of arsenic in the environment.

Further studies on arsenic speciation in algae are needed to complete a global vision of the levels and the cicle of arsenic in the aquàtic environment. Some of the areas where further studies could be carried on are the Baltic Sea (closed sea); Canal of Suez (high ship tràfic, lessepian migration); Singapur dockyards and causeway (high ship tràfic); St. Lawrence, Elba, Wesser Rivers and Amsterdam and Roterdam Harbours (high ship tràfic, freshwater) or the Artic and Antartic regions (special environemtal interest).

# CAPÍTOL 6

# Capítol 6
## CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts i discutits en el transcurs de la tesi es poden extreure les següents conclusions:

Pel que fa la metodologia analítica:

1. En el estudi de comparació de diferents processaments de la mostra s'arriba a la conclusió que la congelació no és un mètode adient per a emmagatzemar mostres ja que pot provocar pèrdues d'arsènic en l'etapa de descongelació. Aquestes pèrdues no s'observen en mètodes d'assecament. Els mètodes més adequats són els d'assecatge, d'entre els quals es recomana la liofilització. Tot i que aquest processament requereix dels equipaments apropiats, facilita enormement la polvorització de la mostra, que és un pas clau per assegurar-ne la representativitat. L'assecatge sota flux d'aire a temperatura ambient es recomana en preses de mostra en localitzacions remotes.
2. De la posada a punt d'un mètode de separació cromatogràfica per a l'acoblament amb espectrometria de masses, es conclou que la fase mòbil de $NH_4HCO_3$ (20 mM, pH 8) permet la correcta separació dels components que se separen amb bescanvi aniònic, amb l'excepció de $SO_3$-sug i MA que coelueixen, en un temps de 17 minuts. La fase mòbil emprada en la cromatografia de bescanvi catiònic, formiat de piridini 20 mM pH 2,6, és compatible amb l'analitzador. Ambdós sistemes permeten caracteritzar els compostos separats mitjançant l'espectre de masses obtingut. L'aplicació a extractes de mostres d'algues per a comprovar la identitat de pics no identificats ha resultat satisfactòria amb la mostra de *F. vesiculosus*, tant per a cromatografia de bescanvi aniònic i bescanvi catiònic.
3. De la posada a punt d'un mètode amb cromatografia preparativa de bescanvi aniònic als extractes per a l'obtenció de fraccions que contenen un únic compost que contingui arsènic, es conclou que el mètode es pot aplicar per a l'obtenció de solucions dels arsenosucres $PO_4$-sug, $SO_3$-sug i $SO_4$-sug de manera ràpida i fàcil. Aquestes fracciones mostren la presència d'altres compostos que no presenten arsènic, tot i que no impedeixen l'ús d'aquestes solucions en LC-ICP-MS com a

solucions de referència. Malgrat la feina feta, cal posar a punt un procediment que permeti l'obtenció del gly-sug a partir dels extractes de *Fucus vesiculosus.* A més, és important comprovar l'estabilitat dels compostos aïllats tant del liofilitzat com de la solució.

4. En la preparació d'un material de referència per al control de la qualitat en estudis d'especiació d'arsènic en algues, es conclou que l'homogeneïtat del material de referència és adequada pel que fa als paràmetres estudiats; tanmateix, el compost o compostos eluïts entre el As(V) i el $SO_3$-sug no s'han pogut separar correctament ni identificar. A més, cal afegir que la finalitat del material és el control de qualitat en especiació d'arsènic en algues i per això seria més adient si contingués els quatre arsenosucres que les algues presenten normalment ($PO_4$-sug, $SO_3$-sug, $SO_4$-sug, gly-sug). Aquest fet, juntament amb la presència de compostos no identificats, pot dificultar l'ús del material com a control en l'especiació d'arsènic en algues. Es proposa la preparació d'un material amb l'alga *F. vessiculosus*, ja que compleix següents requeriments: concentració adequada d'arsènic, presència dels quatre arsenosucres d'interès i és fàcil d'obtenir al mercat local

Pel que fa als estudis de caire ambiental i contribució al coneixement del biogeocicle de l'arsènic:

a) L'estudi realitzat al golf Termaic és el primer en obtenir resultats en l'especiació d'arsènic en algues d'aquesta regió. La contribució pot ser d'utilitat per a la comprensió de comportament i el cicle de l'arsènic al medi marí. La concentració d'arsènic total a les algues dominants del golf Termaic varien entre espècies, època de l'any i zones de mostreig; les concentracions d'arsènic en teixits d'algues a l'inici de l'estiu i de la tardor eren generalment inferiors al de les mostres recollides a l'inici de l'hivern. *Cystoseira* spp. i *Codium fragile* mostren les concentracions més altes, mentre que les *Ulva* spp. les més baixes. Les mostres analitzades tenen una concentració d'arsènic total de l'ordre de les d'altres estudis en algues del mateix gènere. Respecte l'especiació, els arsenosucres són la família de compostos predominants excepte per les mostres de *Cystoseira* spp., les quals presenten l'arsenat com a compost predominant.

b) De l'estudi realitzat en algues i plantes aquàtiques de Panamà, que és el primer d'aquestes característiques que es realitza en algues de la zona es conclou que les mostres de *Sargassum* cf. *acinarum* són les que tenen un contingut superior d'arsènic, seguides de l'altre ocròfit (*Padina* cf. *sanctae-crucis*) i del cloròfit *Udotea* cf. *flabellum*. Els altres cloròfits i la planta *Thalassia testudinum* tenen un contingut baix. El contingut d'arsènic més baix es dóna a les mostres de la platja Sherman, que són les que es van recollir de la sorra. Les mostres recollides en els altres punts de mostreig tenen un contingut semblant. Totes les mostres presenten arsènic inorgànic i totes menys una, *Pencillus capitatus*, contenen arsenosucres; destaca la presència dels quatre arsenosucres a les mostres de *S.* cf. *acinarum*.

c) En el estudi realitzat en mostres de *Macrocystis pyrifera*, provinent de la Terra del Foc, i amb *Cystoseira mediterranea* i *Padina pavonica*, provinents de la Costa Brava, se n'extreuen les següents conclusions:

- La *C. mediterranea* presenta un contingut d'arsènic i una distribució d'espècies diferent entre les diferents parts estructurals. Les parts amb un contingut més elevat d'arsènic, branques i còrtex de l'estípit, estan en contacte directe amb l'aigua i presenten una proporció d'arsènic inorgànic superior a la de la resta de morfologies. La medul·la de l'estípit i el disc de fixació tenen un contingut d'arsènic molt inferir a les altres morfologies i la fracció més important és la dels arsenosucres; fet que es podria relacionar amb mecanismes de protecció d'aquestes estructures perennes que poden regenerar l'alga.
- La *P. pavonica* no presenta diferències significants en el contingut d'arsènic total entre les algues recollides a la platja i a l'aigua; tanmateix, sí que hi ha diferències en l'especiació. Els arsenosucres predominen a la mostra viva, que disminueixen a la mostra embarrancada a la platja en la qual predomina el iAs i els arsenats metilats.
- La *M. pyrifera* no presenta diferències en l'especiació i el contingut d'arsènic pel que fa la majoria de parts. Tanmateix, dues de les morfologies tenen una distribució diferent. Destaca la presència d'arsenosucres a les mostres recollides a l'aigua i la disminució d'aquest i de l'arsènic total en les mostres recollides a la sorra. Aquest efectes són més marcats a les mostres de Fin del

Mundo i només s'insinuen a les mostres de la Estancia Harberton. Aquestes dades són les primeres obtingudes en aquesta regió.

d) De l'estudi realitzat a algues i plantes marines provinents de la caldera de Santorí, es conclou que la majoria de mostres tenen un contingut baix d'arsenosucres i n'hi ha que no en tenen i en la majoria de casos és gly-sug. Dues de les mostres contenen $PO_4$-sug i $SO_3$-sug, a més de gly-sug i tenen com a principals composts els arsenosucres. D'altra banda, s'observa la presència d'arsenobetaïna en algunes mostres. Donada la severitat de les condicions ambientals, es descarta la presència d'animals epífits i la presència d'aquest compost s'atribueix a l'activitat microbiana, molt elevada en aquestes aigües.

e) De l'estudi en algues i plantes aquàtiques de la conca del riu Loa, Xile, el primer que dóna informació sobre l'especiació d'arsènic en mostres de la zona, es conclou que les mostres presenten un interval ampli de concentracions que abasta des de 20 fins a 341 mg As $kg^{-1}$, excepte una mostra de *Cladophora* sp. que amb un contingut de 11.000 mg As $kg^{-1}$ es por classificar com a hiperacamuladora. L'arsènic inorgànic predomina en totes les mostres, i representa entre el 82 i el 100 % de les espècies d'arsènic mesurades. Vàries mostres presenten petites quantitats de DMA, MA i gly-sug. La informació obtinguda pot resultat útil per a futurs estudis de bioremediació i en la selecció d'organismes amb finalitat de biomonitorització en aquesta zona.

Transversalment, es conclou que totes les mostres d'algues analitzades presenten gly-sug fet que indicaria aquest compost és important pel metabolisme de l'arsènic en les algues, fet que concorda amb el descrit a la literatura. Tampoc s'ha trobat una relació entre la divisió a la que pertany l'alga i el seu contingut d'arsènic, tot i que les mostres analitzades de certes famílies sí que tenen una major concentració d'arsènic total, com ara les Sargassaceae, les Laminarecea i les Codiaceae.

The following conclusions can be drawn from the results obtained and discoursed in the present dissertation:

Regarding the analytical methodology:

1. In relation with the pre-processing of algal samples, we conclude that freezing is not a suitable storage method for macroalgae since this procedure leads to loss of arsenic. These losses are not detected in drying procedures. We found drying to be the most convenient processing method, so we recommend lyophilization. Although this process requires a suitable system, it facilitates further pulverization of the sample, which is necessary to ensure representativeness. Air-drying is recommended when sampling is performed in a remote location due to its simplicity. We do not recommend working with non-dried samples. Freezing proved to be a process to be avoided, so we do not recommend it.
2. In respect to the developing of a chromatographic method for coupling LC with MS, we conclude that the mobile phase of 20 mM $NH_4HCO_3$ (pH 8) allows the proper separation with anionic exchange chromatography of all compounds except for $SO_3$-sug i MA in 17 minutes. In cationic exchange chromatography, the mobile phase used for LC-ICP-MS, 20 mM $C_5H_6N^+COO^-$ (pH 2,6), is compatible with the MS analyser, so no further adaptation is required. Both systems allow the characterization of the arsenicals through the mass spectra. The method was successfully applied in a sample of *Fucus vesiculosus*.
3. Regarding the setting up of a preparative chromatography of anionic exchange method for obtaining extract fraction with only one arsenocompound, we conclude that the method can be applied successfully to obtain solutions of the arsenosugars $PO_4$-sug, $SO_3$-sug i $SO_4$-sug with a rapid and easy procedure. This solution can be used as a reference in LC-ICP-MS, regardless the presence of other compounds providing that these compounds do not have arsenic. Notwithstanding the achieved objective, we need to develop a procedure to purify gly-sug and check the stability of the compounds in both, the lyophilisate and the solution.
4. From the preparation of the reference material for the quality control in arsenic speciation studies, we conclude that the homogeneity of the material is adequate for the evaluated parameters; however, the compound or compounds that elute between As(V) and $SO_3$-sug were nor separated neither identified properly. In

addition, the purpose of the material is the quality control in alga arsenic speciation; therefore, the preferred material should contain the four arsenosugars ($PO_4$-sug, $SO_3$-sug, $SO_4$-sug and gly-sug). Taking this into account, as well as the presence of unidentified compounds, the use of the prepared material might be not worthwhile. We propose the preparation of a new material from the alga *F. vessiculosus* since it fulfils the following criteria: adequate arsenic content, presence of the four arsenosugars and availability in the local market.

Regarding the environmental studies and the contribution to the arsenic cycle:

a) The study performend in the Thermaikos Gulf is the first study reporting arsenic species occurrence in this area and its contribution may be useful to further understanding of the arsenic behaviour and fate of arsenic in the marine environment. Total As concentrations in the dominant seaweeds in the Gulf of Thessaloniki generally varied between seaweed species. *Cystoseira* spp. and *Codium fragile* showed the highest total As concentrations, while *Ulva* spp. (*U. intestinalis*, *U. rigida and U. fasciata*) the lowest. Total arsenic contents in seaweed tissues in this survey were generally comparable to those previously reported for these species or species of the same genus from other coastal locations. Arsenosugars were the main arsenic compounds determined in the study except for *Cystoseira* spp. which presented inorganic arsenic as the predominant form.
b) From the study carried on algae and aquatic plants from Panama, which is the first one reporting total arsenic and arsenic species in the area, we might conclude that *Sargassum* cf. *acinarum* samples had the highest arsenic content, followed be the ocrophyte algae (*Padina* cf. *sanctae-crucis*) and the chlorophyte *Udotea* cf. *flabellum*. The other green algae and the plant *Thalassia testudinum* had a low total arsenic content. Samples from the beach at Sherman Fort had the lowest content and they were collected on the sand. The arsenic content in samples collected the other two sites was similar. All samples had inorganic arsenic and arsenosugars, with the exception of *Pencillus capitatus* that did not had arsenosugars. The presence of the four arsenosugars in the samples of *S.* cf. *acinarum* is a highlight.

c) Regarding the study with samples of *Macrocystis pyrifera* from Tierra del Fuego and *Cystoseira mediterranea* and *Padina pavonica* from Costa Brava, the following conclusions were drawn:
   - C. mediterranea had a high arsenic content and an arsenic species distribution that varies in the different structural parts. The parts with a higher content are the branches and the cortex, which are the ones in direct contact with seawater and had a higher proportion of inorganic arsenic. The medulla of the stipe and the holdfast had less arsenic content and the most common compound were the arsenosugars, which can be related with a protection mechanism for these perennial structures that can regenerate the alga.
   - Total arsenic content in samples of *P. pavonia* collected in the water and on the sand was not significantly different. Arsenosugars were dominant in the sample from the water, and deacresed dramatically in the stormcast sample, in which inorganic arsenic was the dominant arsenical.
   - The macroalga *M. pyrifera* showed no differences in the total arsenic content and in the arsenic speciation. However; two samples had a different speciation pattern. There is a strong presence of arsenosugars in samples collected from the water, and the decrease of them in samples collected in the sand. This trend is sharper in samples from Fin del Mundo while it is faint in samples from Estancia Harberton. These data are the first reported in this area.

d) From the study with algae and aquatic plants from Santorini Caldera, we conclude that most sample had a low arsenosugars contents, mainly gly-sug. Two samples had $PO_4$-sug and $SO_3$-sug. Some samples had arsenobetaïne, which origin was attributed to the high microbial activity, and it was discharted an epiphyte origil due to the severe environamental condicions.

e) From the study in the Loa River Basin, which is the the first one reporting arsenic speciation data in algae and freshwater plants, we may conclude that's amples had a wide range of concentrations of total arsenic, from 20 to 341 mg As $kg^{-1}$ (d.w.), except for one algal sample with 11,100 mg As $kg^{-1}$, *Cladophora* sp., which can be classified as a hyperaccumulator. Inorganic arsenic predominated in all samples, accounting for 82–100% of the arsenicals measured. Small amounts of DMA, MA and gly-sug were detected in several samples. This

preliminary information should contribute usefully to further bioremediation assays and to the proposal for biomonitoring organisms in this extremely arid region.

The transversal conclusion are that all algal samples analysed had gly-sug, which may indicate that this compound is vital for arsenic methabolism in algae as the literature suggests. Furthermore, no relation was found on the content of arsenic and the division, even though some famílies had higher arsenic than the rest, namely: Sargassaceae, Laminarecea and Codiaceae.

# BIBLIOGRAFIA

# BIBLIOGRAFIA


1. Greenwood, N. & Earnshaw, A. *Chemistry of the Elements.* 547–597 (ElSevier Butterworth-Heinemann, 1998).

2. Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., Weller, M. & Armstrong, F. *Shriver & Atkins' Inorganic Chemistry.* 385 (Oxford University Press, 2010).

3. Francesconi, K. A. & Edmonds, J. S. Arsenic Species in Marine Samples. *Croatica Chemica Actatia* **71,** 343–359 (1998).

4. Feldmann, J. & Krupp, E. Critical review or scientific opinion paper : Arsenosugars — a class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs ? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399,** 1735–1741 (2011).

5. Atkins, P. & Jones, L. *Química: moléculas, materia y cambio.* 375 (Ediciones Omega, 1998).

6. WHO. *The Report of World Health.* (1981).

7. Azcue, J. & Nriagu, J. in *Arsenic in Environment. Part I: Cylcing and Characterization* (Nriagu, J.) (John Wiley & Sons, Ltd., 1994).

8. Castaigne, S., Chomienne, C., Daniel, M. T., Ballerini, P., Berger, R., Fenaux, P. & Degos, L. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood* **76,** 1704–9 (1990).

9. Müller, S., Matunis, M. J. & Dejean, A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO Journal* **17,** 61–70 (1998).

10. Treleaven, J., Meller, S., Farmer, P., Birchall, D., Goldman, J. & Piller, G. Arsenic and Ayurveda. *Leukemia Lymphoma* **10,** 343–345 (1994).

11. Holmes, B. Arsenic and ancient remedies. *New Scientist* 5 (1997).

12. Wong, S. S., Tan, K. C. & Goh, C. L. Cutaneous manifestations of chronic arsenicism: review of seventeen cases. *Journal of the American Academy of Dermatology* **38,** 179–185 (1998).

13. Kerr, H. D. & Saryan, L. A. Arsenic content of homeopathic medicines. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology* **24,** 451–459 (1986).

14. Roy, P. & Saha, A. Metabolism and toxicity of arsenic : A human carcinogen. *Current Science* **82,** 38–45 (2002).

15. Mandal, B. K., Ogra, Y. & Suzuki, K. T. Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry. *Toxicology and applied pharmacology* **189,** 73–83 (2003).

16. Davidson, C. I., Wiersma, G. B., Brown, K. W., Goold, W. D., Mathison, T. P. & Reilly, M. T. Airborne trace elements in Great Smoky Mountains, Olympic, and Glacier National Parks. *Environmental Science and Technology* **19,** 27–35 (1985).

17. Ng, J. C. Environmental Contamination of Arsenic and its Toxicological Impact on Humans. *Environmental Chemistry* **2,** 146 (2005).

18. Bissen, M. & Frimmel, F. H. Arsenic — a Review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **31,** 9–18 (2003).

19. Bissen, M. & Frimmel, F. H. Arsenic - a review. Part II: Oxidation of arsenic and its removal in water treatment. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **31,** 97–107 (2003).

20. Dirección General de Aguas. *Diagnóstico y Clasificación de los Cursos y Cuerpos de Agua según Objetivos de Calidad, Cuenca Río Loa. Ministerio de Medio Ambiente, Chile* (2004).

21. Sancha, A. & Castro, M. in *Arsenic: Exposure and Health Effects IV* (Abernathy, C., Calderon, R. & Cambell, W.) 87–96 (Elsevier Inc., 2001).

22. Shrestha, R., Shrestha, M., Upadhay, N., Pradhan, R., Khadka, R., Maskey, A., Tuladhar, S., Dahal, B., Shrestha, S. & Shrestha, K. in *Arsenic: Exposure and Health Effects V* (Abernathy, C., Calderón, R. & Cambell, W.) 25–37 (Elsevier Inc., 2003).

23. Mandal, B., Chowdhury, T., Samanta, G., Basu, G., Chowdhary, P., Chanda, C., Lodh, D., Karan, N., Dhar, R., Tamili, D., Das, D., Saha, K. & Chakraborti, D. Arsenic in groundwater in seven districts of West Bengal, India--The biggest aresenic calamity in the world. *Current Science* **70,** 976–986 (1996).

24. Dhar, R., Biswas, B., Samanta, G., Mandal, B., Chakraborty, D., Roy, S., Jafar, A., Islam, A., Ara, G., Kabir, S., Khan, A. W., Ahmed, S. A. & Hadi, S. A. Groundwater arsenic calamity in Bangladesh. *Current Science* **73,** 48–59 (1997).

25. Terlecka, E. Arsenic speciation analysis in water samples: a review of the hyphenated techniques. *Environmental Monitoring and Assessment* **107,** 259–84 (2005).

26. WHO. Arsenic in drinking-water. **WHO/SDE/WS,** (2003).

27. European Council. *Directive 98/83/EC*. Directive 98/83/EC (1998).

28. Mandal, B. & Suzuki, K. T. Arsenic round the world: a review. *Talanta* **58,** 201 – 35 (2002).

29. Pontius, F., Broun, K. & Chen, C. Health Implications of Arsenic in Drinking Water. *Journal of the American Water Works Association* **86,** 53–63 (1994).

30. Environment Directorate-General (European Commission). *Ambient air pollution by As, Cd and Ni compounds. Position Paper.* (2000).

31. De la Calle, M. B., Linsinger, T., Emteborg, H., Charoud-Got, J. & Verbist, I. *IMEP-107: Total and inorganic As in rice.* EUR24314 EN (2010).

32. Naranmandura, H., Ibata, K. & Suzuki, K. T. Toxicity of dimethylmonothioarsinic acid toward human epidermoid carcinoma A431 cells. *Chemical Research in Toxicology* **20,** 1120–5 (2007).

33. Vega, L., Styblo, M., Patterson, R., Cullen, W., Wang, C. & Germolec, D. Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicology and applied pharmacology* **172,** 225–32 (2001).

34. Edmonds, J. S. & Francesconi, K. A. in *Organometallic Compounds in the Environment* (Craig, P. J.) 195–222 (Wiley, 2003).

35. Le, S. X. C., Cullen, W. W. R., Reimer, K. J. K. & Le, X. Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed, crab, and shrimp. *Clinical Chemistry* **40,** 617–624 (1994).

36. Kaise, T. & Fukui, S. The chemical form and acute toxicity of arsenic compounds in marine organisms. *Applied Organometallic Chemistry* **6,** 155–160 (1992).

37. Oya-Ohta, Y., Kaise, T. & Ochi, T. Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblasts by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **357,** 123–129 (1996).

38. Sakurai, T. Review: Biological effects of organic arsenic compounds in seafood. *Applied Organometallic Chemistry* **16,** 401–405 (2002).

39. Hedegaard, R. V. & Sloth, J. J. Speciation of arsenic and mercury in feed : why and how ? **15,** 45–51 (2011).

40. Goering, P. L., Aposhian, H. V., Mass, M. J., Cebrián, M., Beck, B. D. & Waalkes, M. P. The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicological sciences* **49,** 5–14 (1999).

41. Maeda, S. in *Arsenic in the Environment, Part 1, Cycling and Characterization* (Nriagu, J. O.) (John Wiley & Sons, Ltd., 1994).

42. Kaise, T., Watanabe, S. & Itoh, K. The acute toxicity of arsenobetaine. *Chemosphere* **14,** 1327–1332 (1985).

43. Cullen, W. R. & Reimer, K. J. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* **89,** 713–764 (1989).

44. Aposhian, H. V., Zakharyan, R., Wu, Y., Healy, S. & Aposhian, M. M. in *Arsenic. Exposure and Health Effects* (Abernathy, C. O., Calderon, R. L. & Chappell, W. R.) 296–321 (Springer Netherlands, 1997). doi:10.1007/978-94-011-5864-0

45. Challenger, F. Biological Methylation. *Chemical Reviews* **36,** 315–361 (1945).

46. Styblo, M. & Thomas, D. in *Arsenic: Exposure and Health Effects* (Abernathy, C., Calderón, R. & Cambell, W.) 283–295 (Chapman & Hall, 1997).

47. Styblo, M., Yamauchi, H. & Thomas, D. J. Comparative in vitro methylation of trivalent and pentavalent arsenicals. *Toxicology and applied pharmacology* **135,** 172–8 (1995).

48. Zhao, C. Q., Young, M. R., Diwan, B. A., Coogan, T. P. & Waalkes, M. P. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94,** 10907–12 (1997).

49. Abernathy, C. O., Liu, Y. P., Longfellow, D., Aposhian, H. V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C. & Waalkes, M. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environmental Health Perspectives* **107,** 593–7 (1999).

50. Francesconi, K. A., Tanggaard, R., McKenzie, C. J., Goessler, W. & Tanggaar, R. Arsenic Metabolites in Human Urine after Ingestion of an Arsenosugar. *Clinical Chemistry* **101,** 92–101 (2002).

51. Van Hulle, M., Zhang, C., Schotte, B., Mees, L., Vanhaecke, F., Vanholder, R., Zhang, X. R. & Cornelis, R. Identification of some arsenic species in human urine and blood after ingestion of Chinese seaweed Laminaria. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **19,** 58 (2004).

52. Hansen, H. R., Pickford, R., Thomas-Oates, J., Jaspars, M. & Feldmann, J. 2-Dimethylarsinothioyl acetic acid identified in a biological sample: the first occurrence of a mammalian arsinothioyl metabolite. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **43,** 337–40 (2004).

53. Hansen, H. R., Raab, A., Jaspars, M., Milne, B. F. & Feldmann, J. Sulfur-containing arsenical mistaken for dimethylarsinous acid [DMA(III)] and identified as a natural metabolite in urine: major implications for studies on arsenic metabolism and toxicity. *Chemical Research in Toxicology* **17,** 1086–91 (2004).

54. Raml, R., Rumpler, A., Goessler, W., Vahter, M., Li, L., Ochi, T. & Francesconi, K. A. Thio-dimethylarsinate is a common metabolite in urine samples from arsenic-exposed women in Bangladesh. *Toxicology and applied pharmacology* **222,** 374–80 (2007).

55. Salim, E. I., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Mitsuhashi, M., Yoshida, K., Endo, G. & Fukushima, S. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* **24,** 335–42 (2003).

56. Ochi, T., Kita, K., Suzuki, T., Rumpler, A., Goessler, W. & Francesconi, K. A. Cytotoxic, genotoxic and cell-cycle disruptive effects of thio-dimethylarsinate in cultured human cells and the role of glutathione. *Toxicology and applied pharmacology* **228,** 59–67 (2008).

57. Sanders, J. G. Role of Marine Phytoplankton in Determining the Chemical Speciation and Biogeochemical Cycling of Arsenic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **40,** s192–s196 (1983).

58. Sanders, J. G. Direct and Indirect Effects of Arsenic on the Survival and Fecundity of Estuarine Zooplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **43,** 694–699 (1986).

59. Brannon, J. M. & Patrick, W. H. Fixation, transformation, and mobilization of arsenic in sediments. *Environmental Science and Technology* **21,** 450–9 (1987).

60. Santosa, S. J., Mokudai, H., Takahashi, M. & Tanaka, S. The Distribution of Arsenic Compounds in the Ocean: Biological Activity in the Surface Zone and Removal Processes in the Deep Zone. *Applied Organometallic Chemistry* **10,** 697–705 (1996).

61. Howard, A. G., Comber, S. D. W., Kifle, D., Antai, E. E. & Purdie, D. a. Arsenic Speciation and Seasonal Changes in Nutrient Availability and Micro-plankton Abundance in Southampton Water, U.K. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **40,** 435–450 (1995).

62. Edmonds, J. S. & Francesconi, K. A. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia* **43,** 553–557 (1987).

63. Edmonds, J. S., Francesconi, K. A. & Hansen, J. A. Dimethyloxarsylethanol from anaerobic decomposition of brown kelp (Ecklonia radiata): A likely precursor of arsenobetaine in marine fauna. *Experientia* **38,** 643–644 (1982).

64. Francesconi, K. A., Hunter, D. A., Bachmann, B., Raber, G. & Goessler, W. Uptake and transformation of arsenosugars in the shrimp Crangon crangon. *Applied Organometallic Chemistry* **13,** 669–679 (1999).

65. McSheehy, S., Szpunar, J., Lobinski, R., Haldys, V., Tortajada, J. & Edmonds, J. S. Characterization of Arsenic Species in Kidney of the Clam Tridacna d erasa by Multidimensional Liquid Chromatography-ICPMS and Electrospray Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **74,** 2370–2378 (2002).

66. Llorente-Mirandes, T., Ruíz Chancho, M. J., Barbero, M., Rubio, R. & López-Sánchez, J. F. Measurement of arsenic compounds in littoral zone algae from the

Western Mediterranean Sea. Occurrence of arsenobetaine. *Chemosphere* **81,** 867–875 (2010).

67. Caumette, G., Koch, I. & Reimer, K. J. Arsenobetaine formation in plankton: a review of studies at the base of the aquatic food chain. *Journal of Environmental Monitoring* **14,** 2841–53 (2012).

68. Shibata, Y., Sekiguchi, M., Otsuki, A. & Morita, M. Arsenic Compounds in Zoo- and Phyto-plankton of Marine Origin. *Applied Organometallic Chemistry* **10,** 713–719 (1996).

69. Edmonds, J. S., Shibata, Y., Francesconi, K. a., Rippingale, R. J. & Morita, M. Arsenic Transformations in Short Marine Food Chains studied by HPLC-ICP MS. *Applied Organometallic Chemistry* **11,** 281–287 (1997).

70. Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X. & Hirano, S. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of Toxicology* **79,** 183–91 (2005).

71. Kirby, J., Maher, W. & Spooner, D. Arsenic Occurrence and Species in Near-Shore Macroalgae-Feeding Marine Animals. *Environmental Science and Technology* **39,** 5999–6005 (2005).

72. Khokiattiwong, S., Kornkanitnan, N., Goessler, W., Kokarnig, S. & Francesconi, K. A. Arsenic compounds in tropical marine ecosystems: similarities between mangrove forest and coral reef. *Environmental Chemistry* **6,** 226 (2009).

73. Duncan, E., Foster, S. & Maher, W. A. Uptake and metabolism of arsenate , methylarsonate and arsenobetaine by axenic cultures of the phytoplankton Dunaliella tertiolecta. *Botanica Marina* **53,** 377–386 (2010).

74. Takeuchi, M., Terada, A., Nanba, K., Kanai, Y., Owaki, M., Yoshida, T., Kuroiwa, T., Nirei, H. & Komai, T. Distribution and fate of biologically formed organoarsenicals in coastal marine sediment. *Applied Organometallic Chemistry* **19,** 945–951 (2005).

75. Kunito, T., Kubota, R., Fujihara, J., Agusa, T. & Tanabe, S. Arsenic in marine mammals, seabirds, and sea turtles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **195,** 31–69 (2008).

76. Pengprecha, P., Wilson, M., Raab, A. & Feldmann, J. Biodegradation of arsenosugars in marine sediment. *Applied Organometallic Chemistry* **19,** 819–826 (2005).

77. Schaeffer, R., Francesconi, K. A., Kienzl, N., Soeroes, C., Fodor, P., Váradi, L., Raml, R., Goessler, W. & Kuehnelt, D. Arsenic speciation in freshwater organisms from the river Danube in Hungary. *Talanta* **69,** 856–865 (2006).

78. Navratilova, J., Raber, G., Fisher, S. J. & Francesconi, K. A. Arsenic cycling in marine systems: degradation of arsenosugars to arsenate in decomposing algae,

and preliminary evidence for the formation of recalcitrant arsenic. *Environmental Chemistry* **8,** 44–51 (2011).

79. Castlehouse, H., Smith, C., Raab, A., Deacon, C., Meharg, A. A. & Feldmann, J. Biotransformation and Accumulation of Arsenic in Soil Amended with Seaweed. *Environmental Science and Technology* **37,** 951–957 (2003).

80. Soeroes, C., Goessler, W., Francesconi, K. a, Schmeisser, E., Raml, R., Kienzl, N., Kahn, M., Fodor, P. & Kuehnelt, D. Thio arsenosugars in freshwater mussels from the Danube in Hungary. *Journal of Environmental Monitoring* **7,** 688–92 (2005).

81. Meier, J., Kienzl, N., Goessler, W. & Francesconi, K. A. The occurrence of thio-arsenosugars in some samples of marine algae. *Environmental Chemistry* **2,** 304–307 (2005).

82. Guiry, M. D. & Guiry, G. . Algaebase. *World-wide electronic publication* (2013). at <http://www.algaebase.org>

83. Cabana i Pujol, M., Comelles i Folch, M., Pubill i Porta, R., Verger i Arce, Guillem Robert i Andreu, M. & Riu i Codinach, M. M. Alga. *Enciclopèdia Catalana* on–line ressource (2013). at <http://www.enciclopedia.cat/enciclopèdies/gran-enciclopèdia-catalana/EC-GEC-0076657.xml?s.q=alga#.UbM6i5z1Yfs>

84. Caliceti, M., Argese, E., Sfriso, A. & Pavoni, B. Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice lagoon. *Chemosphere* **47,** 443–454 (2002).

85. Henke, K. R. *Arsenic.* (John Wiley & Sons, Ltd, 2009). doi:10.1002/9780470741122

86. Šlejkovec, Z., Kápolna, E., Ipolyi, I., van Elteren, J. T., Slejkovec, Z. & Kapolna, E. Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the Adriatic Sea. *Chemosphere* **63,** 1098–1105 (2006).

87. Tukai, R., Maher, W. A., McNaught, I., Ellwood, M. J. & Coleman, M. Occurrence and chemical form of arsenic in marine macroalgae from the east coast of Australia. *Marine and Freshwater Research* **53,** 971–980 (2002).

88. Llorente-Mirandes, T., Ruiz-Chancho, M. J., Barbero, M., Rubio, R. & López-Sánchez, J. F. Determination of water-soluble arsenic compounds in commercial edible seaweed by LC-ICPMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59,** 12963–8 (2011).

89. Miyashita, S., Shimoya, M., Kamidate, Y., Kuroiwa, T., Shikino, O., Fujiwara, S., Francesconi, K. A. & Kaise, T. Rapid determination of arsenic species in freshwater organisms from the arsenic-rich Hayakawa River in Japan using HPLC-ICP-MS. *Chemosphere* **75,** 1065–1073 (2009).

90. Koch, I., Wang, L. H., Andrewes, P., Reimer, K. J. & Cullen, W. R. Arsenic in the Meager Creek hot springs environment , British Columbia , Canada. *Science of the Total Environment* **236,** 101–117 (1999).

91. Ghassemzadeh, F., Babaee, Y., Alavi Moghaddam, M. R., Arbab, Z. & Mohammad, H. Phytoremediation of Arsenic by Macroalga: Implication in Natural Contaminated Water, Northeast Iran. *Journal of Applied Sciences* **7,** 1614–1619 (2007).

92. Bird, M. I., Wurster, C. M., de Paula Silva, P. H., Bass, A. M. & de Nys, R. Algal biochar - production and properties. *Bioresource Technology* **102,** 1886–1891 (2011).

93. Vasquez, J. A. & Guerra, N. The use of seaweeds as bioindicators of natural and anthropogenic contaminants in northern Chile. *Hydrobiologia* **326-327,** 327–333 (1996).

94. European Comission. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. *WFD* **Directive,** (2000).

95. Pinedo, S., García, M., Satta, M. P., Torres, M. d. & Ballesteros, E. Rocky-shore communities as indicators of water quality: A case study in the Northwestern Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin* **55,** 126–135 (2007).

96. Krause-Jensen, D., Greve, T. M. & Nielsen, K. Eelgrass as a Bioindicator Under the European Water Framework Directive. *Water Resources Management* **19,** 63–75 (2005).

97. Hansen, H. K., Ribeiro, A. & Mateus, E. Biosorption of arsenic(V) with Lessonia nigrescens. *Minerals Engineering* **19,** 486–490 (2006).

98. Devalla, S. & Feldmann, J. Determination of lipid-soluble arsenic species in seaweed-eating sheep from Orkney. *Applied Organometallic Chemistry* **17,** 906–912 (2003).

99. Shariatpanahi, M. & Anderson, A. C. Uptake, distribution and elimination of monosodium methanearsonate following long term oral administration of the herbicide to sheep and goats. *Journal of Environmental Science and Health - Part B* **19,** 555–64 (1984).

100. Morita, M. & Shibata, Y. Isolation and Identification of Arseno-Lipid from a Brown Alga, Undaria pinnatifida (Wakame). *Chemosphere* **17,** 1147–1152 (1988).

101. García-Salgado, S., Raber, G., Raml, R., Magnes, C. & Francesconi, K. A. Arsenosugar phospholipids and arsenic hydrocarbons in two species of brown macroalgae. *Environmental Chemistry* **9,** 63 (2012).

102. Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, C., Danielsson, L. G., Muntaus, H., van Leeuweng, H. P. & Łobińsky, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* **72,** 1453–1470 (2000).

103. Rubio, R., Ruíz Chancho, M. J. & López-Sánchez, J. F. Sample pre-treatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants. *Trends in Analytical Chemistry* **29,** 53–69 (2010).

104. Nischwitz, V. & Pergantis, S. A. First report on the detection and quantification of arsenobetaine in extracts of marine algae using HPLC-ES-MS/MS. *Analyst* **130,** 1348–1350 (2005).

105. Grotti, M., Soggia, F., Lagomarsino, C., Goessler, W. & Francesconi, K. A. Arsenobetaine is a significant arsenical constituent of the red Antarctic alga Phyllophora antarctica. *Environmental Chemistry* **5,** 171–175 (2008).

106. Thomson, D., Maher, W. A. & Foster, S. Arsenic and selected elements in marine angiosperms, south-east coast, NSW, Australia. *Applied Organometallic Chemistry* **21,** 381–395 (2007).

107. Foster, S., Maher, W. A. & Krikowa, F. Changes in proportions of arsenic species within an Ecklonia radiata food chain. *Environmental Chemistry* **5,** 176–183 (2008).

108. Thomson, D., Maher, W. A. & Foster, S. Arsenic and selected elements in inter-tidal and estuarine marine algae , south-east coast , NSW , Australia. *Applied Organometallic Chemistry* **21,** 396–411 (2007).

109. Raber, G., Francesconi, K. A., Irgolic, K. J. & Goessler, W. Determination of "arsenosugars" in algae with anion-exchange chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **367,** 181–188 (2000).

110. García Salgado, S., Quijano Nieto, M. A. & Bonilla Simón, M. M. Assessment of total arsenic and arsenic species stability in alga samples and their aqueous extracts. *Talanta* **75,** 897–903 (2008).

111. Van Hulle, M., Zhang, C., Zhang, X. R. & Cornelis, R. Arsenic speciation in chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS. *Analyst* **127,** 634–640 (2002).

112. Wei, C., Li, W. H., Zhang, C., Van Hulle, M., Cornelis, R. & Zhang, X. R. Safety evaluation of organoarsenical species in edible porphyra from the China Sea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51,** 5176–5182 (2003).

113. Wuilloud, R. G., Altamirano, J. C., Smichowski, P. N. & Heitkemper, D. T. Investigation of arsenic speciation in algae of the Antarctic region by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-Ion Trap MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **21,** 1214 (2006).

114. Han, C., Cao, X., Yu, J.-J., Wang, X.-R. & Shen, Y. Arsenic Speciation in Sargassum fusiforme by Microwave-Assisted Extraction and LC-ICP-MS. *Chromatographia* **69,** 587–591 (2009).

115. Foster, S., Maher, W. A., Krikowa, F. & Apte, S. A microwave-assisted sequential extraction of water and dilute acid soluble arsenic species from marine plant and animal tissues. *Talanta* **71,** 537–549 (2007).

116. Francesconi, K. A. Complete extraction of arsenic species: A worthwhile goal? *Applied Organometallic Chemistry* **17,** 682–683 (2003).

117. Niegel, C. & Matysik, F.-M. Analytical methods for the determination of arsenosugars--a review of recent trends and developments. *Analytica chimica acta* **657,** 83–99 (2010).

118. Francesconi, K. A. & Kuehnelt, D. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst* **129,** 373–395 (2004).

119. Kuehnelt, D., Lintschinger, J. & Goessler, W. Arsenic compounds in terrestrial organisms. IV. Green plants and lichens from an old arsenic smelter site in Austria. *Applied Organometallic Chemistry* **14,** 411–420 (2000).

120. Sánchez-Rodas, D., Geiszinger, A., Gómez-Ariza, J. L. & Francesconi, K. A. Determination of an arsenosugar in oyster extracts by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *The Analyst* **127,** 60–65 (2002).

121. Fricke, M. W., Creed, P. A., Parks, A. N., Shoemaker, J. A., Schwegel, C. A. & Creed, J. T. Extraction and detection of a new arsine sulfide containing arsenosugar in molluscs by IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **19,** 1454 (2004).

122. Nischwitz, V. & Pergantis, S. A. Mapping of arsenic species and identification of a novel arsenosugar in giant clams Tridacna maxima and Tridacna derasa using advanced mass spectrometric techniques. *Environmental Chemistry* **4,** 187 (2007).

123. Francesconi, K. A. & Sperling, M. Speciation analysis with HPLC-mass spectrometry: Time to take stock. *Analyst* **130,** 998–1001 (2005).

124. Regmi, R., Milne, B. F. & Feldmann, J. Hydride generation activity of arsenosugars and thioarsenicals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388,** 775–82 (2007).

125. Corr, J. J. & Larsen, E. H. Arsenic speciation by liquid chromatography coupled with ionspray tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **11,** 1215 (1996).

126. Nischwitz, V., Kanaki, K. & Pergantis, S. A. Mass spectrometric identification of novel arsinothioyl-sugars in marine bivalves and algae. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **21,** 33–40 (2006).

127. Kanaki, K. & Pergantis, S. A. Precursor ion scanning for the non-targeted detection of individual arsenosugars in extracts of marine organisms. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20,** 1925–31 (2006).

128. Schmeisser, E., Raml, R., Francesconi, K. A., Kuehnelt, D., Lindberg, A.-L., Soros, C. & Goessler, W. Thio arsenosugars identified as natural constituents of mussels by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Communications (Cambridge, England)* 1824–5 (2004). doi:10.1039/b406917j

129. Hirata, S. & Toshimitsu, H. Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Applied Organometallic Chemistry* **21,** 447–454 (2007).

130. Hsieh, Y.-J. & Jiang, S.-J. Application of HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS procedures for arsenic speciation in seaweeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60,** 2083–9 (2012).

131. Narukawa, T., Inagaki, K., Zhu, Y., Kuroiwa, T., Narushima, I., Chiba, K. & Hioki, A. Preparation and certification of hijiki reference material, NMIJ CRM 7405-a, from the edible marine algae hijiki (Hizikia fusiforme). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402,** 1713–22 (2012).

132. Madsen, A. D., Goessler, W., Pedersen, S. N. & Francesconi, K. A. Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC-electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **15,** 657–662 (2000).

133. Almela, C., Laparra, J. M., Vélez, D., Barberá, R., Farré, R. & Montoro, R. Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: characterization and bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53,** 7344–51 (2005).

134. Schmeisser, E., Goessler, W., Kienzl, N. & Francesconi, K. A. Volatile analytes formed from arsenosugars: Determination by HPLC-HG-ICPMS and implications for arsenic speciation analyses. *Analytical Chemistry* **76,** 418–423 (2004).

135. Kohlmeyer, U., Jantzen, E., Kuballa, J. & Jakubik, S. Benefits of high resolution IC-ICP-MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377,** 6–13 (2003).

136. Ruíz Chancho, M. J., López-Sánchez, J. F. & Rubio, R. Occurrence of arsenic species in the seagrass Posidonia oceanica and in the marine algae Lessonia nigrescens and Durvillaea antarctica. *Journal of Applied Phycology* **22,** 465–472 (2010).

137. Salgado, S. G., Quijano Nieto, M. A. & Bonilla Simón, M. M. Optimisation of sample treatment for arsenic speciation in alga samples by focussed sonication and ultrafiltration. *Talanta* **68,** 1522–7 (2006).

138. Caumette, G., Koch, I., Estrada, E. & Reimer, K. J. Arsenic Speciation in Plankton Organisms from Contaminated Lakes: Transformations at the Base of the Freshwater Food Chain. *Environmental Science and Technology* **45,** 9917–9923 (2011).

139. Van Elteren, J. T., Slejkovec, Z., Kahn, M. & Goessler, W. A systematic study on the extractability of arsenic species from algal certified reference material IAEA-140/TM (Fucus sp., Sea Plant Homogenate) using methanol/water extractant mixtures. *Analytica chimica acta* **585,** 24–31 (2007).

140. Geng, W., Komine, R., Ohta, T., Nakajima, T., Takanashi, H. & Ohki, A. Arsenic speciation in marine product samples: Comparison of extraction-HPLC method and digestion-cryogenic trap method. *Talanta* **79,** 369–375 (2009).

141. Ruiz-Chancho, M. J., Pichler, T. & Price, R. E. Arsenic occurrence and speciation in Cyclope neritea, a gastropod inhabiting the arsenic-rich marine shallow-water hydrothermal system off Milos Island, Greece. *Chemical Geology* **348,** 56–64 (2013).

142. Cabon, J. Y. & Cabon, N. Speciation of major arsenic species in seawater by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **368,** 484–489 (2000).

143. Truus, K., Viitak, A., Vaher, M., Muinasmaa, U., Paasrand, K., Tuvikene, R. & Levandi, T. Comparative determination of microelements in Baltic seawater and brown algae samples by atomic absorption spectrometric and inductively coupled plasma methods. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences: Chemistry* **56,** 122–133 (2007).

144. Measurements, I. for R. M. and. Certificate of análisis: BCR CRM 279. (2007).

145. Le, S. X. C., Cullen, W. R. & Reimer, K. J. Speciation of arsenic compounds in some marine organisms. *Environmental Science and Technology* **28,** 1598–1604 (1994).

146. Bluemlein, K., Raab, A. & Feldmann, J. Stability of arsenic peptides in plant extracts: Off-line versus on-line parallel elemental and molecular mass spectrometric detection for liquid chromatographic separation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393,** 357–366 (2009).

147. Gallagher, P. a., Wei, X., Shoemaker, J. a., Brockhoff, C. a. & Creed, J. T. Detection of arsenosugars from kelp extracts via IC-electrospray ionization-MS-MS and IC membrane hydride generation ICP?MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **14,** 1829–1834 (1999).

148. Traar, P. & Francesconi, K. A. Synthetic routes for naturally-occurring arsenic-containing ribosides. *Tetrahedron Letters* **47,** 5293–5296 (2006).

149. Edmonds, J. S. & Francesconi, K. A. Arsenic-containing ribofuranosides: isolation from brown kelp Ecklonia radiata and nuclear magnetic resonance spectra. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 2375 (1983). doi:10.1039/p19830002375

150. Francesconi, K. A., Edmonds, J. S., Stick, R. V, Skelton, B. W. & White, A. H. Arsenic-containing ribosides from the brown alga Sargassum lacerifolium: X-ray

molecular structure of 2-amino-3-[5[prime or minute]-deoxy-5[prime or minute]-(dimethylarsinoyl)ribosyloxy]propane-1-sulphonic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 2707–2716 (1991). at <http://dx.doi.org/10.1039/P19910002707>

151. Gamble, B. M., Gallagher, P. A., Shoemaker, J. A., Wei, X. Y., Schwegel, C. A. & Creed, J. T. An investigation of the chemical stability of arsenosugars in simulated gastric juice and acidic environments using IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. *Analyst* **127,** 781–785 (2002).

152. Lai, V. W. M., Cullen, W. R., Harrington, C. & Reimer, K. J. Seasonal changes in arsenic speciation in Fucus species. *Applied Organometallic Chemistry* **12,** 243–251 (1998).

153. Granchinho, S. C. R., Polishchuk, E., Cullen, W. R. & Reimer, K. J. Biomethylation and bioaccumulation of arsenic(V) by marine alga Fucus gardneri. *Applied Organometallic Chemistry* **15,** 553–560 (2001).

154. Gamble, B. M., Gallagher, P. A., Shoemaker, J. A., Parks, A. N., Freeman, D. M., Schwegel, C. A. & Creed, J. T. An investigation of the chemical stability of arsenosugars in basic environments using IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. *Analyst* **128,** 1458–1461 (2003).

155. Sawidis, T. & Voulgaropoulos, A. N. Seasonal bioaccumulation of iron, cobalt and copper in marine algae from Thermaikos Gulf of the Northern Aegean Sea, Greece. *Marine Environmental Research* **19,** 39–47 (1986).

156. Djingova, R., Kuleff, I., Arpadjan, S., Alexandrov, S., Voulgaropoulos, A. N. & Sawidis, T. Neutron activation and atomic absorption analysis of Ulva lactuca and Gracilaria verrucosa from Thermaikos Gulf, Greece. *Toxicological and Environmental Chemistry* **15,** 149–158 (1987).

157. Haritonidis, S. & Malea, P. Seasonal and local variation of Cr, Ni and Co concentrations in Ulva rigida C. Agardh and Enteromorpha linza (Linnaeus) from Thermaikos Gulf, Greece. *Environmental Pollution* **89,** 319–327 (1995).

158. Haritonidis, S. & Malea, P. Bioaccumulation of metals by the green alga Ulva rigida from Thermaikos Gulf, Greece. *Environmental Pollution* **104,** 365–372 (1999).

159. Malea, P. & Haritonidis, S. Cymodocea nodosa (ucria) Aschers, as a bioindicator of metals in Thermaikos Gulf, Greece, during monthly samplings. *Botanica Marina* **42,** 419–430 (1999).

160. Malea, P. & Haritonidis, S. Seasonal accumulation of metals by red alga Gracilaria verrucosa (Huds.) Papens. from Thermaikos Gulf, Greece. *Journal of Applied Phycology* **11,** 503–509 (1999).

161. Malea, P. & Haritonidis, S. Use of the green alga Ulva rigida C. Agardh as an indicator species to reassess metal pollution in the Thermaikos Gulf, Greece, after 13 years. *Journal of Applied Phycology* **12,** 169–176 (2000).

162. Malea, P., Haritonidis, S. & Kevrekidis, T. Metal content of some green and brown seaweeds from Antikyra Gulf (Greece). *Hydrobiologia* **310,** 19–31 (1995).

163. Boubonari, T., Malea, P. & Kevrekidis, T. The green seaweed Ulva rigida as a bioindicator of metals (Zn, Cu, Pb and Cd) in a low salinity coastal environment. *Botanica Marina* **51,** 472–484 (2008).

164. Boubonari, T., Malea, P., Koyro, H.-W. & Kevrekidis, T. The red macroalga Gracilaria bursa-pastoris as a bioindicator of metals (Fe, Zn, Cu, Pb, Cd) in oligohaline coastal environments. *Fresenius Environmental Bulletin* **17,** 2207–2216 (2008).

165. Collins, M. B. Sediment yield studies of headwater catchments in Sussex, S-E. England. *Earth Surface Processes* **13,** 25–36 (1981).

166. Ganoulis, J. & Krestenitis, J. Choix du site optimum d'evacuation des eaux usées dans une région côtière. *Societé Hydrotechnique17 Journeés de l' Hydraulique.* (1982).

167. Christophoridis, C., Dedepsidis, D. & Fytianos, K. Occurrence and distribution of selected heavy metals in the surface sediments of Thermaikos Gulf, N. Greece. Assessment using pollution indicators. *Journal of Hazardous Materials* **168,** 1082–1091 (2009).

168. Nikolaidis, G., Moschandreou, K., Koukaras, K., Aligizaki, K., Kalopesa, E. & Heracleous, A. The use of chlorophyll-a for trophic state assessment of water masses in the inner part of Thermaikos bay (NW Aegean Sea). *Fresenius Environmental Bulletin* **15,** 1193–1198 (2006).

169. Nikolaidis, G., Patoucheas, D. P. & Moschandreou, K. Estimating breakpoints of Chl-a in relation with nutrients from Thermaikos gulf (Greece) using piecewise linear regression. *Fresenius Environmental Bulletin* **15,** 1189–1192 (2006).

170. Marcantonatos, G. *Treatment and Disposal of Aquatic Wastes, Sewage, Industrial Effluents, Animal Residue.* 7348 (Marcantonatos, 1990).

171. Orfanidis, S., Papathanasiou, V., Gounaris, S. & Theodosiou, T. H. Size distribution approaches for monitoring and conservation of coastal Cymodocea habitats. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **20,** 177–188 (2010).

172. Morita, M. & Shibata, Y. Chemical form of arsenic in marine macroalgae. *Applied Organometallic Chemistry* **4,** 181–190 (1990).

173. Almela, C., Algora, S., Benito, V., Clemente, M. J., Devesa, V., Súñer, M. A., Vélez, D. & Montoro, R. Heavy metal, total arsenic, and inorganic arsenic contents of

algae food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50,** 918–923 (2002).

174. Almela, C., Clemente, M. J., Vélez, D. & Montoro, R. Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. *Food and Chemical Toxicology* **44,** 1901–8 (2006).

175. Whyte, J. & Englar, J. Analysis of inorganic and organic bound arsenic in marine brown algae. *Botanica Marina* **26,** 159–164 (1983).

176. Delepine, R., Bourdouresque, C. F., Frada-Orestano, C., Noailles, M. C. & Asensi, A. in *Fisches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noir. Zone de peche 37.* (Fischer, W., Scheneider, M. & Bauchot, M. L.) **I,** 136 (FAO, 1987).

177. Luoma, S. N., Bryan, G. W. & Langston, W. J. Scavenging of heavy metals from particulates by brown seaweed. *Marine Pollution Bulletin* **13,** 394–396 (1982).

178. Rönnberg, O., Adjers, K., Ruokolahti, C. & Bondestam, M. Fucus vesiculosus as an indicator of heavy metal availability in a fish farm recipient in the northern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* **21,** 388–392 (1990).

179. Malea, P. & Haritonidis, S. Metal content in Enteromorpha linza (Linnaeus) in Thermaikos Gulf (Greece). *Hydrobiologia* **394,** 103–112 (1999).

180. Güven, K. C., Topcuoḡlu, S., Kut, D., Esen, N., Erentürk, N., Saygı, N., Cevher, E., Güvener, B. & Öztürk, B. Metal Uptake by Black Sea Algae. *Botanica Marina* **35,** 337–340 (1992).

181. Koch, I., Wang, L. H., Reimer, K. J. & Cullen, W. R. Arsenic species in terrestrial fungi and lichens from Yellowknife, NWT, Canada. *Applied Organometallic Chemistry* **14,** 245–252 (2000).

182. Koch, I., Wang, L. H., Ollson, C. A., Cullen, W. R. & Reimer, K. J. The predominance of inorganic arsenic species in plants from Yellowknife, Northwest Territories, Canada. *Environmental Science and Technology* **34,** 22–26 (2000).

183. Al-Masri, M. S., Mamish, S. & Budier, Y. Radionuclides and trace metals in eastern Mediterranean Sea algae. *Journal of Environmental Radioactivity* **67,** 157–168 (2003).

184. Díaz, O., Tapia, Y., Muñoz, O., Montoro, R., Velez, D. & Almela, C. Total and inorganic arsenic concentrations in different species of economically important algae harvested from coastal zones of Chile. *Food and Chemical Toxicology* **50,** 744–9 (2012).

185. Sánchez-Rodríguez, I., Huerta-Diaz, M. A., Choumiline, E., Holguín-Quiones, O. & Zertuche-González, J. A. Elemental concentrations in different species of seaweeds from Loreto Bay, Baja California Sur, Mexico: Implications for the

geochemical control of metals in algal tissue. *Environmental Pollution* **114,** 145–160 (2001).

186. Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC). *Censo Nacional de Población y de Vivienda.* (2010).

187. Whelan, T., Espinoza, J., Villarreal, X. & Cottagoma, M. Trace metal partitioning in Thalassia testudinum and sediments in the Lower Laguna Madre, Texas. *Environment International* **31,** 15–24 (2005).

188. Lewis, M. a, Dantin, D. D., Chancy, C. a, Abel, K. C. & Lewis, C. G. Florida seagrass habitat evaluation: a comparative survey for chemical quality. *Environmental Pollution* **146,** 206–18 (2007).

189. García-Salgado, S., Nieto, M. A. Q., Simon, M. M. B., García Salgado, S., Quijano Nieto, M. a & Bonilla Simón, M. M. Determination of soluble toxic arsenic species in alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography-hydride generation-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Journal of Chromatography. A* **1129,** 54–60 (2006).

190. Rose, M., Lewis, J., Langford, N., Baxter, M., Origgi, S., Barber, M., MacBain, H. & Thomas, K. Arsenic in seaweed--forms, concentration and dietary exposure. *Food and Chemical Toxicology* **45,** 1263–7 (2007).

191. UK Food Standards Agency. Seaweed warning. at <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20081231170837/http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2004/jul/hijiki>

192. McSheehy, S. & Szpunar, J. Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **15,** 79–87 (2000).

193. Ichikawa, S., Kamoshida, M., Hanaoka, K., Hamano, M., Maitani, T. & Kaise, T. Decrease of arsenic in edible brown algaeHijikia fusiforme by the cooking process. *Applied Organometallic Chemistry* **20,** 585–590 (2006).

194. Hanaoka, K., Yosida, K., Tamano, M., Kuroiwa, T., Kaise, T. & Maeda, S. Arsenic in the prepared edible brown alga hijiki,Hizikia fusiforme. *Applied Organometallic Chemistry* **15,** 561–565 (2001).

195. Katayama, M., Sugawa-Katayama, Y., Sawada, R. & Yamamoto, Y. Distribution of Accumulated Arsenic in the Plant Body of Akamoku , Sargassum horneri. *Trace Nutrients Research* **25,** 129–133 (2008).

196. Suzuki, N. & Iwata, Y. Determination of arsenic and other elemental abundances in marine macro-algae by photon activation analysis. *Applied Organometallic Chemistry* **4,** 287–291 (1990).

197. Maeda, S., Nakashima, S., Takeshita, T. & Higashi, S. Bioaccumulation of arsenic by freshwater algae and the application to the removal of inorganic arsenic from

an aqueous phase. Part II. By Chlorella vulgaris isolated from arsenic-polluted environment. *Separation Science and Technology* **20,** 153–161 (1985).

198. Burger, J., Gochfeld, M., Jeitner, C., Gray, M., Shukla, T., Shukla, S. & Burke, S. Kelp as a bioindicator: Does it matter which part of 5 m long plant is used for metal analysis? *Environmental Monitoring and Assessment* **128,** 311–321 (2007).

199. Rodríguez Prieto, C. *Algues de la Costa Brava.* 30,30–34,34 (Ajuntament de Calonge - Regidoria de Cultura, 1989).

200. Sales, M. Cystoseira-dominated assemblages from sheltered areas in the Mediterranean Sea: Diversity, distribution and effects of pollution. (2010).

201. Miyashita, S., Fujiwara, S., Tsuzuki, M. & Kaise, T. Rapid biotransformation of arsenate into oxo-arsenosugars by a freshwater unicellular green alga, Chlamydomonas reinhardtii. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **75,** 522–530 (2011).

202. Kain, J. in *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential.* (Guiry, M. D. & Blunden, G.) (Wiley, 1991).

203. Davis, C. *Californica Reefs.* (Chronicle Books Llc, 1991).

204. Lobban, C. & Harrison, P. *Seaweed Ecology and Physiology.* (Cambridge University Press, 1994).

205. Díaz, O., Tapia, Y., Muñoz, O., Montoro, R., Velez, D. & Almela, C. Total and inorganic arsenic concentrations in different species of economically important algae harvested from coastal zones of Chile. *Food and Chemical Toxicology* **50,** 744–9 (2012).

206. Grotti, M., Soggia, F., Lagomarsino, C., Riva, S. D., Goessler, W. & Francesconi, K. a. Natural variability and distribution of trace elements in marine organisms from Antarctic coastal environments. *Antarctic Science* **20,** (2007).

207. Pérez, A., Farías, S., Strobl, A., Péres, L., López, C., Piñeiro, A., Roses, O. & Fajardo, M. Levels of essential and toxic elements in Porphyra columbina and Ulva sp. from San Jorge Gulf, Patagonia Argentina. *Science of the total …* **376,** 51–59 (2007).

208. North, W. & Hubbs, C. Utilization of kelp-bed resources in southern California. *Fish Bulletin* **139,** (1968).

209. Echegaray, L. & Seoane Camba, J. Aspectos sobre la capacidad de regeneración de Cystoseira mediterranea Sauvageau. *Botanica Complutensis* **17,** 47 (1992).

210. Cabana i Pujol, M., Comelles i Folch, M., Pubill i Porta, R., Verger i Arce, Guillem Robert i Andreu, M. & Riu i Codinach, M. M. Santorí. *Enciclopèdia Catalana* on–line resource (2013). at <http://www.enciclopedia.cat/enciclopèdies/gran-enciclopèdia-catalana/EC-GEC-0060506.xml?s.q=santori#.UWLPCldmPLk>

211. Varnavas, S. P. & Cronan, D. S. Submarine hydrothermal activity off Santorini and Milos in the Central Hellenic Volcanic Arc: A synthesis. *Chemical Geology* **224,** 40–54 (2005).

212. Queirolo, F., Stegen, S., Mondaca, J., Cortés, R., Rojas, R., Contreras, C., Muñoz, L., Schwuger, M. & Ostapczuk, P. Total arsenic , lead , cadmium , copper , and zinc in some salt rivers in the northern Andes of Antofagasta , Chile. *Science of the Total Environment* **255,** 85–95 (2000).

213. Romero, L., Alonso, H., Campano, P., Fanfani, L., Cidu, R., Dadea, C., Keegan, T., Thornton, I. & Farago, M. Arsenic enrichment in waters and sediments of the Rio Loa (Second Region, Chile). *Applied Geochemistry* **18,** 1399–1416 (2003).

214. Smedley, P. L., Nicolli, H. B. & Luo, Z. D. *Arsenic in groundwaters from major aquifers: sources, effects and potential mitigation.* **Brit. Geol,** (2000).

215. Ministerio de Salud Pública. Decreto 735: Reglamento Reglamento de los servicios de agua al consumo humano. (versión 31 de julio de 2010). *Boletín Oficial de Chile* (1969).

216. Hansen, H. K., Rojo, A., Ribeiro, A. & Mateus, E. The use of Lessonia nigrescens as biosorbant for Arsenic(V) removal. *CHISA 2006 - 17th International Congress of Chemical and Process Engineering* **Prague,** (2006).

217. Knauer, K. & Hemond, H. Accumulation and reduction of arsenate by the freshwater green alga Chlorella sp (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **36,** 506–509 (2000).

218. Robinson, B., Kim, N., Marchetti, M., Moni, C., Schroeter, L., van den Dijssel, C., Milne, G. & Clothier, B. Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Environmental and Experimental Botany* **58,** 206–215 (2006).

219. Muñoz, O., Diaz, O. P., Leyton, I., Nuñez, N., Devesa, V., Súñer, M. A., Vélez, D. & Montoro, R. Vegetables collected in the cultivated Andean area of Northern Chile: Total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50,** 642–647 (2002).

220. Queirolo, F., Stegen, S., Restovic, M., Paz, M., Ostapczuk, P., Schwuger, M. & Muñoz, L. Total arsenic , lead , and cadmium levels in vegetables cultivated at the Andean villages of northern Chile. *Science of the Total Environment* **255,** 75–84 (2000).

221. Stegen, S., Queirolo, F., Cortés, S., Pastenes, J., Ostapczuk, P., Backhaus, F. & Moh, C. Use of the fresh water plants Zannichellia pallustris and Myriophyllum acuaticum for biomonitoring of Cd, Pb and Cu in Anden Rivers of Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **45,** 449–459 (2000).

222. Zheng, J., Hintelmann, H., Dimock, B. & Dzurko, M. S. Speciation of arsenic in water, sediment, and plants of the Moira watershed, Canada, using HPLC coupled

to high resolution ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377,** 14–24 (2003).

223. Brundenius, C. & Göransson, B. Technological Change and Pollution Abatement in the Copper Industries of Chile and China. *Minerals and Energy* **14,** 3 (1990).

224. Wang, J., Zhao, F.-J., Meharg, A. A., Raab, A., Feldmann, J. & McGrath, S. P. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in Pteris vittata. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology* **130,** 1552–1561 (2002).

225. Al-Homaidan, A. A., Al-Ghanayem, A. A. & Alkhalifa, A. H. Green Algae as Bioindicators of Heavy Metal Pollution in Wadi Hanifah Stream, Riyadh, Saudi Arabi. *International Journal of Water Resources and Arid Environments* **1,** 10–15 (2011).

226. Kabata-Pendias, A., Piotrowska, M. & Dudka, S. in *Plants as Biomonitors* (Markert, B.) **654,** 485–494 (VCH Publishers, 1997).

227. HIERBA FUCUS TRIT 100gr - Aldicasa. at <http://www.aldicasa.com/product/3597/0/0/1/1/HIERBA-FUCUS-TRIT-100gr.htm>

# ANNEXOS

# ANNEXOS: ARTICLES I RESUMS

Als annexos es recullen els articles científics produïts i els resums dels articles potencials.

*Capítol 3.1: Article*

Effects of sample processin on arsenic speciation in marine macroalgae.
A. Pell, A. Màrquez, R. Rubio, J. F. López Sánchez
Analítical Methods, 2013, 5, 2543
doi: 10.1039/c3ay00024a

*Capítol 4.1. Article*

LC-ICP-MS analysis of arsenic compounds in dominant seaweeds from the Thermaikos Gulf (Northern Aegean Sea, Greece)
A. Pell, G. Kokkinis, P. Malea, S. A. Pergantins, R. Rubio, J. F. López Sánchez
Chemosphere, 2013, 93, 2187
doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.08.003

*Capítol 4.2: Resum*

Occurrence of arsenic and arsenic species in seaweeds and aquatic plants from the Caribbean Sea in Panama
A. Pell, R. Rubio, J. F. López Sánchez

*Capítol 4.3: Resum*

Differences on the Distribution of arsenic in algae collectec in their original habitat and on the beach
A. Pell, A. Màrquez, M. Barbero, R. Rubio, J. F. López Sánchez
Distribution of arsenic and arsenic species in diferent morphologies of the brown algae *Cystoseira mediterranea* and *Macrocystis pyrifera.*
A. Pell, A. Màrquez, M. Barbero, R. Rubio, J. F. López Sánchez

*Capítol 4.4: Resum*

Arsenic speciation in the seaweed *Posidonia oceànica* samples from an arsenic-rich shallow-sea hydrothermal vent, Santorini, Greece
A. Pell, R. Rubio, J. F. López Sánchez, R. Price, T. Pichler

*Capítol 4.5: Article*

Occurrence of arsenic species in algae and freshwater plants of an extreme arid regios in northern Chile, the Loa River Basin
A. Pell, A. Màrquez, M. Barbero, R. Rubio, J. F. López Sánchez, S. Stegen, F. Queirolo, P. Díaz Palma
Chemosphere, 2013, 90, 556
doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.08.028

Analytical Methods

RSC Publishing

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Published on 26 March 2013. Downloaded by Monash University on 03/09/2013 11:28:23.

Cite this: *Anal. Methods*, 2013, **5**, 2543

# Effects of sample processing on arsenic speciation in marine macroalgae

Albert Pell,[a] Anna Márquez,[a] Roser Rubio[ab] and José Fermín López-Sánchez*[ab]

Received 4th January 2013
Accepted 23rd March 2013

DOI: 10.1039/c3ay00024a

www.rsc.org/methods

The stability of arsenic species in environmental samples during sampling, storage and processing is crucial for speciation studies. Losses, interconversion and degradation of arsenocompounds can occur during these steps as a result of the interaction with the container material, microbial activity and temperature or light. In order to study the possible effects of storage and processing on arsenic compounds, subsamples of alga *Cystoseira mediterranea* Sauvageau were stored under different conditions (non-frozen; frozen at −18 °C for 24 h and 45 days; frozen at −80 °C for 24 h and 45 days) and subjected to one of the following processing methods: chopping into fine pieces with a knife; grinding by hand in a glass mortar under $N_2$(l); drying under an air current at room temperature (25 °C); drying in an oven at 40 °C; lyophilization. The total contents of arsenic and arsenic compounds were then determined in these subsamples. Non-frozen subsamples were of 150 mg As per kg while frozen-defrosted samples were of 92 mg As per kg. Nevertheless, in spite of this loss in content, the proportion of arsenic compounds was maintained in both cases. Our results indicate that freezing is an unsuitable storage method for macroalgae because losses of arsenic may occur. We recommend a drying method for this purpose.

## Introduction

The stability of chemical species of trace elements during sample handling and storage is a prerequisite to obtain reliable information in speciation studies. Given that biological samples are especially vulnerable to storage and handling conditions, these require special care to avoid losses or changes in some elemental species.

A large number of studies have addressed arsenic speciation in marine organisms, including algae, and a high number of publications have been generated in the last decades. Many are dedicated to examining new compounds and their behavior, transformations and metabolic pathways because algae are crucial organisms in arsenic biogeochemistry and furthermore many algae are selected for human consumption.[1–5] Studies and reviews have reported on the influence of the storage, drying and powdering conditions on total arsenic and arsenic speciation in general or for particular compounds.[6–9] On the basis of these studies, it can be deduced that no common treatment is reliable and that handling and storage protocols should be established in function of the matrix composition, environmental conditions where the sample is collected (*e.g.* microbial activity, aquatic or dry media), chemical species to be determined, and analytical technique for their measurement.

Here we sought to ascertain the influence of sample storage conditions and further processing on the results of arsenic speciation in the brown alga *Cystoseira mediterranea*. For this purpose, we tested the effect of freezing on algal samples at two temperatures (−18 °C and −80 °C) for a range of periods, and of non-freezing storage methods. We also tested five sample processing methods (chopping, grinding under liquid nitrogen, air drying, drying at 40 °C, and lyophilization) before the extraction of arsenic species. The same extraction method (water extraction) was applied in all cases in order to ensure that the differences in the results are only attributable to the pre-treatment. We selected *C. mediterranea* Sauvageau (heterokonphyta, fucales) because of its abundance, availability, environmental interest and arsenic content; specifically, we worked with the algal branches because they are deciduous structures that can completely regenerate from the stipe. Communities of *C. mediterranea* grow along the northern Atlantic coast of Morocco, the Mediterranean coast of Spain, France, Tunisia, and Sicily and the southern Tyrrhenian coast of Italy.[10] This alga is characterized by perennial structures, such as holdfast and stipe, and annual deciduous branches. Several studies[11,12] have proposed that this macroalga could be used as a bioindicator of the quality of coastal water as part of the European Water Framework Directive.[13] Some have reported values for the total arsenic and arsenic species content in stipe medulla of *C. mediterranea*:[14] Total As, 39.0 ± 1.2 mg As per kg; As(III), 0.49 ± 0.19

[a]*Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, Barcelona ES-08028, Spain. E-mail: fermin.lopez@ub.edu; Fax: +34 93 40 21 233; Tel: +34 93 40 34 873*

[b]*Water Research Institute, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 684, Barcelona ES-08034, Spain*

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Published on 26 March 2013. Downloaded by Monash University on 03/09/2013 11:28:23.

mg As per kg; DMA, 0.26 ± 0.03 mg As per kg; As(v), 1.17 ± 0.06 mg As per kg; $PO_4$-sug, 0.39 ± 0.04 mg As per kg; $SO_3$-sug, 19.6 ± 0.2 mg As per kg; gly-sug, 2.21 ± 0.21 mg As per kg; unknown anion, 1.17 ± 0.10 mg As per kg.

## Materials and methods

### Reagents and standards

All chemicals were of analytical grade. Millipore Milli-Q Plus Water (18.2 MΩ cm) was used for all solution preparations. Ammonium dihydrogen phosphate (Panreac, p.a.) and pyridine (Scharlau, p.a.) were used for anionic and cationic mobile phase preparation, respectively. pH was adjusted using ammonia solution (25%, Panreac, p.a.) and formic acid (98%, Panreac, p.a.). Sample digestion was achieved with nitric acid (69%, Panreac, Hiperpur) and hydrogen peroxide (31%, Merck, Selectipur). Potassium iodide (Panreac, p.a.), ascorbic acid (Panreac, p.a.), hydrochloric acid (37%, Panreac, p.a.) and sodium borohydride (Aldrich, purum, tablets) were used for arsenic determination by HG-AFS (hydride generation atomic fluorescence spectrometry). A 20 μg $l^{-1}$ solution of $^{9}Be$, $^{103}Rh$, and $^{205}Tl$ (NIST High-Purity Standards) was used as an internal standard for ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) measurements.

**Arsenic standards.** The following were used as arsenic standards in speciation: arsenite from $As_2O_3$ (NIST, USA, Oxidimetric Primary Standard 83d, 99.99%); arsenate from $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ (Carlo Erba); methylarsonic acid (MA) as $(CH_3)AsO(ONa)_2 \cdot 6H_2O$ (Carlo Erba); dimethylarsinic acid (DMA) as $(CH_3)_2AsNaO_2 \cdot 3H_2O$ (Fluka); arsenocholine (AC) as $(CH_3)_3As^+CH_2\ CH_2OHBr^-$ supplied by the "Service Central d'Analyse" (CNRS Vernaison, France); arsenobetaine (AB) as $(CH_3)_3\ As^+CH_2COO^-$ provided by BCR (CRM 626, standard solution) and trimethylarsenic oxide (TMAO) from $(CH_3)_3AsO$ (Argus Chemicals srl). Standardized stock solutions of the arsenic compounds containing about 1000 mg $l^{-1}$ were prepared in water, except arsenite, which was dissolved in a concentration of 4 g $l^{-1}$ in NaOH solution (Merck, Suprapure). All solutions were stored in the dark at 4 °C. Arsenate standard solution with a certified concentration of 1000 ± 2 mg As per l from NIST High-Purity Standards was used for external calibration for the determination of the content with ICP-MS as well as for the standardization of MA, DMA, AC, AB and TMAO stock solutions. Arsenate standard was used for the total arsenic determination in seawater by HG-AFS. An aliquot of freeze-dried extract of *Fucus serratus* dissolved in water was used as an internal laboratory reference material for the identification of the major arsenosugars: phosphate ($PO_4$-sug), sulfate ($SO_4$-sug), sulfonate ($SO_3$-sug), and glycerol (Gly-sug).[15] The certified reference material BCR CRM 279 Sea Lettuce (*Ulva lactuca*), from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) of the European Commission, with a certified value of 3.09 ± 0.20 mg As per kg, was used for quality control purposes in total arsenic determinations.

### Instruments and apparatus

A closed microwave digestion system, Milestone Ethos Touch Control, was used for sample and CRM digestion. HG-AFS Millenium Excallibur (PS Analytical, UK) was used for total arsenic measurement in seawater. The chromatographic system, consisting of an Agilent 1200 LC quaternary pump equipped with an autosampler, was connected to an anion-exchange and cation-exchange column and a guard-column and coupled to an Agilent 7500ce ICP-MS (Agilent, Germany) equipped with an Ari Mist HP nebulizer (Burgener, Canada). The chromatographic program, instrumental operating conditions of LC-ICP-MS and the arsenicals that can be separated with each chromatographic system are given in Table 1. A LyoQuest −80 freeze-dryer (Telstar) was used during sample preparation. A P. Selecta oven was used for sample drying and humidity determination. A CVF 220/86 ultrafreezer was used to keep samples at −80 °C, and for −18 °C a Liebherr Economy GT3602 was used.

### Sampling and sample preparation

*Cystoseira mediterranea* (2 kg, pooled sample) was collected on 19th July 2011 in Lloret de Mar on the coast of Catalonia (Spain) in the Western Mediterranean Sea. This alga was collected in a rock platform close to the beach. Branches were cut with a sharp knife to prevent damage to the perennial regenerative structures.[16] Seawater (1 l) was also collected in PET bottles to obtain additional information on the arsenic content of the growth medium of algae. The whole amount of sample was immediately transported to the laboratory and divided into five subsamples of 50 g each (Fig. 1). Subsample A was processed

**Table 1** Chromatographic conditions used for arsenic speciation

| | Anion exchange | Cation exchange |
|---|---|---|
| Column | PRP-X100 (250 mm × 4.1 mm, 10 μm) (Hamilton, Reno, USA) | Zorbax SCX300 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (Agilent, Waldbronn, Germany) |
| Pre column | PRP-X100 (20 mm × 2.0 mm, 10 μm) | Zorbax SCX300 (12.5 mm × 4.6 mm, 5 μm) |
| Mobile phase | $NH_4H_2PO_4$ 20 mM | Pyridine 20 mM |
| pH | 5.8 | 2.6 |
| Injection volume | 20 μl | 20 μl |
| Flow rate | 1.5 ml $min^{-1}$ | 1.5 ml $min^{-1}$ |
| Column temperature | Room temperature | Room temperature |
| As species | As(III), DMA, MA, As(v), $PO_4$-sug, $SO_3$-sug and $SO_4$-sug | AB, TMAO, AC and Gly-sug |

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Published on 26 March 2013. Downloaded by Monash University on 03/09/2013 11:28:23.

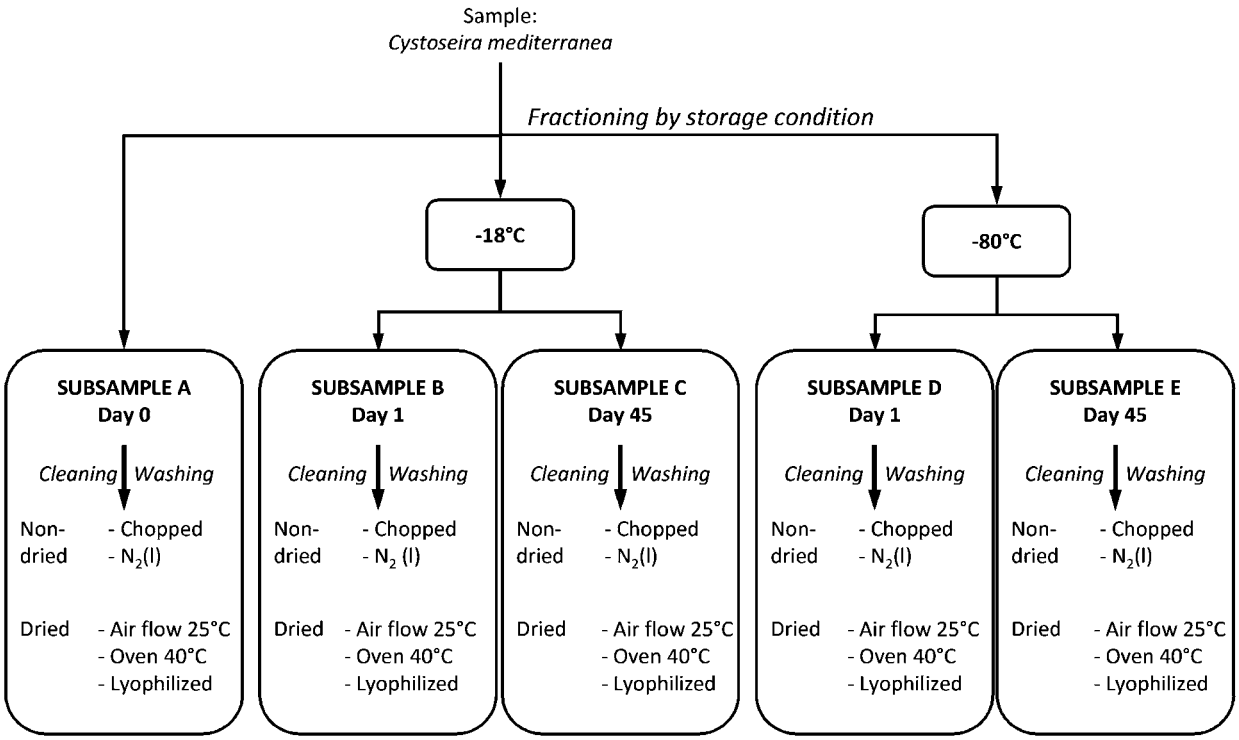



**Fig. 1** Scheme of the storage and processing applied to subsamples.

within 10 h of sampling (Day 0), subsamples B and C were stored at −18 °C and D and E at −80 °C in sealed plastic bags. Subsamples B and D were defrosted the day after freezing (Day 1) and C and E 45 days later (Day 45). After these periods of storage, the common cleaning consisted of removing epiphytes and other substances with tweezers and a short wash in deionized water (<10 s). Each subsample was then divided into five fractions and the following procedures were applied, as summarized in Fig. 1:

- Chopping into fine pieces with a stainless steal knife
- Grinding by hand in a glass mortar under $N_2$(l)
- Drying under an air current at room temperature (25 °C)
- Drying in an oven at 40 °C
- Lyophilization.

Dried subsamples were ground by hand in an agate mortar and stored at room temperature in amber glass bottles until analysis. Non-dried samples were shortly stored at 4 °C in the dark until acidic digestion and extraction.

### Total arsenic determination

Acidic digestion was performed in a middle-pressure closed microwave system. Samples (0.8 g of non-dried alga or 0.2 g of dried alga) were digested using the procedure reported for marine algae.[14,17] Non-dried samples were digested within 2 days after sample processing and dried samples in a lapse of a week. Digests were diluted 1 : 50 with 1% $HNO_3$ before total arsenic measurement, which was performed using ICP-MS (external calibration, $^{103}$Rh as the internal standard, He as the collision gas). All samples and BCR CRM 279 Sea Lettuce (*Ulva lactuca*) were analyzed in triplicate with their corresponding digestion blanks.

Arsenic from seawater was measured in triplicate by HG-AFS. Pre-reduction to increase the arsine yield was performed as follows: 35 ml of seawater or arsenate standard (for calibration) was acidified with 7.5 ml of 37% HCl. We then added 5 ml of a reducing solution (10% KI, 2% ascorbic acid, 2 M HCl) and diluted this up to 50 ml. The resulting solution was diluted up to 50 ml and kept at 37 °C for 2 h to ensure complete reduction of arsenate to arsenite before measurement. Quantification was performed by using the standard addition calibration method.

### Arsenic speciation

Aqueous extracts of alga were obtained in an end-over-end shaker (35 rpm, 16 h) from 1 g of non-dried samples or 0.1 g of dried samples and 10 g of water. Extracts were centrifuged (3000 rpm, 15 min) and passed through PET syringe filters (Chromafil PET®, Macherey-Nagel, 0.45 μm) and stored at −80 °C until analyses were performed. Arsenicals were extracted from non-dried samples the day they were collected (fresh-pretreated) or defrosted.

Extracts were defrosted immediately before measurements and vortex homogenized. Arsenic speciation was carried out in extracts by LC-ICP-MS using the method reported for marine algae.[14,17,18] Extracts were diluted with water (1 : 10 for dried samples and 1 : 25 for non-dried samples). LC-ICP-MS was used for measurement using anionic exchange chromatography for diluted extracts, while non-diluted extracts were analyzed by cationic exchange chromatography. Multispecies standards of

Published on 26 March 2013. Downloaded by Monash University on 03/09/2013 11:28:23.

As(III), DMA, MA and As(V) for anionic exchange chromatography and AB, AC and TMAO for cationic exchange chromatography covering the range of 1–100 μg As per l were prepared fresh daily for speciation analysis. Chromatographic peaks were identified on the basis of their retention times by comparison with standards. Arsenic species were quantified by external calibration curves. As(III) was quantified by subtracting from the front peak of anionic exchange chromatography the species quantified in cationic exchange chromatography. In addition, the total arsenic in the extracts was measured under the conditions used for algal acidic digests.

For those species for which a quantification standard was not available, the quantification was performed with the calibration curve of the closest standard in retention time as Francesconi and Sperling[19] suggested thought this assumption has been questioned.[20,21] Thus $SO_3$-sug was quantified with the calibration curve of the As(V) standard and Gy-sug with the calibration curve of the AC standard; even though AB is the closest standard, AC does not show overlapping problems.

LODs and LOQs were estimated. The former is the lowest concentration of an analyte that can be reliably differentiated from the background noise (signal-to-noise ratio greater than 3). The LOQ is the lowest concentration that can be measured (signal-to-noise ratio greater than 10). For calculating LOD and LOQ, the standard deviation of the base line and the peak base of each analyte multiplied by 3 or 10 (LOD and LOQ respectively) were interpolated in the height calibration curve. The LOD and LOQ of arsenosugar were estimated using a correction factor, which is the relation within the concentration of arsenosugar in *F. serratus* and the peak height.

## Results

### Seawater

The arsenic concentration in the seawater sample was 1.4 ± 0.2 μg As per l. This content is within the range of arsenic concentrations commonly reported for the Mediterranean Sea, which is typically 1.1–1.9 μg $l^{-1}$.[22–24]

### Cystoseira mediterranea

All results are given on dry weight basis. Moisture was estimated as the weight loss at 105 ± 5 °C until constant weight.

The mean values for total arsenic ranged from 76 mg As per kg to 163 mg As per kg (see Table 2). An histogram was built with the data of all the replicates (Fig. 2) and two populations were identified: samples that were not frozen presented 150 mg As per kg and samples stored at −18 °C or −80 °C had a lower arsenic concentration (92 mg As per kg). A two factors ANOVA analysis of all data revealed that both, freezing and processing of samples, were significant ($\alpha = 0.05$). Subsequent Post-hoc analyses (DHS Turkey; $\alpha = 0.05$) found two defined subgroups for processing. Oven and air dried samples presented a mean of 110 and 113 mg As per kg, respectively; whereas non-dried and

**Table 2** Total arsenic, arsenic species, extraction efficiency, column recovery and limits of detection and quantification (mean ± standard deviation, $n = 3$, mg As per kg, results expressed on dry weight basis)

| | Subsample | Storage | Processing[a] | Total As | As(V) | $SO_3$-sug | gly-sug | Extraction efficiency | Column recovery |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DAY 0 | A | — | C | 140 ± 10 | 47 ± 3 | 11 ± 1 | 2.16 ± 0.08 | 57% ± 8% | 78% ± 15% |
| | | | N | 150 ± 20 | 105 ± 2 | 15.3 ± 0.6 | 3.1 ± 0.2 | 97% ± 14% | 87% ± 15% |
| | | | A | 163 ± 2 | 110 ± 10 | 14.1 ± 0.8 | 3.37 ± 0.07 | 94% ± 6% | 83% ± 2% |
| | | | O | 160 ± 10 | 112 ± 4 | 13.5 ± 0.4 | 3.8 ± 0.2 | 97% ± 6% | 82% ± 2% |
| | | | L | 140 ± 3 | 101 ± 4 | 13.2 ± 0.3 | 3.5 ± 0.2 | 104% ± 4% | 81% ± 2% |
| | B | −18 °C | C | 82 ± 5 | 53 ± 3 | 10.4 ± 0.6 | 2.3 ± 0.2 | 91% ± 10% | 90% ± 9% |
| | | | N | 83 ± 5 | 52.3 ± 0.5 | 9.18 ± 0.05 | 2.36 ± 0.02 | 97% ± 12% | 80% ± 3% |
| | | | A | 101 ± 5 | 67 ± 2 | 10.5 ± 1 | 2.6 ± 0.1 | 99% ± 1% | 80% ± 4% |
| | | | O | 103 ± 3 | 65 ± 6 | 10.5 ± 0.7 | 2.4 ± 0.1 | 94% ± 8% | 80% ± 2% |
| | | | L | 97 ± 5 | 64.75 ± 0.01 | 10.3 ± 0.4 | 3.05 ± 0.08 | 102% ± 4% | 79% ± 1% |
| DAY 1 | C | −80 °C | C | 100 ± 10 | 61 ± 0.3 | 10.3 ± 0.8 | 2.47 ± 0.09 | 90% ± 11% | 82% ± 3% |
| | | | N | 85 ± 1 | 65 ± 4 | 11 ± 0.3 | 2.5 ± 0.1 | 104% ± 12% | 89% ± 3% |
| | | | A | 100 ± 2 | 61 ± 2 | 11.2 ± 0.3 | 2.45 ± 0.01 | 92% ± 4% | 82% ± 3% |
| | | | O | 105.2 ± 0.4 | 67.1 ± 0.7 | 10.5 ± 0.5 | 2.9 ± 0.1 | 92% ± 5% | 83% ± 4% |
| | | | L | 91 ± 1 | 55 ± 2 | 9.9 ± 0.1 | 3 ± 0.2 | 96% ± 1% | 77% ± 2% |
| | D | −18 °C | C | 89 ± 6 | 66 ± 3 | 9.7 ± 0.6 | 2.9 ± 0.2 | 99% ± 4% | 91% ± 1% |
| | | | N | 79 ± 3 | 54.6 ± 0.5 | 8.9 ± 0.1 | 3 ± 0.2 | 96% ± 3% | 88% ± 3% |
| | | | A | 95.8 ± 0.5 | 58 ± 1 | 9.3 ± 0.3 | 2.6 ± 0.2 | 90% ± 1% | 81% ± 1% |
| | | | O | 93.6 ± 0.5 | 59 ± 1 | 10 ± 0.1 | 2.9 ± 0.1 | 93% ± 4% | 82% ± 4% |
| | | | L | 84 ± 8 | 57 ± 1 | 9.3 ± 0.6 | 2.47 ± 0.08 | 95% ± 10% | 86% ± 2% |
| DAY 45 | E | −80 °C | C | 94 ± 10 | 77 ± 3 | 11.6 ± 0.6 | 3.1 ± 0.3 | 106% ± 11% | 93% ± 1% |
| | | | N | 76 ± 4 | 50 ± 1 | 10 ± 0.6 | 2.7 ± 0.1 | 91% ± 3% | 91% ± 1% |
| | | | A | 94 ± 5 | 63.8 ± 0.4 | 10.5 ± 0.5 | 2.68 ± 0.03 | 99% ± 6% | 83% ± 2% |
| | | | O | 101 ± 7 | 65 ± 1 | 11.3 ± 0.3 | 2.8 ± 0.1 | 93% ± 6% | 84% ± 3% |
| | | | L | 90 ± 2 | 62 ± 1 | 10.4 ± 0.5 | 2.73 ± 0.04 | 99% ± 1% | 85% ± 3% |
| Limit of detection | | | | 0.003 | 0.08 | 0.41 | 0.016 | | |
| Limit of quantification | | | | 0.01 | 0.22 | 1.36 | 0.05 | | |

[a] C: non-dried, chopped; N: non-dried, ground with liquid $N_2$; A: dried under air flow at 25 °C; O: dried in an oven at 40 °C, L: lyophilized.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Published on 26 March 2013. Downloaded by Monash University on 03/09/2013 11:28:23.

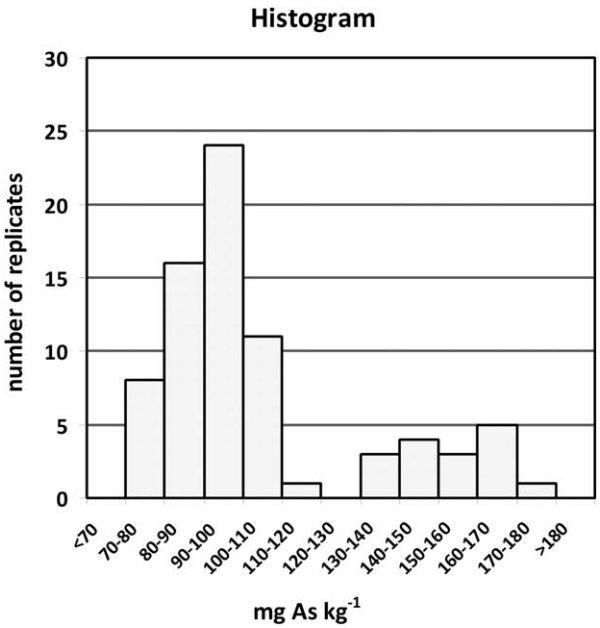



**Fig. 2** Histogram representing the total arsenic content in *C. mediterranea* subjected to various storage and processing conditions.

lyophilized samples presented the following means: 94 (N) and 100 (C and L) mg As per kg.

For arsenic speciation, the extraction efficiency (calculated as the total arsenic in the extract to the total arsenic in digests) ranged from 89.5% to 105.9% except for non-frozen chopped samples, which showed an extraction efficiency of 57.0% (Table 2). All subsamples presented As(v), $SO_3$-sug and Gly-sug in the same proportion with respect to the sum of species (Fig. 3). As an example, chromatograms of subsample A (ground under $N_2$(l)) are shown in Fig. 4. It can be seen that an unknown peak is eluting after AB, which cannot be attributed to this compound.

### Quality assessment in the determination of arsenic and arsenic species

**Column recovery.** For quality assessment in speciation studies, column recovery must be evaluated in order to guarantee the correct chromatographic separation. With this aim, we calculated the ratio of the sum of the species eluted from the chromatographic columns to the total arsenic in the extract injected into the column. This parameter allowed us to properly evaluate the quantification of arsenic species. Column recoveries ranged between 77.3% and 92.9% (Table 2).

**Certified reference material (CRM).** To check the accuracy, the total arsenic concentration was determined in CRM BCR 279 Sea lettuce (*Ulva lactuca*). The result obtained (2.9 ± 0.3 mg As per kg) was consistent with the certified value (3.09 ± 0.20 mg As per kg), thereby demonstrating the accuracy of the analytical method. Results of arsenic speciation for the CRM are shown in Table 3; in addition values found in the literature are given for comparison purposes.[25,26] Although we used the simplest extraction method (water and end-over-end extraction), we obtained the same extraction efficiencies (57%) and only one reported result showed higher extraction but it was performed with MeOH : $H_2O_2$ (1 : 1) at 75 °C using microwave.

**Analysis of *F. serratus* extract.** We used an extract from the brown seaweed *F. serratus*[15] to identify arsenosugars present in our algae samples. For quality control purposes, we quantified As species in *F. serratus* extracts. Our results (DMA: 0.010 ± 0.003 μg; Gly-sug: 0.07 ± 0.01 μg; $PO_4$-sug: 0.07 ± 0.01 μg; $SO_3$-sug: 0.56 ± 0.04 μg; $SO_4$-sug: 0.37 ± 0.02 μg; values for the *F. serratus* extract are given as the absolute amount of extract in μg.) confirm those reported by Madsen *et al.*[15] and other values in the literature for the same extract.[14,27,28]

## Discussion

Total arsenic in *C. mediterranea* branches was 150 ± 10 ($n = 15$) mg As per kg. This value is the mean of the 15 replicates analyzed for subsample A not considering the processing method. This subsample was processed few hours after sampling and presented the highest arsenic concentration.

Extraction efficiencies ranged from 57% to 106% and are higher than usual values reported for alga,[8] thereby indicating that *C. mediterranea* presents most arsenic in the water-soluble form; thus we conclude that water is a suitable extracting agent for this macroalga. However, fresh samples cut with knife give low extraction efficiencies. This observation can be attributable to the presence of unbroken cell structures that have the capacity to retain arsenic species.

The level of arsenic in all frozen samples was ~60% lower than that of the non-frozen samples. Regarding processing methods, it should be taken into account that moisture is a crucial factor and little differences can result in wide variation when correcting for dry weight. For that reason, further studies are required to assess the effect of the processing methods. Furthermore, arsenic compounds did not show changes in their relative contents when we compared frozen and non-frozen samples. This behavior suggests that losses of total arsenic are related directly to the freezing/defrosting process. We postulate that algal cell structures might have broken during this process and arsenic compounds were removed when broken cells were rinsed away after defrosting. This is in agreement with the findings reported by Le *et al.*[29] in a deep study of the effect of freezing as a storage method. The authors also observed losses of total As in the range of 3–40% when defrosting samples. The same study reported that losses of As affected all species without discrimination. In the present study (see Fig. 3), no significant differences between the species in the extract of defrosted samples and those in the extract of non-frozen samples were detected.

Each processing method has strengths and weaknesses; therefore, the choice of the method should depend on the kind of sample involved, the amount collected, equipment availability, and period of storage before analyses, among other factors. Non-drying methods proved to be demanding and conditioned to the location of the laboratory to the sampling point. In addition, fresh samples cannot be preserved for long

Published on 26 March 2013. Downloaded by Monash University on 03/09/2013 11:28:23.

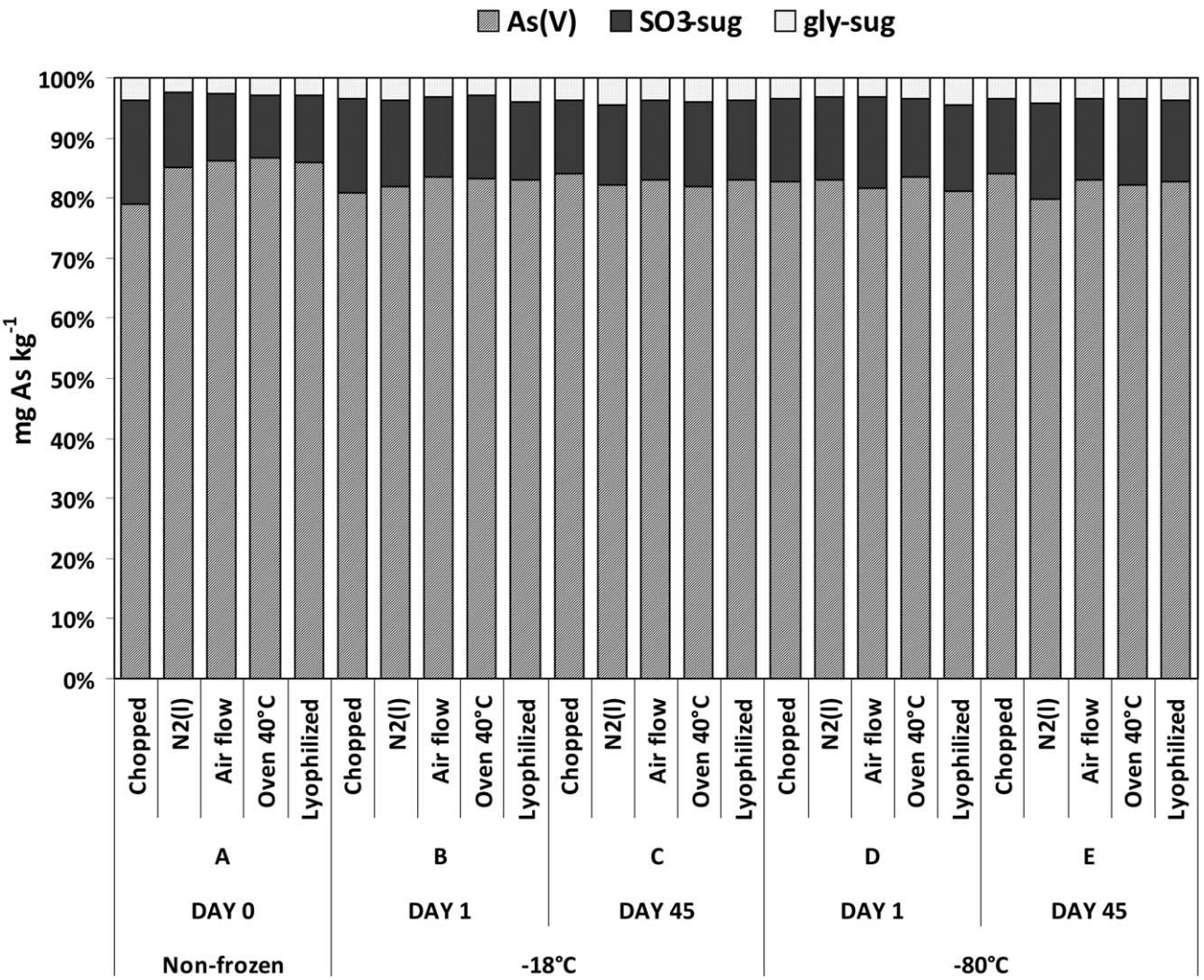



**Fig. 3** Percentages of species in *C. mediterranea* subjected to various storage and processing conditions.

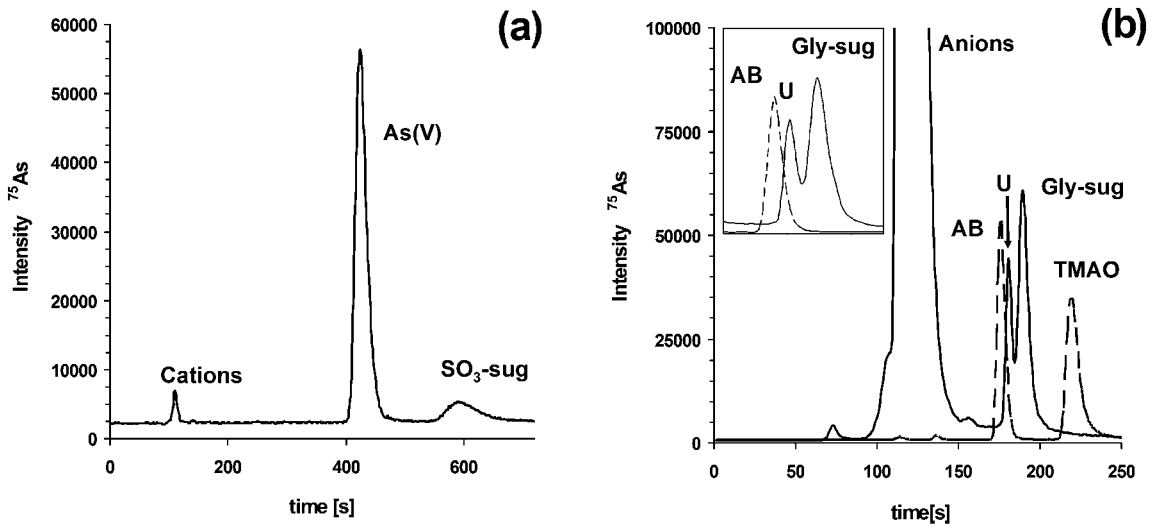



**Fig. 4** Anionic (a) and cationic (b) exchange chromatograms of subsample A, which was non-dried and ground under $N_2$(l). In (b), the solid line corresponds to the sample and the dashed line to the AB and TMAO standard (10 μg As per l).

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Published on 26 March 2013. Downloaded by Monash University on 03/09/2013 11:28:23.

**Table 3** Speciation results for CRM BRC 279 Sea lettuce (*Ulva lactuca*). Values for CRM reported in the literature are shown for comparison purposes

| Reference | Extracting agent | Extracting method | As(v) (mg As per kg) | As(III) (mg As per kg) | DMA (mg As per kg) | MA (mg As per kg) | TETRA (mg As per kg) | AB (mg As per kg) | gly-sug (mg As per kg) | $PO_4$-sug (mg As per kg) | $SO_3$-sug (mg As per kg) | Unknown (mg As per kg) | Extraction efficiency | Column recovery |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Present study[a] | $H_2O$ | End-over-end agitation | 0.53 ± 0.04 | 0.06 ± 0.03 | 0.06 ± 0.03 | 0.04 ± 0.01 | | 0.14 ± 0.02 | 0.096 ± 0.004 | 0.08 ± 0.01 | | 0.07 ± 0.02 | 57% | 81% |
| Foster *et al.*[25] | MeOH : $H_2O$ (1 : 1, v/v) | MW-assisted, 70 °C, 15 min | 0.52 ± 0.03 | | 0.08 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | 0.04 ± 0.01 | | 0.05 ± 0.01 | 0.21 ± 0.03 | | 0.01 ± 0.01 | 77% | |
| Foster *et al.*[25] | 2% $HNO_3$ | MW assisted, 95 °C, 6 min | 1.2 ± 0.06 | | 0.04 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 | | | 0.24 ± 0.03 | | | 0.16 ± 0.02 | 57% | 92% |
| Caumette *et al.*[26] | $H_2O$ | 60 °C, 4 h, 15 min sonification | 0.7 | | | | Traces | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | | 53% | 87% |

[a] Mean ± standard deviation, $n = 3$, results expressed on dry weight basis.

periods without damage to the algae and to the arsenic species and freezing showed losses of large amounts of arsenic. Given all of the above points, drying methodologies are more suitable for arsenic speciation studies. Air-drying is a simple method; however, air-dried samples are difficult to pulverize. It is a suitable procedure when samples cannot be transported to the laboratory, and cleaning and drying should be performed *in situ* but avoided when equipment is available. Lyophilization and oven-drying facilitate grinding but reports of losses of volatile compounds and species interconversion respectively are found in the literature;[6] however, we did not detect these processes.

## Conclusions and recommendations

On the basis of our results, we conclude that freezing is not a suitable storage method for macroalgae since this procedure leads to loss of arsenic. These losses are not detected in drying procedures.

We found drying to be the most convenient processing method, so we recommend lyophilization. Although this process requires a suitable system, it facilitates further pulverization of the sample, which is necessary to ensure representativeness. Air-drying is recommended when sampling is performed in a remote location due to its simplicity. We do not recommend working with non-dried samples. Freezing proved to be a process to be avoided, so we do not recommend it.

## Acknowledgements

The authors thank the *Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica* (DGICyT Project No. CTQ2010-15337/BQU) and the *Grup de Recerca Consolidat* (Project no. SGR2009-1188) for financial support. Thanks also go to Dr Toni Padró from the *Serveis Científico-Tècnics* of the University of Barcelona for his valuable support with ICP-MS measurements. We acknowledge Prof. Mercedes Barbero, from the Plant Biology Department of the *Universitat de Barcelona*, for her valuable assistance with sampling. We thank Dr Lizaso for his assistance with statistical analyses. The authors are also grateful to Prof. Kevin A. Francesconi for kindly donating the *F. serratus* extract. A. Pell acknowledges the *Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca* (*Generalitat de Catalunya*) and the European Social Fund for a pre-doctoral grant.

## References

1 S. Foster, W. Maher and F. Krikowa, *Environ. Chem.*, 2008, **5**, 176–183.
2 L. A. Murray, A. Raab, I. L. Marr and J. Feldmann, *Appl. Organomet. Chem.*, 2003, **17**, 669–674, DOI: 10.1002/aoc.498.
3 P. Pengprecha, M. Wilson, A. Raab and J. Feldmann, *Appl. Organomet. Chem.*, 2005, **19**, 819–826.
4 J. Navratilova, G. Raber, S. J. Fisher and K. A. Francesconi, *Environ. Chem.*, 2011, **8**, 44–51.
5 E. Duncan, S. Foster and W. A. Maher, *Bot. Mar.*, 2010, **53**, 377–386.

Published on 26 March 2013. Downloaded by Monash University on 03/09/2013 11:28:23.

6 K. Bluemlein, A. Raab and J. Feldmann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **393**, 357–366, DOI: 10.1007/s00216-008-2395-z.
7 J. Huang and G. Ilgen, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2006, **86**, 347–358.
8 R. Rubio, M. J. Ruíz Chancho and J. F. López-Sánchez, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2010, **29**, 53–69.
9 R. Wolf, S. Morman, P. Hageman, T. Hoefen and G. Plumlee, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2733–2745, DOI: 10.1007/s00216-011-5275-x.
10 W. Fischer, M. L. Bauchot and M. Scheneider, *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche (Révision 1). Méditerranée et mer Noire*, Zone de Pêche 37, Végétaux et Invertébrés., FAO, Rome, 1987, vol. I.
11 S. Pinedo, M. García, M. P. Satta, M. d. Torres and E. Ballesteros, *Mar. Pollut. Bull.*, 2007, **55**, 126–135.
12 P. Panayotidis, B. Montesanto and S. Orfanidis, *J. Appl. Phycol.*, 2004, **16**, 49–59.
13 European Comission, WFD, 2000, Directive 2000/60/EC.
14 T. Llorente-Mirandes, M. J. Ruíz Chancho, M. Barbero, R. Rubio and J. F. López-Sánchez, *Chemosphere*, 2010, **81**, 867–875, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.08.007.
15 A. D. Madsen, W. Goessler, S. N. Pedersen and K. A. Francesconi, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 657–662.
16 L. Echegaray and J. Seoane Camba, *Bot. Complutensis*, 1992, **17**, 47.
17 M. J. Ruíz Chancho, J. F. López-Sánchez and R. Rubio, *J. Appl. Phycol.*, 2010, **22**, 465–472.
18 A. Pell, A. Márquez, J. F. López-Sánchez, R. Rubio, M. Barbero, S. Stegen, F. Queirolo and P. Díaz-Palma, *Chemosphere*, 2012, **90**, 556–564, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.08.028.
19 K. A. Francesconi and M. Sperling, *Analyst*, 2005, **130**, 998–1001.
20 D. A. Polya, P. R. Lythgoe, F. Abou-Shakra, A. G. Gault, J. R. Brydie, J. G. Webster, K. L. Brown, M. K. Nimfopoulos and K. M. Michailidis, *Mineral. Mag.*, 2003, **67**, 247–261, DOI: 10.1180/0026461036720098.
21 J. Entwisle and R. Hearn, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2006, **61**, 438–443.
22 J. Y. Cabon and N. Cabon, *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 2000, **368**, 484–489.
23 K. R. Henke, *Arsenic: environmental chemistry, health threats and waste treatment*, Wiley, Chichester, UK, 2009.
24 K. Truus, A. Viitak, M. Vaher, U. Muinasmaa, K. Paasrand, R. Tuvikene and T. Levandi, *Proc. Est. Acad. Sci., Chem.*, 2007, **56**, 122–133.
25 S. Foster, W. Maher, F. Krikowa and S. Apte, *Talanta*, 2007, **71**, 537–549, DOI: 10.1016/j.talanta.2006.04.027.
26 G. Caumette, I. Koch, E. Estrada and K. J. Reimer, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 9917–9923, DOI: 10.1021/es2025092.
27 U. Kohlmeyer, E. Jantzen, J. Kuballa and S. Jakubik, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 6–13.
28 Z. Šlejkovec, E. Kápolna, I. Ipolyi and J. T. van Elteren, *Chemosphere*, 2006, **63**, 1098–1105.
29 S. X. C. Le, W. R. Cullen and K. J. Reimer, *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28**, 1598–1604.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Chemosphere 93 (2013) 2187–2194

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

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

# LC–ICP–MS analysis of arsenic compounds in dominant seaweeds from the Thermaikos Gulf (Northern Aegean Sea, Greece)

Albert Pell [a], Giannis Kokkinis [b], Paraskevi Malea [c], Spiros A. Pergantis [b], Roser Rubio [a,d], José Fermín López-Sánchez [a,d,*]

[a] Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, ES-08028, Barcelona, Spain
[b] Environmental Chemical Processes Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, GR-71409 Heraklion, Greece
[c] Department of Botany, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, GR-54124 Thessaloniki, Greece
[d] Water Research Institute, Universitat de Barcelona, ES-08028 Barcelona, Spain

## HIGHLIGHTS

- Arsenic content in dominant seaweed from the Thermaikos Gulf was determined.
- Total arsenic values are lower than those found in other Mediterranean seaweeds.
- As speciation of water extracts from the algae are performed by LC-ICP-MS.
- Arsenosugars are measured in all samples.

## ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 2 April 2013
Received in revised form 1 August 2013
Accepted 4 August 2013
Available online 7 September 2013

*Keywords:*
LC–ICP–MS
Arsenic speciation
Seaweeds
Thermaikos Gulf

## ABSTRACT

The content of total arsenic and arsenic compounds in the dominant seaweed species in the Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea was determined in samples collected in different seasons. Total arsenic was determined by acid digestion followed by ICP–MS. Arsenic speciation was analyzed by water extraction followed by LC–ICP–MS. Total arsenic concentrations in the seaweeds ranged from 1.39 to 55.0 mg $kg^{-1}$. *Cystoseira* species and *Codium fragile* showed the highest total As contents, while *Ulva* species (*U. intestinalis, U. rigida*,*U. fasciata*) had the lowest Arsenosugars, the most common arsenic species in seaweeds, were found in all samples, and glycerol-arsenosugar was the most common form; however, phosphate-arsenosugar and sulfate-arsenosugar were also present. Inorganic arsenic was measured in seven algae species and detected in another. Arsenate was the most abundant species in *Cystoseira barbata* (27.0 mg $kg^{-1}$). Arsenobetaine was measured in only one sample. Methylated arsenic species were measured at very low concentrations. The information should contribute to further understanding the presence of arsenic compounds in dominant seaweeds from the Thermaikos Gulf.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Arsenic in the marine ecosystem may derive from natural sources or anthropogenic activities. Inorganic arsenic predominates in seawater. In living organisms, organoarsenic compounds were detected years ago, but more recently a large number and variety of organic forms have been identified (Francesconi and Edmonds, 1998; Le et al., 2004; Taleshi et al., 2010).

Marine algae contain most of their arsenic in the form of arsenosugars. In recent decades, a number of studies have described the mechanisms of the transformation and accumulation of arsenicals as well as correlations among arsenosugars and algal orders (Thomson et al., 2007). Furthermore, there have been several reports of the potentially toxic. character of such organoarsenic compounds (Andrewes et al., 2004; Feldmann and Krupp, 2011). The presence and behavior of arsenic compounds in algae is of interest not only to assess the pollution level in a particular zone, but to evaluate the health risk posed by the consumption of seaweed. The presence of arsenic compounds has been reported in marine algae from several zones arond the world (Tukai et al., 2002; Yang et al., 2012). However, studies on arsenic speciation in algae or aquatic plants in the Mediterranean zone are scarce (Nischwitz and Pergantis, 2005a; Šlejkovec et al., 2006; Llorente-Mirandes et al., 2010; Ruíz Chancho et al., 2010).

In the present study total arsenic content and arsenic species are determined in 10 seaweed species collected in three sampling

* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, ES-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4034873; fax: +34 93 4021211.
*E-mail address:* fermin.lopez@ub.edu (J.F. López-Sánchez).

0045-6535/$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.003

sites in the Thermaikos Gulf (Greece). We selected this area since it is affected by urban and industrial sources of pollution. The only research on metal accumulation by seaweeds in the Thermaikos Gulf have been done by Sawidis and Voulgaropoulos (1986), Djingova et al. (1987), Haritonidis and Malea (1995, 1999) and Malea and Haritonidis (1999a, 1999b, 2000); Malea et al. (1994). These studies concerned three species (*Ulva linza* formerly *Enteromorpha linza*, *U. rigida* and *Gracilaria gracilis*) and only the metals Cr, Co, Ni, Fe, Pb, Cu, Cd and Zn were studied. Moreover, there are some studies on metal accumulation (Fe, Cu, Zn, Cd, Pb, Na, K, Ca and Mg) by the former seaweeds or seaweeds of the same genus as in the present study (*Padina pavonica, Cystoseira zosteroides, Codium bursa, Gracilaria bursa-pastoris* and *Ulva rigida*) in other areas of Greece (Malea et al., 1995; Boubonari et al., 2008a,b). There is no measurement on As accumulation by seaweeds in the Thermaikos Gulf, but this issue has been sparsely reported in other areas (Burger et al., 2007; Pell et al., 2013; Sales, 2010).

The aim of this study is to provide data on arsenic speciation in the Thermaikos Gulf to improve the understanding of arsenic-alga interaction in both, this and other marine environments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area

The Gulf of Thermaikos is a water mass located in the northwestern Aegean Sea (Fig. 1). The area, volume and maximum depth of this gulf are 518 $km^2$, 11.33 $km^3$ and 36 m, respectively. The rivers Axios, Aliakmon, Loudias and Galikos flow into the Gulf. The total annual discharge from the rivers is $10.2 \times 10^6$ $m^3$ and the total sediment supply $3–4 \times 10^6$ $m^3$ (Collins, 1981). To the north, the Thermaikos Gulf becomes narrow and continues into the Gulf of Thessaloniki, on the northern coast of which the city of Thessaloniki is located. In the Gulf of Thessaloniki, the currents have a cyclic direction (Ganoulis and Krestenitis, 1982). The Thessaloniki Gulf receives industrial, partially treated domestic and agricultural effluents (Nikolaidis et al., 2006a; Nikolaidis et al., 2006b; Christophoridis et al., 2009). In particular, effluents from food industries, leather tanning, chrome painting, petrochemical distilleries and electrolytic manganese dioxide factories are discharged into the northwestern part of the Gulf of Thessaloniki (Marcantonatos, 1990). The harbor of Thessaloniki is widely used by cargo ships, which release quantities of oil, lubricants, etc. into the sea.

The Kalochori area (K) is situated near the industrial zone, the harbor and the pump room of the main wastewater treatment plant (WWTP) of Thessaloniki. The coastal area Viamyl (V) receives local effluents from a small WWTP and a small factory that treats starch, direct urban discharges and freshwater inputs from a stream (Anthemoundas River). This area is considered to be polluted (Orfanidis et al., 2010). Agia Triada (AT) is a tourist resort located relatively far from the harbor facilities, industrial activities and domestic effluents (Christophoridis et al., 2009) (Fig. 1). At sites K, V and AT during June, September and December 2007 the water temperature, salinity and pH near the bottom varied between 10.4 and 26.6 °C, 33.4 and 36.9 psu and 7.4 and 9.4, respectively.

### 2.2. Sampling and sample pretreatment

Seasonal samplings (June, September and December 2007) of the dominant seaweed species were carried out at three sampling stations in the Gulf of Thessaloniki: K (Kalochori, 40°36′N, 22°51′E), V (Viamyl, 40°33′N, 22°58′E) and AT (Agia Triada, 40°30′N, 22°52′E) (Fig. 1). The seaweed samples were clipped off at the sediment level, washed in seawater at the sampling site and carried to the laboratory in plastic bags containing seawater. In the laboratory, the seaweeds were identified. Then, samples were frozen at −20 °C until they were transported by plane to Barcelona in a fridge with $CO_2$(s). There, the samples were defrosted. A stereomicroscope (Zeiss) was used to remove any remaining impurities, such as sand, epiphytes and other attached material. Then, samples were dried at 40 °C, pulverized by hand in a glass mortar and stored in PET bottles until analysis.

### 2.3. Instrumentation

Digestions were performed in a medium-pressure closed microwave system from Milestone (Ethos ONE Touch, Milestone S.R.L., Italy). An Agilent 7500ce ICP–MS (Agilent Technologies, Germany)

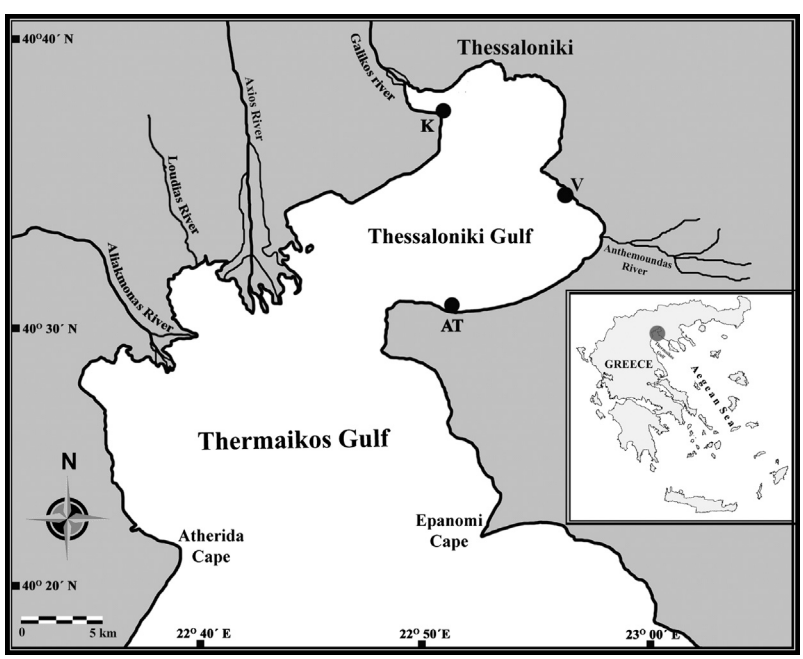



**Fig. 1.** Geographical location of the study site and map of Thermaikos Gulf indicating the sampling stations: Kalochori (K), Viamyl (V) and Agia triada (AT).

with an Ari Mist HP nebulizer (Burgener, Canada) was used to measure total arsenic content and arsenic species. For arsenic speciation, a coupled LC–ICP–MS system was used, with an Agilent 1200 quaternary pump, that had a vacuum degasification module and autosampler and the analytical columns Hamilton PRP-X100 (250 × 4.1 mm, 10 μm, Hamilton, USA) and Zorbax-SCX300 (250 × 4.6 mm, 5 μm, Agilent), which were protected by guard columns filled with the corresponding stationary phases. The outlet of the HPLC column was directly connected via PEEK tubing to the nebulizer of the ICP–MS, which was the arsenic-selective detector. Ion intensity at *m/z* 75 ($^{75}$As) was monitored using time-resolved analysis software. In addition, the ion intensities at *m/z* 77 ($^{40}$Ar$^{37}$Cl and $^{77}$Se) were monitored to detect potential argon chloride ($^{40}$Ar$^{35}$Cl) interference at *m/z* 75.

### 2.4. Standards and reagents

All solutions were prepared with doubly deionised water obtained from a Millipore water purification system (Elix&Rios) (18.2 MΩ cm$^{-1}$ and TOC < 30 μg L$^{-1}$). Nitric acid (69%) (Panreac, Hiperpur) and 31% hydrogen peroxide (Merck, Selectipur) were used in the digestions. Mobile phases were prepared with 98% formic acid (Panreac, P.A.), ammonium dihydrogen phosphate (Panreac, P.A.), 25% aqueous ammonia solution (Panreac, P.A.) and pyridine (Scharlau, P.A.). Stock standard solutions (1000 mg As l$^{-1}$) were prepared as follows: arsenite(AsIII), from $As_2O_3$ (NIST, USA, Oxidimetric Primary Standard 83d, 99.99%) dissolved in 4 g L$^{-1}$ NaOH (Merck, Suprapure); arsenate (AsV), from $Na_2HAsO_4{\cdot}7H_2O$ (Carlo Erba) dissolved in water; methylarsenate (MA), prepared from $(CH_3)AsO(ONa)_2{\cdot}6H_2O$ (Carlo Erba) dissolved in water; and dimethylarsenate (DMA), prepared from $(CH_3)_2AsNaO_2{\cdot}3H_2O$ (Fluka) dissolved in water. Arsenocholine (AC) from $(CH3)_3As^+CH_2CH_2OHBr^-$ was supplied by the "Service Central d'Analyse" (CNRS Vernaison, France); a certified reference material of arsenobetaine (AB) solution, CRM 626 from $(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$, was provided by BCR, and trimethylarsine oxide (TMAO) was prepared from $(CH_3)_3AsO$ (Argus Chemicals, S.R.L.) dissolved in water. All stock solutions were kept at 4 °C and were further diluted daily for the analyses. Arsenic standard solution from NIST High-Purity Standards with a certified concentration of 1000 ± 2 mg As L$^{-1}$ was used as a calibrant in the determination of total arsenic content by ICP–MS. AsV, DMA, MA, AC, TMAO and AB were standardized against an arsenic standard solution from NIST High-Purity Standards for our internal quality control. NIES CRM 09 Sargasso (*Sargassum fulvellum*) seaweed, supplied by NIES (Japan), had a certified total arsenic content of 115 ± 9.2 mg As kg$^{-1}$. An aliquot freeze-dried extract of *Fucus serratus*, containing the four common arsenosugars (phosphate ($PO_4$-sug), sulfate ($SO_4$-sug), sulphonate ($SO_3$-sug) and glycerol (gly-sug)) was used to assign the peaks in the chromatograms (Madsen et al., 2000).

### 2.5. Total arsenic analyses

Digestion was performed in triplicate (samples, blanks and CRM). Digestion was only performed in samples for which a sufficient amount was available. Dried samples (40 °C, 0.1 g) were mineralized with 8 ml of nitric acid and 2 ml of hydrogen peroxide. Mixtures were digested according to the following program: 10 min from room temperature to 90 °C, then maintained for 5 min at 90 °C, 10 min from 90 °C to 120 °C, 10 min from 120 °C to 190 °C and then 10 min maintained at 190 °C. Solutions were passed through ash-free filter papers (Whatman 40), diluted up to 20 ml with water and stored at 4 °C in PET bottles. A 1:20 dilution was performed before measuring the total arsenic by ICP–MS (external calibration, $^{103}$Rh as internal standard, measurements in triplicate). He was used as the collision gas.

### 2.6. Arsenic speciation

Sample water extracts were obtained in an end-over-end system (16 h, 35 rpm) in a sample:water ratio of 1:100. Extracts were centrifuged (2800 rpm, 10 min) and passed through PET syringe filters (Chromafil PET, Macherey–Nagel, 0.45 μm) before analysis. Extraction pellets were washed three times with water and digested. Thus, arsenic content was measured in pellet digests and in extracts (as described in the preceding paragraph), and total arsenic in the original sample was evaluated as the sum of these contents. Arsenic speciation was carried out in extracts by LC–ICP–MS using the method developed for marine algae (Ruíz Chancho et al., 2010). Anionic exchange chromatography was performed just after the extraction. Extracts were stored at 4 °C until cationic exchange chromatography, which was performed one or two days after the extraction. The performance of the two chromatographic systems is described in Table 1. Arsenic species in extracts were identified by retention time comparison with standards. MA, DMA, arsenite, arsenate, AB, TMAO and AC were quantified from external curves obtained with the corresponding standards. Extraction blanks were analyzed for each extraction batch. We quantified $PO_4$-sug with the MA calibration curve, $SO_3$-sug and $SO_4$-sug with the As(V) calibration curve, and gly-sug with the calibration curve of the AC standard as other authors suggested (Francesconi and Sperling, 2005). An unknown cation was quantified with the calibration curve of AC. As(III) was quantified by subtracting the species quantified in cationic exchange chromatography from the front peak of anionic exchange chromatography.

## 3. Results

### 3.1. Total arsenic concentrations

Total arsenic concentrations in seaweed tissue ranged from 1.4 mg As kg$^{-1}$ (*U. rigida, AT, September*) to 55.0 mg As kg$^{-1}$ (*Cystoseira barbata, AT, December*) (Table 2). The winter *C. barbata* samples from the AT station accumulated the highest total As concentration (55.0 mg kg$^{-1}$), followed by the samples of *Codium fragile* (23.0; 39.0 mg kg$^{-1}$), *Cystoseira spinosa* (16.8 mg kg$^{-1}$), *P. pavonica* (11.3; 11.5 mg kg$^{-1}$), *G. gracilis* (5.7; 12.2 mg kg$^{-1}$) and *Gracilaria* sp. (7.1 mg kg$^{-1}$). Finally, *Ulva intestinalis*, *U. rigida* and *U. fasciata* accumulated lower values (1.9–4.3; 1.4–2.7 and 2.2 mg kg$^{-1}$, respectively). Total arsenic ranged from 1.9 to 23.0 mg kg$^{-1}$ in June, from 1.4 to 16.8 mg kg$^{-1}$ in September and from 2.2 to 55.0 mg kg$^{-1}$ in December.

### 3.2. Arsenic species determination

The extraction efficiency (Table 3) for arsenic compounds ranged widely, from 9% (*C. fragile*, station AT, summer sampling) to 69% (*C. barbata*, station AT, winter sampling). The main compounds

**Table 1**
Chromatographic conditions used for the separation of arsenic species.

| | Anion exchange | Cation exchange |
|---|---|---|
| Column | PRP-X100 (250 × 1.4 mm) 10 μm (Hamilton, USA) | Zorbax 300-SCX (150 × 4.1 mm), 5 mm (Agilent, Germany) |
| Mobile phase | 20 mM $NH_4H_2PO_4$ pH 5.8 | 20 mM pyridine pH 2.6 |
| Injection volume | 20 μl | 20 μl |
| Flow | 1.5 ml min$^{-1}$ | 1.5 ml min$^{-1}$ |
| Arsenic species | As (III), DMA, MA, As (V) $PO_4$-sug, $SO_3$-sug, $SO_4$-sug | AB, AC, TMAO Gly-sug |

**Table 2**
Mean ± standard deviation of the total arsenic concentrations (mg $kg^{-1}$) in the dominant seaweeds of Thermaikos Gulf, $n = 3$.

| Species | Division | Phylum | Family | Month | Station AT | Station K | Station V |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Cystoseira barbata* | Brown | Ochrophyta | Sargassaceae | December | 55 ± 2 | – | – |
| *Cystoseira spinosa* | Brown | Ochrophyta | Sargassaceae | September | 16.8 ± 0.8 | – | – |
| *Padina pavonica* | Brown | Ochrophyta | Dictyotaceae | June | 11.5 ± 0.8 | – | – |
| | | | | September | 11.3 ± 0.5 | – | – |
| *Gracilaria* sp. | Red | Rhodophyta | Gracilariaceae | December | – | – | 7.1 ± 0.4 |
| *Gracilaria gracilis* | Red | Rhodophyta | Gracilariaceae | December | – | 9.0 ± 0.2 | 12.2 ± 0.5 |
| | | | | June | – | – | 5.7 ± 0.2 |
| | | | | September | – | 7.2 ± 0.5 | 6.2 ± 0.2 |
| *Hypnea musciformis* | Red | Rhodophyta | Cystocloniaceae | June | 4.6 ± 0.4 | – | 5.0 ± 0.2 |
| *Codium fragile* | Green | Chlorophyta | Codiaceae | June | 23 ± 1 | – | 7.4 ± 0.3 |
| | | | | December | – | – | 39.0 ± 0.4 |
| *Ulva intestinalis* | Green | Chlorophyta | Ulvaceae | June | 1.9 ± 0.1 | – | – |
| | | | | December | – | – | 4.3 ± 0.2 |
| *Ulva rigida* | Green | Chlorophyta | Ulvaceae | September | 1.4 ± 0.1 | 2.7 ± 0.3 | – |
| *Ulva fasciata* | Green | Chlorophyta | Ulvaceae | December | – | – | 2.2 ± 0.2 |

quantified were arsenosugars. Gly-sug was present in all the samples and $SO_4$-sug in none. The major arsenosugar in green seaweeds was gly-sug, $SO_3$-sug was not found in any sample and $PO_4$-sug was quantified in *C. fragile* (station V, summer sampling). All brown algal samples contained quantified gly-sug and $SO_3$-sug, and $PO_4$-sug was detected in a *P. pavonica* sample (station AT, autumn sampling). Red algal samples contained a considerable number of arsenosugars, except for *Hypnea musciformis* samples, in which only gly-sug was detected and quantified. In some samples, other arsenic compounds were the most common species: TMAO was the major quantified arsenic species in *Enteromorpha intestinalis* (station V, winter sampling) and As(V) in *Cystoseira* spp samples. AB was quantified in one sample (*C. barbata*) and DMA, MA and As(III) in several. As examples, the anionic and cationic exchange chromatograms obtained for *P. pavonica* (station AT, summer sampling) are shown in Fig. 2.

### 3.3. Quality assessment of the obtained data

#### 3.3.1. Column recovery

Column recovery was calculated as the ratio of the sum of the species eluted from the chromatographic columns to the total arsenic in the extract injected into the column. Column recoveries ranged between 11% and 103% (Table 3). Low column recovery values were obtained in some samples. These values could be attributable to the presence of several arsenic compounds that could not be quantified with the separation method used.

#### 3.3.2. Certified reference material (CRM)

In order to check the accuracy of the technique, the total arsenic concentration was determined in the CRM NIES n°9 (Sargasso). A total of 99 ± 9 mg $kg^{-1}$ was found, which is in agreement with the certified value (115 ± 9.2 mg $kg^{-1}$), when we consider the associated uncertainties.

#### 3.3.3. Analysis of Fucus serratus extract

We used an extract from the brown seaweed *F. serratus* (Madsen et al., 2000) to identify the arsenosugars present in our seaweed samples. For quality control purposes, we quantified As species in *F. serratus* extracts. Our results[1] (DMA: 0.01 ± 0.01 μg; gly-sug: 0.07 ± 0.01 μg; $PO_4$-sug: 0.07 ± 0.01 μg; $SO_3$-sug: 0.56 ± 0.04 μg; $SO_4$-sug: 0.37 ± 0.02 μg) confirm those reported by Madsen et al. (2000) and other values in the literature on the same extract (Kohlmeyer et al., 2003; Llorente-Mirandes et al., 2010; Ruíz Chancho et al., 2010; Šlejkovec et al., 2006).

#### 3.3.4. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

LODs and LOQs were estimated (Table 3). The LOD is the lowest concentration of an analyte that can be reliably differentiated from background noise (signal-to-noise ratio greater than 3). The LOQ is the lowest concentration that can be quantified (signal-to-noise ratio greater than 10). To calculate the LOD and the LOQ, the standard deviation of the base line and the peak base of each analyte multiplied by 3 or 10 (LOD and LOQ respectively) were calculated in the peak height calibration curve. The arsenosugar LODs and LOQs were estimated by means of a correction factor, which is the ratio between the concentration of arsenosugar in *F. serratus* and the peak height.

## 4. Discussion

The values reported in the results were compared with those reported in the literature for the same alga species or genus from other geographical areas (see Table 4). The arsenic content in the samples was either in the range of the bibliography (*Cystoseira* spp.), at a higher concentration (*C. fragile*) or at a lower concentration (*P. pavonica, Gracilaria* spp. and *Ulva* spp). These differences can be attributed to local environmental arsenic levels, to distinct arsenic accumulation capacity and to the growth cycle stage of the alga.

Several authors studied the relationship between the phylum and the arsenic content and proposed different sequences (Morita and Shibata, 1990; Almela et al., 2002; Tukai et al., 2002; Almela et al., 2006). We did not find a defined sequence among the phyla, since the green alga *C. fragile* had a relativity high arsenic content and the arsenic contents in samples of *P. pavonica, Gracilaria* spp. and *Ulva* spp. were at the same level.

The data available in the literature suggest that algae naturally accumulate more arsenic in winter than in warmer seasons (Lai et al., 1998). Our results for *C. fragile* in station V and *G. gracilis* in stations V and K, are consistent with this suggestion. Nonetheless, not enough data were obtained in the present study to draw further conclusions on this subject.

### 4.1. Arsenic species determination

Most samples had low arsenic content with los concentrations of arsenicals. In addition, extraction efficiencies and column recoveries varied widely. A wide range of extraction efficiencies is also reported in the literature (Francesconi and Kuehnelt, 2004; Rubio

[1] Values for the *F. serratus* extract are given as the absolute amount (μg) in the extract.

**Table 3**
Arsenic speciation, extraction efficiency and column recovery values (mean ± standard deviation, mg As $kg^{-1}$, n = 3).

| Species | Site–Date | As (III) | DMA | MMA | As (V) | AB | TMAO | $PO_4$-sug | $SO_3$-sug | Gly-sug | Unknown cation | Extractionefficiency (%) | Column recovery (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Cystoseira barbata* | Ag. Triada–22/ December/2007 | – | – | – | 27.0 ± 0.8 | 0.020 ± 0.003 | – | – | 1.43 ± 0.08 | 0.40 ± 0.06 | – | 69 | 76 |
| *Cystoseira compressa* | Ag. Triada–28/ September/2007 | – | 0.072 ± 0.004 | – | 3.27 ± 0.07 | – | – | – | 1.3 ± 0.1 | 0.35 ± 0.01 | – | 30 | 66 |
| *Padina pavonica* | Ag. Triada–30/ June/2007 | – | Detected | 0.07 ± 0.01 | 0.164 ± 0.003 | – | – | – | 0.62 ± 0.01 | 0.388 ± 0.006 | – | 30 | 38 |
| | Ag. Triada–28/ September/2007 | – | Detected | Detected | 0.38 ± 0.02 | – | – | Detected | 0.52 ± 0.04 | 0.197 ± 0.005 | – | 48 | 22 |
| *Gracilaria* sp. | Kalohori–22/ December/2007 | 0.05 ± 0.01 | – | – | 0.50 ± 0.02 | – | – | – | 1.21 ± 0.05 | 1.27 ± 0.07 | – | 45 | 68 |
| *Gracilaria gracilis* | Viamyl–30/ June/2007 | – | – | – | Detected | – | – | 0.12 ± 0.01 | – | 0.253 ± 0.002 | – | 17 | 36 |
| | Viamyl-22/ December/2007 | Detected | – | Detected | Detected | – | – | Detected | 1.26 ± 0.04 | 1.10 ± 0.02 | – | 48 | 75 |
| | Kalohori–28/ September/2007 | – | 0.052 ± 0.006 | – | Detected | – | – | 0.28 ± 0.05 | Detected | 0.164 ± 0.001 | – | 9 | 70 |
| | Viamyl-22/ December/2007 | – | – | – | 0.68 ± 0.007 | – | – | 0.53 ± 0.01 | Detected | 0.232 ± 0.005 | – | 41 | 17 |
| | Viamyl–28/ September/2007 | – | – | – | – | – | – | – | – | 0.754 ± 0.009 | – | 20 | 40 |
| *Hypnea musciformis* | Ag. Triada–30/ June/2007 | 0.048 ± 0.009 | – | – | – | – | – | – | – | 0.155 ± 0.006 | 0.046 ± 0.008 | 25 | 16 |
| | Viamyl–30/ June/2007 | – | – | Detected | – | – | – | – | – | 0.103 ± 0.005 | – | 18 | 11 |
| *Codium fragile* | Ag. Triada–30/ June/2007 | – | 0.062 ± 0.002 | – | – | – | – | – | – | 0.70 ± 0.02 | – | 14 | 19 |
| | Viamyl–30/ June/2007 | – | 0.059 ± 0.01 | – | – | – | – | 0.26 ± 0.04 | – | 1.20 ± 0.04 | – | 47 | 44 |
| | Viamyl-22/ December/2007 | – | – | – | – | – | – | – | – | 5.0 ± 0.9 | 0.104 ± 0.045 | 30 | 46 |
| *Enteromorpha intestinalis* | Ag. Triada–30/ June/2007 | 0.049 ± 0.02 | – | – | – | – | – | – | – | 0.044 ± 0.001 | 0.038 ± 0.004 | 30 | 27 |
| | Viamyl-22/ December/2007 | 0.041 ± 0.004 | – | – | – | – | 0.081 ± 0.004 | – | – | 0.068 ± 0.001 | – | 21 | 103 |
| *Ulva rigida* | Ag. Triada–28/ September/2007 | – | – | – | – | – | – | – | – | 0.075 ± 0.002 | 0.031 ± 0.006 | 26 | 24 |
| | Kalohori–28/ September/2007 | – | – | – | – | – | – | – | – | 0.433 ± 0.005 | – | 65 | 28 |
| | Viamyl–22/ December/2007 | – | – | – | Detected | – | – | – | – | 0.179 ± 0.007 | – | 21 | 35 |
| Limit of detection | | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.003 | 0.009 | 0.03 | 0.01 | 0.008 | | | |
| Limit of quantification | | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.1 | 0.01 | 0.03 | 0.1 | 0.3 | 0.03 | | | |

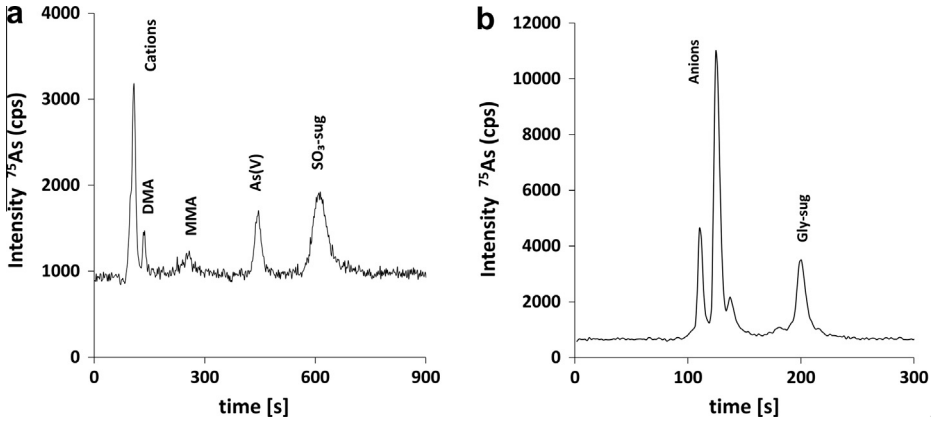



**Fig. 2.** Anionic (a) and cationic (b) chromatograms for *Padina pavonica* from station Agia Triada sampling on June 2007.

**Table 4**
Literature data on total arsenic concentrations (mg As $kg^{-1}$) in seaweed species of the genus *Cystoseira*, *Padina*,*Gracilaria*, *Hypnea*,*Codium* and *Ulva*.

| Species | Geographical locations | As concentrations[a] | Reference |
|---|---|---|---|
| *Cystoseira barbata* | Tartous (Syria) | 131 ± 1 | Al-Masri et al. (2003) |
| | Venice Lagoon (Italy) | 360 ± 50 | Caliceti et al. (2002) |
| | Thermaikos Gulf | 55.0 | Present study |
| *Cystoseira compressa* | Piran (Slovenia) | 17.6 ± 0.9 | Šlejkovec et al. (2006) |
| | Black sea | 28.0–48.4 | Güven et al. (1992) |
| *Cystoseira mediterranea* | Lloret de Mar (Spain) | 39.0 | Llorente-Mirandes et al. (2010) |
| *Cystoseira spinosa* | Thermaikos Gulf | 16.8 | Present study |
| *Cystoseira sp.* | Lattakia (Syria) | 4.20 ± 0.14 | Al-Masri et al. (2003) |
| | Tartous (Syria) | 5.95 ± 0.20 | Al-Masri et al. (2003) |
| *Padina pavonica* | Piran (Slovenia) | 1.89 ± 0.09 | Šlejkovec et al. (2006) |
| | Tartous (Syria) May 1999 | 18.3 ± 0.2 | Al-Masri et al. (2003) |
| | Tartous (Syria) June 2000 | 20.9 ± 0.7 | Al-Masri et al. (2003) |
| | Thermaikos Gulf | 1.3–1.5 | Present study |
| *Padina fraseri* | Sydney (Australia) | 13 | Tukai et al. (2002) |
| *Gracilaria gracilis* | Venice Lagoon (Italy) | 32 ± 1 | Caliceti et al., 2002 |
| | Black sea | 12.3–17.7 | Güven et al. (1992) |
| | Thermaikos Gulf | 5.7–12.2 | Present study |
| *Gracilaria sp.* | Thermaikos Gulf | 7.1 | Present study |
| *Hypnea musciformis* | Thermaikos Gulf | 4.6–5.0 | Present study |
| *Hypnea pannosa* | Baja California (Mexico) | 0.28 | Sánchez-Rodríguez et al. (2001) |
| *Codium vermilara* | Lloret de Mar (Spain) | 27 | Llorente-Mirandes et al. (2010) |
| *Codium fragile* | Thermaikos Gulf | 7.4–39 | Present study |
| *Ulva fasciata* | Thermaikos Gulf | 2.2 | Present study |
| *Ulva intestinalis* | Thermaikos Gulf | 1.9–4.3 | Present study |
| *Ulva lactuca* | Sydney (Australia) | 2.9 | Tukai et al. (2002) |
| *Ulva rigida* | Tartous (Syria) | 5.03 ± 0.04 | Al-Masri et al. (2003) |
| | Lloret de Mar (Spain) | 5.3 | Llorente-Mirandes et al. (2010) |
| | Venice Lagoon (Italy) | 12 ± 2 | Caliceti et al. (2002) |
| | Piran (Slovenia) | 1.35 ± 0.07 | Šlejkovec et al. (2006) |
| | Black sea | 3.2–6.4 | Güven et al. (1992) |
| | Thermaikos Gulf | 1.39–2.7 | Present study |

[a] Values given as in original source.

et al., 2010). Usually, the most abundant arsenic compounds in the samples are arsenosugars with a strong polar character, thus water is a suitable extractant since it can penetrate the sample matrix (Francesconi and Kuehnelt, 2004). However, samples also contained a large fraction of arsenic compounds that was not extracted with water. This fraction could be associated with lipids and might account for up to 50% of total arsenic in algae (Francesconi, 2003), and also with arsenic bound to cell components or proteins that are not extracted with water (Koch et al., 2000a,b).

Even though arsenosugars are the most common arsenical in most samples, the main arsenic compound in *Cystoseira* spp. was As(V). In addition, AB was quantified in *C. barbata* (0.020 ± 0.003 mg As $kg^{-1}$). We have postulated in previous studies that this may be attributable to the presence of microorganisms (Llorente-Mirandes et al., 2010), while other authors attributed the occurrence of arsenobetaine to non-removed epiphytes (Šlejkovec et al., 2006).

In some cases, unknown peaks were observed. For instance, in the chromatogram of Fig. 3 (*U. rigida*, Agia Triada, 30/September/2007), an unknown peak was obtained from the cationic exchange column, eluted between AB and gly-sug, and the species might be identified using an LC–ES–MS/MS system (Nischwitz and Pergantis, 2005a,b).

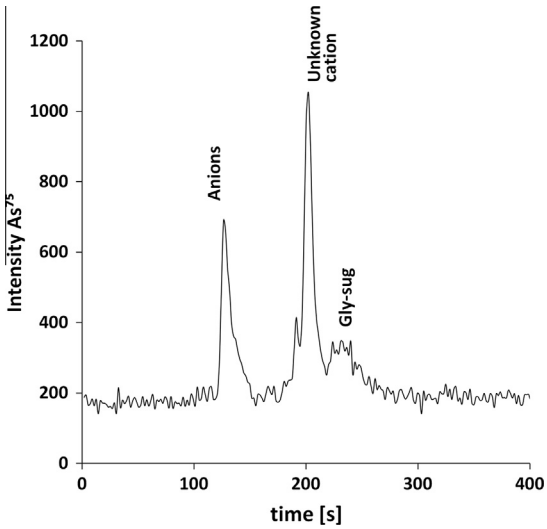



**Fig. 3.** Cationic exchange chromatogram for *Ulva rigida* from station Agia Triada, sampling on September 2007.

## 5. Conclusions

This is the first study of arsenic species occurrence in the Thermaikos Gulf and its contribution may be useful to further understanding of the arsenic behavior and fate of arsenic in the marine environment. Total As concentrations in the dominant seaweeds in the Gulf of Thessaloniki generally varied between seaweed species. *Cystoseira* species and *C. fragile* showed the highest total As concentrations, while *Ulva* species (*U. intestinalis*, *U. rigida* and *U. fasciata*) the lowest. Total arsenic contents in seaweed tissues in this survey were generally comparable to those previously reported for these species or species of the same genus from other coastal locations. Arsenosugars were the main arsenic compounds determined in the study except for *Cystoseira* spp. which presented inorganic arsenic as the predominant form.

## Acknowledgements

The authors thank the DGICYT (Project No. CTQ2010-15377/BQU) and the *Grup de Recerca Consolidat* (Project No. SGR2009-1188) for financial support. We also thank Dr. Toni Padró from the *Serveis Científico-Tècnics* of the University of Barcelona for his valuable support with ICP–MS measurements. The authors are also grateful to Prof. Kevin A. Francesconi for the *F. serratus* extract and Prof. Mecerdes Barbero for her kind help during sample processing. A. Pell acknowledges the CUR of DIUE (*Generalitat de Catalunya*) and the European Social Fund for the support given through a pre-doctoral grant.

## References

Al-Masri, M.S., Mamish, S., Budier, Y., 2003. Radionuclides and trace metals in eastern Mediterranean Sea algae. J. Environ. Radioact. 67, 157–168.
Almela, C., Algora, S., Benito, V., Clemente, M.J., Devesa, V., Súñer, M.A., Vélez, D., Montoro, R., 2002. Heavy metal, total arsenic, and inorganic arsenic contents of algae food products. J. Agric. Food Chem. 50, 918–923.
Almela, C., Clemente, M.J., Vélez, D., Montoro, R., 2006. Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. Food Chem. Toxicol. 44, 1901–1908.
Andrewes, P., DeMarini, D.M., Funasaka, K., Wallace, K., Lai, V.W.M., Sun, H., Cullen, W.R., Kitchin, K.T., 2004. Do arsenosugars pose a risk to human health? The comparative toxicities of a trivalent and pentavalent arsenosugar. Environ. Sci. Technol. 38, 4140–4148.
Boubonari, T., Malea, P., Kevrekidis, T., 2008a. The green seaweed *Ulva rigida* as a bioindicator of metals (Zn, Cu, Pb and Cd) in a low salinity coastal environment. Bot. Mar. 51, 472–484.
Boubonari, T., Malea, P., Koyro, H., Kevrekidis, T., 2008b. The red macroalga *Gracilaria bursa-pastoris* as a bioindicator of metals (Fe, Zn, Cu, Pb, Cd) in oligohaline coastal environments. Fresenius Environ. Bull. 17, 2207–2216.
Burger, J., Gochfeld, M., Jeitner, C., Gray, M., Shukla, T., Shukla, S., Burke, S., 2007. Kelp as a bioindicator: does it matter which part of 5 m long plant is used for metal analysis? Environ. Monit. Assess. 128, 311–321.
Caliceti, M., Argese, E., Sfriso, A., Pavoni, B., 2002. Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice lagoon. Chemosphere 47, 443–454.
Christophoridis, C., Dedepsidis, D., Fytianos, K., 2009. Occurrence and distribution of selected heavy metals in the surface sediments of Thermaikos Gulf, N. Greece. Assessment using pollution indicators. J. Hazard. Mater. 168, 1082–1091.
Collins, M.B., 1981. Sediment yield studies of headwater catchments in Sussex, S–E. England. Earth Surface Processes. Landforms 13, 25–36.
Djingova, R., Kuleff, I., Arpadjan, S., Alexandrov, S., Voulgaropoulos, A., Sawidis, T., 1987. Neutron activation and atomic absorption analysis of *Ulva Lactuca* and *Gracilaria Verrucosa* from Thermaikos Gulf, Greece. Toxicol. Environ. Chem. 15, 149–158.
Feldmann, J., Krupp, E.M., 2011. Critical review or scientific opinion paper: Arsenosugars-a class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs? Anal. Bioanal. Chem. 399, 1735–1741.
Francesconi, K.A., 2003. Complete extraction of arsenic species: a worthwhile goal? Appl. Organometal. Chem. 17, 682–683.
Francesconi, K.A., Edmonds, J.S., 1998. Arsenic species in marine samples. Croat. Chem. Acta 71, 343–359.
Francesconi, K.A., Kuehnelt, D., 2004. Determination of arsenic species: a critical review of methods and applications, 2000–2003. Analyst 129, 373–395.
Francesconi, K.A., Sperling, M., 2005. Speciation analysis with HPLC-mass spectrometry: time to take stock. Analyst 130, 998–1001.
Ganoulis, J., Krestenitis, J., 1982. Choix du site optimum d'evacuation des eaux usées dans une région côtière. Societé Hydrotechnique17 Journeés de l' Hydraulique.
Güven, K., Topcuoglu, S., Kut, D., Esen, N., Erentürk, N., Sayri, N., Cevher, E., Güvener, B., Öztürk, B., 1992. Metal uptake by Black Sea algae. Bot. Mar. 35 (4), 337–340.
Haritonidis, S., Malea, P., 1995. Seasonal and local variation of Cr, Ni and Co concentrations in *Ulva rigida* C. Agardh and *Enteromorpha linza* (Linnaeus) from Thermaikos Gulf, Greece. Environ. Pollut. 89, 319–327.
Haritonidis, S., Malea, P., 1999. Bioaccumulation of metals by the green alga *Ulva rigida* from Thermaikos Gulf, Greece. Environ. Pollut. 104, 365–372.
Koch, I., Wang, L., Ollson, C.A., Cullen, W.R., Reimer, K.J., 2000a. The predominance of inorganic arsenic species in plants from Yellowknife, Northwest Territories, Canada. Environ. Sci. Technol. 34, 22–26.
Koch, I., Wang, L., Reimer, K.J., Cullen, W.R., 2000b. Arsenic species in terrestrial fungi and lichens from Yellowknife, NWT, Canada. Appl. Organomet. Chem. 14, 245–252.
Kohlmeyer, U., Jantzen, E., Kuballa, J., Jakubik, S., 2003. Benefits of high resolution IC–ICP–MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin. Anal. Bioanal. Chem. 377, 6–13.
Lai, V.W., Cullen, W.R., Harrington, C.F., Reimer, K.J., 1998. Seasonal changes in arsenic speciation in fucus species. Appl. Organomet. Chem. 12, 243–251.
Le, X.C., Lu, X., Li, X., 2004. Peer reviewed: arsenic speciation. Anal. Chem. 76, 26A–33A.
Llorente-Mirandes, T., Ruíz Chancho, M.J., Barbero, M., Rubio, R., López-Sánchez, J.F., 2010. Measurement of arsenic compounds in littoral zone algae from the Western Mediterranean Sea. Occurrence of arsenobetaine. Chemosphere 81, 867–875.
Madsen, A.D., Goessler, W., Pedersen, S.N., Francesconi, K.A., 2000. Characterization of an algal extract by HPLC–ICP–MS and LC-electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies. J. Anal. At. Spectrom. 15, 657–662.
Malea, P., Haritonidis, S., Stratis, I., 1994. Bioaccumulation of metals by rhodophyta species at antikyra gulf (Greece) near an aluminium factory. Bot. Mar. 37, 505–513.
Malea, P., Haritonidis, S., 1999a. Metal content in *Enteromorpha linza* (Linnaeus) in Thermaikos Gulf (Greece). Hydrobiologia 394, 103–112.
Malea, P., Haritonidis, S., 1999b. Seasonal accumulation of metals by red alga *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papens. from Thermaikos Gulf, Greece. J. Appl. Phycol. 11, 503–509.
Malea, P., Haritonidis, S., 2000. Use of the green alga *Ulva rigida* C. Agardh as an indicator species to reassess metal pollution in the Thermaikos Gulf, Greece, after 13 years. J. Appl. Phycol. 12, 169–176.
Malea, P., Haritonidis, S., Kevrekidis, T., 1995. Metal content of some green and brown seaweeds from Antikyra Gulf (Greece). Hydrobiologia 310, 19–31.
Marcantonatos, G., 1990. Treatment and Disposal of Aquatic Wastes, Sewage, Industrial Effluents. Animal Residue, Marcantonatos, Athens.
Morita, M., Shibata, Y., 1990. Chemical form of arsenic in marine macroalgae. Appl. Organomet. Chem. 4, 181–190.
Nikolaidis, G., Moschandreou, K., Koukaras, K., Aligizaki, K., Kalopesa, E., Heracleous, A., 2006a. The use of chlorophyll-a for trophic state assessment of water masses in the inner part of Thermaikos bay (NW Aegean Sea). Fresenius Environ. Bull. 15, 1193–1198.
Nikolaidis, G., Patoucheas, D.P., Moschandreou, K., 2006b. Estimating breakpoints of Chl-a in relation with nutrients from Thermaikos gulf (Greece) using piecewise linear regression. Fresenius Environ. Bull. 15, 1189–1192.

Nischwitz, V., Pergantis, S.A., 2005a. First report on the detection and quantification of arsenobetaine in extracts of marine algae using HPLC–ES–MS/MS. Analyst 130, 1348–1350.

Nischwitz, V., Pergantis, S.A., 2005b. Liquid chromatography online with selected reaction monitoring electrospray mass spectrometry for the determination of organoarsenic species in crude extracts of marine reference materials. Anal. Chem. 77, 5551–5563.

Orfanidis, S., Papathanasiou, V., Gounaris, S., Theodosiou, T., 2010. Size distribution approaches for monitoring and conservation of coastal Cymodocea habitats. Aquat. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst. 20, 177–188.

Pell, A., Márquez, A., López-Sánchez, J.F., Rubio, R., Barbero, M., Stegen, S., Queirolo, F., Díaz-Palma, P., 2013. Occurrence of arsenic species in algae and freshwater plants of an extreme arid region in northern Chile, the Loa River Basin. Chemosphere 90 (2), 556–564.

Rubio, R., Ruíz Chancho, M.J., López-Sánchez, J.F., 2010. Sample pre-treatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants. TrAC, Trends Anal. Chem. 29, 53–69.

Ruíz Chancho, M.J., López-Sánchez, J.F., Rubio, R., 2010. Occurrence of arsenic species in the seagrass *Posidonia oceanica* and in the marine algae *Lessonia nigrescens* and *Durvillaea antarctica*. J. Appl. Phycol. 22, 465–472.

Sales, M., 2010. Thesis: *Cystoseira*-Dominated Assemblages from Sheltered Areas in the Mediterranean Sea: Diversity, Distribution and Effects of Pollution. Universitat de Girona, Girona (Spain).

Sánchez-Rodríguez, I., Huerta-Diaz, M.A., Choumiline, E., Holguín-Quiones, O., Zertuche-González, J.A., 2001. Elemental concentrations in different species of seaweeds from Loreto Bay, Baja California Sur, Mexico: implications for the geochemical control of metals in algal tissue. Environ. Pollut. 114, 145–160.

Sawidis, T., Voulgaropoulos, A.N., 1986. Seasonal bioaccumulation of iron, cobalt and copper in marine algae from Thermaikos Gulf of the Northern Aegean Sea, Greece. Mar. Environ. Res. 19, 39–47.

Šlejkovec, Z., Kápolna, E., Ipolyi, I., van Elteren, J.T., 2006. Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the Adriatic Sea. Chemosphere 63, 1098–1105.

Taleshi, M.S., Edmonds, J.S., Goessler, W., Ruiz-Chancho, M., Raber, G., Jensen, K.B., Francesconi, K.A., 2010. Arsenic-containing lipids are natural constituents of sashimi tuna. Environ. Sci. Technol. 44, 1478–1483.

Thomson, D., Maher, W.A., Foster, S., 2007. Arsenic and selected elements in intertidal and estuarine marine algae, south-east coast, NSW, Australia. Appl. Organomet. Chem. 21, 396–411.

Tukai, R., Maher, W.A., McNaught, I.J., Ellwood, M.J., Coleman, M., 2002. Occurrence and chemical form of arsenic in marine macroalgae from the east coast of Australia. Mar. Freshw. Res. 53, 971–980.

Yang, G., Zheng, J., Chen, L., Lin, Q., Zhao, Y., Wu, Y., Fu, F., 2012. Speciation analysis and characterisation of arsenic in lavers collected from coastal waters of Fujian, south-eastern China. Food Chem. 132, 1480–1485.

# Occurrence of arsenic and arsenic species in seaweeds and aquatic plants from the Caribbean Sea in Panama.

Albert Pell[a], Roser Rubio[a,b], José Fermín López-Sánchez[a,b,*]

[a]Analytical Chemistry Department, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, Barcelona ES-08028, Spain
[b]Water Research Institute, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 684, Barcelona ES-08034, Spain
*Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, ES-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4034873; fax: +34 93 4021211. E-mail address: fermin.lopez@ub.edu (J.F. López-Sánchez).

The content of total arsenic and arsenic compounds in seaweed and aquatic plant species in several locations in the Caribbean Sea from Panama was determined. Samples were collected in an urban area (Bocas del Toro Town), in the northern entry from the Canal of Panama (Fort Sherman) and in a maritime park (Cayo Zapatilla, Isla Bastimentos Maritime Park). Two species were collected in the three sites, *Sargasso* cf. a*cinarum* and *Thalassia testudinum*. Total arsenic was determined by acid digestion followed by ICP–MS. Arsenic speciation was analysed by water extraction followed by LC–ICP–MS. Total arsenic concentration ranged from 1.69 mg As $kg^{-1}$ to 78.45 ng As $kg^{-1}$. Highest arsenic concentration was found in the alga *Sargasso* cf. a*cinarum* (25.78 mg As $kg^{-}1$ – 78.45 mg As $kg^{-1}$) and the lowest in samples of the seaweed *Halimeda* cf. *incressata* (1,79 ± 0,06) and the aquatic plant *Thalassia testudinum* (1.69 – 1.28 mg As $kg^{-1}$). Inorganic arsenic was measured in all samples, and it was the main arsenic species in *Sargasso* cf. *acinarum* samples. Arsenosugars were found in all samples, except for the alga *Pencillus capitatus*. Sulphate-arsenosugar was found in *Sargasso* cf. a*cinarum*; this arsenic compound is seldom present in algae but for a few algal species. Methylates arsenic species were measured in a few samples. Samples from Fort Sherman had the lowest arsenic concentrations; however, they were collected on the beach, whereas samples from other locations were full immersed in the water. It might be possible that some of the arsenic content was rinsed away from the sample. The data reported in this study provides information from unstudied geographical zones and may contribute to the global understanding of the arsenic in the marine environment.

# Differences on the distribution of arsenic species in algae collected in their original habitat and on the beach.

Albert Pell[a], Anna Marquez[a], Mercedes Barbero[b], Roser Rubio[a,c], José Fermín López-Sánchez[a,c,*]

[a]Analytical Chemistry Department, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, Barcelona ES-08028, Spain
[b]Plant Biology Department, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 647, Barcelona ES-08028, Spain
[c]Water Research Institute, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 684, Barcelona ES-08034, Spain
*Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, ES-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4034873; fax: +34 93 4021211. E-mail address: fermin.lopez@ub.edu (J.F. López-Sánchez).

Total arsenic and arsenic species were determined in algae collected in both, submerged in the water and on the beach. We selected the brown algae *Padina pavonica* and *Macrocystis pirifera* collected in Lloret de Mar (Girona, Spain) and Tierra del Fuego (Argentina), respectively. Total arsenic content in *P. pavonica* showed no significance difference; however, the distribution of arsenic species, namely a decrease of the content of arsenosugars, As(III) and DMA and increase in MA and As(V). Two sets of *M. pirifera* samples were analysed diverting in the sampling site and the time spend on the shore. Both sets of samples showed distinct speciation changes: samples that had been for a short time showed the same arsenic species distribution than the ones immersed in sea water, whilst samples that had been for a longer time showed the similar behaviour than samples of *P. pavonica*, an increase of inorganic arsenic and gly-sug and a decrease of $PO_4$-sug. These results agree with the data available in the literature for arsenosugar degradation, converging in inorganic arsenic forms.

# Distribution of arsenic and arsenic species in different morphologies of the brown macroalgae *Cystoseira* mediterranea and *Macrocystis pyrifera*.

Albert Pell[a], Anna Marquez[a], Mercedes Barbero[b], Roser Rubio[a,c], José Fermín López-Sánchez[a,c,*]

[a]Analytical Chemistry Department, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, Barcelona ES-08028, Spain
[b]Plant Biology Department, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 647, Barcelona ES-08028, Spain
[c]Water Research Institute, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 684, Barcelona ES-08034, Spain
*Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, ES-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4034873; fax: +34 93 4021211. E-mail address: fermin.lopez@ub.edu (J.F. López-Sánchez).

This study reports arsenic and arsenic species in algae with differentiated morphological structures. The selected algae are *Cystoseira mediterranea* from Lloret de Mar (Girona, Spain) and *Macrocystis pyrifera* from Tierra del Fuego (Argentina), which had high environmental interest. Arsenic concentration in *C. mediterranea* varied considerably between the diverse morphological sections, following the sequence: deciduous branches > stipe cortex > stipe medulla > holdfast. These results suggest that structures in contact with water (branches and stipe cortex) present higher concentrations of this element than medulla. In addition, structures with a greater external surface, such as branches, had higher concentrations of arsenic than those with a lower surface area (cortex). The major arsenic compound in the stipe cortex and deciduous branches was As(V), while $SO_3$-sug was the most abundant compound in the stipe medulla and holdfast. Concerning *M. pyrifera* samples, the structure with higher total arsenic content are the gas bladders, followed by the blades or the stipe depending on the sampling site. All morphologies had gly-sug, $PO_4$-sug, $SO_3$-sug, methylated arsenicals and most inorganic arsenic. Arsenobetaine was found in two samples. Broadly, differences between the structures in *C. mediterranea* were clear, whilst in *M. pyrifera* were faint and varied among sampling sites. This study seek to shed light in the distribution of arsenic and arsenic species in the structures of algae for in order to contribute to a widest comprehension of the interaction of arsenic and algae.

**Arsenic speciation in the seaweed *Posidonia oceanica* sampled from an arsenic-rich shallow-sea hydrothermal vent, Santorini, Greece.**

Albert Pell[a], Roser Rubio[a,b], José Fermín López-Sánchez[a,b,*], Roy Price[c], Thomas Pichler[d,e]

[a]Analytical Chemistry Department, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, Barcelona ES-08028, Spain

[b]Water Research Institute, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 684, Barcelona ES-08034, Spain

[c]Department of Earth Sciences, University of Southern California, Los Angeles, USA

[d]MARUM Center for Marine Environmental Science, University Bremen, Bremen, Germany

[e]Fachbereich Geowissenschaften, Universität Bremen, Postfach 330 440, D-28334 Bremen, Germany

*Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, ES-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4034873; fax: +34 93 4021211. E-mail address: fermin.lopez@ub.edu (J.F. López-Sánchez).

Arsenic (As) is naturally enriched in most terrestrial and marine hydrothermal systems. Its discharge from shallow-sea hydrothermal vents into coastal marine environments can dramatically affect the surrounding ecosystems. Shallow-sea hydrothermal venting of acidic (pH~5), hot (28 – 30 °C), and highly sulphidic fluids occurs at the interior channels of the Kameni Islands, in the centre of the Santorini archipelago. The fluids are extremely Fe enriched () and had an average As content (6.5-16.5 μg As $l^{-1}$) about 5-14 times the concentration of the Mediterranean seawater. Iron hydroxides precipitate in the outer side of the channel and arsenic is adsorbed to them. The seagrass *Posidonia oceanica* living in there is completely cover with a layer of this precipitate.

Total iron and arsenic, and arsenic speciation (HPLC-HRMS) was carried out in samples collected in this site. Total arsenic ranged from 1.7 – 26.6 mg As $kg^{-1}$, a concentration higher than the expected for seagrasses. Inorganic arsenic was the most abundant species, and some arsenosugars and methylated species were found. Extraction efficiencies were low in most samples which may indicate high sediment presence in the sample after cleaning. This study will contribute in further understanding of the arsenic cycle in this environment.

Chemosphere 90 (2013) 556–564

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemosphere

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

# Occurrence of arsenic species in algae and freshwater plants of an extreme arid region in northern Chile, the Loa River Basin

Albert Pell [a], Anna Márquez [a], José Fermín López-Sánchez [a,b,*], Roser Rubio [a,b], Mercedes Barbero [c], Susana Stegen [d], Fabrizio Queirolo [d], Paula Díaz-Palma [d]

[a] Analytical Chemistry Department, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, Barcelona ES-08028, Spain
[b] Water Research Institute, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 684, Barcelona ES-08034, Spain
[c] Plant Biology Department, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 647, Barcelona ES-08028, Spain
[d] Chemistry Department, Universidad Católica del Norte, Avda. Angamos 0610, Antofagasta CL-1270709, Chile

## HIGHLIGHTS

- ▶ Loa River Basin (area of study) presents extreme environmental conditions.
- ▶ Arsenic and arsenic compounds were determined in algae and aquatic plants.
- ▶ Inorganic arsenic species predominated in all samples.
- ▶ Arsenic content in most samples ranged from 20 to 341 mg As $kg^{-1}$.
- ▶ One sample (*Cladophora* sp.) presented hyperaccumulation of As (11 000 mg As $kg^{-1}$).

## ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 7 June 2012
Received in revised form 5 August 2012
Accepted 13 August 2012
Available online 13 September 2012

*Keywords:*
Arsenic speciation
LC–ICP–MS
Algae
Aquatic plants
Loa River

## ABSTRACT

This study reports data on arsenic speciation in two green algae species (*Cladophora* sp. and *Chara* sp.) and in five aquatic plants (*Azolla* sp., *Myriophyllum aquaticum*, *Phylloscirpus* cf. *desserticola*, *Potamogeton pectinatus*, *Ruppia filifolia* and *Zannichellia palustris*) from the Loa River Basin in the Atacama Desert (northern Chile). Arsenic content was measured by Mass spectrometry coupled with Inductively Coupled Plasma (ICP–MS), after acidic digestion. Liquid chromatography coupled to ICP–MS was used for arsenic speciation, using both anionic and cationic chromatographic exchange systems. Inorganic arsenic compounds were the main arsenic species measured in all samples. The main arsenic species in the extracts of freshwater algae and plants were arsenite and arsenate, whereas glycerol-arsenosugar (gly-sug), dimethylarsinic acid (DMA) and methylarsonic acid (MA) were present only as minor constituents. Of the samples studied, algae species accumulated more arsenic than aquatic plants. Total arsenic content ranged from 182 to 11 100 and from 20 to 248 mg As $kg^{-1}$ (d.w.) in algae and freshwater plants, respectively. In comparison with As concentration in water samples, there was hyper-accumulation (>0.1% d.w.) in *Cladophora* sp.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The Antofagasta Region (northern Chile) has high environmental levels of arsenic (Queirolo et al., 2000a). The only river in the region that flows into the sea is the Loa, an extremely saline river. Dissolved arsenic content in the Loa and its tributaries range from 200 to 4400 μg As $L^{-1}$ (seasonal maximum) (Dirección General de Aguas (DGA), 2004). The chemical composition of the Loa's water is strongly influenced by its tributaries, mostly by the Salado River, which is As-enriched by waters from the El Tatio geothermal fields with levels up to 27 mg As $L^{-1}$ (Romero et al., 2003). The extremely arid conditions, high evaporation and the lack of low-level arsenic tributaries maintain high concentrations of arsenic and other components (e.g. copper, boron, chloride, sulfate, etc.) throughout the river course. Nevertheless, arsenic not only comes from natural sources such as volcanic bedrock and geothermal activity, but also has anthropogenic origins, such as smelter emissions, mining waste and enriched arsenic effluents from water treatment plants (Dirección General de Aguas (DGA), 2004). The Loa River and its main tributaries provide water to the cities and it is extensively used for agriculture and by the mining industry in the Atacama

* Corresponding author at: Analytical Chemistry Department, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, Barcelona ES-08028, Spain. Tel.: +34 93 403 48 73.
*E-mail address:* fermin.lopez@ub.edu (J.F. López-Sánchez).

0045-6535/$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.028

region. Adverse health effects due to high arsenic concentrations in drinking water have been reported in rural populations since 1962 (Smedley et al., 2000). Nowadays, major cities and towns receive water that complies with Chilean legislation (<0.010 mg As $L^{-1}$) (Ministerio de Salud Pública, 1969).

The Loa River is a suitable habitat for a high number of endemic flora and fauna species, particularly relevant for their adaptation to this extremely arid region. Algae and aquatic plants can be considered possible bioindicators of arsenic levels in the aquatic system. As they are able to remove inorganic arsenic from water, they could be useful for bioremediation purposes (Knauer and Hemond, 2000; Hansen et al., 2006; Robinson et al., 2006b; Bird et al., 2011).

A comprehensive review on distribution an occurrence of organoarsenic compounds in living organisms is available from Reimer et al. (2010). Specifically, several studies on arsenic and its compounds in marine algae around the world have been reported (Francesconi and Edmonds, 1998; Tukai et al., 2002; Thomson et al., 2007; Llorente-Mirandes et al., 2010). However, few data are available for total arsenic (Vasquez and Guerra, 1996; Hansen et al., 2006) and arsenic speciation in Chilean seaweeds (Ruíz Chancho et al., 2010). Nor is there much information on freshwater algae and aquatic plants (Zheng et al., 2003; Schaeffer et al., 2006; Miyashita et al., 2009). Although some reports are available on arsenic in water (Queirolo et al., 2000a; Romero et al., 2003; Dirección General de Aguas (DGA), 2004), vegetables (Queirolo et al., 2000a,b; Muñoz et al., 2002) and aquatic plants (Stegen et al., 2000) from the Loa River Basin, no study was found reporting arsenic speciation in the algae and aquatic plants of this basin.

The aim of the study is to determine total arsenic and arsenic species in algae and aquatic plants from the Loa River Basin in order to assess their contribution to overall contamination in this lotic ecosystem. This could be a motive for further bioremediation studies in the area and studies of possible bio-monitoring organisms.

## 2. Study area

The study area was restricted to the Loa River Basin in northern Chile (22°16′0″S 68°38′0″W). The location and general view of the study area are given in Fig. 1. Mining activity in the Loa Basin takes place in the intensively mineralized porphyry-Cu belt with developments at three large Cu deposits: Chuquicamata, Radomiro Tomic and El Abra (Fig. 1). The main tributaries of the Loa River are the San Pedro, Salado and San Salvador rivers. Two important sources of arsenic have to be considered in this basin. On the one hand, the Salado River, mainly fed by the geothermal springs of El Tatio located in the Andes, flows in an E–W direction into a canyon and cuts into volcanic rocks, mainly andesite and rhyolitic ignimbrite of the Miocene–Holocene age. On the other hand, the Chuquicamata smelter, at 2850 MASL and 16 km from the city of Calama, producing high As content in the copper concentrates and the release of $SO_2$ and aerosols (containing mainly arsenic as $As_2O_3$ and a low proportion of Cd, Cu, Pb and Zn) into the air, contributes to the contamination of water bodies, especially saltpans (Brundenius and Göransson, 1990). The hydrologic regime of the Loa Basin is rain-dominated: the river flow increases mainly during the summer in January and February (Dirección General de Aguas (DGA), 2004). The region is extremely arid with a rainfall ranging from 300 mm per year at 3000 MASL to 1–2 mm per year at sea level (Romero et al., 2003) and is associated with high environmental levels of arsenic (Queirolo et al., 2000a). Owing to the extremely arid conditions in the region, all rivers are temporal or endorrheic except for the Loa River, which is the only permanently exorrheic river in the region. It is 440 km long, covers an area of 33 570 $km^2$ and flows sinuously across the Atacama Desert from the Andes to the Pacific Ocean. In this basin, plants and algae grow in water with high conductivity and pH (see Table 1) and under strongly limiting conditions, such as large daily temperature variations and prolonged daily UV exposure.

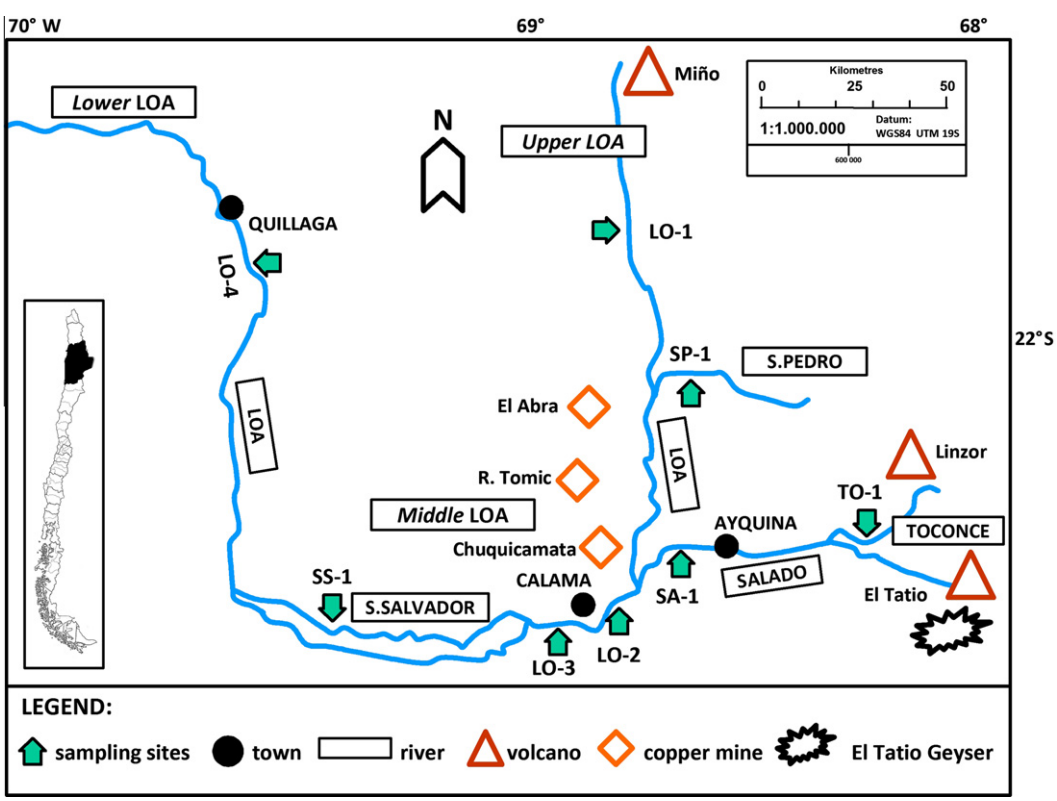



**Fig. 1.** Sampling sites location at the Loa River and at its main tributaries: San Pedro, Salado and San Salvador.

**Table 1**
Coordinates and water properties of the sampling sites.

| Sampling site | Code | UTM coordinates zone 19S | | Height MASL | Date | Temperature (°C) | pH | Electrical conductivity (mS cm$^{-1}$) | Dissolved oxygen (mg L$^{-1}$) | TDS (g L$^{-1}$) | Hardness (mg $CaCO_3$ L$^{-1}$) | Total As (mg L$^{-1}$) | $PO_4^{3-}$ (mg L$^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | East | North | | | | | | | | | | |
| *Upper Loa* | | | | | | | | | | | | | |
| Loa river in Lequena | LO-1 | 535264 | 7604060 | 3250 | 3-June-2010 | 9.4 | 8.42 | 0.669 | 9.2 | 1.90 | 490 | 0.220 | <0.778 |
| San Pedro river in Parshall 1 | SP-1 | 565449 | 7570727 | 3700 | 3-June-2010 | 20.4 | 7.41 | 0.850 | 12.6 | 2.58 | 610 | 0.456 | – |
| *Salado River* | | | | | | | | | | | | | |
| Toconce river before Sendos Dam | TO-1 | 588204 | 7536667 | 3445 | 4-June-2010 | 7.7 | 8.30 | 0.438 | 9.6 | 1.84 | 504 | 0.670 | – |
| Salado river in Sifón de Ayquina | SA-1 | 567504 | 7534956 | 2980 | 4-June-2010 | 11.1 | 7.27 | 5.19 | 10.1 | 3.98 | 690 | 0.798 | <0.078 |
| *Middle Loa* | | | | | | | | | | | | | |
| Loa river in Escorial | LO-2 | 510530 | 7518137 | 2450 | 2-June-2010 | 9.2 | 8.05 | 7.15 | 8.7 | 4.98 | 778 | 0.710 | 0.346 |
| Loa river in La Finca | LO-3 | 504192 | 7511789 | 2100 | 2-June-2010 | 12.2 | 8.21 | 7.65 | 8.4 | 5.30 | 1300 | 0.897 | 0.299 |
| San Salvador river before junction with Loa River | SS-1 | 446248 | 7523414 | 1238 | 2-June-2010 | 11.6 | 8.27 | 8.50 | 6.3 | 6.21 | 1380 | 1.20 | 1.790 |
| *Lower Loa* | | | | | | | | | | | | | |
| Loa river before agricultural area of Quillagua | LO-4 | 443087 | 7605780 | 802 | 1-June-2010 | 13.2 | 7.85 | 20.9 | 5.5 | 10.61 | 2160 | 1.40 | 1.017 |

TDS = total dissolved solids; < = below detection limit.

Along the Loa Basin (Fig. 1 and Table 1), three different sections of the river with specific chemical properties can be defined. The *Upper Loa Section* comprises the zone between the source, at the foot of the Miño volcano (UTM coordinates: 19S 541,002 7,657,055), and its confluence with the Salado River. After Lequena (Fig. 1: LO-1), most of the river flow is extracted for mining and agricultural activities. The main tributary in this section is the San Pedro River, which receives water from several sources. Before the confluence with the San Pedro River, the Loa is recharged from groundwater tributaries. The *Middle Loa Section* comprises the zone between the Loa–Salado confluence near Calama (Fig. 1: before LO-2) and the confluence with the San Salvador River (Fig. 1: after SS-1). The origin of the Salado River is close to the El Tatio geothermal field. The Toconce River, which flows into the Salado River's upper course (Fig. 1: before TO-1), has its source at the foot of the Linzor volcano (Fig. 1). The *Lower Loa Section* comprises the zone between the confluence with the San Salvador River and the mouth of the river in the Pacific Ocean. The source of the San Salvador River is on the west side of Calama. The main agricultural areas in the *Lower Loa Section* are in Quillagua (Fig. 1: after LO-4).

## 3. Material and methods

### 3.1. Reagents and standards

All chemicals were of analytical and/or suprapur grade. Millipore Milli-Q Plus Water (18.2 MΩ cm) was used for all solutions. Ammonium dihydrogen phosphate (Panreac, p.a.) and pyridine (Scharlau, p.a.) were used for anionic and cationic mobile phase preparation, respectively. pH was adjusted with 30% ammonia (Panreac, p.a.) and 98% formic acid (Panreac, p.a.). For sample digestion, 69% nitric acid (Panreac, Hiperpur) and 31% hydrogen peroxide (Merck, Selectipur) were used. $^{9}$Be, $^{103}$Rh, $^{205}$Tl 20 μg L$^{-1}$ (NIST High-Purity Standards) were used as internal standards in ICP–MS measurements.

#### 3.1.1. Arsenic standards and certified reference materials

Arsenite from $As_2O_3$ (NIST, USA, Oxidimetric Primary Standard 83d, 99.99%); arsenate from $Na_2HAsO_4{\cdot}7H_2O$ (Carlo Erba); methylarsonic acid (MA) as $(CH_3)AsO(ONa)_2{\cdot}6H_2O$ (Carlo Erba); dimethylarsinic acid (DMA) as $(CH_3)_2AsNaO_2{\cdot}3H_2O$ (Fluka); arsenocholine (AC) as $(CH_3)_3As^+(CH_2)\ CH_2OHBr^-$ supplied by the "Service Central d'Analyse" (CNRS Vernaison, France); arsenobetaine (AB) as $(CH_3)_3\ As^+CH_2COO^-$, CRM 626, supplied by BCR (now IRMM), standard solution; and trimethylarsenic oxide (TMAO) from $(CH_3)_3AsO$ (Argus Chemicals srl) were used as arsenic standards in speciation. Standardized stock solutions of the arsenic compounds containing about 1000 mg L$^{-1}$ were prepared in water, except for arsenite, which was dissolved in NaOH (4 g L$^{-1}$, Merck, Suprapure), and all were stored in the dark at 4 °C to prevent decomposition or oxidation. Multispecies standard working solutions covering the range 1–100 μg As L$^{-1}$ were prepared fresh daily for speciation analysis. Arsenate standard solution from NIST High-Purity Standards with a certified concentration of 1000 ± 2 mg As L$^{-1}$ was used for external calibration in the determination of total arsenic content with ICP–MS. An aliquot of freeze-dried extract of *Fucus serratus* dissolved in water (Madsen et al., 2000) was used as a laboratory reference material for the identification of the major arsenosugars: phosphate ($PO_4$-sug), sulfate ($SO_4$-sug), sulfonate ($SO_3$-sug) and glycerol (gly-sug). The Certified Reference Material BCR CRM 279 Sea Lettuce (*Ulva lactuca*), supplied by the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) of the European Commission, with a certified value of 3.09 ± 0.20 mg As kg$^{-1}$, and the Standard Reference Material

(SRM) 1640 for natural water were used for internal quality control purposes in total arsenic determinations.

### 3.2. Instruments

A Perkin Elmer system of Flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry (FI-HG-AAS), Model AAnalyst 700 and FIAS 400, was used for total As in water, under the following conditions: sample loop 0.5 mL; reducing agent, 0.5% $NaBH_4$ in 0.125% NaOH at 5 mL $min^{-1}$; 10% HCl, at 10 mL $min^{-1}$; and argon at 100 mL $min^{-1}$ as carrier gas for the FI system. An As electrodeless discharge lamp and electric oven temperature for the quartz cell at 900 °C was used in AAS.

Algae and aquatic plants and CRM Sea Lettuce were digested in a closed microwave digestion system, Milestone Ethos Touch Control. The ICP–MS analyses were performed through an Agilent 7500ce ICP–MS (Agilent, Germany) with Ari Mist HP nebulizer (Burgener, Canada). The chromatographic system consisting of an Agilent 1200 LC quaternary pump, equipped with an autosampler and degasification module, was connected to an analytical PRP-X100 (Hamilton, USA) and Zorbax SCX300 (Agilent, Germany). Both columns were protected with their respective guard column. The Instrument operating conditions of LC–ICP–MS and arsenicals that are separated with each chromatographic system are given in Table 2.

### 3.3. Procedures

#### 3.3.1. Sample collection and preparation

In June 2010, the Analytical and Environmental research group of the Chemistry Department of the Católica del Norte University (Antofagasta, Chile) collected samples of water and of the dominant species of both algae and plants from eight sites along the Loa River and its tributaries, San Pedro, Salado and San Salvador (Fig. 1). The geographical coordinates and the water properties of the sampling sites are shown in Table 1. Electrical conductivity, dissolved oxygen, pH and water temperature were measured *in situ*. Water samples were acidified with 2 M $HNO_3$ and cooled in a refrigerator (<5 °C) during transport to the laboratory, where they were stored at −20 °C until further analysis. The taxonomic identification of the plants and algae is given in Table 3. Samples were stored in sealed plastic bags at −18 °C in the laboratory until preparation for transportation. Samples were defrosted under a laminar flow clean bench, washed with deionized water to remove mud, sand and little stones, pre-dried at 45 °C for 3 d and sealed in plastic bags.

Plant and algae samples were transported by plane to the Analytical Chemistry Department of the University of Barcelona. There, a stereomicroscope (Zeiss) was used to remove remaining impurities. Then, samples were dried at 40 °C, crushed by hand in a glass mortar and stored in PET bottles until their analyses.

#### 3.3.2. Determination of total As in water

Total arsenic content in water samples was determined after microwave acidic digestion, using a closed-vessel system as follows: a 45 mL water sample was placed into the pre-cleaned Easy-Prep™ vessels and 9 mL of 65% nitric acid and 3 mL of 40% hydrogen peroxide were added for digestion. The program for addition was as follows: 10 min at room temperature, 10 min from room temperature to 200 °C and 15 min maintained at 170 °C. After cooling, digested samples were filtered through ash-free filter papers (Whatman 42) into a 100 mL volumetric flask and 5 mL of 50% HCl and 5 mL of reducing solution (5% KI + 5% ascorbic acid) were added. After 30 min, the resulting solution was diluted to volume with 50% HCl. Blanks were also prepared for each batch sample. Total As was measured by FI-HG-AAS under the conditions described in Section 3.2.

#### 3.3.3. Extraction of arsenic compounds and speciation analysis

Homogenized, powdered samples (0.1 g) were separately weighed in polypropylene tubes in triplicate and 10 mL of water was added. The extraction procedure was performed in an end-over-end shaker overnight at 35 rpm for 16 h at room temperature. Water extracts were centrifuged (3000 rpm, 15 min) and the supernatants were filtered through PET syringe filters (Chromafil PET, Macherey–Nagel, 0.45 μm) before analysis. The LC–ICP–MS system previously used (Llorente-Mirandes et al., 2010; Ruíz Chancho et al., 2010) was applied for the determination of arsenic compounds in algae and plant extracts, under the conditions described in Table 2. An aliquot of each extract was analyzed by anionic exchange chromatography immediately after extraction. The remaining extract was stored at −80 °C for further analyses (cationic exchange and total arsenic measurements). Chromatographic peaks were identified according to their retention time by comparison with standards. Arsenic species were quantified by external calibration curves. Total As was determined in aliquots of the extracts, for mass balance calculations.

#### 3.3.4. Determination of total As in algae, aquatic plants and the speciation extracts

Algae and aquatic plants and BCR CMR 279 were digested under a closed-vessel microwave system as follows: 0.2 g of powdered sample was weighed in the pre-cleaned TEFLON® vessels in triplicate. After addition of 8 mL of 69% nitric acid and 2 mL of 33% hydrogen peroxide, samples were digested according to the following program: 10 min from room temperature to 90 °C, maintained for 5 min at 90 °C, 10 min from 90 °C to 120 °C, 10 min from 120 °C to 190 °C and maintained for 10 min at 190 °C. After cooling, digested samples were filtered through ash-free filter papers (Whatman 40) and diluted to 20 mL with water. Blanks were also prepared for each batch sample. Total arsenic content was measured by ICP–MS. The digested samples and the extracts obtained for further arsenic speciation were properly diluted with 1% nitric acid prior to measurement, to ensure that all arsenic concentra-

**Table 2**
Chromatographic conditions used for arsenic speciation.

| | Anion exchange | Cation exchange |
|---|---|---|
| Column | PRP-X100 (250 mm × 4.1 mm, 10 μm) (Hamilton, Reno, USA) | Zorbax SCX300 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (Agilent, Waldbronn, Germany) |
| Pre column | PRP-X100 (20 mm × 2.0 mm, 10 μm) | Zorbax SCX300 (12.5 mm × 4.6 mm, 5 μm) |
| Mobile phase | $NH_4H_2PO_4$ 20 mM | Pyridine 20 mM |
| pH | 5.8 | 2.6 |
| Injection volume | 20 μL | 20 μL |
| Flow rate | 1.5 mL $min^{-1}$ | 1.5 mL $min^{-1}$ |
| Column temperature | Room temperature | Room temperature |
| As species | As(III), DMA, MA, As(V), $PO_4$-sug, $SO_3$-sug and $SO_4$-sug | AB, TMAO, AC and gly-sug |

**Table 3**
Levels of total As and arsenic species in algae and aquatic plants (*mean* ± standard deviation, $n = 3$, d.w.), extraction efficiency and column recoveries.

| Sample | Sampling site | As total (mg As kg$^{-1}$) | As(III)[a] (mg As kg$^{-1}$) | DMA (mg As kg$^{-1}$) | MA (mg As kg$^{-1}$) | As(V) (mg As kg$^{-1}$) | gly-sug (mg As kg$^{-1}$) | iAs[b] (mg As kg$^{-1}$) | Extraction efficiency (%) | Anionic column recovery (%) | Cationic column recovery (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Zannichellia palustris* L. | LO-1 | 79 ± 5 | 13.5 ± 1.4 | – | – | 6.7 ± 0.8 | – | 20 ± 2 | 32 | 80 | 94 |
| *Azolla* sp. | LO-1 | 199 ± 12 | | | | | | | | | |
| *Myriophyllum aquaticum* L. | SP-1 | 209 ± 11 | 56 ± 1 | – | – | 80 ± 1 | – | 136 ± 3 | 67 | 96 | 86 |
| *Potamogeton pectinatus* L. | TO-1 | 20 ± 2 | 0.9 ± 0.4 | 0.2 ± 0.01 | – | 7.5 ± 0.2 | 0.84 ± 0.04 | 8.4 ± 0.6 | 80 | 60 | 97 |
| *Ruppia filifolia* Skottsb. | TO-1 | 23 ± 2 | 0.6 ± 0.1 | 0.53 ± 0.05 | – | 4.1 ± 0.3 | 0.52 ± 0.04 | 4.7 ± 0.4 | 34 | 73 | 93 |
| *Phylloscirpus* cf. *deserticola* (Phil.) Dhooge & Goetgh. | SA-1 | 49 ± 3 | 12 ± 4 | – | – | 36 ± 6 | – | 49 ± 3 | 127 | 78 | 80 |
| *Cladophora* sp. | SA-1 | 11 100 ± 300 | 2 ± 1 | – | – | 389 ± 7 | – | 391 ± 8 | 5 | 67 | 75 |
| *Chara* sp. | LO-2 | 341 ± 6 | 3.88 ± 0.09 | 0.14 ± 0.01 | – | 28.2 ± 0.8 | 0.93 ± 0.02 | 31 ± 2 | 13 | 73 | 97 |
| *Potamogeton pectinatus* L. | LO-3 | 134 ± 1 | 15.7 ± 0.9 | 0.17 ± 0.01 | – | 57 ± 4 | Detected | 73 ± 4 | 77 | 71 | 100 |
| *Cladophora* sp. | SS-1 | 182 ± 7 | 4 ± 1 | Detected | 0.31 ± 0.02 | 64 ± 4 | – | 68 ± 5 | 53 | 73 | 92 |
| *Potamogeton pectinatus* L. | LO-4 | 248 ± 2 | 4.6 ± 0.2 | – | – | 130 ± 2 | – | 135 ± 1 | 58 | 94 | 92 |
| Limit of detection | | 0.003 | 0.02 | 0.03 | 0.05 | 0.08 | 0.15 | | | | |
| Limit of quantification | | 0.01 | 0.07 | 0.11 | 0.15 | 0.28 | 0.49 | | | | |

[a] As(III) as the subtraction of the sum of cationic species from the front of anionic exchange chromatograms. As(III) peak coelutes with cationic arsenicals.
[b] Inorganic arsenic (iAs) as the sum of arsenate and arsenite.

tions were within the working calibration range (0–50 μg As L$^{-1}$). Helium was used in the collision cell to remove interferences in ICP–MS measurements and a solution of $^{9}$Be, $^{103}$Rh, $^{205}$Tl (20 μg L$^{-1}$) was used as an internal standard. Samples were quantified by external calibration method. For quality control purposes, the calibration curve was run before, within and after each sample series measurement.

### 3.4. Quality assessment in the determination of arsenic and arsenic species

#### 3.4.1. Column recovery

Column recovery was calculated as the ratio of the sum of the species eluted from the chromatographic columns to the total arsenic in the extract injected into the column. Column recoveries ranged between 60% and 100% (Table 3). This parameter allows to evaluate correctly the quantification of the species and to guarantee the correct chromatographic separation.

#### 3.4.2. Certified reference material (CRM)

To check accuracy, total arsenic concentration was determined in CRM BCR 279 Sea lettuce (*Ulva lactuca*). The result obtained (2.9 ± 0.3 mg As kg$^{-1}$) was consistent with the certified value (3.09 ± 0.20 mg As kg$^{-1}$), thereby demonstrating the accuracy of the analytical method. Our results for arsenic species (As(V): 0.53 ± 0.04 mg As kg$^{-1}$; As(III): 0.06 ± 0.03 mg As kg$^{-1}$; DMA: 0.06 ± 0.03 mg As kg$^{-1}$; MA: 0.04 ± 0.01 mg As kg$^{-1}$; AB: 0.14 ± 0.02 mg As kg$^{-1}$; gly-sug: 0.096 ± 0.004 mg As kg$^{-1}$; $PO_4$-sug: 0.08 ± 0.01 mg As kg$^{-1}$; Unknown species: 0.07 ± 0.02 mg As kg$^{-1}$; Extraction efficiency: 57%; Column recovery: 81%) and those reported in the literature do not disagree (Foster et al., 2007; Caumette et al., 2011).

#### 3.4.3. Analysis of F. serratus extract

We used an extract from the brown seaweed *F. serratus* (Madsen et al., 2000) to identify arsenosugars present in our algae samples. For quality control purposes, we quantified As species in *F. serratus* extracts. Our results[1] (DMA: 0.01 ± 0.01 μg; gly-sug: 0.07 ± 0.01 μg; $PO_4$-sug: 0.07 ± 0.01 μg; $SO_3$-sug: 0.56 ± 0.04 μg; $SO_4$-sug: 0.37 ± 0.02 μg) confirm those reported by Madsen et al. (2000) and other values in the literature on the same extract (Kohlmeyer et al., 2003; Šlejkovec et al., 2006; Ruíz Chancho et al., 2008; Llorente-Mirandes et al., 2010).

#### 3.4.4. Quantification of arsenic species without standard

Standards were not used for some arsenic species since they were not offered. Using calibration curves form others species is a controversial point as nebulization efficiency might be different for each compound (Polya et al., 2003; Entwisle and Hearn, 2006); however, we quantified $PO_4$-sug with the MA calibration curve, $SO_3$-sug and $SO_4$-sug with the As(V) calibration curve, and gly-sug with the calibration curve of the AC standard as other authors suggested (Francesconi and Sperling, 2005).

#### 3.4.5. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

LOD and LOQ were estimated. The former is the lowest concentration of an analyte that can be reliably differentiated from background noise (signal-to-noise ratio greater than 3). The LOQ is the lowest concentration that can be quantified (signal-to-noise ratio greater than 10). For calculating LOD and LOQ, the standard deviation of the base line and the peak base of each analyte multiplied by 3 or 10 (LOD and LOQ respectively) were calculated in the peak height calibration curve. The arsenosugar LODs and LOQs was

[1] Values for *F. serratus* extract are given as absolute amount for extract μg.

estimated through a correction factor, which is the relation within the concentration of arsenosugar in *F. serratus* and the height of the peak.

## 4. Results and discussion

### 4.1. Surface water characteristics

Coordinates and water characteristics are shown in Table 1. Surface waters were characterized by pH values near neutral to slightly alkaline (pH 7.27–8.42). Electrical conductivity (0.438–20.9 mS $cm^{-1}$) and total dissolved solids (1.84–10.61 g $L^{-1}$) showed wide ranges of values between Loa River sections and were consistent with the location of the anthropogenic sources (wastewater and mining activities). Arsenic content in the surface waters ranged from 0.220 to 1.40 mg As $L^{-1}$ and varied depending on the sampling point. The results indicated that the main contribution is due to the anthropogenic inputs of tributaries near the mining area of Chuquicamata and Calama city. Therefore, the ecological risk of anthropogenic As from long-term human activities might be mainly due to the sediments of these tributaries. An increase of arsenic is observed down-stream even at a considerable distance from the confluence, through the important mining area of Chuquicamata, to the mouth. The highest level of As was measured in Lower Loa (LO-4), mainly polluted by mining, smelting, industrial and agricultural activities. For internal quality control, the SRM 1640 was analyzed for arsenic and the results obtained were within ±5% of the reference value.

### 4.2. Total arsenic in algae and aquatic plants

Results of total arsenic and arsenic species found in the algae and aquatic plants, limits of quantification and detection, extraction efficiency and column recoveries are given in Table 3. Each of the values shown in the tables is the mean of three replicates.

Total arsenic content determined in various species of algae and aquatic plants varied along the river course and ranged from 20 to 341 mg As $kg^{-1}$ (Table 3), but this range was greatly exceeded in an algae sample (*Cladophora* sp.: 11 100 mg As $kg^{-1}$) from the Salado River (SA-1), one of the most polluted sites (Dirección General de Aguas (DGA), 2004). The disparity in the values found in these algae is largely attributable to the water's chemical composition in the Salado River, which is strongly influenced by its origin in the geothermal field of El Tatio. Nevertheless, a freshwater plant (*Phylloscirpus* cf. *deserticola*) collected at the same site (SA-1) as *Cladophora* sp. had 49 mg As $kg^{-1}$. A similar figure was seen in a study comparing the same algal species with some aquatic plants in a freshwater environment (Schaeffer et al., 2006). The differences in arsenic concentration between samples might be due either to the fact that *P.* cf. *deserticola* is a vascular plant and *Cladophora* sp. is a filamentous alga, or to differences in the *habitat* where samples were collected. *Cladophora* sp. lives submerged in water, whereas the analyzed samples of *P.* cf. *deserticola* were only aerial stems, not submerged roots and stems. Data on arsenic content in algae and freshwater plants of the same genus as in the present study but from different locations are summarized in Table 4 for comparison purposes. Algae and aquatic plants growing in the Loa River Basin survive in an environment with high arsenic content, meaning that these species have developed arsenic tolerance mechanisms (which may vary between species). In general, hyperaccumulating plants can concentrate some elements in their tissues up to 0.1% of their dry weight. Of the species analyzed, *Cladophora* sp. is able to hyperaccumulate arsenic (1.11% of dry weight) and would be a good candidate for bioremediation studies. With this aim in mind, bioaccumulation coefficients (BC) were estimated as the ratios of total arsenic in the sample to the arsenic in water, according to Robinson et al. (2006a) (values shown in Table 5). *Cladophora* sp. shows remarkable differences between SA-1 (13910) and SS-1 (152), whereas arsenic concentration in water at SA-1 is lower than at SS-1 (see Table 1). This behavior could be explained by including phosphorous, since the ratio As:P in soil and water affects intake, distribution and speciation due to the chemical analogy between arsenate and phosphate (Wang et al., 2002). In the present study, as differences in phosphate concentration were found between the water samples (see Table 1), the highest BC (the highest uptake of arsenate) was obtained with the data from the site with low phosphate concentration. Thus, the increase in phosphate in the water appears to result in a decrease in arsenic uptake.

### 4.3. Arsenic speciation

Results of arsenic speciation, limits of quantification and detection, extraction efficiency and column recoveries are given in Table 3.

Extraction efficiencies (calculated as the ratio of total As in the extract to total As from acidic digestions) ranged from 5% to 126%. Rubio et al. (2010) reported a wide range of extraction efficiencies among algae and plants with different extracting agents (6–108%). Water is a good extracting agent, since it enters the sample matrix and extracts the compounds determined in the present study, as these are very polar and soluble in water (Francesconi and Kuehnelt, 2004). Low extraction efficiencies are related to the presence

**Table 4**
Data reported for similar freshwater algae and plants from different locations.

| Sample | Sampling site | As in water (μg $L^{-1}$) | As in sample (mg $kg^{-1}$) | Speciation[a] | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| *Cladophora* sp. (fresh) | Danube River, Hungary | 1.1 ± 0.2 | 9.33 | + | Schaeffer et al. (2006) |
| *Cladophora* sp. (sun-dried) | Danube River, Hungary | 1.1 ± 0.2 | 5.06 | + | Schaeffer et al. (2006) |
| *Cladophora glomerata* Pilg. | Hayakawa River, Japan | 17 | 18 | + | Miyashita et al. (2009) |
| *Cladophora glomerata* Pilg. | Wadi Hanifah, Riyadh, Saudi Arabia | – | 0.45–18.48 | – | Al-Homaidan et al. (2011) |
| *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. | Loa River, Chile | – | 90–900 | – | Stegen et al. (2000) |
| *Myriophylum* sp. | Danube River, Hungary | 1.1 ± 0.2 | 5.42 | + | Schaeffer et al. (2006) |
| *Chara vulgaris* L. | Chelpa River, Iran | 150 | 212.5 ± 0.4 | – | Ghassemzadeh et al. (2007) |
| *Scirpus* sp. | Meager Creek hot springs, Canada (1996) | 303 | 7.1 | + | Koch et al. (1999) |
| *Scirpus* sp. | Meager Creek hot springs, Canada (1997) | 286 | 4.5 | + | Koch et al. (1999) |
| *Zannichellia palustris* L. | Loa River, Chile | – | 600–800 | – | Stegen et al. (2000) |

[a] (+)Reported. (–)Not reported.

**Table 5**
Bioaccumulation coefficients (BC) estimated as the ratios of total arsenic in the sample to the arsenic in water.

| Sampling point | Alga, aquatic plant | As (dw) (mg As $kg^{-1}$) | As in water (mg As mg $L^{-1}$) | BC |
|---|---|---|---|---|
| LO-1 | *Zannichellia palustris* | 79 | 0.220 | 359 |
| | *Azolla* sp. | 199 | | 905 |
| SP-1 | *Myriophyllum aquaticum* | 209 | 0.456 | 458 |
| TO-1 | *Potamogeton pectinatus* | 20 | 0.670 | 30 |
| | *Ruppia filifolia* | 23 | | 34 |
| SA-1 | *Phylloscirpus* cf. *deserticol* | 49 | 0.798 | 61 |
| | *Cladophora* sp. | 11 100 | | 13 910 |
| LO-2 | *Chara* sp. | 341 | 0.710 | 480 |
| LO-3 | *Potamogeton pectinatus* | 134 | 1.897 | 71 |
| SS-1 | *Cladophora* sp. | 182 | 1.20 | 152 |
| LO-4 | *Potamogeton pectinatus* | 248 | 1.40 | 177 |

of non water-soluble arsenicals like arsenolipids (Francesconi, 2003), and to arsenic bound to cell components or proteins, which are not extracted by soft extractants such as water (Koch et al., 2000). For example, *Cladophora* sp. (SA-1) had a total arsenic concentration of 11 100 mg As $kg^{-1}$, but only 5% of arsenic compounds were extracted, only as inorganic forms.

Inorganic arsenic (iAs) is the main form in the samples, representing 82–100% of the sum of arsenic species. High values of standard deviation in some arsenite values could be explained by the rapid oxidation of this species to arsenate (Table 3). DMA, MA and glycerol arsenosugars were found as minor compounds in several samples. Gly-sug was found in plant samples of *P. pectinatus* and *R. filifolia*, corroborating recent studies of aquatic plants (Llorente-Mirandes et al., 2010; Ruíz Chancho et al., 2010). AB was not detected in any sample, which indicates that the removal of epiphytes during sample pre-treatment was accurate and that microbial activity, which might be involved in the formation of such an arsenocompound (Llorente-Mirandes et al., 2010; Ruíz Chancho et al., 2010), is not significant in the Loa River Basin. In some chromatograms the presence of a large amount of a major arsenic compound might make it difficult to quantify minor species that elute with a similar retention time. As an example, Fig. 2 shows an anionic and a cationic exchange chromatogram of extracts of *P. pectinatus* (LO-4) and *Chara* sp. (LO-2).

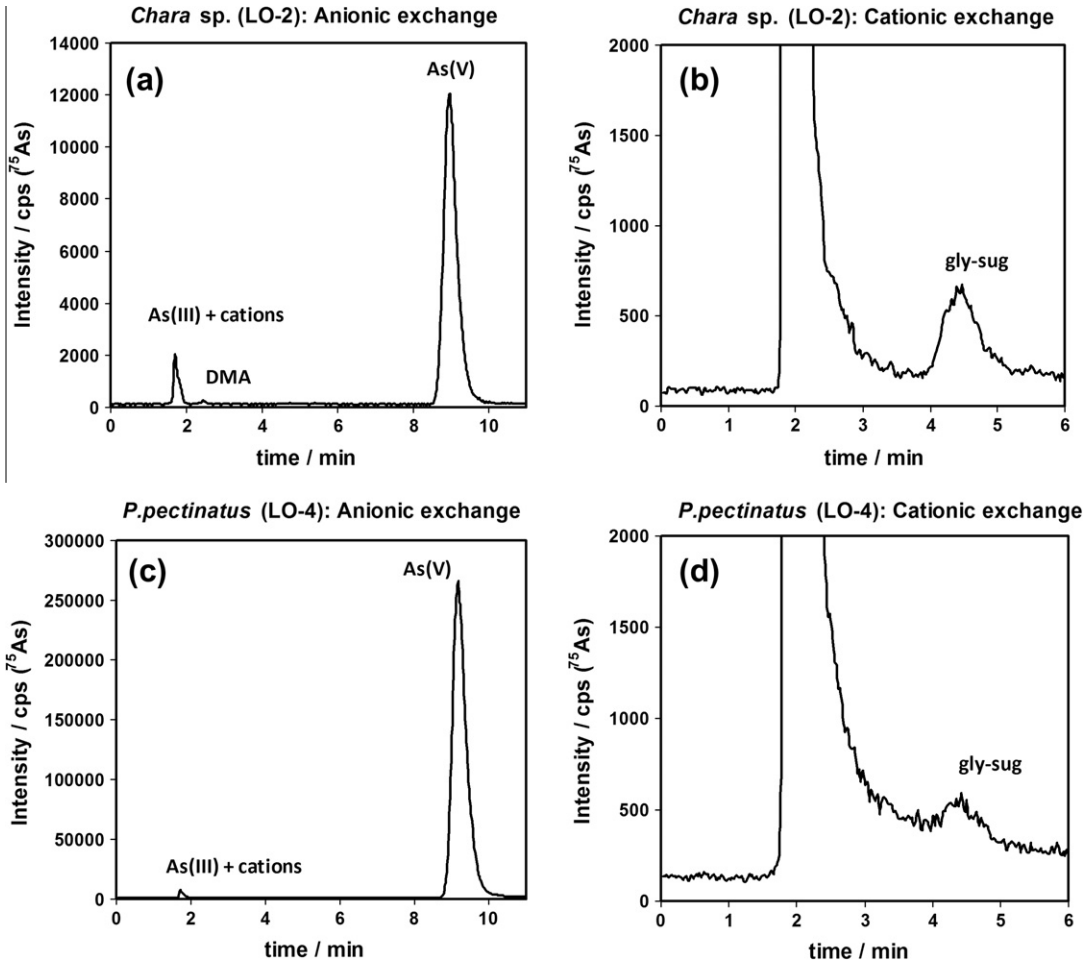



**Fig. 2.** Anionic (a) and cationic (b) exchange chromatograms of a *Chara* sp. (LO-2) extract. *P. pectinatus* (LO-4) chromatograms from anionic (c) and cationic (d) exchange systems.

Column recovery values, calculated as the ratio of the sum of arsenicals eluted from the column to the arsenic injected in the column, are shown in Table 3. Anionic column recoveries ranged from 60% to 96%; and cationic ones, from 75% to 100%.

It is interesting to notice that samples from TO-1 and SA-1 present the same speciation patters despite being different *taxa* of aquatic plants. These results might suggest that arsenic uptake, transformation and accumulation in plants and algae growing under chemical stress depend on the environmental conditions rather than the biological species (Kabata-Pendias et al., 1997). Diatoms were present in all algae (*Chara* sp. and *Cladophora* sp.) and in *P. pectinatus* (LO-3). Therefore, the possible influence of adsorbed diatoms on samples was examined. However, this seems to have had no effect on extraction efficiency, since samples had both low (5%) and high ratios (76%). Nor was any correlation between occurrence of diatoms and total arsenic and arsenical concentrations found (see Table 3).

## 5. Conclusions

This is the first study of arsenic speciation in algae and freshwater plants from the Loa River Basin (northern Chile). Samples had a wide range of concentrations of total arsenic, from 20 to 341 mg As $kg^{-1}$ (d.w.), except for one algal sample with 11 100 mg As $kg^{-1}$, *Cladophora* sp., which can be classified as a hyperaccumulator. Inorganic arsenic predominated in all samples, accounting for 82–100% of the arsenicals measured. Small amounts of DMA, MA and gly-sug were detected in several samples. This preliminary information should contribute usefully to further bioremediation assays and to the proposal for biomonitoring organisms in this extremely arid region.

## Acknowledgements

This study was supported financially by the DGICYT (Project No. CTQ2010-15377), the Grup de Recerca Consolidat (Project No. SGR2009-1188), DGIP (Project No. 155/2009, University Católica del Norte, Chile) and the Master EMQAL "Erasmus Mundus Quality in Analytical Laboratories, Project No. 2008-0095", which are all gratefully acknowledged. We also thank Dr. Toni Padró from the Serveis Científico-tècnics of the University of Barcelona for his valuable support with ICP–MS measurements. The authors are also grateful to Prof. Kevin A. Francesconi for the kind donation of the *F. serratus* extract and to Prof. M.J. Ruiz-Chancho for her help with the safe sample transportation from Chile to Barcelona. A. Pell is grateful to the CUR of DIEU (Generalitat de Catalunya) for the support given through a pre-doctoral grant.

## References

Al-Homaidan, A.A., Al-Ghanayem, A.A., Alkhalifa, A.H., 2011. Green algae as bioindicators of heavy metal pollution in wadi hanifah stream, Riyadh, Saudi Arabi. Int. J. Water Resour. Arid Environ. 1, 10–15.

Bird, M.I., Wurster, C.M., de Paula Silva, P.H., Bass, A.M., de Nys, R., 2011. Algal biochar – production and properties. Bioresour. Technol. 102, 1886–1891.

Brundenius, C., Göransson, B., 1990. Technological change and pollution abatement in the copper industries of Chile and China. Miner. Energy 14, 3.

Caumette, G., Koch, I., Estrada, E., Reimer, K.J., 2011. Arsenic speciation in plankton organisms from contaminated lakes: transformations at the base of the freshwater food chain. Environ. Sci. Technol. 45, 9917–9923.

Dirección General de Aguas (DGA), 2004. Diagnóstico y Clasificación de los Cursos y Cuerpos de Agua según Objetivos de Calidad. Cuenca Río Loa, Ministerio de Medio Ambiente, Chile.

Entwisle, J., Hearn, R., 2006. Development of an accurate procedure for the determination of arsenic in fish tissues of marine origin by inductively coupled plasma mass spectrometry. Spectrochim. Acta Part B: At. Spectrosc. 61, 438–443.

Foster, S., Maher, W., Krikowa, F., Apte, S., 2007. A microwave-assisted sequential extraction of water and dilute acid soluble arsenic species from marine plant and animal tissues. Talanta 71, 537–549.

Francesconi, K.A., 2003. Complete extraction of arsenic species: a worthwhile goal? Appl. Organomet. Chem. 17, 682–683.

Francesconi, K.A., Edmonds, J.S., 1998. Arsenic species in marine samples. Croat. Chem. Acta 71, 343–359.

Francesconi, K.A., Kuehnelt, D., 2004. Determination of arsenic species: a critical review of methods and applications, 2000–2003. Analyst 129, 373–395.

Francesconi, K.A., Sperling, M., 2005. Speciation analysis with HPLC–mass spectrometry: time to take stock. Analyst 130, 998–1001.

Ghassemzadeh, F., Babaee, F., Alavi, R., Arbab, Z., Mohammad, H., 2007. Phytoremediation of arsenic by macroalga: implication in natural contaminated water, northeast Iran. J. Appl. Sci. 7, 1614–1619.

Hansen, H.K., Ribeiro, A., Mateus, E., 2006. Biosorption of arsenic(V) with Lessonia nigrescens. Minerals Engineering 19, 486–490.

Kabata-Pendias, A., Piotrowska, M., Dudka, S., 1997. Trace metals in legumes and monocotyledons and their suitability for the assessment of soil contamination. In: Markert, B. (Ed.), Plants as Biomonitors. VCH Publishers, New York, USA, pp. 485–494.

Knauer, K., Hemond, H., 2000. Accumulation and reduction of arsenate by the freshwater green alga *Chlorella* sp. (Chlorophyta). J. Phycol. 36, 506–509.

Koch, I., Feldmann, J., Wang, L., Andrewes, P., Reimer, K.J., Cullen, W.R., 1999. Arsenic in the Meager Creek hot springs environment, British Columbia, Canada. Sci. Total Environ. 236, 101–117.

Koch, I., Wang, L., Ollson, C.A., Cullen, W.R., Reimer, K.J., 2000. The predominance of inorganic arsenic species in plants from Yellowknife, Northwest Territories, Canada. Environ. Sci. Technol. 34, 22–26.

Kohlmeyer, U., Jantzen, E., Kuballa, J., Jakubik, S., 2003. Benefits of high resolution IC–ICP–MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin. Anal. Bioanal. Chem. 377, 6–13.

Llorente-Mirandes, T., Ruíz Chancho, M.J., Barbero, M., Rubio, R., López-Sánchez, J.F., 2010. Measurement of arsenic compounds in littoral zone algae from the Western Mediterranean Sea. Occurrence of arsenobetaine. Chemosphere 81, 867–875.

Madsen, A.D., Goessler, W., Pedersen, S.N., Francesconi, K.A., 2000. Characterization of an algal extract by HPLC–ICP–MS and LC–electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies. J. Anal. At. Spectrom. 15, 657–662.

Ministerio de Salud Pública, 1969. Decreto 735: Reglamento de los servicios de agua al consumo humano. (versión 31 de julio de 2010). Boletín oficial de Chile.

Miyashita, S., Shimoya, M., Kamidate, Y., Kuroiwa, T., Shikino, O., Fujiwara, S., Francesconi, K.A., Kaise, T., 2009. Rapid determination of arsenic species in freshwater organisms from the arsenic-rich Hayakawa River in Japan using HPLC–ICP–MS. Chemosphere 75, 1065–1073.

Muñoz, O., Diaz, O.P., Leyton, I., Nuñez, N., Devesa, V., Súñer, M.A., Vélez, D., Montoro, R., 2002. Vegetables collected in the cultivated Andean area of northern Chile: total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. J. Agric. Food Chem. 50, 642–647.

Polya, D.A., Lythgoe, P.R., Abou-Shakra, F., Gault, A.G., Brydie, J.R., Webster, J.G., Brown, K.L., Nimfopoulos, M.K., Michailidis, K.M., 2003. IC–ICP–MS and IC–ICP–HEX–MS determination of arsenic speciation in surface and groundwaters: preservation and analytical issues. Mineral. Mag. 67, 247–261.

Queirolo, F., Stegen, S., Mondaca, J., Cortés, R., Rojas, R., Contreras, C., Munoz, L., Schwuger, M.J., Ostapczuk, P., 2000a. Total arsenic, lead, cadmium, copper, and zinc in some salt rivers in the northern Andes of Antofagasta, Chile. Sci. Total Environ. 255, 85–95.

Queirolo, F., Stegen, S., Restovic, M., Paz, M., Ostapczuk, P., Schwuger, M.J., Muñoz, L., 2000b. Total arsenic, lead, and cadmium levels in vegetables cultivated at the Andean villages of northern Chile. Sci. Total Environ. 255, 75–84.

Reimer, K.J., Koch, I., Cullen, W.R., 2010. Organoarsenicals. Distribution and transformation in the environment. In: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. (Eds.), Organometallics in Environment and Toxicology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 165–229.

Robinson, B., Marchgetti, M., Moni, C., Schroeter, L., van den Dijssel, C., Milne, G., Bolan, N., Mahimairaja, S., 2006a. Arsenic accumulation by aquatic and terrestrial plants. In: Smith, N.E., Owens, G., Bhattacharya, P., Nadebaum, P. (Eds.), Managing Arsenic in the Environment. CSIRO Publications, Australia, p. 235.

Robinson, B., Kim, N., Marchetti, M., Moni, C., Schroeter, L., van den Dijssel, C., Milne, G., Clothier, B., 2006b. Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. Environ. Exp. Bot. 58, 206–215.

Romero, L., Alonso, H., Campano, P., Fanfani, L., Cidu, R., Dadea, C., Keegan, T., Thornton, I., Farago, M., 2003. Arsenic enrichment in waters and sediments of the Rio Loa (Second Region, Chile). Appl. Geochem. 18, 1399–1416.

Rubio, R., Ruíz Chancho, M.J., López-Sánchez, J.F., 2010. Sample pre-treatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants. TrAC Trends Anal. Chem. 29, 53–69.

Ruíz Chancho, M.J., López-Sánchez, J.F., Rubio, R., 2010. Occurrence of arsenic species in the seagrass *Posidonia oceanica* and in the marine algae *Lessonia nigrescens* and *Durvillaea antarctica*. J. Appl. Phycol. 22, 465–472.

Ruíz Chancho, M.J., López-Sánchez, J.F., Schmeisser, E., Goessler, W., Francesconi, K.A., Rubio, R., 2008. Arsenic speciation in plants growing in arsenic-contaminated sites. Chemosphere 71, 1522–1530.

Schaeffer, R., Francesconi, K.A., Kienzl, N., Soeroes, C., Fodor, P., Váradi, L., Raml, R., Goessler, W., Kuehnelt, D., 2006. Arsenic speciation in freshwater organisms from the river Danube in Hungary. Talanta 69, 856–865.

Šlejkovec, Z., Kápolna, E., Ipolyi, I., van Elteren, J.T., 2006. Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the Adriatic Sea. Chemosphere 63, 1098–1105.

Smedley, P.L., Nicolli, H.B., Luo, Z.D., 2000. Arsenic in groundwaters from major aquifers: sources, effects and potential mitigation. Brit. Geol. Surv. Tech. Rep. WC/99/38.

Stegen, S., Queirolo, F., Cortés, S., Pastenes, J., Ostapczuk, P., Backhaus, F., Moh, C., 2000. Use of the fresh water plants *Zannichellia pallustris* and *Myriophyllum acuaticum* for biomonitoring of Cd, Pb and Cu in Anden Rivers of Chile. Bol. Soc. Chil. Quím. 45, 449–459.

Thomson, D., Maher, W.A., Foster, S., 2007. Arsenic and selected elements in intertidal and estuarine marine algae, south-east coast, NSW, Australia. Appl. Organomet. Chem. 21, 396–411.

Tukai, R., Maher, W.A., McNaught, I.J., Ellwood, M.J., Coleman, M., 2002. Occurrence and chemical form of arsenic in marine macroalgae from the east coast of Australia. Mar. Freshwater Res. 53, 971–980.

Vasquez, J.A., Guerra, N., 1996. The use of seaweeds as bioindicators of natural and anthropogenic contaminants in northern Chile. Hydrobiologia 326–327, 327–333.

Wang, J., Zhao, F.J., Meharg, A.A., Raab, A., Feldmann, J., McGrath, S.P., 2002. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. Plant Physiol. 130, 1552–1561.

Zheng, J., Hintelmann, H., Dimock, B., Dzurko, M.S., 2003. Speciation of arsenic in water, sediment, and plants of the Moira watershed, Canada, using HPLC coupled to high resolution ICP–MS. Anal. Bioanal. Chem. 377, 14–24.