

PROJECTE DE FINAL DE CARRERA

Llicenciatura de Ciències Ambientals

Facultat de Ciències

Universitat Autònoma de Barcelona

Curs 2011-2012

# Bioacumulació de $^{210}\text{Po}$ a nivell subcel·lular

Marina López Boix

Dirigit per : Dr. Jordi Garcia-Orellana

*Bellaterra, 3 de Setembre de 2012*



A la meua família



## AGRAÏMENTS

Amb aquest projecte finalitza la meua llicenciatura en Ciències Ambientals i una etapa de la meua vida. En primer lloc m'agradaria agrair a Jordi Garcia-Orellana l'oportunitat de realitzar aquest projecte al seu costat, el seu suport en tot moment tot i els moments difícils i sobretot la seva paciència per explicar-me les coses en moments de saturació.

En segon lloc donar les gràcies a Mònica Pons Pons i Anna Aragay Combas que m'han permès treballar a les seves instal·lacions en l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB) i m'han ajudat a portar a terme les tècniques del fraccionament cel·lular i electroforesi de gel de poliacrilamida.

També donar-li les gràcies a Oscar Palacios Bonilla per iniciar-me en la tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució, prestar-me el seu instrumental del departament de química inorgànica i ajudarnos en aquest estudi.

Seguidament agrair d'una manera especial a tots els integrants del Laboratori de Radioactivitat Ambiental sobretot a Núria Casacuberta i Joan Manel Bruach Menchén per ajudar-me en el treball de laboratori, juntament amb altres integrants que han fet més amena la feina.

Agrair també la col·laboració de la peixateria de Torrelles de Llobregat per proporcionar i participar de manera activa en la selecció de les mostres a analitzar.

També m'agradaria donar les gràcies als meus amics de la carrera que han fet d'aquests camí universitari uns cinc anys únics i meravellosos que sense ells no hauria sigut el mateix. Especialment donar les gràcies a Nil per la seva comprensió, la seva ajuda i suport en tot moment.

Per finalitzar agrair a la meua família el seu suport incondicional en tot moment de la meua vida i ajudar-me sempre a seguir en davant sigui quina sigui la meua decisió.

Moltes gràcies a tots!



# Índex

## Agraïments

---

<b>Índex de figures</b>	<b>III</b>
-------------------------	------------

---

<b>Índex de taules</b>	<b>V</b>
------------------------	----------

---

<b>Prefaci</b>	<b>VII</b>
----------------	------------

---

<b>1 Objectius</b>	<b>11</b>
--------------------	-----------

---

<b>2 Introducció: <math>^{210}\text{Po}</math></b>	<b>13</b>
--	-----------

---

<b>3 Bioacumulació del <math>^{210}\text{Po}</math></b>	<b>17</b>
---	-----------

---

<b>4 Mètodes</b>	<b>19</b>
------------------	-----------

---

<b>4.1 Materials</b>	<b>19</b>
----------------------	-----------

<b>4.2 Preparació de mostres</b>	<b>20</b>
----------------------------------	-----------

4.2.1 Fraccionament cel·lular o lisat	20
---------------------------------------	----

4.2.2 Protocol de precipitació de proteïnes TCA	22
---	----

4.2.3 Electroforesis de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	23
--	----

4.2.4 Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).	28
--	----

<b>4.3 Anàlisi de mostres</b>	<b>29</b>
-------------------------------	-----------

4.3.1 Digestió en vas obert i deposició.	29
--	----

4.3.2 Digestió en microones	30
-----------------------------	----

4.3.3 Metalls	31
---------------	----

<b>4.4 Sistema de detecció</b>	<b>31</b>
--------------------------------	-----------

4.4.1 Espectrometria alfa	31
---------------------------	----

4.4.2 Metalls	32
---------------	----

<b>5 Resultats i Discussió</b>	<b>33</b>
--------------------------------	-----------

---

<b>5.1 Assaig del contingut <math>^{210}\text{Po}</math> en sardines.</b>	<b>33</b>
---	-----------

<b>5.2 Assaig del contingut <math>^{210}\text{Po}</math> en bonítol.</b>	<b>34</b>
--	-----------

5.2.1 $^{210}\text{Po}$	34
-------------------------	----

5.2.2 Electroforesi de gel de poliacrilamida	36
--	----

<b>5.3 Assaig del contingut de <math>^{210}\text{Po}</math> i metalls en verat, turbot, tallahams, sardines i rap</b>	<b>37</b>
---	-----------

5.3.1 $^{210}\text{Po}$	37
-------------------------	----

5.3.2 Relació de $^{210}\text{Po}$ i metalls en teixit de peix.	39
---	----

5.3.3 Cromatografia líquida d'alta resolució	51
--	----

<b>6 Conclusions i perspectives de futur</b>	<b>53</b>
--	-----------

---

<b>6.1 Conclusions</b>	<b>53</b>
------------------------	-----------

<b>6.2 Perspectives de futur</b>	<b>54</b>
----------------------------------	-----------

<b>7 Bibliografia</b>	<b>55</b>
-----------------------	-----------

---





## Índex de figures

Figura 2.1. Cadena de desintegració del $^{238}\text{U}$ .	13
Figura 4.1. Orgànuls de la cèl·lula animal.	20
Figura 4.2. Potter-Elvehjem amb mostra en l'interior.	21
Figura 4.3. Preparació del gel de poliacrilamida.	25
Figura 4.4. Procés de separació de les proteïnes.	26
Figura 4.5. Gel de Poliacrilamida amb els carrils de proteïnes i les proteïnes tenyides.	27
Figura 4.6. Fraccions del gel de Poliacrilamida.	27
Figura 4.7. Cromatògraf.	29
Figura 4.8. Espectre obtingut en mesures de Po.	32
Figura 5.1. Percentatge de $^{210}\text{Po}$ en cadascun dels orgànuls de les cèl·lules de teixit d'hepatopàncrees analitzat.	33
Figura 5.2. Activitats de $^{210}\text{Po}$ en els diferents orgànuls de la mostra de bonítol ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}\text{pes sec}$ ).	35
Figura 5.3. Percentatge de $^{210}\text{Po}$ en els diferents orgànuls de la cèl·lula en fetge de bonítol	35
Figura 5.4. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Fe ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de les vuit mostres analitzades.	40
Figura 5.5. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Hg ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de les vuit mostres analitzades.	40
Figura 5.6. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Ni ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de les vuit mostres analitzades.	42
Figura 5.7. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Cu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de les vuit mostres analitzades.	42
Figura 5.8. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Zn ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de les vuit mostres analitzades.	43
Figura 5.9. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Cd ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de les vuit mostres analitzades.	43
Figura 5.10. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Pb ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de les vuit mostres analitzades.	44
Figura 5.11. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Fe ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.	46
Figura 5.12. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Ni ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.	46
Figura 5.13. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Cu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.	47
Figura 5.14. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Hg ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.	47

Figura 5.15. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i $\text{Zn}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.	49
Figura 5.16. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i $\text{Cd}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.	49
Figura 5.17. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i $\text{Pb}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.	50
Figura 5.18. Resultats de la cromatografia d'alta resolució.	51

## Índex de taules

Taula 2.1. Dosi efectives compromeses per unitat d'incorporació per ingestió de radionúclids naturals. _____	14
Taula 4.1. Característiques de les mostres de peixos analitzades. _____	19
Taula 4.2. Preparació del segon gel (separador) _____	24
Taula 4.3. Preparació del primer gel (contenedor) _____	24
Taula 4.4 Característiques dels detectors alfa utilitzats. _____	31
Taula 5.1. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ pes sec) en mostres de fetge de Bonítol. _____	34
Taula 5.2. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ pes sec )de les mostres digerides amb microones i en vas obert. _____	37
Taula 5.3. Concentracions de $^{210}\text{Po}$ per a la fracció de citoplasma i per a la resta d'orgànuls. _____	39



## Prefaci

La protecció radiològica de l'home ha estat un dels reptes dels investigadors per entendre com protegir-se dels efectes nocius de les radiacions ionitzants. Tot i que la salut de les persones és un dels aspectes principals a tenir en compte per la protecció radiològica, existeixen altres aspectes que cal considerar com són la protecció del medi ambient marí i terrestre. En conseqüència la protecció radiològica ha començat a evolucionar, augmentant la protecció dels efectes potencials de la radiació sobre el medi, les poblacions biòtiques i l'home (Pentreath, 1999).

La majoria de la radiació rebuda per tots els organismes prové de fonts naturals. La radioactivitat natural es refereix a les fonts radioactives que no han estat originades per les activitats humanes (Ortega i Jorba, 1994). La radioactivitat natural inclou la radiació dels radionúclids primordials i els seus productes de desintegració, els raigs còsmics i els productes de la seva interacció amb els núclids estables en l'atmosfera, l'activació de neutrons i els productes d'espall·lació (Eisenbud i Gesell, 1997; Shaheed, 1997). Els radionúclids primordials es poden classificar en dos grups, els radionúclids que formen una cadena de desintegració com  $^{238}\text{U}$ ,  $^{232}\text{Th}$  i  $^{235}\text{U}$  i els que es descomponen en elements estables que no formen cadena de desintegració com per exemple  $^{40}\text{K}$ . No obstant, la majoria de radionúclids terrestres pertanyen a cadenes de desintegració naturals. Alguns dels radionúclids naturals de la sèrie  $^{238}\text{U}$  ( $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Pb}$  i  $^{210}\text{Po}$ ) i altres de la sèrie  $^{232}\text{Th}$  ( $^{228}\text{Ra}$ ) es consideren crucials, ja sigui per la seva importància toxicològica com pel seu comportament d'acumulació en el medi ambient (Shaheed, 1997).

En temes relacionats amb dosimetria l'anàlisi de radionúclids com el  $^{210}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Pb}$  són d'especial rellevància, ja que aquests dos elements són els que generen una exposició més elevada per ingestió dins la sèrie del  $^{238}\text{U}$ , sota condicions d'exposició normals (Linsalata, 1994; UNSCEAR, 2000). La dosi total que rebem és la suma de la dosi externa, que prové del medi i la dosi interna, que rebem a través del medi, incorporada per inhalació o ingesta de radionúclids. Es considera que el  $^{210}\text{Po}$  produeix més del 50% de la dosi interna de la radiació alfa en els humans (Holtzman, 1966). Tant el  $^{210}\text{Po}$  com el  $^{210}\text{Pb}$  presenten la dosi més alta de factors de conversió de dosi equivalent h(g) per unitat d'incorporació per ingestió dins de la cadena de desintegració del  $^{238}\text{U}$  (Casacuberta, 2011). Les fonts principals de  $^{210}\text{Po}$  que afecten el cos humà són el fum dels cigarrets, els aliments i la ingesta de productes marins com el peix i el marisc (Parfenov, 1974; Holtzman, 1966; UNSCEAR, 1982).

La distribució i el comportament dels radionúclids de la sèrie del  $^{238}\text{U}$  en el medi marí ha esdevingut un focus d'estudi durant quasi 50 anys, especialment en referència al  $^{210}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Pb}$  en organismes marins. Els primers estudis van començar en 1960 i 1970, d'on es va establir que el  $^{210}\text{Po}$  és la font de major radiació  $\alpha$  en el plàncton (Cherry, 1964; Shannon i Cherry, 1967; Shannon et al., 1970; Heyraud et al., 1976; Heyraud i Cherry, 1979). Cherry i Shannon (1974) van determinar que el  $^{210}\text{Po}$  produeix la major contribució (90%) a la dosi de radiació natural produïda per radionúclids emissors de partícules alfa a la majoria de organismes marins (Cherry i Shannon, 1974).

Inicialment, el principal interès en aquest emissor alfa va sorgir a causa dels nivells relativament alts de  $^{210}\text{Po}$  mesurats en la biota marina i l'alta dosi natural que rebem

d'aquest radionúclid (Cherry i Shannon, 1974; Stewart et al., 2008). S'ha estudiat el comportament de  $^{210}\text{Po}$  en els organismes marins i les cadenes alimentàries, centrant-se en invertebrats com els musclos, calamars i gambes (Skwarzek i Falkowski, 1988; Heyraud et al., 1994). Altres treballs d'investigació s'han centrat en l'acumulació de  $^{210}\text{Po}$  en nivells més alts de les cadenes tròfiques, en peixos i depredadors de gran mida (Carvalho, 2011). D'altra banda també s'han realitzat estudis sobre l'acumulació de  $^{210}\text{Po}$  en fetges de peixos i es va observar que el  $^{210}\text{Po}$  estava relacionat amb les proteïnes metal·lotioneïnes i ferritina, que no tenia el seu progenitor  $^{210}\text{Pb}$  i que explicaria la relació  $^{210}\text{Po}/^{210}\text{Pb}$  generalment tan alta en teixits de peixos i en particular en fetges de peixos (Durand et al., 1999).

El comportament del  $^{210}\text{Po}$  en els nivells superior de les cadenes alimentàries s'ha anat estudiant, però actualment encara no està totalment resolt. Està relativament ben estudiada l'assimilació preferent del  $^{210}\text{Po}$  sobre el  $^{210}\text{Pb}$  en els teixits tous dels organismes marins, tot i que la major concentració de  $^{210}\text{Pb}$  es troba en les parts dures com els ossos i la closca degut al seu comportament similar al Ca (Carvalho i Fowler, 1994). També queda clara l'assimilació i bioacumulació de  $^{210}\text{Po}$ , que passa a través dels nivells tròfics superiors, a diferència del  $^{210}\text{Pb}$  (Stewart et al., 2005). El  $^{210}\text{Po}$  és un radionúclid que penetra a l'interior del citoplasma de les cèl·lules, essencialment en fitoplàncton i zooplàncton amb una eficiència del 40% (Stewart i Fisher, 2003b; Durand et al., 1999).

La presència de  $^{210}\text{Po}$  en els oceans i la seva capacitat d'acumulació en els organismes permet que es pugui emprar com a traçadors de processos oceanogràfics. Una característica de la parella de radionúclids  $^{210}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Pb}$  és que es pot utilitzar com a traçador en el flux de partícules en els oceans (Bacon, 1976). Així, s'observà que el dèficit de  $^{210}\text{Po}$  en els primers centenars de metres de la columna d'aigua respecte del seu progenitor el  $^{210}\text{Pb}$ , podria ser un indicador de fluxos de partícules en els oceans, degut a les seves diferències biogeoquímiques (Verdeny et al., 2009) i a les diferents afinitats d'ambdós radionúclids per les partícules, ja que el  $^{210}\text{Po}$  presenta una afinitat més gran que el  $^{210}\text{Pb}$  (Radakovitch et al., 1999). El desequilibri entre  $^{210}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Pb}$  en aigua de mar i de les partícules en suspensió han estat estudiats com a anàleg possible per a l'avaluació de carboni orgànic particulat (COP) i el seu flux a través de la columna d'aigua (Stewart et al., 2007a, 2007b, 2011; Verdeny et al., 2009).

Per poder entendre millor els processos biogeoquímics en el medi marí és important conèixer millor el cicle del  $^{210}\text{Po}$  en el medi marí i sobretot entendre el seu comportament a nivell cel·lular o subcel·lular. Així és necessari un coneixement en profunditat del comportament d'aquest radionúclid en espècies marines, la seva distribució en la cadena alimentària i la seva capacitat per bioacumular-se en l'interior de la cèl·lula.

Aquest projecte es porta a terme com a treball complementari al projecte final de carrera de ciències ambientals d'Ester López Castillo "Bioaccumulation of  $^{210}\text{Po}$  and  $^{210}\text{Pb}$  in fish tissues in a radioactive naturally enhanced area: the Peníscola marsh (Castelló, Spain)" realitzat en el marc del sub-projecte "Mesures de vigilància radiològica ambiental a la Marjal de Peníscola" dins d'un projecte principal "Estudi de la instrumentació de Vigilància radiològica ambiental i de Mesura de radó a condicions ambientals extremes", finançat per el Consell de Seguretat Nuclear en 2009.







## 1 Objectius

La importància sobre l'estudi del  $^{210}\text{Po}$  té una clara rellevància a causa de la seva forta bioacumulació en la biota marina en comparació amb altres radionúclids com el seu progenitor el  $^{210}\text{Pb}$ .

La recerca realitzada en aquest projecte es basa en l'estudi del  $^{210}\text{Po}$  en espècies marines, utilitzades per al consum humà i centrant-nos en la seva transferència a l'interior de l'aparell digestiu i la seva distribució a l'interior de la cèl·lula.

Tot i que s'han realitzat diversos estudis sobre la bioacumulació de  $^{210}\text{Po}$  en els organismes marins, encara no està ben establert quins són realment els mecanismes d'acumulació a nivell intracel·lular. L'objectiu principal d'aquest projecte és contribuir en entendre quins poden ser aquests mecanismes d'entrada i determinar en quina fracció subcel·lular es bioacumula el  $^{210}\text{Po}$ .

Objectius específics:

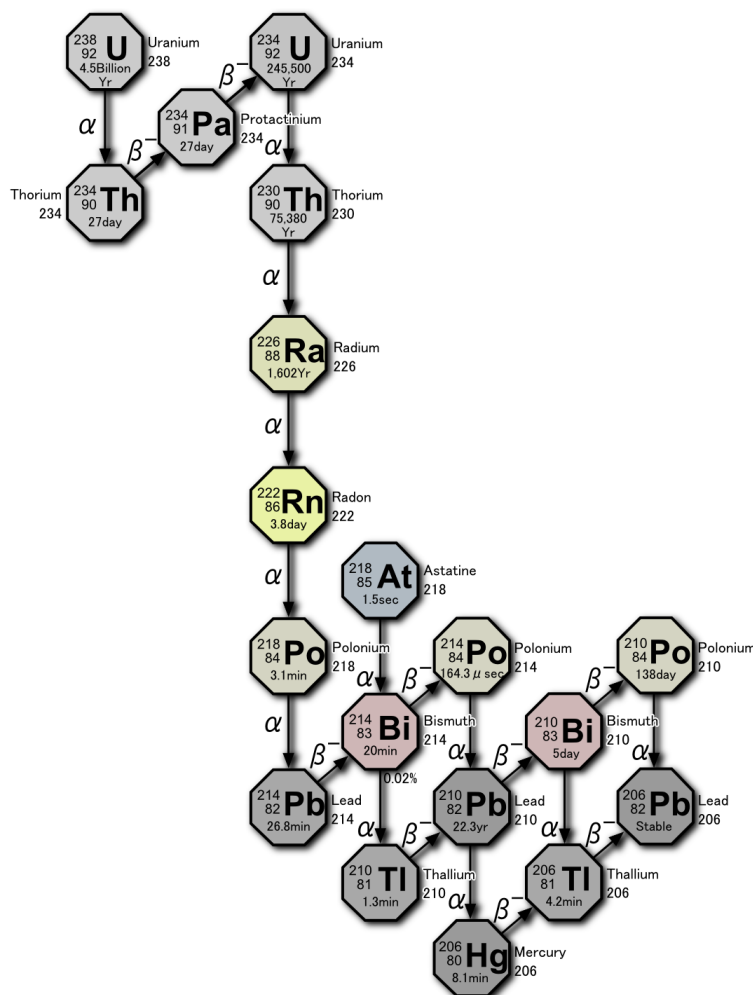
- Establir un mètode de separació de les diferents fraccions subcel·lulars per a l'anàlisi de  $^{210}\text{Po}$  en els diferents fraccions subcel·lulars.
- Determinar en quina fracció subcel·lular es concentra el  $^{210}\text{Po}$ . (ex. Nuclis, mitocondris, lisosomes, microsomes i citoplasma)
- Relació entre el contingut de metalls en hepatopàncrees i citoplasma de cèl·lules d'hepatopàncrees (ex. Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg) amb el  $^{210}\text{Po}$ .
- Establir un mètode de separació de proteïnes per a l'anàlisi de  $^{210}\text{Po}$ .
- Determinar en quina especiació química s'acumula el  $^{210}\text{Po}$  a nivell subcel·lular (proteïna, sal o ió).



## 2 Introducció: $^{210}\text{Po}$

El Poloni va ser descobert per Pierre i Marie Curie l'any 1898 durant la investigació del mineral de urani i tori. El Poloni és caracteritzat per tenir 25 isòtops coneguts, amb nombre màssics de 192-218, els quals es caracteritzen per ser tots radioactius i tenir un període de semidesintegració curt, dels quals només els isòtops 208 i 209 que són d'origen artificials i el isòtop 210 tenen un període de semidesintegració més llargs a 1 dia (Connan et al., 2007).

El  $^{210}\text{Po}$  és un radionúclid d'origen natural producte generat per la cadena de desintegració del  $^{238}\text{U}$  (Ivanovich et al., 1992; Figura 2.1). El  $^{210}\text{Po}$  té un període de semidesintegració de 138,3 dies, és el fill del  $^{210}\text{Bi}$  i el seu avi és el  $^{210}\text{Pb}$  (Eisenbud i Gesell, 1997). El  $^{210}\text{Po}$  també pot produir-se per l'activitat neutrònica del  $^{209}\text{Bi}$  (NKS,2009).



**Figura 2.1.** Cadena de desintegració del  $^{238}\text{U}$ . Font: American Heritage Dictionary

El  $^{210}\text{Po}$  és caracteritzat per ser un emissor de partícules alfa (Cherry i Shannon, 1974). Els emissors alfa es consideren de gran importància ja que a causa de la seva gran massa i carrega, són molt ionitzants i per tant se'ls considera en un factor de ponderació de la radiació de 20 (ICRP, 1990). El  $^{210}\text{Po}$  té una activitat específica de  $166 \text{ TBq}\cdot\text{s}^{-1}$  (NKS, 2009). Per aquesta raó el  $^{210}\text{Po}$  pot tenir un efecte tòxic fins i tot en

concentracions molt baixes degut a l'alta energia de la partícula alfa que emet (Moroz i Parenov, 1972).

El rang de concentració d'activitat en l'aire a nivell del sòl per al  $^{210}\text{Po}$  és de 0,03 a 0,3  $\text{Bq}\cdot\text{m}^{-3}$  i per al  $^{210}\text{Pb}$  és de 0,2 a 1,5  $\text{Bq}\cdot\text{m}^{-3}$  (Persson et al., 2011). En aigua potable del pous l'activitat del  $^{210}\text{Po}$  es de l'ordre 7-48  $\text{mBq}\cdot\text{L}^{-1}$  i per al  $^{210}\text{Pb}$  al voltant de 11-40  $\text{mBq}\cdot\text{L}^{-1}$ .

La concentració de l'activitat promig de  $^{210}\text{Po}$  en l'atmosfera del hemisferi nord es de 0,05  $\text{mBq}\cdot\text{m}^{-3}$  (UNSCEAR, 2000). Aquests núclids de l'atmosfera es dipositen en la superfície terrestre i marina juntament amb les partícules d'aerosols (Lee et al., 2009). Les molses, líquens i turba tenen una alta eficiència de retenció de  $^{210}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Pb}$  provinent de la precipitació atmosfèrica, i mostren inventaris de l'ordre de 0,5-5  $\text{kBq}\cdot\text{m}^{-2}$  (Persson et al., 2011). Les plantes absorbeixen radionúclids directament del sòl o per la deposició de la pluja radioactiva humida o seca. En les fulles de les plantes els nivells de  $^{210}\text{Po}$  són particularment alts com a resultat de la deposició del  $^{222}\text{Rn}$  de la deposició atmosfèrica. El tabac és un producte terrestre amb una alta activitat de  $^{210}\text{Po}$ .

A causa de la seva alta radiotoxicitat, el  $^{210}\text{Po}$  ha estat un tema de recerca des de el punt de vista de l'home. En l'àmbit legislatiu és la "Directiva 96/29/Euratom del Consejo de 13 de mayo de 1996" és on s'estableixen les normes bàsiques relatives a la protecció sanitària dels treballadors i de la població contra els riscos que resulten de les radiacions ionitzants " entre altres.

El  $^{210}\text{Po}$  ingerit en els aliments esta considerat com un dels majors contribuents a la dosi de radiació interna per l'home (Lee et al., 2009). Més de la meitat de la dosi de radiació interna rebuda per l'ésser humà prové d'aquest radionúclid natural com a resultat del consum de peix i marisc (Aarkog et al., 1997). A través de la ingesta de  $^{210}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Pb}$  es produeix al voltant del 83% de la dosi efectiva anual per els éssers humans (UNSCEAR, 2000). Tant el  $^{210}\text{Po}$  com el  $^{210}\text{Pb}$  presenten la dosi més alta de factors de conversió de dosi efectiva  $h(g)$  per unitat d'incorporació per ingestió, dins de la cadena de desintegració del  $^{238}\text{U}$  (Taula 1).

**Taula 2.1.** Dosi efectives compromeses per unitat d'incorporació per ingestió de radionúclids naturals. Font: RD 783/2001.

Isòtop	$h(g) \text{ Sv}\cdot\text{Bq}^{-1}$
$^{238}\text{U}$	$4,5\cdot 10^{-8}$
$^{234}\text{Th}$	$3,4\cdot 10^{-9}$
$^{234}\text{U}$	$4,9\cdot 10^{-8}$
$^{230}\text{Th}$	$2,1\cdot 10^{-7}$
$^{226}\text{Ra}$	$2,8\cdot 10^{-7}$
$^{210}\text{Pb}$	$6,9\cdot 10^{-7}$
$^{210}\text{Po}$	$1,2\cdot 10^{-6}$

El promig de la mitjana de la ingesta diària de  $^{210}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Pb}$  de la població mundial adulta s'estima de  $160 \text{ mBq}\cdot\text{d}^{-1}$ , i  $110 \text{ mBq}\cdot\text{d}^{-1}$ , respectivament, que correspon a una dosi efectiva anual de  $70 \text{ mSv}\cdot\text{a}^{-1}$  i  $28 \text{ mSv}\cdot\text{a}^{-1}$ , respectivament (Persson et al., 2011).

El  $^{210}\text{Po}$  a banda de ser un emissor de partícules alfa (Cherry i Shannon, 1974), es caracteritza per ser un radionúclid natural present en els oceans igual que el seu progenitor el  $^{210}\text{Pb}$ . La formació del  $^{210}\text{Pb}$  es produeix a través del  $^{222}\text{Rn}$  ( $T_{1/2} = 3,8$  dies) que s'escapa contínuament dels sòls i un cop a l'atmosfera, es desintegra a través d'una sèrie de productes de vida mitjana curta a  $^{210}\text{Pb}$  ( $T_{1/2} = 22,3$  anys), que es caracteritza per unir-se a les partícules i associar-se a aerosols (Turekian et al., 1977). El temps de residència de  $^{210}\text{Pb}$  en l'atmosfera és de l'ordre de dies a setmanes i queda dipositat sobre la terra i la superfície dels oceans per deposició seca i humida (Moore et al., 1974; Turekian et al., 1977; Kritz, 1983). En els sistemes marins, el  $^{210}\text{Pb}$  també es produeix en la columna d'aigua per la desintegració "in situ" de  $^{226}\text{Ra}$  (Broecker et al., 1967; Ku i Lin, 1976). En la producció "in situ" de  $^{210}\text{Pb}$  en les aigües poc profundes de les zones costaneres és gairebé insignificant en comparació amb el flux atmosfèric. En contrast, la producció "in situ" de  $^{210}\text{Pb}$  representa una contribució molt més gran en mar obert, encara que l'excés de  $^{210}\text{Pb}$  comparat amb el  $^{226}\text{Ra}$  també pot ser important en determinades àrees, a causa de l'entrada atmosfèrica (Cochran, 1992).

El  $^{210}\text{Po}$  es produeix com ja hem dit anteriorment per la desintegració de  $^{210}\text{Pb}$  a través del  $^{210}\text{Bi}$  de vida curta. A causa del curt temps de residència del  $^{210}\text{Pb}$  en l'atmosfera, les concentracions de  $^{210}\text{Po}$  en els aerosols, i per tant els fluxos atmosfèrics a les aigües superficials de l'oceà, són només aproximadament el 10-20% de la de  $^{210}\text{Pb}$  (Lambert et al., 1982). Per tant, la principal font de  $^{210}\text{Po}$  en aigua de mar és la desintegració "in situ" de  $^{210}\text{Pb}$ , que presenta les activitats típiques que varien entre 10-20 dpm per  $100\text{L}^{-1}$ , depenent de la regió.

La vida mitjana de  $^{210}\text{Po}$  ( $T_{1/2} = 138,4$  dies) és molt més curta que la de  $^{210}\text{Pb}$  ( $T_{1/2} = 22,3$  anys) i per aquesta raó estan en equilibri secular en la columna d'aigua oceànica en absència de partícules que s'enfonsen. No obstant això, una deficiència relativa de  $^{210}\text{Po}$  respecte al  $^{210}\text{Pb}$  sovint s'observa en la part superior de l'oceà a uns centenars de metres de la columna d'aigua, el que condueix a una relació de l'activitat total de  $^{210}\text{Po}/^{210}\text{Pb}$  típica a la superfície de l'oceà de  $\sim 0,5$  (Bacon et al., 1976; Nozaki et al., 1976; Cochran, 1992).

El desequilibri entre aquest parell de radionúclids es deu principalment a la diferència en la biogeoquímica del  $^{210}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Pb}$ . Tots dos radionúclids s'uneixen fàcilment a altres partícules, però el  $^{210}\text{Po}$  presenta una afinitat més forta per les partícules que el  $^{210}\text{Pb}$  (Kharkar et al., 1976; Heyraud et al., 1976). El  $^{210}\text{Pb}$  i el  $^{210}\text{Po}$  tenen diferents mecanismes d'enllaç, si bé el  $^{210}\text{Pb}$  només és adsorbit en superfícies de les partícules el  $^{210}\text{Po}$  és assimilat també per les cèl·lules de fitoplàncton per entrar al cicle biològic dels organismes. Així, el  $^{210}\text{Po}$  s'enriqueix en els teixits orgànics, específicament proteïnes, i poden bioacumular en la cadena alimentària (Fisher et al., 1983; Cherrier et al., 1995; Stewart i Fisher, 2003a, b; Stewart et al., 2005. ).

Estimacions indirectes dels fluxos de partícules es poden aconseguir mitjançant l'ús de partícules reactives com a radiotracadors (Cochran i Masqué, 2003). La producció de radionúclids amb taxa de desintegració coneguda, són útils per a la quantificació

dels processos dependents del temps. Si aquests radionúclids tenen la capacitat d'unir-se a partícules o bé la de ser absorbits per partícules, d'aquesta manera es pot portar un seguiment del seu progrés a través de la columna d'aigua. Una combinació d'aquestes dues característiques es requereix per a utilitzar aquests radionúclids com a traçadors per a que puguin esdevenir una eina potencial per a la quantificació dels fluxos de partícules d'exportació. El flux d'exportació d'un paràmetre donat com podria ser el cas del carboni orgànic particulat (COP) es pot estimar si la relació de la concentració del paràmetre per al radionúclid en partícules que s'enfonsen es coneix. Els radionúclids  $^{210}\text{Pb}$  i  $^{210}\text{Po}$  presenten aquestes característiques i poden ser utilitzats com a traçadors per a l'estudi dels processos en la superfície de l'oceà, són considerats traçadors especialment adequats (Coale i Bruland, 1985; Bacon et al., 1976; Bacon, 1988; Cochran i Masqué, 2003).

Com s'ha discutit en els treballs seminals de Turekian et al., (1974), Nozaki i Turekian (1976) i Bacon et al., (1976), la parella de radionúclids com el  $^{210}\text{Pb}$ - $^{210}\text{Po}$  es pot utilitzar per rastrejar els processos de transport de partícules i quantificar les taxes de recol·lecció de residus químics i eliminació de partícules a la capa superior de l'oceà per les escales de temps de setmanes a mesos.

Estudis realitzats per Stewart i Fisher., (2003a, b) i Stewart et al., (2005, 2007a) proporcionen suport addicional per l'ús de  $^{210}\text{Po}$  com traçador per a la matèria orgànica en l'oceà. Així doncs, proposant la parella de radionúclids per a l'avaluació de carboni orgànic particulat (COP) present en la columna d'aigua en els oceans (Stewart et al., 2007a, 2007b; Verdeny et al., 2009). No obstant això, només uns pocs estudis han aplicat el desequilibri  $^{210}\text{Po}/^{210}\text{Pb}$  per estimar el flux d'exportació COP.

### 3 Bioacumulació del $^{210}\text{Po}$

El poloni no té definida cap funció biològica coneguda; per aquesta raó els organismes no haurien d'incorporar-lo per cap mecanisme conegut com: l'acció enzimàtica, canals específics de membrana o altres mecanismes, com és evident per altres metalls essencials (Williams, 1981; Simkiss i Taylor, 1995).

Tant el poloni com el plom es troben en forma de catió en aigua de mar i mostren una unió molt forta a la superfície de les partícules, incloent els organismes (Stewart et al., 2008). L'especiació del Poloni en l'aigua de mar continua sent desconeguda. Es coneix la seva capacitat de penetració a l'interior de les cèl·lules per la qual cosa els organismes unicel·lulars com el fitoplàncton l'absorbeix i presenten un factor de concentració important. Els valors per a la relació  $^{210}\text{Po}/^{210}\text{Pb}$  són 3 per a fitoplàncton i 12 per a zooplàncton (Shannon et al., 1970; Turekian et al., 1974; Kharkar et al., 1976). Aquests resultats suggereixen que el  $^{210}\text{Po}$  s'enriqueix dintre dels ordres superiors de la cadena tròfica.

Tot i els nombrosos estudis sobre  $^{210}\text{Po}$ , el mecanisme específic d'absorció per part de les cèl·lules encara no estan clarificats. El  $^{210}\text{Po}$  sembla ser absorbit per les cèl·lules com un anàleg d'algun element necessari. La seva posició en el grup VI de la taula periòdica i la seva unió a proteïnes, ha suggerit que el  $^{210}\text{Po}$  actua com un anàleg del sofre o el seleni, però en qualsevol cas, principalment associat a proteïnes en els organismes vius (Schwarz, 1976; Cherrier et al., 1995; Stewart i Fisher, 2003; Durand et al., (2002). No obstant, Cherrier et al., (1995) va investigar la captació del  $^{210}\text{Po}$  i  $^{35}\text{S}$  radioactiu en cèl·lules bacterianes, i van trobar que la cinètica d'absorció era diferents entre els dos elements, encara que tenien localitzacions eventuais similars dins la cèl·lula. A diferència d'altres radionúclids com el Pb i Th, el Po té la capacitat de penetrar en el citoplasma de les cèl·lules (Fisher et al., 1983; Cherrier et al., 1995; Durand et al., 1999; Stepnowski et al., 2000; Stewart i Fisher., 2003). Durand et al. (1999) va demostrar que en fetsges de Verat *Scomber Scombrus* el 80% de poloni de la cèl·lula es trobava a la part del citoplasma, altres estudis relacionats com el de Stepnowski et al. (2000) va concloure que el 60% del poloni en hepatopàncrees del crustaci *Saduria entomon* es concentrava en la part del citoplasma. Stewart i Fisher (2003a) van estudiar que entre un 30 i 60% del  $^{210}\text{Po}$  cel·lular es troba en el citoplasma de diferents espècies d'algues.

Altres estudis han trobat altes concentracions de  $^{210}\text{Po}$  en proteïnes com hemocianines i la ferritina en fetge de vertebrats, hepatopàncrees de mol·luscs i hepatopàncrees de llagostes (Durand et al., 2002).

En l'estudi de Durand et al. (1999) s'observa un l'alta afinitat del  $^{210}\text{Po}$  per les proteïnes metal·lotioneïnes (MTs) i les proteïnes que contenen ferro, com es el cas de la Ferritina.

Les metal·lotioneïnes (MTs) són unes proteïnes molt particulars, no només per la seva ubiqüitat ja que estan presents en la majoria d'organismes vius, sinó perquè, a més a més, es caracteritzen per tenir un baix pes molecular (3-10 kD) i un elevat nombre de cisteïnes (30% dels seus aminoàcids). Aquest alt contingut en Cys els confereix una elevada capacitat per enllaçar ions metàl·lics així com una considerable reactivitat (Villarreal-Tolchinsky, 2005).

El fraccionament de les proteïnes del citosol per cromatografia d'exclusió molecular i una cromatografia d'intercanvi iònic van exposar que el 30% del  $^{210}\text{Po}$  es trobava unit a la Ferritina i el 28% a les metal·lotioneïnes (MTs). Altres proteïnes que probablement contenen enzims amb seleni i zinc també poden contenir sobre un 8% de  $^{210}\text{Po}$  (Durand et al., 1999).

Degut a la capacitat del  $^{210}\text{Po}$  a unir-se fàcilment a partícules permet que aquest radionúclid quedi unit a cèl·lules fitoplanctòniques que l'incorporen a l'interior de la cèl·lula associat a les proteïnes. Un cop incorporat a la cèl·lula, el  $^{210}\text{Po}$  pot ser assimilat pels teixits d'animals queingereixen aquestes cèl·lules fitoplanctòniques com per exemple mol·lusc, zooplàncton o peixos. La característica del  $^{210}\text{Po}$  de penetrar a l'interior del citoplasma de la cèl·lula, produeix una forta assimilació d'aquest radionúclid en el zooplàncton, amb una eficiència aproximada del 40% (Stewart i Fisher, 2003b). No obstant la eficiència amb la que els elements ingerits són assimilats per herbívors sembla estar directament relacionat amb el grau en que penetren en el citoplasma de les cèl·lules del fitoplàncton (Reinfelder i Fisher., 1991). L'assimilació del poloni passa a través de la cadena tròfica, d'herbívors a carnívors que els consumeixen i per tant bioconcentrat en teixits de diversos animals marins en els nivell tròfics superiors.

Heyraud i Cherry, (1979), Skwarzec, (1988), Swift et al. (1994), Wildgust et al. (1998) han trobat que el  $^{210}\text{Po}$  no esta distribuït uniformement en els peixos i els organismes bentònics. La major concentració d'aquest radionúclid es troba en els òrgans implicats en la digestió, com l'hepatopàncrees d'invertebrats marins (Swift et al., 1994), intestí, estómac i melsa de peixos (Skwarzec., 1988), sent la ingesta la via principal d'entrada del  $^{210}\text{Po}$  en aquests organismes (Carvalho i Fowler., 1994)

Una vegada el  $^{210}\text{Po}$  és absorbit pel peix es distribueix internament de la següent manera: intestí  $\geq$  fetge  $>$  esquelet  $>$  músculs (Lazorenko et al., 2002). Es va veure que les altes concentracions de  $^{210}\text{Po}$  es mostraven en fetge i intestí, mentre que les concentracions més baixes eren presents en brànquies, músculs, pell i ossos. Afortunadament la part muscular, ja que es la part que es destina al consum humà, presentava normalment una baixa acumulació de  $^{210}\text{Po}$ .

Es coneix que el  $^{210}\text{Po}$  és responsable d'una gran part de la dosi de radiació rebuda per els éssers humans, pel consum d'aliments d'origen marí. El  $^{210}\text{Po}$  que contenen els organismes marins, que són consumits pels humans poden ser una font d'exposició d'entre 5 a 20  $\mu\text{Sv}\cdot\text{a}^{-1}$  per persona i podria contribuir fins a un 80% de la dosi col·lectiva rebuda per una població consumidora de productes marins (Aarkrog et al., 1997; Pollard et al., 1998). Així, el peix, els mol·luscs i els crustacis juguen un paper important en la transferència de radionúclids als éssers humans.

La bioacumulació de radionúclids naturals en els organismes marins seguirà sent el centre d'estudis marins radioecològics, sobretot perquè aquests radionúclid actuen com a una font primària de la dosi de radiació en les cadenes alimentaries marines que arriben a l'home.



## 4 Mètodes

### 4.1 Materials

Durant aquest projecte es van realitzar tres tipus d'assajos per posar a punt el mètode d'obtenció de les fraccions subcel·lulars per al posterior anàlisi de  $^{210}\text{Po}$ . Les mostres es van ser obtingudes en llocs de venda destinada per al consum humà.

- El primera assaig es va dur a terme amb l'hepatopàncrees de 10 sardines El 18 de gener de 2012.
- El segon assaig es va realitzar el 28 de març de 2012 amb l'estudi de fetge de bonítol, és va analitzar el fetge i també els òrgans cel·lulars.
- El tercer assaig es va fer el 26 de juny del 2012 amb òrgans de diferents espècies: verat, tallahams, turbot, sardines i rap (Taula 4.1).

**Taula 4.1.** Característiques de les mostres de peixos analitzades. Font: Pròpia

Característiques	Verat	Tallam	Turbot	Sardines	Rap
Sexe	Femella	Masclé	-	-	-
Pes (kg)	0,5	2	1,25	0,03	4
Longitud (cm)	27	50	30	15	60
Lloc de captura	Vilanova	Roses	Criança Lugo	Vilanova	Dinamarca
Número d'especimens	1	1	1	10	1
Òrgans	Hepatopàncrees i gonades	Fetge i intestí	Hepatopàncrees i gonades	Hepatopàncrees	Hepatopàncrees

## 4.2 Preparació de mostres

### 4.2.1 Fraccionament cel·lular o lisat

Per complir un dels nostres objectius específics d'identificar la fracció subcel·lular on es concentra el  $^{210}\text{Po}$ , era essencial la utilització d'una tècnica per a la separació dels diferents orgànuls de la cèl·lula. Per aquest procés es va utilitzar la tècnica del fraccionament o lisat cel·lular que es va portar a terme al laboratori de l' Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC.

La fracció cel·lular o lisat és una tècnica bioquímica utilitzada per a separar els distints orgànuls i components cel·lulars per al seu estudi. La tècnica s'inicia amb la homogeneïtzació. El teixit es tritura en un homogeneïtzador de manera que les cèl·lules es comprimeixen i s'allibera el seu contingut. Posteriorment amb aquest extracte es sotmet a diferents centrifugacions a diferents velocitats i temps, de manera que s'obtenen fraccions enriquides dels distints orgànuls.

Els orgànuls que es van separar en aquesta mitjançant el fraccionament van ser, els nuclis que contenen el material genètic, els mitocondris que permeten la respiració i la descomposició de grasses i sucres per produir energia, els lisosomes que realitzen la digestió intracel·lular, els microsomes que són les fraccions de reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i altres i els citoplasma que es localitza entre el nucli i la membrana plasmàtica i consta d'una solució principalment formada per aigua i enzims on es realitzen nombroses reaccions metabòliques de la cèl·lula (Figura 4.1).

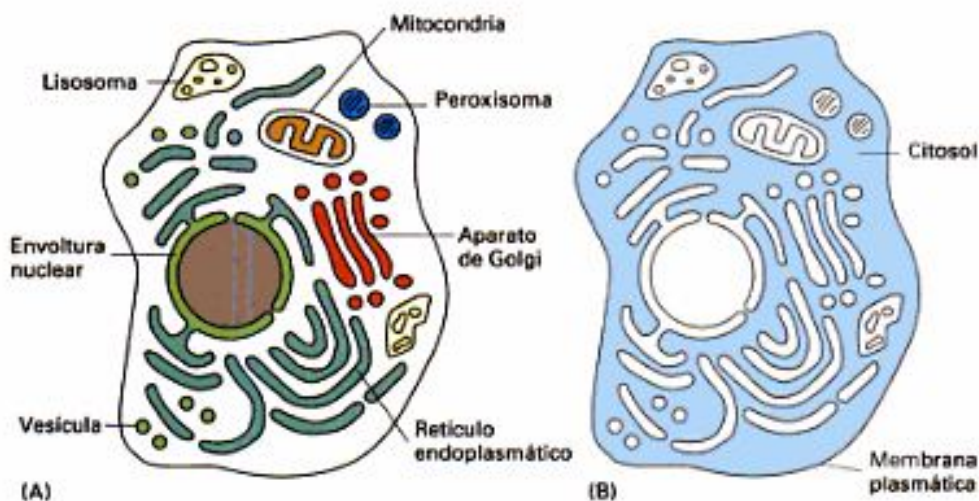
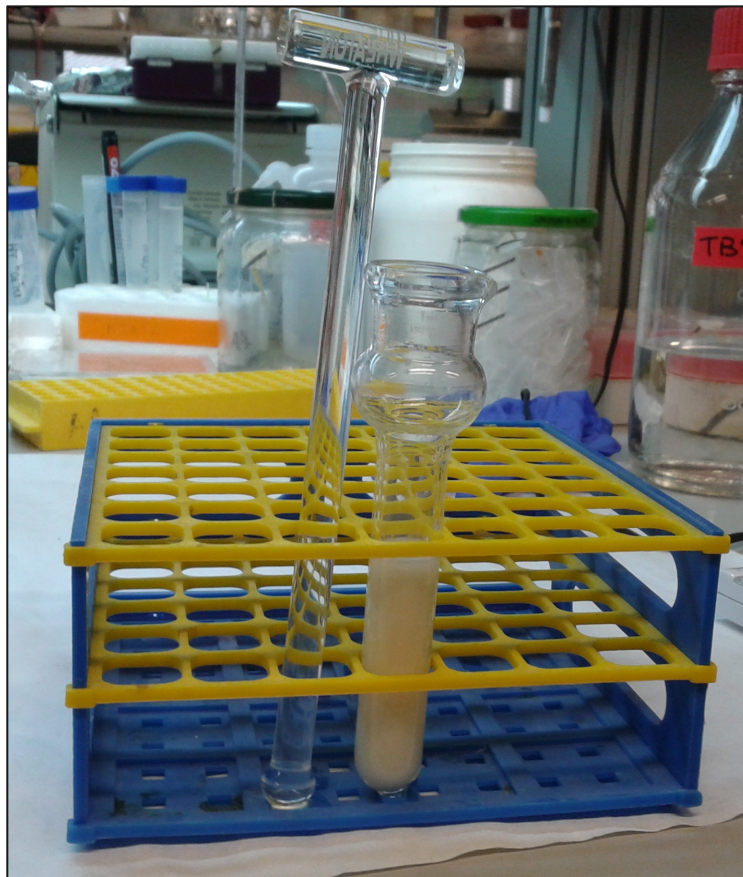


Figura 4.1. Orgànuls de la cèl·lula animal. Font: Llibre *Introducción a la Biología Celular*.

Es va realitzar una primera prova amb 1 g de fetge en pes humit i 7 mL de solució tampó, que posteriorment es va millorar utilitzant 0,5 g de fetge en pes humit amb 7 mL de solució tampó. La solució tampó evita el trencament dels orgànuls al realitzar l'homogeneïtzació del teixit.

La solució tampó consta de Tris-HCl 10mM,  $MgCl_2$  1,5 mM i sacarosa 0,5 M. També s'afegeixen inhibidors de proteases, Apopteïna 3  $\mu$ L/10 mL, Leupeptin 3  $\mu$ L/10 mL, fluorur fenilmetanosulfonyl (Pmsf) 100  $\mu$ L/10 mL i Sodi ortovanadat ( $Na_3VO_4$ ), 100  $\mu$ L/10 mL que inhibeixen els enzims que alliberen les cèl·lules al trencar-se i podrien malmetre els orgànuls. Els inhibidors de proteases s'afegeixen en fred d'una altra manera podrien no ser efectius.

La mescla del fetge amb la solució tampó s'homogeneïtza en un Potter-Elvehjem (Figura 4.2), es fan 40 pujades i baixades de l'èmbol del Potter i a continuació s'utilitza una xeringa per xuclar i expulsar 10 vegades més la solució. Així es finalitza el lisat. Els teixits queden trencats i les cèl·lules també. Els orgànuls queden intactes i per separat, flotant en la solució tampó.



**Figura 4.2.** Potter-Elvehjem amb mostra en l'interior. Font: Pròpia

Una vegada trencades les cèl·lules s'agafa de la solució ja homogeneïtzada, un volum de 1,5 mL, la capacitat màxima d'un eppendorf i es traspassa a un d'aquest per començar amb les centrifugacions.

Seguidament es realitzen les centrifugacions on es separen els diferents orgànuls segons la seva grandària. Sent aquest l'últim pas de la separació:

- Primera centrifugació a 2500rpm durant 10 minuts.

En la primera centrifugació s'obté una fracció que es queda a la part inferior de l'ependorf anomenada "pelet" on es deposi-te'n les partícules de major pes i volum. En la primera centrifugació són els nuclis, juntament amb cèl·lules senceres, ja que la eficiència del lisat no es del 100%. També s'obté un altra fracció el sobrenedant amb la resta dels orgànuls.

Amb la part del sobrenedant es realitza la segona centrifugar.

- Segona centrifugació a 9300 rpm durant 10 minuts.

En la segona centrifugació s'obté en el "pelet" la fracció dels mitocondris, el segon orgànul amb major volum de la cèl·lula.

Amb la fracció del sobrenedant amb la resta dels orgànuls es realitza la tercera centrifugació.

- Tercera centrifugació 1300 rpm durant 15 minuts.

S'obté en la part del "pelet" la fracció dels lisosomes i en el sobrenedant la resta d'orgànuls. Amb la part del sobrenedant es fa una última centrifugació, en aquest cas ultracentrifugació.

- Quarta ultracentrifugació a 33000 rpm durant 60 minuts a temperatura de 14 °C. Es va fer servir optima TLX ultra centrifuge Beckman coulter 120,000rpm.

S'obté en el "pelet" la fracció dels microsomes que són les fraccions de reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i altres, i en el sobrenedant queda la fracció del citoplasma.

#### **4.2.2 Protocol de precipitació de proteïnes TCA**

Amb la fracció del citoplasma extreta del fraccionament cel·lular explicat anteriorment es va dur a terme una precipitació de proteïnes. Protocol elaborat per Luis Sanchez. Aquest mètode serveix per concentrar les proteïnes i eliminar altres substàncies no desitjades. Aquesta tècnica s'utilitza per concentrar proteïnes per a utilitzar-les seguidament en l'electroforesi de gel de poliacrilamida, on es separen les proteïnes, aquest protocol permet purificar així la fracció de proteïna. Afavorint una millor identificació de proteïnes en l'espectrometria de masses.

- 1- Afegim  $\frac{1}{4}$  de volum de àcid tricloroacètic (TCA) en funció del volum de la mostra.
- 2- Incubem 10 minuts a 4 °C.
- 3- Centrifuguem a 14 krpm durant 10 minuts.
- 4- S'extreu el sobrenedant i deixem el pelet.
- 5- Netegem amb 200  $\mu\text{L}$  d'acetona freda.
- 6- Tornem a centrifugar a 14 rpm durant 10 minuts.

- 7- Repetim els passos 5 i 6.
- 8- Extraïem l'acetona amb molta cura i assequem a 95 °C en tap obert durant 5 o 10 minuts.
- 9- Afegim 25 µL de Laemli buffer i per finalitzar es bull a 95 °C tapat durant 10 minuts.

#### 4.2.3 Electroforesis de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Per realitzar una separació de proteïnes i identificar quines proteïnes contenen més  $^{210}\text{Po}$  es vam utilitzar la tècnica de l'electroforesi de gel de poliacrilamida.

L'electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants va ser originàriament descrita per Laemmli en 1970. L'electroforesi en gel de poliacrilamida és una dels mètodes més utilitzats per a la purificació, anàlisi i caracterització de proteïnes. Aquesta tècnica permet separar molècules carregades que presenten diferències en la mobilitat quan se les sotmet a un camp elèctric.

L'electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida es pot dur a terme en condicions natives (ND-PAGE) o desnaturalitzant (SDS-PAGE). Les diferències entre una i altra radiquen en els components dels gels i del tampó d'electroforesi, així com el tractament de les mostres. En l'electroforesi de gel de poliacrilamida en condicions natives, les proteïnes mantenen la seva estructura tridimensional i les diferents cadenes polipeptídiques poden romandre unides, separant no només en funció de la seva càrrega elèctrica, sinó també segons la seva mida i forma. Per contra, com el seu nom indica, en l'electroforesi en condicions desnaturalitzant (SDS-PAGE), s'inclouen agents desnaturalitzants com detergents. Quan les proteïnes es solubilitzen en presència del detergent aniònic SDS, aquest s'uneix a les proteïnes, trencant interaccions hidrofòbiques i desnaturalitzant-les. Les proteïnes desnaturalitzades de la mostra adoptaran una estructura en forma de bastonet amb una sèrie de molècules de SDS carregades negativament al llarg de la cadena polipeptídica. Com a mitjana, s'uneix una molècula de SDS per cada dos residus d'aminoàcids. La càrrega nativa original de la molècula està completament emmascarada per la càrrega negativa del SDS. Com que la quantitat de SDS que s'uneix a les proteïnes és pràcticament proporcional a la seva mida, els complexos SDS-proteïnes presenten un valor càrrega/massa constant i per tant se separen d'acord a la seva grandària quan migren des del càtode a l'ànode a una velocitat relacionada amb el seu pes molecular, la separació per tant es produeix en funció de la mida de les proteïnes.

La electroforesi de gel de poliacrilamida es porta a terme sobre un suport inert, com els gels de poliacrilamida (PAGE). En la electroforesi desnaturalitzant (SDS-PAGE), que és la que es va utilitzar en aquest estudi, s'utilitzen agents desnaturalitzants, en el nostre cas detergent SDS. En aquesta, la separació es produeix en funció de la mida de les proteïnes (massa molecular). Els gels de poliacrilamida actuen com un tamís molecular, retardant el moviment de macromolècules grans mentre que permet a les molècules més petites moure's lliurement afavorint així la separació. L'entramat dels gels es genera mitjançant la polimerització a través de radicals lliures, de monòmers d'acrilamida en presència de petites quantitats de bisacrilamida. Es formen enllaços creuats entre els polímers d'acrilamida, de manera que se generen gels amb la mida del porus determinada, tant per la concentració total (%T) com per la concentració d'acrilamida i de bisacrilamida. La mida del porus pot

ser ajustat per optimitzar la separació de la mostra. Així gels amb un percentatge alt d'acrilamida (10-15 %T) són òptims per a la separació de proteïnes de petit mida, menys de 50 kDa, mentre que gels amb percentatges menors (>10 %) són el indicats per a la separació de proteïnes majors.

El mètode consisteix en la preparació dels gels i col·locar-los en un suport. Aquest suport s'introdueix en un tanc, que es connectarà a l'electricitat, on es produirà la diferència de potencial i les proteïnes començaran a migrar del càtode al ànode. Una vegada les proteïnes s'han desplaçat i separat correctament per el gel, s'utilitzen diferents mètodes de tinció, sent el mes habitual el blau de Coomassie per a la visualització de les proteïnes.

El que permet determinar el pes molecular de les proteïnes, es comparar la mobilitat electroforètica (Rf) de les proteïnes de pes molecular desconeguda amb el de proteïnes de pes molecular conegut.

Preparació dels gels:

Preparació del segon gel (separador) que s'introdueix en el suport en primer lloc. Gel de poliacrilamida 10 mL amb un percentatge d'acrilamida del 12%.

**Taula 4.2.** Preparació del segon gel (separador)

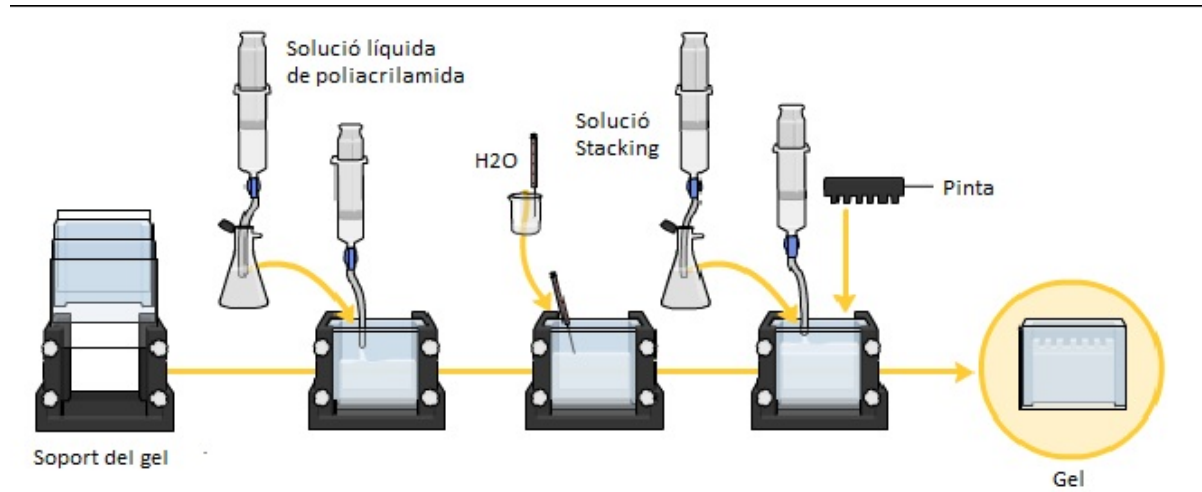
Reactius	Quantitat
H <sub>2</sub> O milliQ	4,8 mL
Tris HCl Ph8 1,5M	2,5 mL
Bis-acrilamida 40%	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
APS	100 µL
TEMED	4 µL

Preparació del primer gel, contenidor (stacking) que s'introdueix sobre el segon gel. Aquest gel conté porus majors (conté menor percentatge d'acrilamida i bisacrilamida) i té un pH més àcid que el segon gel.

**Taula 4.3.** Preparació del primer gel (contenidor)

Reactius	Quantitat
H <sub>2</sub> O milliQ	1,85 mL
Tris HCl Ph 6,8 1M	312 µL
Acrilamida	312 µL
SDS	25 µL
APS	25 µL
TEMED	2,5 µL

El segon gel (separador) es col·loca en el suport, sobre aquest s'introdueix aigua per alinear-lo. Una vegada alineat s'extreu l'aigua i s'introdueix el primer gel (stacking), sobre el segon gel ja introduït. En aquesta fracció del stacking és on s'introdueix la pinta que formarà l'entrada dels pous on s'afegirà la mostra per separar les proteïnes (Figura 4.3). Després de la preparació dels gels es deixen solidificar. El primer gel té la funció d'assegurar la migració de totes les proteïnes en el front de migració, provocant l'acumulació de les proteïnes que s'han carregat en els pous. La separació comença realment quan el front de migració arriba al segon gel.

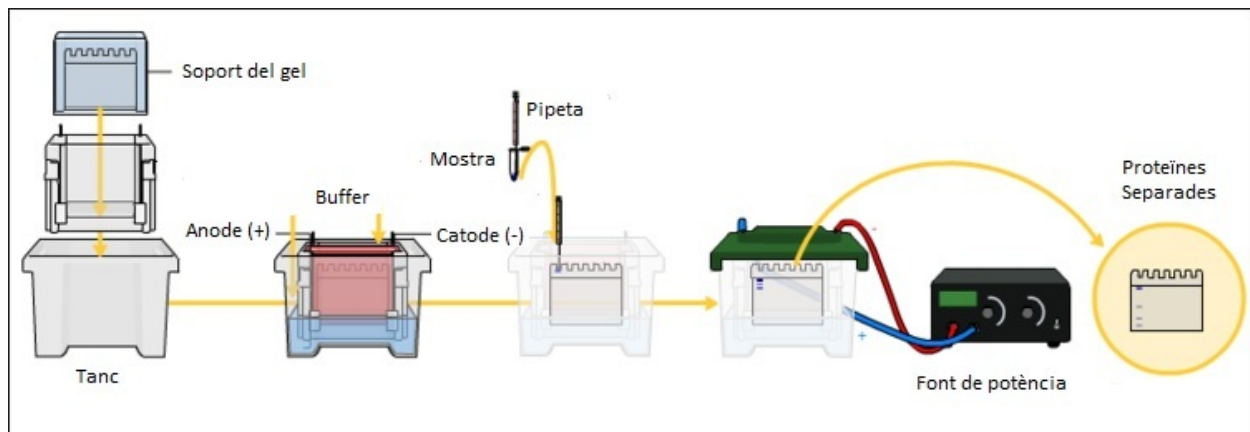


**Figura 4.3.** Preparació del gel de poliacrilamida.

En el tanc on es col·loca el suport amb el gel, on té lloc la diferència de potencial s'afegeix 10 mL de SDS-Page running Buffer en 1000 mL H<sub>2</sub>O miliQ (Figura 4.4.).

A continuació es carreguen les proteïnes en els pous on posteriorment les proteïnes migraran i es produiran els carrils. En aquest cas es necessitarà un carril de proteïnes que analitzarem per espectrometria de masses i un altre carril que s'utilitzarà per mesurar el <sup>210</sup>Po.

Normalment aquesta tècnica s'utilitza per a separar una proteïna en particular per això s'afegeix una solució de proteïnes de referència en un altre carril, de les quals es coneix exactament la seva mida i es sap concretament en quina banda del carril es quedaran. En aquests casos també hem introduït aquestes proteïnes de mida coneguda, en un tercer carril, encara que no estem interessats en una banda de proteïna concreta, serà necessari analitzar totes les bandes de proteïnes per saber exactament a quina o quines fraccions el <sup>210</sup>Po té més afinitat.



**Figura 4.4.** Procés de separació de les proteïnes.

Una vegada les mostres son carregades en els pous i el suport a l'interior del tanc, les proteïnes migraran amb una diferència de potencial de 5-50mA durant aproximadament dues hores.

Superades les dues hores les proteïnes queden separades en el gel, però no es poden visualitzar fàcilment. Per tant s'inicia un procés de tinció de les proteïnes i posteriorment de destinació.

El procés de tinció és el següent:

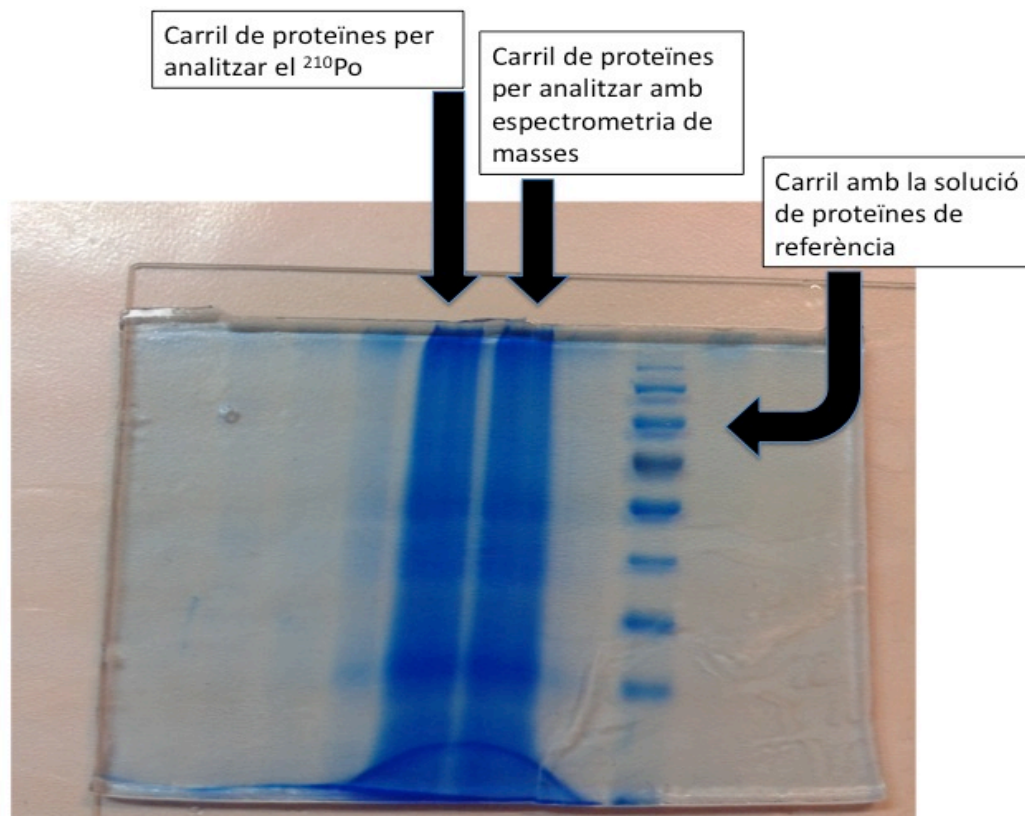
- El gel s'introdueix amb 40 mL de metanol, 2 mL d'àcid acètic i 58 mL  $\text{H}_2\text{O}$  en agitació durant una hora.
- Durant la nit es manté el gel amb agitació amb una dissolució de col·loidal Coomassie. El stock de colloidal Coomassie 1:5 es dilueix amb aigua. Després es mescla 40 mL d'aquest amb 10 mL de metanol i s'introdueix el gel.

El procés de destinació és el següent:

- S'extrau la solució líquida de colloidal Coomassie i es deixa el gel, s'afegeix 25% de metanol, 5% d'àcid acètic duran 1 minut, amb agitació manual.
- S'extrau el líquid i s'introdueix el gel amb 25% de metanol duran 1 hora.

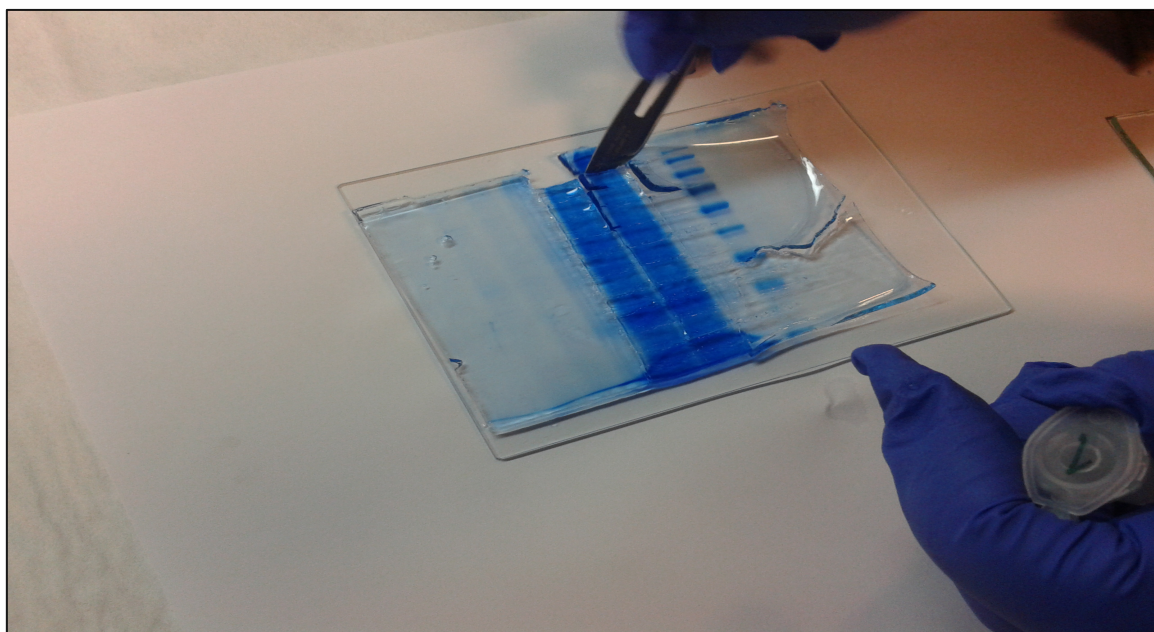
Quan les proteïnes van estar tenyides es va poder observar en el gel tres carrils. Dos totalment blaus on es localitzaven les proteïnes de la fracció de citoplasma, un carril destinat a l'anàlisi de  $^{210}\text{Po}$  i l'altre destinat a l'espectrometria de masses. El tercer carril contenia les proteïnes de referència no necessàries en aquest cas. (Figura 4.5).





**Figura 4.5.** Gel de Poliacrilamida amb els carrils de proteïnes i les proteïnes tenyides. Font: Pròpia

Els dos carrils es van dividir en dotze fraccions iguals (Figura 4.6), les dotze fraccions del primer carril es va analitzar per  $^{210}\text{Po}$ , i les dotze fraccions del segon es va emmagatzemar per realitzar el posterior anàlisi d'espectrometria de masses. on s'identificarien les proteïnes després d'obtenir la fracció de gel amb major contingut en  $^{210}\text{Po}$ .



**Figura 4.6.** Fraccions del gel de Poliacrilamida. Font: Pròpia.

#### 4.2.4 Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).

Es va fer servir un altra tècnica per separar proteïnes la cromatografia líquida d'alta resolució que es va dur a terme en els laboratoris de química inorgànica de la UAB.

La cromatografia líquida d'alta resolució o *high performance liquid chromatography* (HPLC) és un tècnica de cromatografia en columna utilitzada freqüentment en bioquímica i química analítica. Aquesta tècnica es utilitzada per a separar els compostos de una mescla basats en diferents tipus d'interaccions químiques entre les substàncies analitzades i la columna cromatogràfica.

En la HPLC isocràtica el compost passa per la columna cromatogràfica a través de la fase estacionària (normalment, un cilindre amb petites partícules arrodonides amb certes característiques químiques en la seva superfície) mitjançant el bombament de líquid (fase mòbil) a alta pressió a través de la columna. La mostra a analitzar és introduïda en petites quantitats i els seus components es retarden diferencialment depenent de les interaccions químiques o físiques amb la fase estacionària a mesura que avancen per la columna. El grau de retenció dels components de la mostra depèn de la naturalesa del compost, de la composició de la fase estacionària i de la fase mòbil. El temps que tarda un compost a ser eluït de la columna s'anomena temps de retenció i es considera una propietat identificativa característica d'un compost en una determinada fase mòbil i estacionària.

El tipus de separació que té lloc és cromatografia d'exclusió molecular, també coneguda com cromatografia per filtració en gel, separa les partícules de la mostra en funció de la seva mida. Generalment es tracta d'una cromatografia de baixa / mitjana resolució de manera que se sol utilitzar en els passos finals del procés de purificació. També és molt útil per a la determinació de l'estructura terciària i l'estructura quaternària de les proteïnes purificades. Aquest és un mètode de cromatografia en columna pel qual les molècules se separen en solució segons el seu pes molecular, o més precisament, segons el seu radi de Stokes.

En aquesta cromatografia, la fase estacionària consisteix en llargs polímers entrecruats que formen una xarxa tridimensional porosa. Quan es fa passar una barreja de molècules de diferents capacitats, a través d'una columna de filtració, aquelles molècules amb una grandària major que el diàmetre dels porus de les partícules, només podran moure's en el seu camí, a través de la fase estacionària, en l'espai que queda entre les partícules, i per tant, no es veuran retardades en el seu descens. En canvi les molècules més petites capaces de penetrar en les partícules es veuran retardades per la fase estacionària, en major mesura, com menor sigui la seva mida. Per tant, en aquest tipus de cromatografia les molècules eludiran per ordre decreixent de mida molecular, primer les més grans seguides de les més petites.

En el nostre cas es va utilitzar una columna: Superdex 75 (GE Healthcare, Germany), amb rang d'exclusió 3000-70000 Da.

Com a fase mòbil es va fer servir acetat amònic, 50 mM, pH 7, flux de 0.550 mL·min<sup>-1</sup>. Es va utilitzar aquesta fase mòbil per les seves característiques de fàcil volatilització, una vegada realitzada la cromatografia que permetria eliminar-la fàcilment en el procediment de deposició del  $^{210}\text{Po}$ .

detecció: Diodo array UV-vis, seguint les senyals a 210, 254 i 280 nm. Es va fer servir la longitud de 210 nm ja que es el màxim absorció de l'enllaç peptídic present en les proteïnes. Aquesta longitud d'ona es pot arribar a saturar fàcilment per aquesta raó utilitzem les altres. La longitud d'ona de 254 nm (entre 240-260 nm) produeixen adsorció en l'enllaç peptídic però no en el seu punt màxim es útil per veure si hi ha proteïna si el senyal de 210 nm està saturat. La senya de 280 nm presenta el màxim d'absorció dels aminoàcids aromàtics.

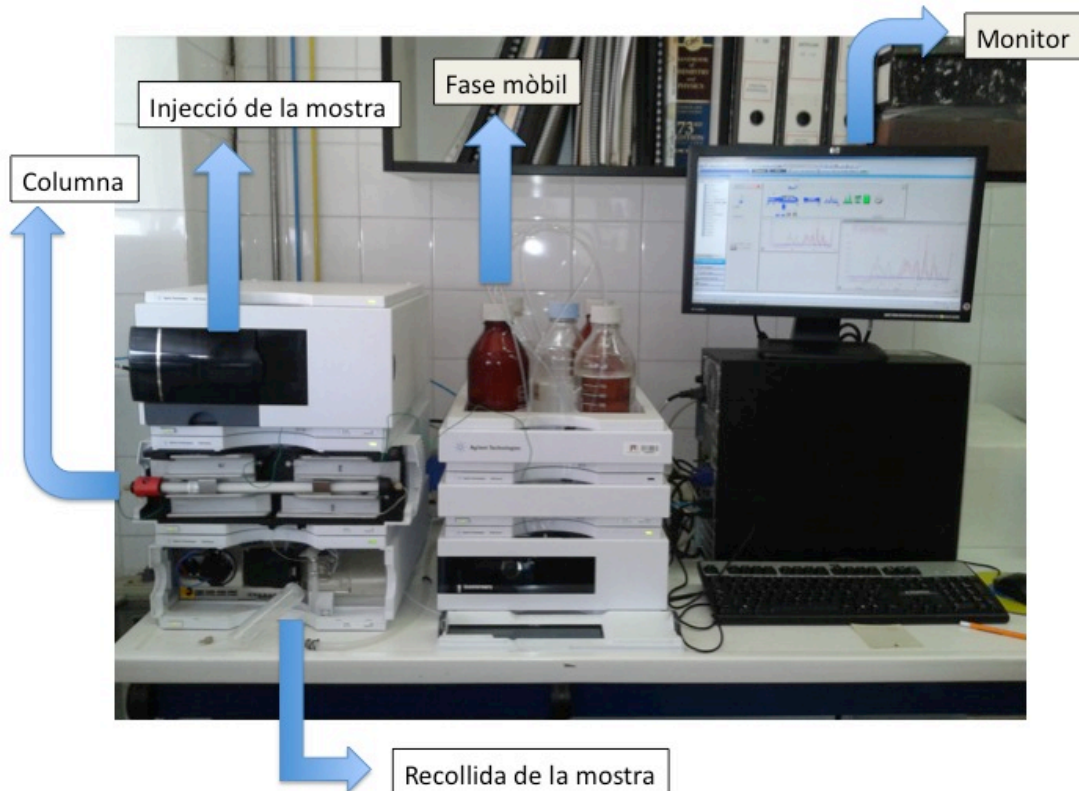


Figura 4.7. Cromatògraf. Font: Pròpia.

### 4.3 Anàlisi de mostres

#### 4.3.1 Digestió en vas obert i deposició.

L'anàlisi de  $^{210}\text{Po}$  es van dur a terme seguint el mètode descrit per Sanchez-Cabeza et al., (1998), el qual consisteix en la dissolució total de la mostra, un condicionament d'aquesta i finalment la autodeposició del  $^{210}\text{Po}$  en discs de plata per tal de ser mesurats, aquest procediment es va realitzar en el Laboratori de Radioactivitat Ambiental de la UAB.

Els anàlisis de  $^{210}\text{Po}$  han estat realitzats en les fraccions obtingudes en el fraccionament cel·lular i de l'anàlisi directe del teixit en pes sec i pes humit.

Les mostres de citoplasma i de les fraccions subcel·lulars són extretes dels eppendorfs amb  $\text{HNO}_3$  8M, mentre que les mostres de teixit humit s'assequen prèviament a  $60^\circ\text{C}$  durant 24 hores. Les mostres es dipositen en beakers de vidre amb 5mL de  $\text{HNO}_3$  2mL de  $\text{HCl}$  i el traçador intern per avaluar les pèrdues de poloni

en el procediment radioquímic. Com a traçador utilitzem el  $^{209}\text{Po}$  (0,05mL) amb activitat  $0,703 \pm 0,015 \text{ Bq}\cdot\text{mL}^{-1}$  a dia 04/11/2009, també s'introdueixen imants que produiran l'agitació. Es tapen el beakers amb vidres de rellotge i es posen a escalfar a  $75^\circ\text{C}$  amb agitació. S'afegeixen gotes de peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) per ajudar a la digestió de la mostra.

Quan ja totes les mostres estan digerides s'evaporen totalment (sense arribar a ebullició), quan es queda un fons sòlid s'afegeix 1mL de HCl i es torna a evaporar, aquest procediment es realitza 3 vegades. Després s'afegeix 100mL de HCl 1M. Posteriorment s'afegeix àcid ascòrbic perquè el  $\text{Fe}^{+3}$  es redueixi a  $\text{Fe}^{+2}$ , per minimitzar interferències en la deposició del Po. Després el  $^{209}\text{Po}$  i  $^{210}\text{Po}$  de la solució són espontàniament dipositats en discs de plata de 25mm de diàmetre. Els discs són prèviament lacats per una banda per tal que tot el poloni quedés dipositat en la mateixa cara. Aquests discs de plata s'introdueixen en la solució dels beakers, subjectes amb fils de niló. Es tornen a posar els vidres de rellotge per tancar les mostres i s'aplica una temperatura de  $80^\circ\text{C}$  i es manté en agitació durant un període de 6 a 8 hores per a que el poloni es dipositi de manera espontània en els discs. Finalment s'extrauen els discs de la solució, es netegen amb aigua Milli-Q i es deixen assecar.

#### 4.3.2 Digestió en microones

Aquest tipus de digestió es va dur a terme per analitzar poloni d'algunes mostres de fetges, degut a que algunes mostres no es van digerir correctament a causa de l'alt contingut en greix de les mostres en la digestió en vas obert. Mostres de teixit i fracció de citoplasma van ser digerits amb aquest mètode per poder analitzades els metalls.

En aquest cas es van transferir 0,2 mg de mostra en pes sec als tubs digestió de tefló (*liners*), es van dissoldre amb 10 mL  $\text{HNO}_3$  65% i es van digerir per microones a alta pressió i temperatura.

Abans de la digestió, es va afegir una quantitat coneguda de traçador intern  $^{209}\text{Po}$  a cada *liner* ( $50 \mu\text{L}$ ,  $A=0,703\pm 0,0015 \text{ Bq mL}^{-1}$  a dia 04/11/2009) per tal d'avaluar les possibles pèrdues de Po durant la preparació de les mostres i el procés analític, només en el cas de les mostres que es van analitzar per poloni posteriorment. Es va portar a terme paral·lelament un calibratge de la pipeta utilitzada per al traçador.

Les mostres es van escalfar al microones a una pressió de 800 psi durant 15 minuts a  $200^\circ\text{C}$ .

Un cop refredats els *liners*, se'ls hi va afegir 15mL  $\text{H}_3\text{BO}_3$  per tal de dissoldre els compostos de fluor amb el microones a 50 psi durant 45 minuts, aquest procediment només es va dur a terme per a les mostres que van se analitzades per poloni.

### 4.3.3 Metalls

Les mostres de metalls es van digerir amb microones, 0,2 g de massa seca, una vegada digerides, es van diluir 1:1, 10 mL de la mostra per 10 mL H<sub>2</sub>O milliQ, i es van portar al Servei d'Anàlisi Químic de la Universitat Autònoma de Barcelona on es va analitzar els metalls per espectrometria ICP-MS. Es va analitzar el contingut de Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg en les mostres de hepatopàncrees de Verat, Gònades de Verat, Fetge de turbot, Intestí de Turbot, hepatopàncrees de tallahams, gònades de tallahams, hepatopàncrees de sardines i hepatopàncrees de rap i també les fraccions de citoplasma de les mostres anteriors.

## 4.4 Sistema de detecció

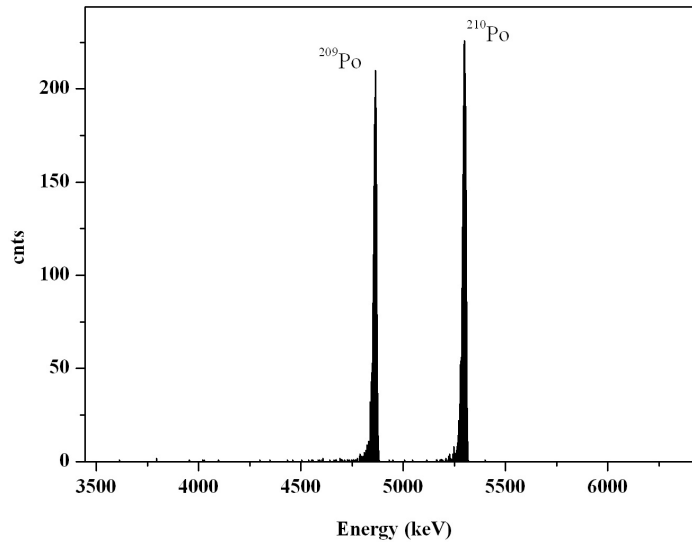
### 4.4.1 Espectrometria alfa

Els isòtops de Poloni van ser mesurats utilitzant els espectròmetres alfa PIPS (*Passivated Implanted Planar Silicon*) (CANBERRA, model PD-450.18 A.M) i el *Silicon Surface Barrier* (EG&G Ortec, model SSB 450R).

Aquests dos detectors es caracteritzen per tenir una excel·lent resolució energètica, un baix fons, una estabilitat excel·lent i una sensibilitat baixa a la radiació gamma (veure Taula 4.4). Els discs van ser comptats fins a obtenir menys d'un 5% d'incertesa en la velocitat de recompte del <sup>210</sup>Po, fins a un màxim de 400000 segons.

Taula 4.4 Característiques dels detectors alfa utilitzats.

Detector	Àrea activa (mm <sup>2</sup> )	Gruix sensible (µm)	Resolució energètica (keV)	Soroll electrònic (keV)	Corrent de fuga (nA)	Voltatge (V)	Fons (cps·d <sup>-1</sup> )
A-450-18-AM (Camberra)	450	275/315	18	7,8-9,2	4	80	6
SSB 450R (EG&G Ortec)	450	100	21	14	0,4	-100	3



**Figura 4.8.** Espectre obtingut en mesures de Po. El Primer pic correspon al traçador de  $^{209}\text{Po}$  (4882 keV) i el segon al del  $^{210}\text{Po}$  (5304 keV).

A la figura 5 s'observa el típic espectre obtingut de la mesura dels discs de plata. Com es veu, es donen dos pics, corresponents a les emissions alfa del  $^{209}\text{Po}$  ( $E_\alpha=4882$  keV) i del  $^{210}\text{Po}$  ( $E_\alpha=5304$  keV). Degut a la separació entre els pics d'energia ( $\Delta E_\alpha=439$  keV) no és necessària una correcció per interferències. El programa Genie 2000 ens permet definir les regions d'interès i obtenir les dades de recompte de cada pic.

L'activitat del  $^{210}\text{Po}$  (Bq), que serà la mateixa que la del  $^{210}\text{Pb}$ , s'obté a partir de l'expressió (4.1)

$$A_{210Po} = A_{209Po} \frac{N_{210Po}}{N_{209Po}} \quad (4.1)$$

on  $A_{209Po}$  és l'activitat (Bq) del  $^{209}\text{Po}$  que s'ha afegit com a traçador intern,  $N_{210Po}$  i  $N_{209Po}$  són l'àrea neta (en comptes) dels pics de  $^{210}\text{Po}$  i  $^{209}\text{Po}$  respectivament. Els comptes nets s'obtenen de restar el fons (Taula 2) i el corresponent blanc del total de comptes.

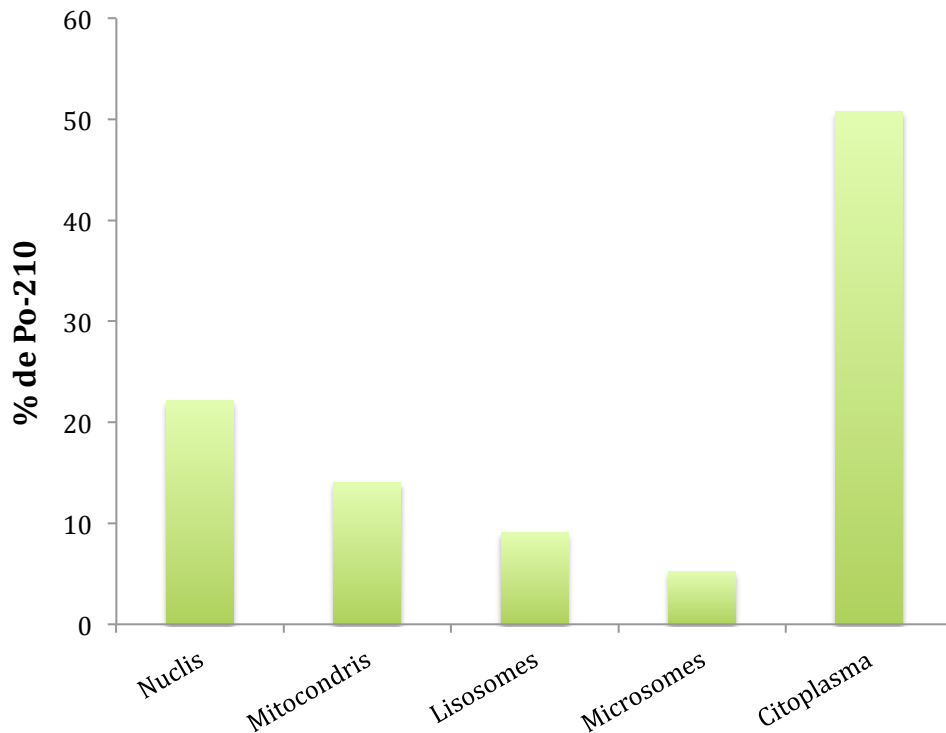
#### 4.4.2 Metalls

L'anàlisi de metalls es va dur a terme al Servei d'Anàlisi Químic de la Universitat Autònoma de Barcelona. L'equip emprat per a la determinació dels metalls va ser un espectròmetre de masses de plasma acoblat inductivament (ICP-MS) AGILENT, model 7500 ce.

## 5 Resultats i discussió

### 5.1 Assaig del contingut $^{210}\text{Po}$ en sardines.

Es van emprar 10 mostres d'hepatopàncrees de sardina per realitzar les primeres proves de separació de les diferents fraccions subcel·lular: nuclis, mitocondris, lisosomes, microsomes i citoplasma. En cadascuna d'aquestes fraccions es va determinar el contingut de  $^{210}\text{Po}$ . Els resultats es mostren a la Figura 5.1. Els resultats mostren com el 50% de  $^{210}\text{Po}$  es trobava al citoplasma el 22% a la fracció del nuclis, el 14% en els mitocondris, el 9% en els lisosomes i el 5% en els microsomes.



**Figura 5.1.** Percentatge de  $^{210}\text{Po}$  en cadascun dels orgànuls de les cèl·lules de teixit d'hepatopàncrees analitzat.

Els resultats mostren que la fracció subcel·lular que acumula més  $^{210}\text{Po}$  és el citoplasma. Això està d'acord amb els estudis portats a terme per Durand et al. (1999) que indiquen que el 80% del  $^{210}\text{Po}$  analitzat en fetge de verat es trobava en aquesta fracció. Observem, però com una fracció significativa també s'acumula en les altres fraccions. Durand et al. (1999) va observar que la segona fracció amb més  $^{210}\text{Po}$  eren mitocondris i lisosomes a diferència dels resultats obtinguts on la segona major concentració de  $^{210}\text{Po}$  era la fracció del nuclis molt probablement degut a que en aquest primer assaig moltes cèl·lules no es van arribar a separar i per tant es van quedar senceres, que en la centrifugació es van quedar en la fracció de nuclis a causa del seu pes, per aquesta raó la segona fracció que més acumula  $^{210}\text{Po}$  en el nostre assaig són els nuclis, per l'acumulació de cèl·lules senceres que no es va fraccionar correctament.

## 5.2 Assaig del contingut $^{210}\text{Po}$ en bonítol.

El següent anàlisi es va dur a terme en fetge de bonítol. Es va realitzar per segona vegada una separació de les diferents fraccions subcel·lulars. Posteriorment es va analitzar el  $^{210}\text{Po}$  per cadascun dels orgànuls i amb la fracció de citoplasma es va fer una separació de les proteïnes mitjançant l'electroforesi de poliacrilamida.

### 5.2.1 $^{210}\text{Po}$

Els resultats de la concentració de 5 replicats de fetge de bonítol es mostren a la Taula 5.1. Els resultats mostren un rang d'activitats força ampli amb concentracions que oscil·len entre els 423 i els 109  $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  amb una activitat mitjana de  $239 \pm 158 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ , l'error es molt elevat a causa de la diferència entre les dades. Aquestes diferències en les activitats de les mostres poden ser degudes a inhomogeneïtats significatives en el fetge o a que en el procés de digestió en vas obert, una fracció del greix de la mostra no es va digerir totalment, d'aquesta manera part del  $^{210}\text{Po}$  podria haver-se quedat en aquesta fracció de greix no digerida i per tant no quedar dipositat en els discs. El fet que en algunes mostres no es digerissin tota la mostra i el greix quedés flotant va implicar que el disc de plata on es diposita el  $^{210}\text{Po}$  quedés tacat de greix i per tant proporcionant una menor resolució als detectors.

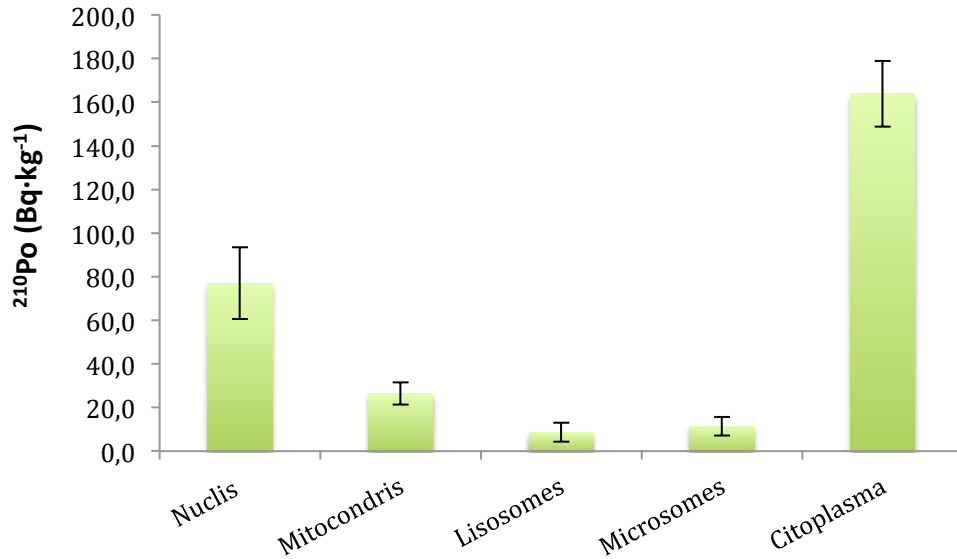
Comparem els resultats obtinguts de bonítol amb els resultats que va obtenir Carvalho (2011) en fetge de tonyina (*Thynnus obesus*), les dues espècies es caracteritzen per ser de la família dels escòmbrids que formen bancs, depredadors de la zona pelàgica i s'alimenten de peixos clupèid, calamars i zooplàncton. Les concentracions de  $^{210}\text{Po}$  que va obtenir Carvalho (2011) per fetge de tonyina van ser  $268 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Comparat amb els resultats de bonítol tonyina veiem que la rèplica 3 i 4 estan al voltat de valor  $268 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  mentre que les rèpliques 1, 2 i 5 tenen un valor de  $^{210}\text{Po}$  molt diferent. Per altra banda si comparem la mitjana obtinguda per les 5 rèpliques de fetge de bonítol  $230 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  es molt semblants al resultat obtingut per Carvalho (2011) en fetge de tonyina  $268 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

**Taula 5.1.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  pes sec) en mostres de fetge de Bonítol.

Mostres de bonítol	Po-210 ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
Rèplica 1	$527 \pm 22$
Rèplica2	$188 \pm 14$
Rèplica3	$265 \pm 22$
Rèplica4	$230 \pm 21$
Rèplica5	$109 \pm 11$

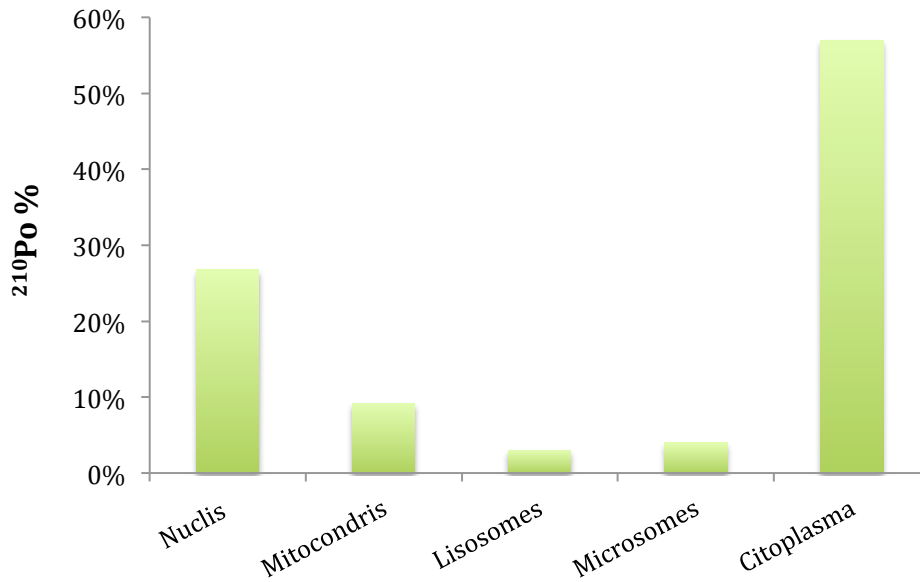
Els resultats de les diferents fraccions subcel·lulars es mostren a la Figura 5.2. Els resultats mostren que l'activitat més elevada es troba en el citoplasma amb una concentració de  $163,8 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Les altres fraccions mostren una concentració de 77,1, 26,5, 11,4 i  $8,7 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  en nuclis, mitocondris, microsomes i lisosomes, respectivament.





**Figura 5.2.** Activitats de  $^{210}\text{Po}$  en els diferents òrganuls de la mostra de bonítol (Bq·kg<sup>-1</sup> pes sec).

El percentatge de  $^{210}\text{Po}$  per a cada òrganul de fetge de bonítol es mostra a la Figura 5.3. S'observa com la fracció del citoplasma és en la que es concentra la major part del  $^{210}\text{Po}$  amb una fracció del (57%). Seguidament la fracció que més  $^{210}\text{Po}$  acumula són en forma decreixent: nuclis (27%), mitocondris (9%), microsomes (4%) i lisosomes (3%).



**Figura 5.3.** Percentatge de  $^{210}\text{Po}$  en els diferents òrganuls de la cèl·lula en fetge de bonítol

Comparant els resultats obtinguts de les concentracions de  $^{210}\text{Po}$  en els diferents òrganuls de Bonítol amb els resultats que va obtenir Durand et al., (1999) en fetge de Verat (*Scomber Scombrus*) veiem que en tots dos casos el  $^{210}\text{Po}$  tenia major concentració en la fracció citoplasmàtica. Pel verat es va observar una major concentració, del 80% i un percentatge del 57% es va observar en el cas de bonítol. La fracció de mitocondris per Verat també contenia lisosomes pesats amb un percentatge de 11,7% i en el cas del bonítol els mitocondris presentaven un

percentatge menor, del 9%. Per la fracció de lisosomes de Verat també incloïa mitocondris, amb un percentatge de 4%. En el cas del bonítol també presentava un percentatge del 4%. Els resultats en la fracció de microsomes per verat es va obtenir un 3,5% a diferència de per bonítol on es va observar un 9% i per últim amb la fracció de nuclis on es presenta la major diferència entre els estudis, per verat es va obtenir un 0,8% del  $^{210}\text{Po}$  en canvi per el bonítol el percentatge era de 27%.

### 5.2.2 Electroforesi de gel de poliacrilamida

Una vegada obtinguts els resultats anteriors on es veia clarament que la fracció de citoplasma era la fracció més rica en  $^{210}\text{Po}$  vam centrar la recerca en la determinació en quina proteïna o en quin tipus de compost químic es trobava associat el  $^{210}\text{Po}$ . Utilitzant la tècnica de l'electroforesi de gel de poliacrilamida és van separar les diferents proteïnes que formaven aquesta fracció. Amb aquesta tècnica es va fer passar en 2 carrils del gel 60 mL per cadascun de solució de citoplasma. Quedant les proteïnes del citoplasma separades per duplicat. Calia analitzar un carril per  $^{210}\text{Po}$  i una vegada localitzada la banda o les bandes amb més  $^{210}\text{Po}$  s'identificarien les proteïnes amb el segon carril del gel per espectrometria de masses.

Abans d'introduir la fracció de citoplasma en el gel per realitzar la separació de proteïnes es va dur a terme el TCA protocol de precipitació de proteïnes. Amb aquesta tècnica es va voler concentrar les proteïnes per veure a través de l'electroforesi una millor separació de proteïnes, que milloraria els resultats de l'espectrometria de masses.

Malauradament una vegada analitzades les fraccions de gel per  $^{210}\text{Po}$  es va veure que no hi havia pràcticament activitat en cap de les fraccions de gel analitzades fet que ens indicava que el  $^{210}\text{Po}$  no havia estat retingut en el gel de poliacrilamida. Es van recollir mostres durant el procediment del protocol de precipitació de proteïnes TCA, ja que el procediment constava de repetides neteja de la fracció de citoplasma amb acetona. Amb l'anàlisi d'aquestes mostres per  $^{210}\text{Po}$  es va veure que l'acetona utilitzada en aquest procediment havia arrossegat part del  $^{210}\text{Po}$  de la nostra mostra, per la qual cosa ja havíem eliminat una part del  $^{210}\text{Po}$  abans de realitzar la separació de proteïnes amb l'electroforesi.

Un altre possible desencadenat d'aquests resultats podria ser el SDS utilitzat en aquesta tècnica. En l'electroforesi de gel de poliacrilamida s'utilitzen agents desnaturalitzants que modifiquen l'estructura de la proteïna, com es el cas del SDS (detergent). Al modificar l'estructura de la proteïna cabria la possibilitat que el  $^{210}\text{Po}$  enganxat a les proteïnes modifiqués la seva posició i es desenganxes, quedant solubilitzat amb la part del detergent. Per tant no localitzable en les fraccions de proteïnes separats en el gel.

Al no obtenir ninguna fracció de gel enriquida amb  $^{210}\text{Po}$  la segona part del assaig on es pretenia analitzar les fraccions de gel més enriquides en  $^{210}\text{Po}$  per espectrometria de masses, no es va dur a terme.

Amb els resultats obtinguts es va concloure que per a l'estudi de  $^{210}\text{Po}$  associat a les proteïnes de citoplasma, la separació de proteïnes mitjançant la tècnica de l'electroforesi de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no és viable per la determinació de les proteïnes on pot estar associat el  $^{210}\text{Po}$ .

### 5.3 Assaig del contingut de $^{210}\text{Po}$ i metalls en verat, turbot, tallahams, sardines i rap

Es van analitzar el  $^{210}\text{Po}$  dels teixits de 5 espècies verat, turbot, tallahams, sardines i rap i de com a mínim un òrgan per espècie, la digestió es va realitzar per dos mètodes, per vas obert i per vas tancat (microones). Les mostres concretament eren d'hepatopàncrees i gònades de verat, fetge i intestí de turbot, hepatopàncrees i gònades de tallahams, hepatopàncrees de sardines i de rap se'ls hi va realitzar el fraccionament cel·lular en totes les mostres. Es va dur a terme l'anàlisi de  $^{210}\text{Po}$  per la fracció de citoplasma i per últim l'anàlisi de  $^{210}\text{Po}$  per la fracció resta que contenia tots els orgànuls menys el citoplasma.

També es van analitzar el contingut en metalls (Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg) dels teixits i de les fraccions de citoplasma extretes. Per últim amb la fracció de citoplasma d'hepatopàncrees de tallahams es va realitzar una separació de proteïnes mitjançant la cromatografia líquida d'alta resolució i es va separar tres fraccions amb tres espècies químiques, la primera fracció contenia les proteïnes per ser les molècules més pesades, la segona fracció contenia les sals i per últim la tercera fracció contenia els ions, la fracció més lleugera.

#### 5.3.1 $^{210}\text{Po}$

Es va realitzar la digestió de les mostres mitjançant dos mètodes. Digestió amb vas obert i digestió amb microones. Els resultats es mostren a la Taula 5.2.

**Taula 5.2.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  ( Bq/kg pes sec ) de les mostres digerides amb microones i en vas obert.

Mostres	Codis	Po-210 digestió Microones (Bq·kg <sup>-1</sup> )	Po-210 digestió vas obert (Bq·kg <sup>-1</sup> )
Hepatopàncrees Verat	(HV)	64± 5	105±9
Gònades Verat	(GV)	20± 2	17± 1
Fetge Turbot	(FT)	4± 1	2± 0
Intestí Turbot	(IT)	74± 6	140 ± 9
Hepatopàncrees Tallahams	(HT)	142± 13	-
Gònades Tallahams	(GT)	88± 8	39± 11
Hepatopàncrees Sardina	(HR)	424± 32	-
Hepatopàncrees Rap	(HS)	9± 1	-

Com es pot apreciar en la Taula 5.1. els resultats obtinguts per  $^{210}\text{Po}$  dels teixits són molt heterogenis si comparem els resultats obtinguts per les mostres digerides en vas obert i en les mostres digerides per microones. Observem que alguns resultats són superiors per a mostres digerides per microones respecte a les mostra digerides en vas obert i a l'inrevés. Cal destacar que els resultats per a la digestió amb microones haurien de ser més elevades ja que s'hauria de digerir tot el contingut de la mostra, en canvi en la digestió amb vas obert a causa de la gran quantitat de greix que contenen algunes de les mostres, va ser molt difícil digerir-les completament. El greix no es va poder digerir totalment i per tant al fer les deposicions de  $^{210}\text{Po}$ , els discs de plata utilitzats van quedar tacats a causa de quedar enganxats greixos no digerits i per tant impossibilitant la lectura d'aquets en els detectors, com es el cas de les mostres d'hepatopàncrees de tallahams, hepatopàncrees de sardina i hepatopàncrees de rap.

Les mostres que presenten un major contingut en  $^{210}\text{Po}$  en vas tancat són hepatopàncrees de tallahams (HT) i hepatopàncrees de sardina (HS), les dues mostres amb gran quantitat de greixos, ja que no es van digerir correctament amb vas obert. Comparant els resultats obtinguts per Carvalho (2011) també amb fetge de sardina  $599 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  (pes sec) s'acosta als resultats d'aquest estudi  $424 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  en fetge de sardina. Podem observar com els valors de  $^{210}\text{Po}$  per fetge de sardina mostren concentracions elevades, ja que es un espècies consumidor de zooplàncton. Segons els estudis de Durand et al. (2002) els resultats per fetge de verat mostraven una concentració de  $^{210}\text{Po}$  de  $36 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  i en l'estudi de Carvalho (2011) el fetge de verat presentava unes concentracions de  $85 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  en aquest estudi el resultats d'hepatopàncrees de verat es localitzen entre els resultats de Carvalho (2011) i Durand et al. (2002) amb un resultat de  $64 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Les mostres amb les concentracions més baixes són fetge de turbot, hepatopàncrees de rap i gònades de verat.

La Taula següent 5.3. mostra el contingut de  $^{210}\text{Po}$  en la fracció del citoplasma de les mostres i la concentració de la resta d'òrgànuls tots concentrats en la mateixa fracció. En general les mostres exposen un baix contingut en  $^{210}\text{Po}$  per a la majoria de les mostres, algunes mostres contenen activitats tan baixes que no arriben a l'activitat mínima detectable pel detector. Molt probablement, la massa emprada per aquests anàlisis va ser inferior a la necessària per poder obtenir uns valors de  $^{210}\text{Po}$  quantificables. La utilització de la mateixa tècnica de fraccionament cel·lular per a tots els òrgans per igual va ser un problema ja que per algunes mostres com es el cas d'intestí de turbot va suposar una incorrecta homogeneïtzació del teixit amb la solució tampó el que va produir només l'anàlisi de molt poc teixit i per tant major solució tampó sense contingut en  $^{210}\text{Po}$ .

Les mostres que contenen  $^{210}\text{Po}$  com són l'hepatopàncrees de verat(HV), l'hepatopàncrees de tallahams (HT) i l'hepatopàncrees de sardina (HS), contràriament als resultats obtinguts anteriorment la fracció de la resta que conté tots els òrgànuls menys el citoplasma conté activitats comparables a la fracció de citoplasma. Això indicaria que el trencament i/o la separació entre la fracció total i el citoplasma no es va realitzar de forma satisfactòria. Els resultats mostren com, en general, les mostres amb més  $^{210}\text{Po}$  en cadascun dels teixits tenen un valor comparable a l'obtingut en el citoplasma i la fracció resta, exceptuant el cas de l'hepatopàncrees del tallaham (HT) que té una concentració superior en les fraccions subcel·lulars comparat amb el valor total de  $^{210}\text{Po}$  mesurat en vas tancat (Taula 5.3).

**Taula 5.3.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  per a la fracció de citoplasma i per a la resta d'òrgans.

Mostres	Po-210 (Bq·kg <sup>-1</sup> )
Hepatopàncrees Verat citoplasma	19 ± 6
Hepatopàncrees Verat resta	33 ± 9
Gònades Verat citoplasma	< MDA
Gònades Verat citoplasma resta	7 ± 4
Fetge Turbot citoplasma	< MDA
Fetge Turbot resta	< MDA
Intestí Turbot citoplasma	< MDA
Intestí Turbot resta	< MDA
Hepatopàncrees Tallahams citoplasma	292 ± 25
Hepatopàncrees Tallahams resta	314 ± 28
Gònades Tallahams citoplasma	< MDA
Gònades Tallahams resta	58 ± 10
Hepatopàncrees Sardina citoplasma	114 ± 11
Hepatopàncrees Sardina resta	136 ± 12
Hepatopàncrees Rap citoplasma	< MDA
Hepatopàncrees Rap resta	< MDA

### 5.3.2 Relació de $^{210}\text{Po}$ i metalls en teixit de peix.

L'anàlisi de metalls es va dur a terme per considerar si les concentracions de metalls podrien tenir algun correlació amb la quantitat de  $^{210}\text{Po}$  a nivell de teixit i a nivells d'acumulació subcel·lular. Els resultats de Durand et al. (1999) apuntaven que les proteïnes com la ferritina i les metal·lotioneïnes, que són riques en ferro i metalls, respectivament, eren les que presentaven més concentració de  $^{210}\text{Po}$ , per aquest motiu es va voler observar la relació entre  $^{210}\text{Po}$  i alguns metalls (Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg). L'assaig es va realitzar per a les vuit mostres i també per la fracció citoplasmàtica d'aquestes.

Per tal de trobar relació entre els elements químicament similars del grup 16 de la taula periòdica els calcògens S, Se, Te, i  $^{210}\text{Po}$  en invertebrats marins, es va realitzar un estudi comparatiu dels patrons de distribució d'aquests elements en calamar, (*Todarodes pacificus*) realitzat per part de la Waska et al. (2008). En aquest estudi s'ha intentar buscar una relació amb altres metalls pesants ja que els resultats de la Waska et al.(2008) no van ser positius.

Les següents Figures mostren el contingut en  $^{210}\text{Po}$  de les vuit mostres analitzades relacionat amb el contingut en diferents metalls (Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg ).

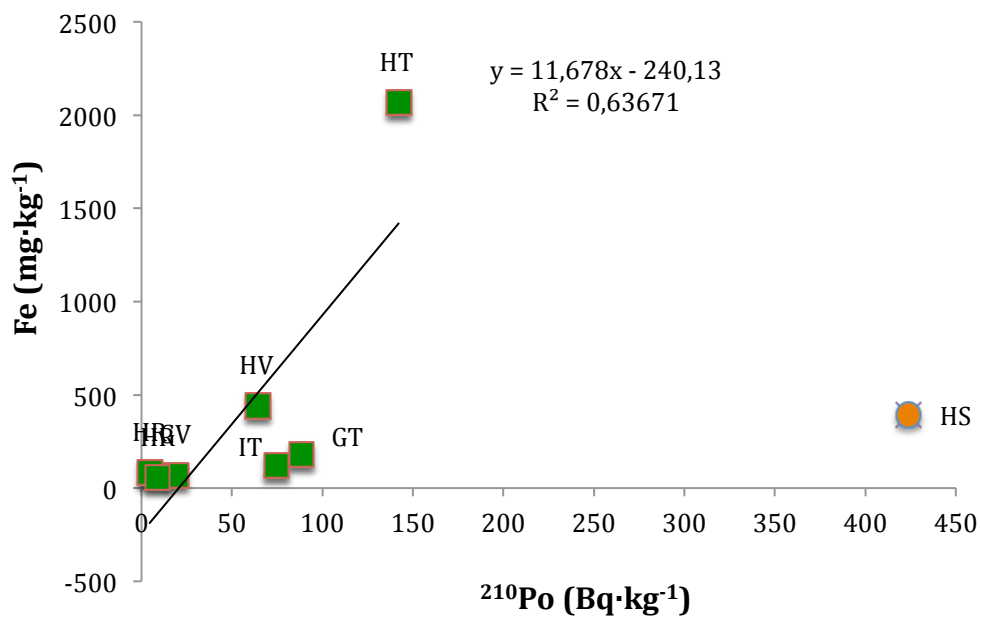


Figura 5.4. Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Fe (mg·kg<sup>-1</sup>) de les vuit mostres analitzades.

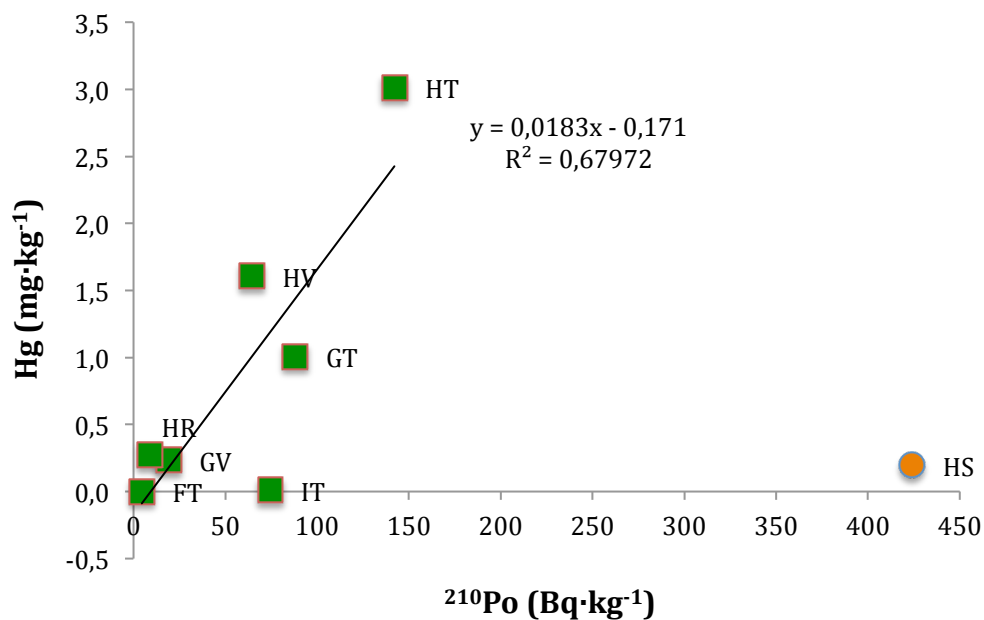


Figura 5.5. Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Hg (mg·kg<sup>-1</sup>) de les vuit mostres analitzades.

A les Figures 5.4 i 5.5 es pot observar que la majoria de les mostres amb més contingut en  $^{210}\text{Po}$  també tenen un major contingut en Fe i Hg. Totes les mostres semblen seguir aquesta tendència menys la mostra d'hepatopàncrees de sardina (HS) que tot i ser la mostra amb un contingut més elevat en  $^{210}\text{Po}$  amb valors de  $424 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  no presenta una gran quantitat de Fe i Hg respecte a la resta de mostres. La Figura 5.4 té una tendència lineal positiva amb una correlació de  $R^2 = 0,636$ , quan treiem el valor de l'hepatopàncrees de sardina (HS). El Hg també com el Fe presenta una relació lineal amb la concentració de  $^{210}\text{Po}$  per a les mostres analitzades amb una correlació de  $R^2 = 0,679$ .

La mostra d'hepatopàncrees de tallahams (HT) conté la major concentració de ferro  $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , sent la segona amb major concentració de  $^{210}\text{Po}$  ( $142 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Les 3 mostres amb menor concentració de Fe són el fetge de turbot (FT), les gònades de verat (GV) i l'hepatopàncrees de rap (HR) amb concentracions de ferro de 83, 68 i  $55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivament. Aquestes mostres són també les que contenen menor concentració de  $^{210}\text{Po}$ . Les mostres amb valor intermedis de Fe són les gònades tallahams (GT) i l'intestí turbot (IT) amb resultats de 179 i  $122 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectivament i amb valors de  $^{210}\text{Po}$  de  $74 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  i  $88 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivament.

Les mostres analitzades per Hg contenen resultats més elevats són la mostra hepatopàncrees de tallahams (HT) amb un valor de  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , la mostra hepatopàncrees de verat (HV) ( $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i la mostra gònades de tallahams (GT) ( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Les mostres hepatopàncrees de tallahams (HT) i gònades de tallahams (GT) són la segona i tercera mostra amb els resultats més alts de  $^{210}\text{Po}$  amb valors de 142 i  $88 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectivament de les vuit mostres analitzades. Les mostres hepatopàncrees de rap (HR), gònades de verat (GV) i hepatopàncrees de sardina (HS) presenten uns valors de mercuri de 0,3, 0,2, 0,2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivament. Les mostres amb menys concentració de  $^{210}\text{Po}$ , fetge de turbot (FT) ( $4 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i gònades de verat (GV) ( $20 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) no presentaven mercuri.

Aquesta relació de la concentració del Fe en front a la concentració de  $^{210}\text{Po}$  dona suport als resultats de Durand et al. (1999; 2002) exposats en els seus articles sobre l'afinitat a la que es veu sotmès el  $^{210}\text{Po}$  enfront a proteïnes com la ferritina, que es caracteritzen per un alt contingut en Fe. Segons Durand et al. (1999) el 30% del  $^{210}\text{Po}$  es troba unit a la ferritina. La relació trobada també amb el Hg i el  $^{210}\text{Po}$  pot estar vinculada amb els resultats de Durand et al. (1999) que associava un 28% del  $^{210}\text{Po}$  a les metal·lotioneïnes (MTs) que són proteïnes amb la capacitat de unir cations metàl·lics

Les figures següents mostren el contingut dels metalls Ni, Cu, Cd, Zn i Pb amb el contingut amb  $^{210}\text{Po}$  de les mostres. En ninguna de elles es pot veure una relació entre el metall estudiat i el contingut en  $^{210}\text{Po}$ .

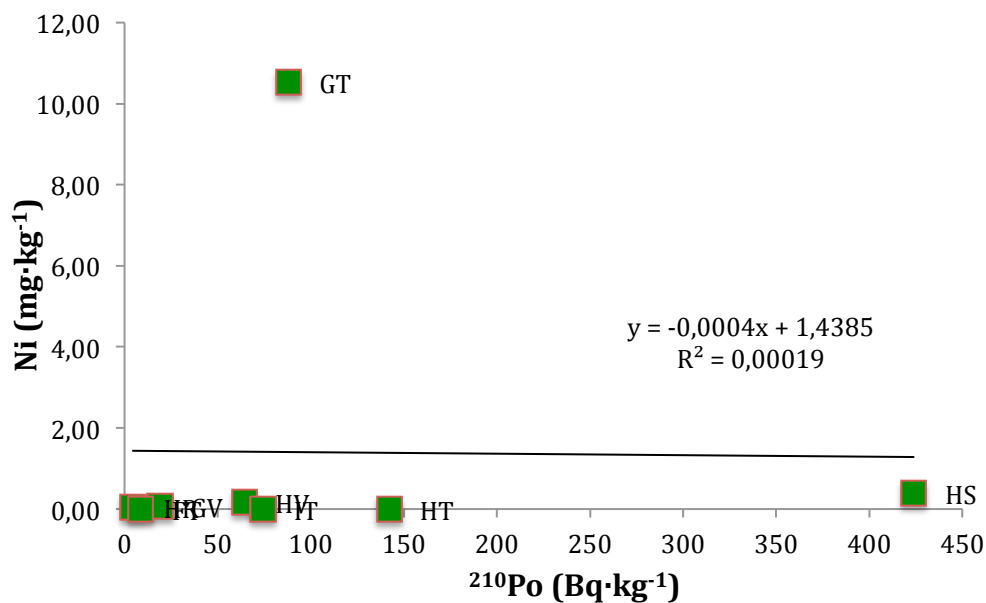


Figura 5.6. Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Ni (mg·kg<sup>-1</sup>) de les vuit mostres analitzades.

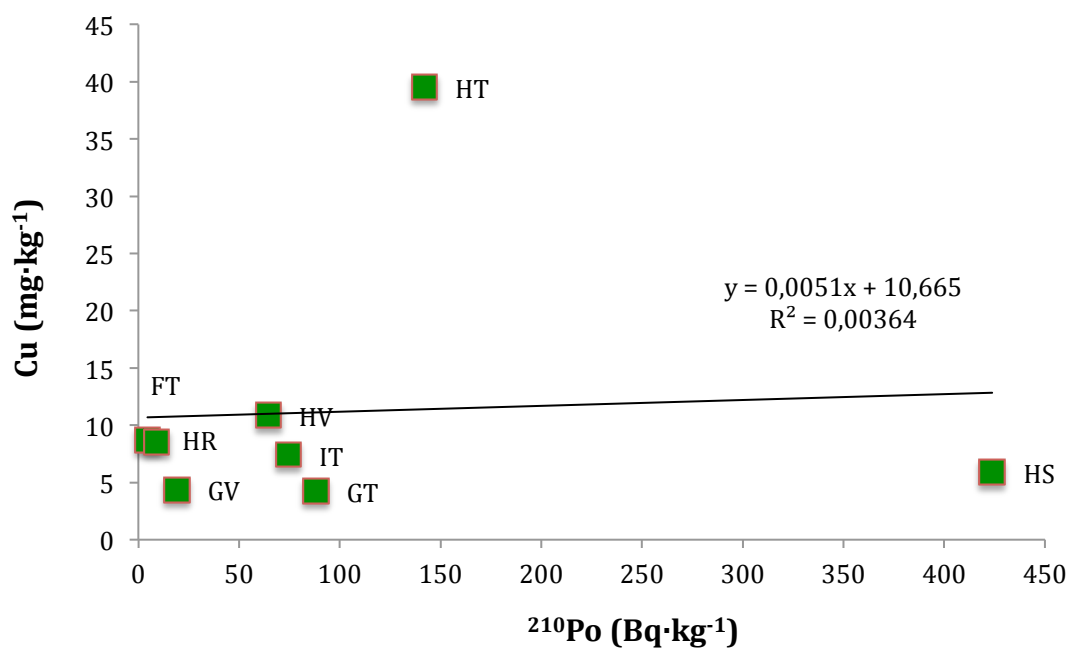


Figura 5.7. Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Cu (mg·kg<sup>-1</sup>) de les vuit mostres analitzades.



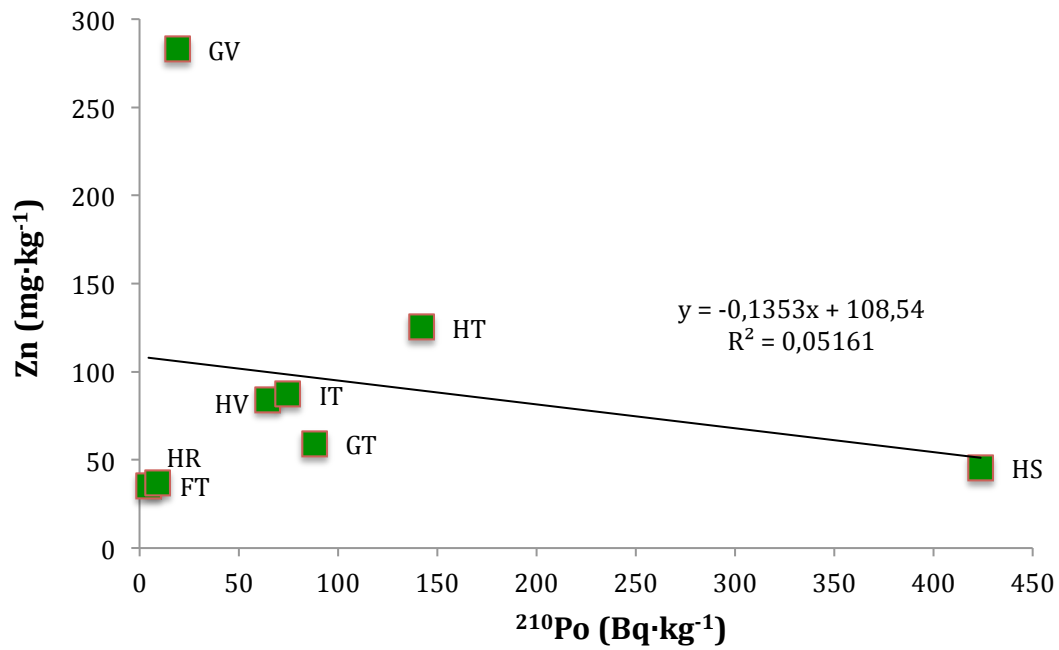


Figura 5.8. Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Zn ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de les vuit mostres analitzades.

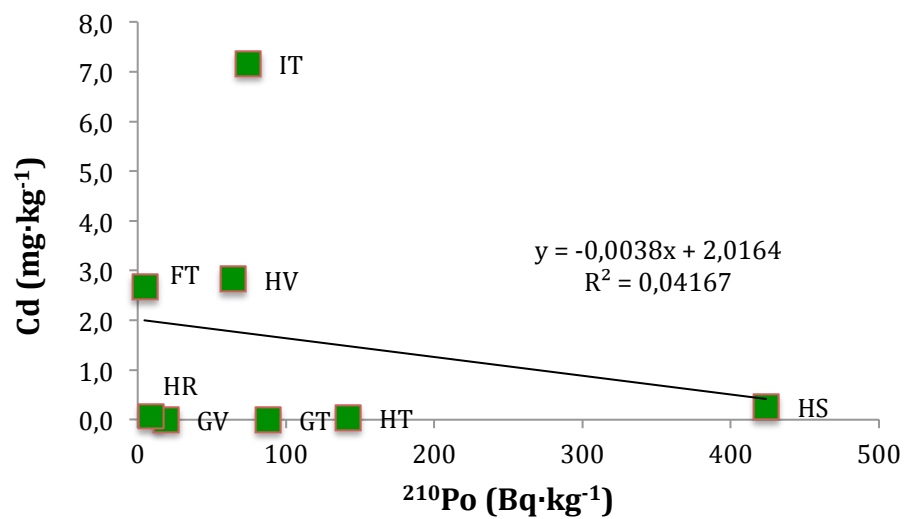
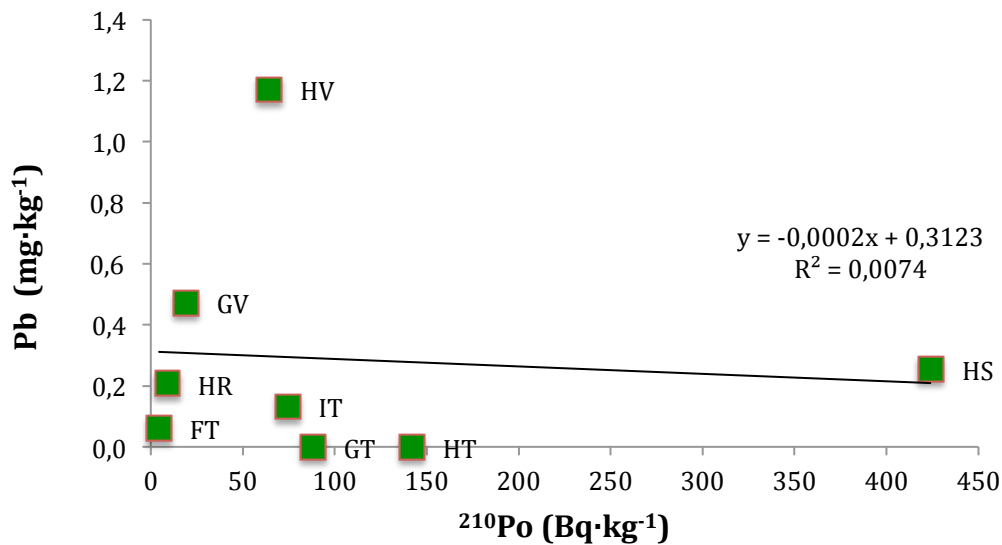


Figura 5.9. Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Cd ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de les vuit mostres analitzades.



**Figura 5.10.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Pb (mg·kg<sup>-1</sup>) de les vuit mostres analitzades.

Ninguna de les Figures anteriors presenta relació entre el metall i  $^{210}\text{Po}$ . Respecte a les concentracions de Ni que es mostren en la Taula 5.6 són en general baixes. La mostra de gònades tallahams (GT) no segueix el mateix patró que la resta de mostres, es la que presenta major concentració de níquel amb un valor de 10,5 mg·kg<sup>-1</sup>, tot i no ser la mostra amb major concentració de  $^{210}\text{Po}$  (179 Bq·kg<sup>-1</sup>), la línia de tendència presenta una pendent descendent negativa i amb una correlació tan sols de R<sup>2</sup>= 0,00019. Així, no existeix una correlació entre el contingut de Ni i Po per a les mostres estudiades.

L'anàlisi de Cu per a les vuit mostres s'exposa en la Figura 5.7. Es pot observar tampoc hi ha una tendència lineal entre el Cu i el amb un factor de correlació només de R<sup>2</sup>= 0,0003. Les mostres presenten concentracions de Cu amb valors molt baixos, amb valors que van des dels 11 a 4 mg·kg<sup>-1</sup> excepte la mostra hepatopàncrees de Tallahams (HT) (40 mg·kg<sup>-1</sup>).

En la Figura 5.8, com en el cas del Cu i Ni, no s'aprecia una correlació significativa entre el Zn i el  $^{210}\text{Po}$ . En aquest cas es troba més Zn en les mostres amb menys concentració de  $^{210}\text{Po}$ . Les dos mostres que contenen un major contingut en aquest metall són 2 gònades de verat (GV) (283 mg·kg<sup>-1</sup>) i hepatopàncrees de Tallahams (HT) (125 mg·kg<sup>-1</sup>). La mostra hepatopàncrees de Tallahams (HT) mostra les concentracions més elevades de Fe, Cu i la segona més elevada en Zn, sent la mostra que presenta la segona concentració més elevada de  $^{210}\text{Po}$ . Les mostres hepatopàncrees de rap (HR) (37 mg·kg<sup>-1</sup>) i fetge de turbot (FT) (35 mg·kg<sup>-1</sup>) contenen les concentracions de zinc més baixes i són de les mostres amb més baix contingut de  $^{210}\text{Po}$ . La resta de mostres intestí de turbot (IT), hepatopàncrees de verat (HV), gònades de tallahams (GT) i hepatopàncrees de sardina (HS) contenen concentracions de 87 mg·kg<sup>-1</sup>, 84 mg·kg<sup>-1</sup>, 60 mg·kg<sup>-1</sup>, 46 mg·kg<sup>-1</sup> respectivament. Comparat amb els metalls analitzats les concentracions de Zn mostren les més altes concentracions juntament amb les de Fe.

En la Figura 5.9 es mostra el contingut en Cd relacionat amb la concentració de  $^{210}\text{Po}$ , com en el cas dels altres metalls no hi ha una correlació positiva ( $R^2 = -0,0038$ ). El contingut més elevat de Cd es localitza en les mostres intestí de turbot (IT) ( $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), hepatopàncrees de verat (HV) ( $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i fetge de turbot (FT) ( $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), ninguna de elles amb gran quantitat de  $^{210}\text{Po}$ . Les mostres hepatopàncrees de rap (HR) i hepatopàncrees de tallahams (HT) tenen valors més baixos  $0,7$  i  $0,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivament. Les mostres analitzades per a l'òrgan de gònades com són gònades de verat (GV) i gònades de tallahams (GT) no presentaven concentració de Cd.

Els valors trobats de Pb són molt baixos i es mostren la Figura 5.9. No s'aprecia ninguna relació entre el Pb i el  $^{210}\text{Po}$  amb un factor de correlació amb només  $R^2 = 0,0074$ . Les mostres hepatopàncrees de verat (HV), gònades de verat (GV) i hepatopàncrees de sardina (HS) contenen el valors més alts,  $1$ ,  $0,5$  i  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectivament. Les mostres hepatopàncrees de rap (HR) ( $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), intestí de turbot (IT) ( $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i fetge de turbot (FT) ( $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) contenen els valors indicats. Per últim les mostres hepatopàncrees de tallahams (HT) i les gònades de tallahams (GT) no presenten concentracions de Pb.

Així doncs, els resultats de les correlacions entre metalls i el  $^{210}\text{Po}$  en teixit de peix mostren una tendència de les mostres a acumular Fe i Hg, al contenir més concentració de  $^{210}\text{Po}$ . La resta de metalls Ni, Zn, Cu, Cd i Pb no mostren cap correlació amb la concentració de  $^{210}\text{Po}$  en els diferents teixits de peix analitzats. Observem que la mostra d'hepatopàncrees de tallahams (HT) conté més concentració de Fe, Cu i Hg, sent la segona mostra amb major contingut de  $^{210}\text{Po}$  ( $142 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). La mostra gònades de tallahams (GT) és la mostra amb major contingut de Ni amb una concentració de  $^{210}\text{Po}$  de  $88 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ . La mostra amb major concentració en Zn són les gònades de verat (GV), sent de les mostres amb un contingut de  $^{210}\text{Po}$  inferior ( $19 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). La mostra d'intestí de turbot (IT) és la que conté més quantitat de Cd amb una concentració de  $^{210}\text{Po}$  de  $74 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  i la mostra d'hepatopàncrees de verat (HV) amb un contingut de  $^{210}\text{Po}$  de  $65 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$  és la mostra que conté més Pb. La mostra hepatopàncrees de sardina (HS) tot i ser la mostra amb un contingut més alt de  $^{210}\text{Po}$  ( $423 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) no conté uns valors alts en metalls com es podria esperar.

A continuació es mostren les figures amb les concentracions de  $^{210}\text{Po}$  de la fracció de citoplasma de les mostres, juntament amb el contingut de metalls analitzats (Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg).

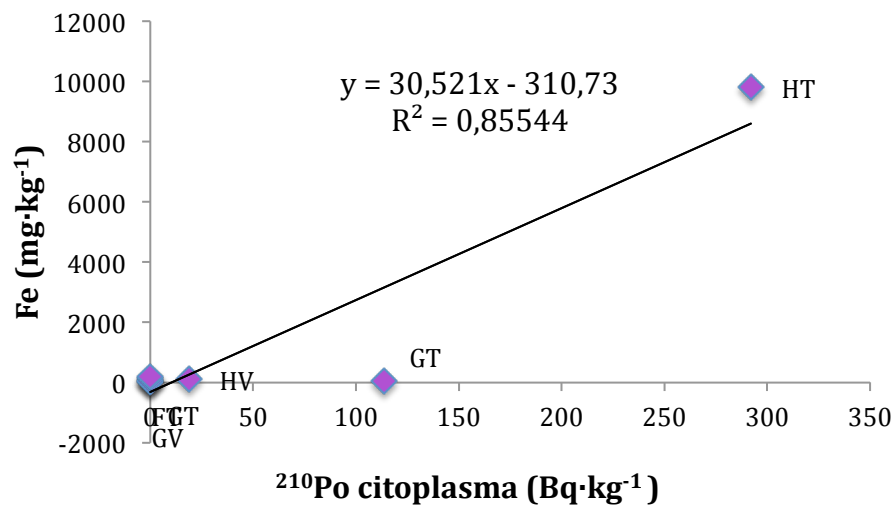


Figura 5.11. Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Fe (mg·kg<sup>-1</sup>) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.

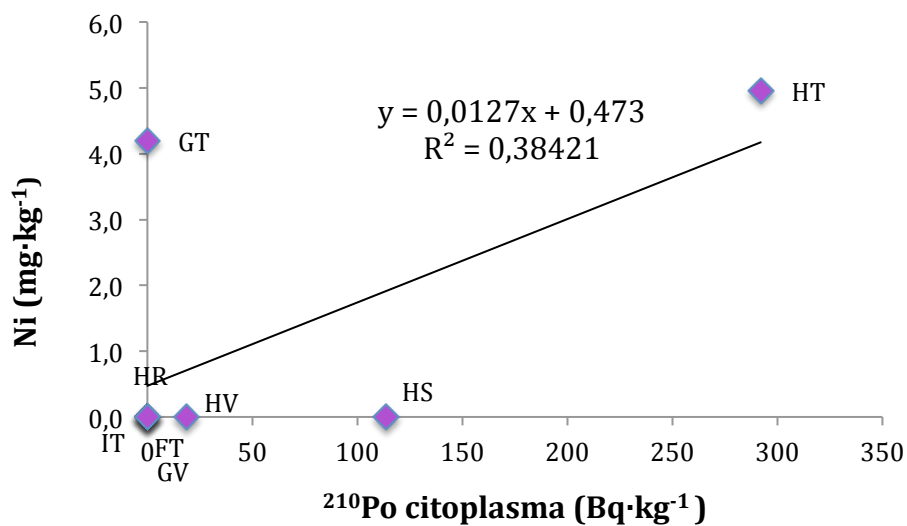
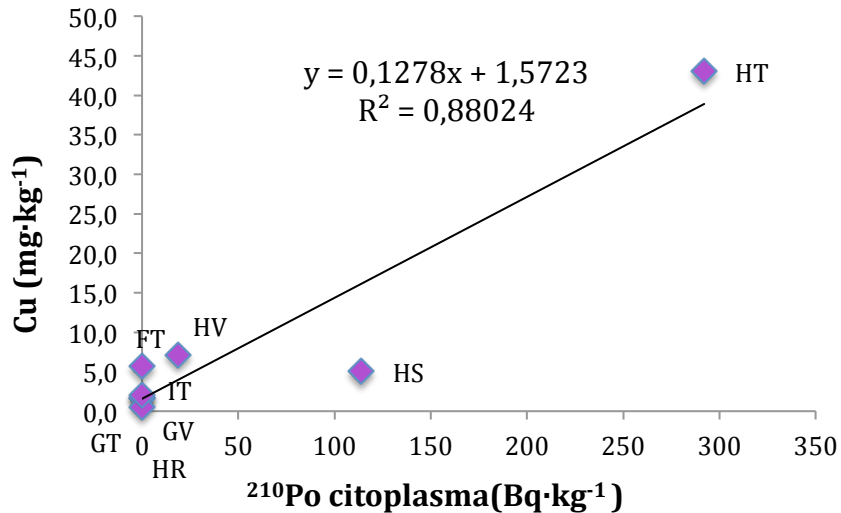
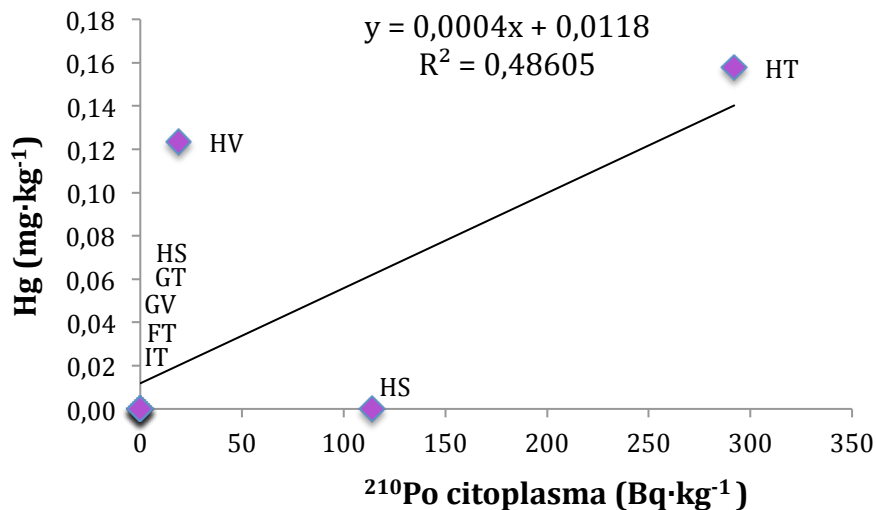


Figura 5.12. Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Ni (mg·kg<sup>-1</sup>) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.



**Figura 5.13.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Cu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.



**Figura 5.14.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  ( $\text{Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i Hg ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.

En les Figures 5.11, 5.12, 5.13, 5.14 es pot observar com per a la fracció de citoplasma de les mostres els metalls Fe, Ni, Cu i Hg presenten una relació amb el  $^{210}\text{Po}$ .

En la Figura 5.11 es veu una tendència de les mostres sobre la concentració de Fe i la seva relació amb la concentració de  $^{210}\text{Po}$ , la línia de tendència mostra una pendent positiva de 30 i una correlació prou bona de  $R^2 = 0,855$  que ens permet dir que hi ha relació entre els dos paràmetres estudiats. Només s'ha observat concentracions de  $^{210}\text{Po}$  per a 3 mostres de les vuit estudiades, hepatopàncrees de verat (HV) ( $19 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), hepatopàncrees de tallahams (HT) ( $292 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i hepatopàncrees de tallahams (HT) ( $114 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Es pot observar com la mostra hepatopàncrees de tallahams (HT) que és la mostra que conté nivells més elevats de  $^{210}\text{Po}$  ( $292 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) és la mostra amb més concentració de ferro amb diferència de les altres mostres amb uns valors de  $1473 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Les altres mostres presents

concentracions de Fe més baixes, els valors són de  $31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  per hepatopàncrees de rap (HR),  $22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  per a la mostra gònades de tallahams (GT),  $18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  en la mostra hepatopàncrees de verat (HV),  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  en la mostra fetge de turbot (FT),  $9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  per a la mostra hepatopàncrees de tallahams (HT),  $8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  per a la mostra intestí de turbot (IT) i per últim en la mostra gònades de verat (GV) no s'apreciava Fe.

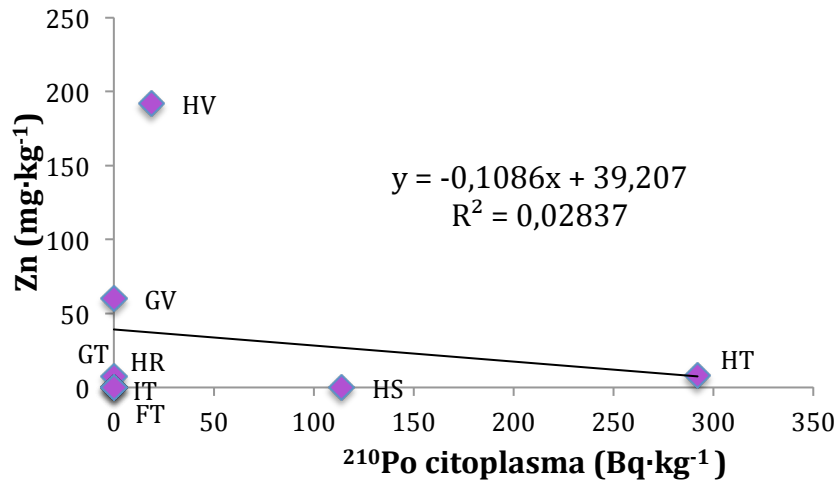
En la Figura 5.11. veiem la representació de les vuit mostres estudiades amb relació al contingut de Ni front a la concentració de  $^{210}\text{Po}$ , la línia de tendència es positiva encara que presenta una correlació baixa de  $R^2= 0,384$ . Les concentracions de Ni per a la majoria de les mostres és molt baixa, només les mostres hepatopàncrees de tallahams (HT) i gònades de tallahams (GT) presenten concentracions de Ni de 5 i  $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivament. La mostra hepatopàncrees de tallahams (HT) si es veu acompanyada per una gran concentració de  $^{210}\text{Po}$  ( $292 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) mentre que la mostra gònades de tallahams (GT) l'activitat de  $^{210}\text{Po}$  no arriba a l'activitat mínima detectable.

La Figura 5.13 mostra els nivells de  $^{210}\text{Po}$  respecte als nivells de Cu de les mostres. S'aprecia una tendència de les mostres a tenir més Cu al tenir més concentració de  $^{210}\text{Po}$  com en el cas el Fe i el Ni. La línia de tendència de la figura mostra que la pendent és positiva de 0,12 i per tant es veu una relació creixent, a més s'observa una correlació bona amb un valor de  $R^2= 0,880$  mitjançant el qual podem dir que hi ha trobem una relació entre el contingut de  $^{210}\text{Po}$  i el contingut de coure de les mostres analitzades.

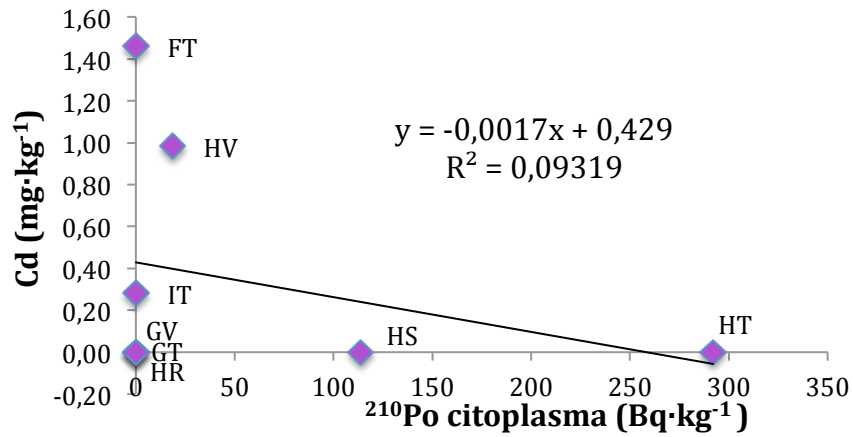
La mostres hepatopàncrees de tallahams (HT) la mostra amb major contingut en Cu amb resultats de  $81 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , com hem vist anteriorment es la mostra de citoplasma amb major concentració de  $^{210}\text{Po}$  i també la mostra amb concentracions de metalls més elevades per al cas del Fe i el Ni. La mostra fetge de turbot (FT) conté valors de  $14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , és la segona mostra amb major concentració de Ni. En la mostra d'hepatopàncrees de verat (HV) podem observar valors de  $11 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i uns valors per  $^{210}\text{Po}$  de  $19 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ , sent la tercera de les tres mostres que contenen major  $^{210}\text{Po}$ . La mostra d'hepatopàncrees de sardina (HS) conté  $8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  amb una concentració de  $^{210}\text{Po}$  de  $114 \text{ Bq}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Les mostres d'hepatopàncrees de rap (HR) ( $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), intestí de turbot (IT) ( $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), gònades de verat (GV) ( $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i gònades de tallahams (GT) ( $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), presenten les concentracions més baixes de Cu, sent també les mostres amb valors de  $^{210}\text{Po}$  més baixos als valors mínims detectables pels detectors.

La concentració per al Hg en funció de la concentració de  $^{210}\text{Po}$  es presenta en la Figura 5.16. Tot i presentar concentracions de Hg per a la fracció citoplasmàtica de les mostres molt baixa es pot apreciar una relació lineal ( $R^2= 0,486$ ) entre el Hg i el  $^{210}\text{Po}$  que ja s'havia vist prèviament per a la relació Hg i  $^{210}\text{Po}$  en les mostres de teixits.

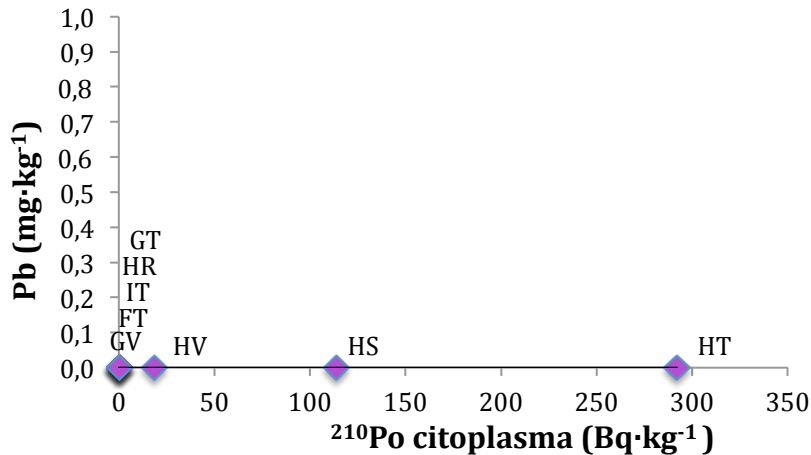
Les Figures següents mostren la relació del Zn, Cd i Pb amb relació amb el  $^{210}\text{Po}$  de les mostres estudiades.



**Figura 5.15.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Zn (mg·kg<sup>-1</sup>) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.



**Figura 5.16.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Cd (mg·kg<sup>-1</sup>) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.



**Figura 5.17.** Concentracions de  $^{210}\text{Po}$  (Bq·kg<sup>-1</sup>) i Pb (mg·kg<sup>-1</sup>) de citoplasma de les vuit mostres analitzades.

La Figura 5.15. mostra els resultats de la concentració de Zn que presenten les mostres de la fracció de citoplasma en front a les concentracions de  $^{210}\text{Po}$ . El  $^{210}\text{Po}$  i el Zn de les mostres de citoplasma no presenten una baixa correlació ( $R^2 = 0,02837$ ). La figura presenta una heterogeneïtat dels resultats del Zn i el  $^{210}\text{Po}$ . La mostra hepatopàncrees de tallahams (HT) presenta els valors més alts de  $^{210}\text{Po}$  i un baix contingut en Zn en canvi la mostra hepatopàncrees de verat (HV) amb una concentració de  $^{210}\text{Po}$  menor presenta concentracions més altes de Zn.

La Figura 5.16 presenta els resultats de Cd front als resultats de  $^{210}\text{Po}$  de la fracció citoplasmàtica de les mostres. Com per al cas del Zn la figura mostra una línia de tendència decreixent amb un valor de correlació baix i per tant no apreciem una relació lineal creixent de les mostres analitzades. Els resultats mostren heterogeneïtat com per al cas de Zn, només tres mostres presenten contingut en Cd i amb valors molt baixos relacionats amb valors molt baixos per  $^{210}\text{Po}$  o fins i tot per a activitats que no arriben al límit de detecció.

Ninguna de les mostres analitzades mostraven concentracions de plom per tant no es apreciable veure una relació entre plom i  $^{210}\text{Po}$  en la Figura 5.17. Si comparem amb el contingut en plom dels teixits aquests resultats es veuen relacionats ja que també mostraven concentracions baixes.

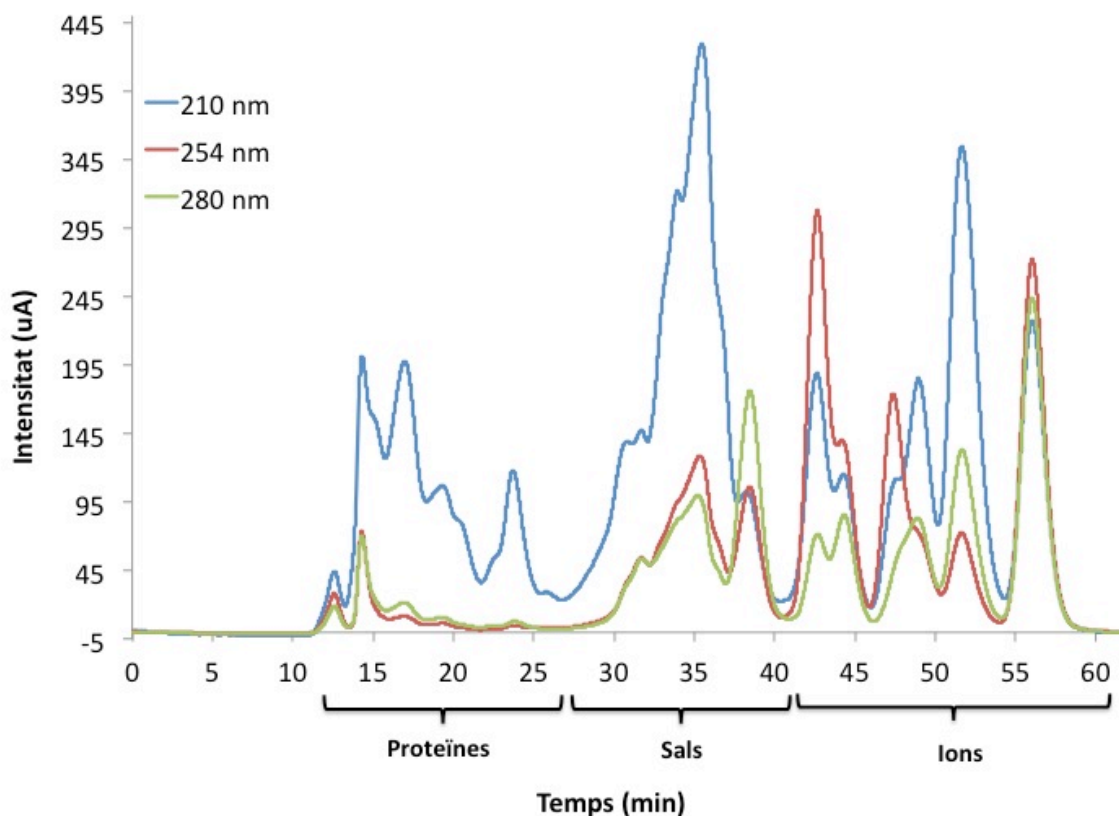
Per als metalls com el Fe, Cu, Ni i Hg analitzats en la fracció de citoplasma de les mostres s'ha trobat una relació front a la concentració de  $^{210}\text{Po}$ . Els altres metalls analitzats com el plom, zinc i cadmi no presenten aquesta relació en les mostres analitzades. Com queda reflexat en l'article de Durand et al. (1999) on s'exposa que el 30% del  $^{210}\text{Po}$  es trobava unit a la ferritina i el 28% a les metal·lotioneïnes (MTs) i altres proteïnes que probablement contenen enzims amb seleni i zinc també poden contenir sobre un 8% de  $^{210}\text{Po}$ . D'aquesta manera la relació que s'ha vist entre el Fe i el  $^{210}\text{Po}$  manté relació amb els resultats de Durand et al. (1999) on es va trobar afinitat del  $^{210}\text{Po}$  associat amb la proteïna ferritina que conté un gran contingut de ferro. Les proteïnes metal·lotioneïnes (MTs) amb la seva capacitat de captar cations metàl·lics podria comportar una captació tan del  $^{210}\text{Po}$  com d'altres metalls amb els quals es podria veure una relació com veiem en els resultats de la figures anteriors.



En canvi una relació entre Zn i  $^{210}\text{Po}$  podria ser esperada segons l'article de Durand et al. (1999) on va trobar  $^{210}\text{Po}$  en proteïnes amb enzims probablement amb Zn però no s'ha trobat una relació en les mostres estudiades.

### 5.3.3 Cromatografia líquida d'alta resolució

Aquesta tècnica es va realitzar per separar les proteïnes de la fracció citoplasmàtica de la nostra mostra. Es va introduir  $10\mu\text{L}$  de la fracció de citoplasma de la mostra hepatopàncrees de tallahams (HT) en el cromatògraf, la mostra va ser filtrada prèviament i posteriorment injectada en el cromatògraf. Es van recollir 3 fraccions del cromatògraf. La primera fracció contenia les proteïnes, la segona fracció contenia sals i l'última fracció contenia ions. La primera fracció es va començar a recollir a partir del minut 12, com es veu en la Figura 5.17 a partir d'aquest moment es comencen a veure les proteïnes fins al minut 27 on es va començar a recollir la segona fracció on sortien les sals fins al minut 41 on es va començar a recollir la tercera i última fracció on sortien les molècules més petites fins al minut 60 on ja tota la mostra de citoplasma havia passat a través del columna. Aquest procediment es va realitzar dues vegades per augmentar la concentració de  $^{210}\text{Po}$  en les tres fraccions fraccions.



**Figura 5.18.** Resultats de la cromatografia d'alta resolució.

Posteriorment es va realitzar l'anàlisi de  $^{210}\text{Po}$  de les 3 fraccions obtingudes per el cromatògraf. Els resultats van mostrar que la primera fracció, la que contenia proteïnes era la més enriquida amb  $^{210}\text{Po}$  amb diferència de les altres dues fraccions, amb un 69% del  $^{210}\text{Po}$ . La tercera fracció recollida on sortien els ions va ser la següent

fracció més enriquida amb un 16% del  $^{210}\text{Po}$  amb poca deferència respecte a la segona fracció que presentava un 12% del  $^{210}\text{Po}$ .

Amb aquests resultats es va evidenciar que la major quantitat de  $^{210}\text{Po}$  del citoplasma es concentrava en la fracció de proteïnes. D'aquesta manera el  $^{210}\text{Po}$  es presentava unit a aquestes. No es va arribar a identificar amb aquest estudi les proteïnes amb major contingut en  $^{210}\text{Po}$ .

Aquests resultats no s'allunyen d'altres resultats obtinguts com es el cas de l'estudi de Durand et al. (1999) que va estudiar la forta relació que presentava el  $^{210}\text{Po}$  amb les proteïnes. El 66% del  $^{210}\text{Po}$  es veia unit a proteïnes puntualitzant que el 30% del  $^{210}\text{Po}$  es mantenia unit a la proteïna ferritina, el 28% a les metal·lotioneïnes (MTs) i el 8% del  $^{210}\text{Po}$  a altres proteïnes que probablement contenen enzims amb seleni i zinc. Però no es va explicar on s'acumula la resta d'aquest  $^{210}\text{Po}$ , el 34% restant, segons la meua opinió i els resultats obtinguts en aquests anàlisis es possible que la resta de  $^{210}\text{Po}$  estigui com a forma d'ió en la fracció citoplasmàtica o en altres especiacions químiques com les sals. En aquest estudi hem trobat que vora un 69% de  $^{210}\text{Po}$  es localitzava en les proteïnes similar als resultats de Durand et al. (1999) i que la resta del  $^{210}\text{Po}$  es trobava repartit entre sals i com a forma d'ió. Es possible que hi hagi una petita diferència entre espècies, ja que el nostre estudi es va fer amb hepatopàncrees de Tallahams i Durand et al. (1999) el va realitzar amb fetge de verat.

## 6 Conclusions i perspectives de futur

### 6.1 Conclusions

L'objectiu principal d'aquest projecte era la recerca basada en l'estudi del  $^{210}\text{Po}$  en espècies marines, utilitzades per al consum humà i centrant-nos en la seva transferència a l'interior de l'aparell digestiu i la seva distribució a l'interior de la cèl·lula.

En dos dels tres assajos realitzats els resultats mostren una major concentració de  $^{210}\text{Po}$  localitzat en la fracció del citoplasma. Al voltant del 50% del  $^{210}\text{Po}$  total de la cèl·lula pertany a aquesta fracció.

Respecte als resultats de metalls relacionats amb el contingut de  $^{210}\text{Po}$  en els teixits de les mostres de verat, turbot, tallahams, sardina i rap, i la seva fraccions de citoplasma. S'ha pogut relacionar el contingut de metalls de les mostres amb concentracions de  $^{210}\text{Po}$ . El Fe i el Hg presenten una relació lineal amb la concentració de  $^{210}\text{Po}$ , en canvi la resta de metalls Ni, Cu, Zn, Cd i Pb, no presenten aquesta relació. Per a l'anàlisi de metalls per a la fracció de citoplasma de les mostres s'ha trobat una relació entre Fe, Cu, Ni i Hg amb el  $^{210}\text{Po}$ , aquests resultats es veuen recolzats per l'estudi de Durand et al. (1999) que va trobar afinitat del  $^{210}\text{Po}$  amb les proteïnes com la ferritina i les metal·lotioneïnes (MTs), proteïnes riques en ferro i amb la capacitat de captar cations metàl·lics respectivament.

Un altre dels objectius específics que es va plantejar va ser el desenvolupament d'un mètode per a l'extracció de proteïnes de la fracció de citoplasma de la cèl·lula útils per a realitzar el posterior estudi de  $^{210}\text{Po}$  d'aquestes proteïnes. Queda car per els resultats obtinguts que la tècnica de l'electroforesi de gels de poliacrilamida permet la separació de les proteïnes però no manté el  $^{210}\text{Po}$  unit a a elles sinó que queda dissolt en les molècules de detergent que s'utilitzen en aquesta tècnica inviabilitzen el procediment. El protocol de precipitació de proteïnes TCA que es va dur a terme abans de l'electroforesi de gel de poliacrilamida es va veure que també arrossega el  $^{210}\text{Po}$  per tant la utilització d'aquest protocol juntament amb la tècnica de l'electroforesi no són efectiu per al desenvolupament d'aquest mètode.

No obstant la cromatografia líquida d'alta resolució ha esdevingut el mètode mitjançant el qual s'ha pogut adquirir resultats en la separació de diferents especiacions químiques, fent possibles l'anàlisi del  $^{210}\text{Po}$  també. Aquesta tècnica va aconseguir separar diferents especiacions químiques com les proteïnes, les sals i ions. Posteriorment es va poder realitzar l'anàlisi del  $^{210}\text{Po}$  on es va trobar que la major concentració de  $^{210}\text{Po}$  es localitzava en la fracció de proteïnes de la mostra. Els resultats obtinguts donen suport a resultats d'altres estudis com el de Durand et al. (1999; 2002).

La unió de tots els resultats evidència la penetració del  $^{210}\text{Po}$  a l'interior de la cèl·lula, la seva bioacumulació en la fracció citoplasmàtica de la cèl·lula i la seva afinitat per les proteïnes. La relació trobada del  $^{210}\text{Po}$  amb alguns metalls recolça estudis que relacionen el  $^{210}\text{Po}$  amb proteïnes com la ferritina i les metal·lotioneïnes (MTs).

## 6.2 Perspectives de futur

Amb la realització d'aquest projecte s'ha intentat separar els diferents orgànuls cel·lular i estudiar el contingut de  $^{210}\text{Po}$  d'aquests, amb el posterior desenvolupament d'un mètode per a la separació de diferents especiacions químiques de la fracció citoplasmàtica, ja que va ser en aquesta fracció on es va veure la major concentració de  $^{210}\text{Po}$ .

La realització de nous estudis posteriors a aquest que continuïn amb la línia de recerca són necessàries per entendre millor el comportament del  $^{210}\text{Po}$  a l'interior de la cèl·lula en les espècies marines. Amb la finalitat d'afirmar que la major concentració de  $^{210}\text{Po}$  es concentra en la fracció del citoplasma, repetir l'experiment amb altres mostres donaria més validesa als resultats, el mètode de fraccionament cel·lular que es va dur a terme per realitzar la separació dels orgànuls de la cèl·lula ha sigut de gran utilitat tot i que es podria utilitzar una tècnica alternativa que permetés una separació les fraccions més pures entre els diferents orgànuls cel·lulars per obtenir una exactitud més elevada ja que el fraccionament de 100% de les cèl·lules del teixit es pràcticament impossible.

Mitjançant el mètode desenvolupat, la cromatografia líquida d'alta resolució es podria separar més concretament la fracció de proteïnes que componen la fracció del citoplasma i identificar quines contenen més  $^{210}\text{Po}$  concentrat i posteriorment amb la espectrometria de masses identificar-les

Per últim l'estudi de l'acumulació de  $^{210}\text{Po}$  a l'interior de la cèl·lula en fitoplàncton i zooplàncton també seria de gran utilitat al ser el fitoplàncton el precursor en la cadena tròfica i mitjançant el qual la resta d'espècies marines incorporen aquest radionúclid, per al fraccionament del fitoplàncton caldria variar la tècnica al utilitzat en aquest estudi, ja que el fitoplàncton presenta cèl·lules vegetals que presenten característiques diferents a les cèl·lules animals.

## 7 Bibliografia

- Aarkrog, A., Baxter M.S. and Bettencourt, A.O.,(1997). A Comparison of Doses from  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{210}\text{Po}$  in Marine Food: A Major International Study. *Journal of Environmental Radioactivity* 34(1): 69–90.
- Bacon, M.P., (1988). Tracers of chemical scavenging in the ocean, boundary effects and large- scale chemical fractionation. *Phil. Trans. Roy. Soc. London A* 325, 147–160.
- Bacon, M.P., Spencer, D.W., Brewer, P.G., (1976). Pb-210/Ra-226 and Po-210/Pb-210 dis- equilibria in seawater and suspended particulate matter. *Earth and Planetary Science Letters* 32, 277–296.
- Broecker, W.S., Goddard, J., Sarmiento, J.L., (1976). The distribution of Ra-226 in the Atlantic Ocean. *Earth and Planetary Science Letters* 32 (2), 220–235.
- Carvalho, F.P. (1988).  $^{210}\text{Po}$  in marine organisms: a wide range of natural radiation dose domains. *Radiation Protection Dosimetry* 24: 113–117.
- Carvalho F.P. (2011). Polonium ( $^{210}\text{Po}$ ) and lead ( $^{210}\text{Pb}$ ) in marine organisms and their transfer in marine food chains, *Journal of Environmental Radioactivity*, 102(5):462-72.
- Carvalho, F.P. and Fowler, S.W. (1994). A double-tracer technique to determine the relative importance of water and food as sources of polonium-210 to marine prawns and fish. *Marine Ecology Progress Series* 103: 251–264.
- Casacuberta, N. (2011). Naturally Occurring Radionuclides in the Dicalcium Phosphate Industry and their Transfer to Poultry. Tesis doctoral.
- Coale, K.H., Bruland, K.W., (1985).  $^{234}\text{Th}$ : $^{238}\text{U}$  disequilibria within the California Current. *Limnology and Oceanography* 30, 22–33.
- Cochran, J.K. and Masqu e, P., (2003). Short-lived U/Th Series Radionuclides in the Ocean: Tracers for Scavenging Rates, Export Fluxes and Particle Dynamics. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 52, 461–492.
- Cochran, J.K., (1992). The oceanic chemistry of the uranium and thorium series nuclides. Uranium series disequilibrium: Applications to earth, marine and environmental sciences. M. Ivanovich, OUP, 334–395.
- Connan, O., Germain, P., Solier, L., Gouret, G. (2007). Variations of  $^{210}\text{Po}$  and  $^{210}\text{Pb}$  in various marine organisms from Western English Channel: contribution of  $^{210}\text{Po}$  to the radiation dose. *Journal of Environmental Radioactivity* 97(2-3): 168-88.
- Cherrier, J., Burnett, W. C., LaRock, P.A. (1995). Uptake of polonium and sulfur by bacteria. *Geomicrobiology Journal* 13, 103–115.
- Cherry, R. D. and Heyraud, M. (1982). Evidence of High Natural Radiation Doses in Certain Mid-Water Oceanic Organisms; *Science* 218.

- Cherry, R.D., Shannon, L.V., (1974). The alpha radioactivity of marine organisms. *Atomic Energy Review* 12, 3-45.
- Durand, J. P., Carvalho, F. P., Goudard, F., Pieri, J., Fowler, S. W., Cotret, O. (1999).  $^{210}\text{Po}$  binding to metallothioneins and ferritin in the liver of teleost marine fish. *Marine Ecology Progress Series*, vol 177, 189-196.
- Durand, J. P., Goudard, F., Pieri, J., Fowler, S. W., Cotret, O. (2002). Ferritin and hemocyanin:  $^{210}\text{Po}$  molecular traps in marine fish, oyster and lobster. *Marine Ecology Progress Series*, vol 233, 199-205.
- Eisenbud, M. and Gesell, T. (1997). *Environmental Radioactivity. From Natural, Industrial, and Military Sources*. Fourth edition. Academic Press.
- Eisenbud, M. and Gesell, T. (1997). *Environmental Radioactivity. From Natural, Industrial, and Military Sources*. Fourth edition. Academic Press.
- Fisher, N. S. (1986). On the reactivity of metals for marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 31, 443-449.
- Fisher, N. S., Burns, K. A., Cherry, R. D. and Heyraud, M. (1983). Accumulation and cellular distribution of  $^{241}\text{Am}$ ,  $^{210}\text{Po}$ , and  $^{210}\text{Pb}$  in two marine algae. *Marine Ecology Progress Series* 11: 233-237.
- Heyraud, M., and R. D. Cherry. (1979). Polonium-210 and lead-210 in marine food chains. *Marine Biology*, 52, 227-236.
- Heyraud, M., Cherry, R.D., Oschadleus, H.D., Augustyn, C.J., Cherry, M.I., Scaly, J.C., (1994). Polonium-210 and Lead-210 in Edible Molluscs from near the Cape of Good Hope: Sources of Variability in Polonium-210 Concentrations. *Journal of Environmental Radioactivity* 24 (3): 253-272.
- Heyraud, M., Fowler, S.W., Beasley, T.M., Cherry, R.D., (1976). Polonium-210 in euphausiids: a detailed study. *Marine Biology* 34, 127-138.
- Holtzman, R. B. (1966). Natural levels of lead-210, polonium-210 and radium-226 in humans and biota of the Arctic. *Nature*, 210, 1094-1097.
- ICRP (1990). ICRP Publication 60: Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *Annals of the ICRP*, Volume 21/1-3.
- Ivanovich, M. (1992b). The phenomenon of radioactivity. In: *Uranium-series Disequilibrium: Applications to Earth, Marine, and Environmental Sciences*. Ivanovich, M. i Harmon, R. (eds) Clarendon Press, Oxford, 1-33.
- Ivanovich, M. and Harmon, R.S. (1992a). *Uranium-Series Disequilibrium: Applications to Earth, Marine, and Environmental Sciences*, 2nd Edition. Oxford Science Publications, Oxford, p. 910.

- Kharkar, D.P., Thomson, J., Turekian, K.K., Forster, W.O., (1976). Uranium and thorium decay series nuclides in plankton from the Caribbean. *Limnology and Oceanography* 21, 294–299.
- Kharkar, D.P., Thomson, J., Turekian, K.K., Forster, W.O., (1976). Uranium and thorium decay series nuclides in plankton from the Caribbean. *Limnology and Oceanography* 21, 294–299.
- Kritz, M.A., (1983). Use of long-lived Radon daughters as indicators of exchange between the free troposphere and the marine boundary layer. *Journal of Geophysical Research* 88, 8569–8573.
- Ku, T.-L., Lin, M.-C., (1976). Ra-226 distribution in the Antarctic Ocean. *Earth and Planetary Science Letters* 32 (2), 236–248.
- Lambert, G., Polian, G., Sanak, J.A., B., Buisson, A., Jegu, A., Le Roulley, J.C., (1982). Cycle du radon et des ces descendants: application a l'etude des changes troposphere stratosphere. *Annales Geophysicae* 38, 497–531.
- Lazorenko, G.E., Polikarpov, G.G. and Boltachev, A.R. (2002). Natural Radioelement Polonium in Primary Ecological Groups of Black Sea Fishes. *Russian Journal of Marine Biology* 28(1): 52–56.
- Lee, C.W., Kang, M.J., Lee, W., Choi, G.S., Cho, H.Y., Kim, H.R., Chung, K.H. (2009) Assessment of  $^{210}\text{Po}$  in foodstuffs consumed in Korea. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 279 (2): 519–522.
- Linsalata, P. (1994). Uranium and thorium decay series radionuclides in human and animal foodchains - a review. *Journal of Environmental Quality*, 23:633–642.
- López, E. (2010-2011) Bioaccumulation of  $^{210}\text{Po}$  and  $^{210}\text{Pb}$  in fish tissues in a radioactive naturally enhanced area: the Península marsh (Castelló, Spain). Pojecte de final de carrera.
- Momoshima, N., Song, Li-X., Osaki, S., Maeda, Y. (2001). Formation and emission of volatile polonium compound with methylcobolamin. *Environmental Science and Technolgt*, 35, 2956-2960.
- Momoshima, N., Song, Li-X., Osaki, S., Maeda, Y. (2002). Biologically induced Po emission from fresh water. *Journal of Environmental Radioactivity*, 63, 187-197.
- Moore, H.E., Poet, S.E., Martell, E.A., Wilkening, L.H.,(1974). Origin of Rn-222 and its long-lived daughters in air over Hawaii. *Journal of Geophysical Research* 79, 5019–5024.
- Moroz, B. B. and Parfenov, Y. D. (1972). Metabolism and biological effects of polonium-210. *Atomic Energy Review* 10: 175-232.
- NKS, (2009). Nordic Nuclear Safety Research, Po-210 and other radionuclides in terrestrialland freshwater environments, A Deliverable report for the NKS-B activity October 2008 GAPRAD.

- Nozaki, J., Turekian, K.K., (1976). The distribution of  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  in the surface waters of the Pacific Ocean. *Earth and Planetary Science Letters* 54, 203–216.
- Nozaki, J., Turekian, K.K., (1976). The distribution of  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  in the surface waters of the Pacific Ocean. *Earth and Planetary Science Letters* 54, 203–216.
- Ortega, X. and Jorba, J.(1994). *Radiaciones ionizantes: Utilización y riesgos*. Second edition. Edicions UPC.
- Parfenov, Y., (1974). Polonium-210 in the environment and in the human organisms. *Atomic Energy Review* 12, 75-143.
- Pentreath, R. J. (1999). A system for radiological protection of the environment: Some initial thoughts and ideas. *Journal of Radiological Protection*, 19, 117–128.
- Persson, R.R., Holm, E. (2011) Polonium-210 and lead-210 in the terrestrial environment: a historical review . *Journal of Environmental Radioactivity* 102: 420-429.
- Pollard, D., Ryan, T.P., and Dowdall, A. (1998). The dose to Irish seafood consumers from  $^{210}\text{Po}$ , *Radiation Protection Dosimetry* 75 (1–4): 139–142.
- Radakovitch, O., R. D. Cherry, and S. Heussner. (1999).  $^{210}\text{Po}$  and  $^{210}\text{Pb}$ : Tracers of particle transfer on the Rhone continental margin (NW Mediterranean). *Deep-Sea Research*, 46, 1539–1563.
- Reinfelder, J. R., and N. S. Fisher. (1991). The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science*, 251, 794–796.
- Schwarz, K. (1976). Essentiality and metabolic functions of selenium. *Medical Clinics of North America*, 60, 745–767.
- Shaheed, K., Somasundaram, S.S.N., Shahul Hameed, P., Iyengar, M.A.R. (1997). A study of polonium-210 distribution aspects in the riverine ecosystem of Kaveri, Tiruchirappalli, India. *Environmental Pollution*, Vol. 95, No. 3, pp. 371-377, 1997.
- Shannon, L.V., Cherry, R.D., Orren, M.J., (1970). Polonium-210 and lead-210 in the marine environment. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 34, 701–711.
- Simkiss, K., and M. G. Taylor. (1995). Transport of metals across membranes. In: *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (Eds A. Tessier and D. R. Turner). Wiley, Chichester, pp. 1–44.
- Skwarzec, B. and Falkowski, L. (1988). Accumulation of  $^{210}\text{Po}$  in Baltic invertebrates. *Journal of Environmental Radioactivity* 8: 99–109
- Skwarzec, B., Falkowski, L. (1988). Accumulation of  $^{210}\text{Po}$  in Baltic Invertebrates, *J. Environ. Radioactivity* 8, 99-109.
- Skwarzec, B., Falkowski, L. (1988). Accumulation of  $^{210}\text{Po}$  in Baltic Invertebrates, *J. Environ. Radioactivity* 8, 99-109.



- Stepnowski, P., Skwarzec, B. (2000). Tissues and subcellular distributions of  $^{210}\text{Po}$  in the crustacean *Saduria entomon* inhabiting the southern Baltic sea. . Journal of Environmental Radioactivity 49:195-199.
- Stewart, G. M., J. K. Cochran, J. Xue, C. Lee, S. Wakeham, R. A. Armstrong, P. Masque, and J. C. Miquel. (2007). Exploring the connection between Po-210 and organic matter in the northwestern Mediterranean. Deep-Sea Research I, 54, 415–427.
- Stewart, G. M., and N. S. Fisher. (2003a). Experimental studies on the accumulation of polonium-210 by marine phytoplankton. Limnology and Oceanography, 48, 1193–1201.
- Stewart, G. M., and N. S. Fisher. (2003b). Bioaccumulation of polonium-210 in marine copepods. Limnology and Oceanography, 48, 2011–2019.
- Stewart, G. M., Fowler, S. W., Teyssie, J. L., Cotret, O., Cochran, J.K. and Fisher, N.S. (2005). Contrasting the transfer of polonium-210 and lead-210 across three trophic levels in the marine plankton. Marine Ecology Progress Series, 290, 27–33.
- Stewart, G.M., Bradley, S., Michael. W., Roger, P. (2011). Direct comparison of  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{234}\text{Th}$  and POC particle-size distributions and exportfluxes at the Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS) site. Journal of Environmental Radioactivity 102:479-489.
- Stewart, G.M., Fowler, S.W., and Fisher, N.S. (2008) The Bioaccumulation of U- and Th-Series Radionuclides in Marine Organisms. Radioactivity in the Environment, Volume 13 , Elsevier.
- Swift D.J., Smith, D.L., Allington, D.J., and Ives, M. J. (1994). The  $^{210}\text{Po}$  content of North Sea edible crab, *Cancer pagurus* L., and common shrimp, *Crangon crangon* L. and the potential radiological impact. Journal of Environmental Radioactivity 23: 213-230.
- Turekian, K.K., Kharkhar, D.P., Thomson, J., (1974). The fates of  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  in the ocean surface. Journal Rechargeable Atmosphere 8, 639–646
- Turekian, K.K., Nozaki, Y., Benninger, L.K., (1977). Geochemistry of atmospheric radon and radon products. Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 5, 227–255.
- UNSCEAR (1982). United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Sources and Effects of Ionizing Radiation, United Nations, New York.
- UNSCEAR (2000). United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR), Sources and Effects of Ionizing Radiation, United Nations, New York.
- Verdeny, E. (2009).  $^{234}\text{Th}$  and  $^{210}\text{Po}$  as tracers for particle export in the surface ocean. Tesi doctoral.
- Villarreal-Tolchinsky, L. (2005). Aprofundiment en la relació estructura/funció de les metal·lotioneïnes (MTs). Estudi de la capacitat coordinant i de la influència de lligands no proteics en MT4 de mamífer i altres MTs relacionades. Tesi doctoral.

Waska, H., Kim, S., Kim, G., Kang, M.R., Kim, G.B. (2008). Distribution patterns of chalcogens (S, Se, Te, and  $^{210}\text{Po}$ ) in various tissues of a squid, *Todarodes pacificus*. Science of the total environment 392:218-224

Wildgust, M.A., McDonald, P. and White, K.N. (1998.) Temporal changes of  $^{210}\text{Po}$  in temperate coastal waters. Science of Total Environment 214: 1-10.

Williams, R. J. P. (1981). Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 294, 57-74.

**Llibres:**

ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis (2004): *Introducción a la Biología Celular*. Editorial Panamericana. 900Pàgines

**Legislació:**

Directiva 96/29/Euratom del Consejo de 13 de mayo de 1996 por la que se establecen las normas básicas relativas a la protección sanitaria de los trabajadores y de la población contra los riesgos que resultan de las radiaciones ionizantes *Diario Oficial n° L 159 de 29/06/1996 P. 0001 - 0114* .