



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE PRECONCENTRACIÓN Y BIODISPONIBILIDAD DE ZINC (II) Y COBRE (II) EN MEDIOS ACUOSOS UTILIZANDO MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS Y DOS ESPECIES DE MICROALGAS (*S. acutus* y *P. subcapitata*)

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ERIK ALBERTO RODRÍGUEZ MORALES

TUTOR: DR. EDUARDO RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

VOCAL: Dra. María Aurora Armienta Hernández

VOCAL: Dr. Alberto Rojas Hernández

VOCAL: Dra. Martha Patricia García Camacho

SECRETARIO: Dra. María del Pilar Cañizares Macías

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:

Laboratorio 113, Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Edificio B, Facultad de Química, UNAM, C.U.

TUTOR: Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

SUSTENTANTE: M.C. Erik Alberto Rodríguez Morales

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los estudios de doctorado, No. De Becario/CVU (240017/347020).

Así mismo se agradece el apoyo económico al proyecto 2011CB167148 de *CONACYT*.

Al Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero por su enorme guía durante la realización de este proyecto doctoral.

Al Dr. Fernando Montiel Aguirre y a la M.C. Raquel Ortega Muñoz por su asistencia en los métodos biológicos.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por proporcionarnos las especies de microalgas *S. acutus* y *P. subcapitata*.

A la Q. Nadia Munguía Acevedo por el apoyo técnico brindado durante la elaboración de este proyecto.

A los miembros del comité tutor por su tiempo y todas las aportaciones realizadas a lo largo de esta investigación: Dra. María del Pilar Cañizares y Dra. Helgi Jung Cook.

A los miembros del jurado por todas sus observaciones realizadas a este trabajo.

El desarrollo de esta investigación dio como resultado los siguientes trabajos:

Publicaciones

Rodríguez-Morales, E.A; Rodríguez de San Miguel, E.; De Gyves, J. 2015. Evaluation of the measurement of Cu(II) bioavailability in complex aqueous media using a hollow-fiber supported liquid membrane device (HFSLM) and two microalgae species (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus acutus*). *Env.Poll.* 206: 712-719.

Rodríguez-Morales, E.A; Rodríguez de San Miguel, E.; De Gyves, J. 2017. Evaluation of a hollow fiber supported liquid membrane devices as a chemical surrogate for the measurements of zinc (II) bioavailability using two microalgae strains as biological references. *Chemosphere.* 171: 435-445.

Congresos

1^{er} Día de la investigación en la Facultad de Química (2012), con el trabajo titulado: “Desarrollo de dispositivos de preconcentración/especiación para evaluar biodisponibilidad de metales”.

IV Congreso Nacional de Membranas: Ciencia, tecnología y aplicaciones (2014), Mérida (Yucatán), con el trabajo titulado: “Evaluación de la biodisponibilidad de Cu (II) en medios acuosos a través de dispositivos de membrana líquida soportada (MLS) y dos especies de microalgas (*S. acutus* y *S. capricornutum*)”.

Semana de Investigación de la Facultad de Química UNAM (2014), con el trabajo: “Evaluación y comparación de la biodisponibilidad de cobre empleando sistemas sintéticos y dos especies de microalgas”.

XVIII Congreso de Euroanalysis (2015), Burdeos (Francia), con el tema: “Comparative study of Cu (II) bioavailability using PLM devices and two microalgae strains (*S. acutus* and *P. subcapitata*)”.

X Congreso Iberoamericano en Ciencias y Tecnología de Membranas (2016), México (Ciudad de México), con el tema: “Optimization of copper extraction using a polymer inclusion Membrane (PIM) based on Kelex-100 as carrier”.

Jornada de la investigación en la Facultad de Química 2016. Facultad de Química, UNAM, C.U.

Índice de contenido

1.	Antecedentes	1
1.1	Metales pesados y medio ambiente	1
1.1.1	Cobre en ambientes acuosos	2
1.1.2	Zinc en ambientes acuosos	3
1.2	Biodisponibilidad y especiación de metales pesados	5
1.2.1	Mecanismo de bio-captación (biouptake) de metales por organismos biológicos	5
1.2.2	Métodos principales empleados para la determinación de la toxicidad o biodisponibilidad de metales pesados.....	8
1.2.2.1	Métodos biológicos para el estudio de la toxicidad y biodisponibilidad de metales	8
1.2.2.2	Métodos químicos para el estudio de especiación y biodisponibilidad de metales.....	9
1.2.2.3	Modelos teóricos para la determinación de la especiación y biodisponibilidad	10
1.3	Membranas líquidas y estudio de biodisponibilidad	12
1.3.1	Membranas líquidas.....	12
1.3.2	Transporte de metales a través de membranas líquidas soportadas (MLS).....	12
1.3.3	Analogías en los procesos de extracción de metales por dispositivos de MLS y los sistemas biológicos	13
1.4	Kelex-100 como agente extractante (acarreador) para estudios de biodisponibilidad.....	16
1.4.1	Extracción de metales por Kelex-100.....	16
1.4.2	Extracción de metales empleando MLSFH y Kelex-100 como agente extractante.....	17
1.4.3	Membranas líquidas soportadas (MLS) empleadas para estudios de preconcentración, especiación y biodisponibilidad	18
1.5	Muestreo pasivo y estudios de biodisponibilidad.....	20
1.5.1	Membranas líquidas y muestreo pasivo	22
1.6	Flujo y eficiencia de extracción	23
1.6.1	Evaluación del flujo inicial (J_0) y constante de velocidad (c) en los dispositivos de MLSFH y microalgas	23
1.6.2	Evaluación de la eficiencia de extracción en las membranas líquidas soportadas (MLS) y las membranas poliméricas de inclusión (PIM).....	24
2.	Encuadre temático	26

2.1	Objetivo General	26
2.2	Objetivos específicos.....	26
2.3	Hipótesis.....	27
3.	Desarrollo Experimental.....	28
3.1	Reactivos	28
3.2	Instrumentación.....	28
3.3	Especiación química y análisis estadístico.....	29
3.4	Preparación de los dispositivos de MLSFH.....	29
3.5	Preparación de las membranas poliméricas de inclusión (PIM)	29
3.6	Cuantificación de metal internalizado por microalgas.....	29
3.7	Cuantificación de metal internalizado por dispositivos de MLSFH	31
3.8	Experimentos de extracción con PIM.....	31
3.9	Determinación de la cantidad de metal internalizado y factor de preconcentración (F).....	31
4.	Resultados y discusión	33
4.1	Cinéticas de crecimiento microalgal	33
4.2	Preconcentración y biodisponibilidad de Cu (II) empleando los dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas (<i>S. acutus</i> y <i>P. subcapitata</i>)	34
4.2.1	Cinéticas de internalización de Cu (II) por dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas (<i>S. acutus</i> y <i>P. subcapitata</i>)	34
4.2.2	Diseño experimental 2 ⁴ para evaluar la influencia de distintos factores en la internalización de Cu (II)	35
4.2.3	Influencia de la especie libre en la internalización de cobre y análisis de correlación bivariada 40	
4.2.4	Influencia del pH en la internalización de Cu (II).....	43
4.2.5	Influencia de ligantes inorgánicos en la internalización de Cu (II)	44
4.2.6	Influencia de cationes metálicos en la internalización de Cu (II)	46
4.3	Preconcentración y biodisponibilidad de Zn (II) empleando los dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas (<i>S. acutus</i> y <i>P. subcapitata</i>)	47
4.3.1	Optimización de la extracción de Zn (II) por dispositivos de MLSFH	47
4.3.2	Extracción de Zn (II) por dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas (<i>S. acutus</i> y <i>P. subcapitata</i>)	48
4.3.3	Evaluación de los factores significativos en la internalización de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH y las dos especies de microalgas.....	49

4.3.4	Influencia del pH en la internalización de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas.....	55
4.3.5	Influencia de ligantes inorgánicos en la internalización de Zn (II)	57
4.3.6	Influencia de cationes metálicos concomitantes	59
4.4	Desarrollo de una membrana polimérica de inclusión para la preconcentración de Cu (II)	61
4.4.1	Resumen.....	61
4.4.2	Optimización en la extracción de Cu (II) por membranas poliméricas de inclusión (PIM) ..	61
4.4.2.1	Cinética de extracción de Cu (II) empleando las PIM.....	61
4.4.2.2	Influencia de la concentración de Kelex-100 y 2-Nitrofenil-Octil-eter (NPOE por sus siglas en inglés) en la matriz polimérica.....	63
4.4.2.3	Influencia del tipo de plastificante en la extracción de Cu (II) por PIM	65
4.4.2.4	Influencia de la concentración de Kelex-100 en la extracción de Cu (II) empleando TEHP 67	
4.4.2.5	Influencia de la concentración de ligante y pH de la fase aceptora en la eficiencia de extracción.....	68
4.4.2.6	Influencia del triacetato de celulosa (CTA) en la extracción de Cu (II).....	69
4.4.3	Prueba de estabilidad de la PIM.....	70
4.4.4	Estudios de la selectividad de la PIM	71
4.4.5	Influencia del volumen en la fase aceptora en la preconcentración de Cu (II) por la PIM ..	72
5.	Conclusiones y perspectivas.....	75
5.1	Conclusiones.....	75
5.2.	Perspectivas	76
6.	Referencias Bibliográficas	77
7.	Glosario de términos.....	85
8.	Anexos	88

Índice de Figuras

Figura 1. Producción mundial de zinc, cobre, cadmio y plomo desde el año 2000 hasta 2012 ³⁵	4
Figura 2. Modelo conceptual de algunos procesos fisicoquímicos involucrados en la toma de metales por microorganismos (Donde L= Ligantes, M= metal), los sufijos (L= lipofílico, h=hidrofílico, bio=biológico e int=internalizado) * (Adaptación de Worms, et al. ⁴⁰).	7
Figura 3. a) Composición de los dispositivos DGT e b) imagen real de un dispositivo DGT	10
Figura 4. Parámetros fisicoquímicos que controlan el flujo del metal (M) de muestras acuosa a través de las Membranas líquidas soportadas (MLS) ⁴⁸ . Donde C= acarreador o extractante, DM= Coeficiente de difusión del metal (M), DML= Coeficiente de difusión del complejo metal-ligante (ML), DMC= Coeficiente de difusión del complejo metal-acarreador (MC), DMA= Coeficiente de difusión del complejo metal-ligante fase aceptora (MA), Kd= constante de disociación del complejo, Kf = constante de formación del complejo.	13
Figura 5. Sitios activos presentes en algunas proteínas transmembranales (Tomado de Xue, H.B et al. ⁵⁶)	15
Figura 6. Procesos principales involucrados en la extracción de cationes metálicos por dispositivos de membrana líquida y sistemas biológicos. (Donde R=receptor y L= Ligantes).....	15
Figura 7. a) Estructura del Kelex-100 y b) Extracción de metales por Kelex-100 en rangos de pH 0.5 a 6.0 (disolución donadora= 5g/L, Kelex-100= 0.5 M, tiempo 5 min, Relación de fases= 3:1, Acuoso/Orgánico) (Adaptado de Ritcey et al. ⁶⁰)	16
Figura 8. Mecanismo de extracción de un catión metálico (M) por Kelex-100 (KH) empleando una membrana líquida soportada (MLS).....	17
Figura 9. a) Conformación de una membrana líquida soportada de fibra hueca (MLSFH) y b) MLSFH empleadas en este trabajo.....	18
Figura 10. Correlación entre los flujos de internalización (Jint) por: a) Dispositivos de MLSFH (Representado como PLM, de las siglas en inglés Permeation Liquid Membrane) y la microalga <i>C. kesslerii</i> bajo la presencia/ausencia de ácidos húmicos (SRHA) (Bayen et al. ⁹) y b) Dispositivos de membrana de hoja plana (PLM) y la microalga <i>C. kesslerii</i> en la ausencia/presencia de diferentes ligantes (ácido nitrilotriacético, ácido cítrico, ácido iminodiacético, ácido malónico y ácidos fúlvicos) (Slaveykova et al. ¹¹).	19
Figura 11. Clasificación de los muestreadores pasivos	20
Figura 12. Cinética de primer orden observado en los muestreadores pasivos.....	21
Figura 13. Diseño de un dispositivo a base membranas poliméricas de inclusión, empleadas como muestreadores pasivos (Adaptación de Inês et al ⁷⁰).....	23
Figura 14. Especies de microalgas empleadas en los estudios de biodisponibilidad de metales: a) <i>Scenedesmus acutus</i> y b) <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	30
Figura 15. Celdas empleadas en la extracción de Cu (II) con PIM	31

Figura 16. Cinética de crecimiento celular de <i>S. acutus</i> (rectángulos) y <i>P. subcapitata</i> (cuadrados)	33
Figura 17. Cinéticas de extracción (internalización) de Cu (II) por: a) dispositivos de MLSFH y b) <i>S. acutus</i> y <i>P. subcapitata</i> (Donde int=internalizado).	35
Figura 18. Cantidad total de Cu (II) internalizado y gráficos de Pareto obtenido después del análisis del diseño experimental 2 ⁴ mostrado en la Tabla 2 para los dispositivos de MLSFH y microalgas. (Empleando las condiciones de extracción mostradas en la Tabla 3).	37
Figura 19. Cinética de extracción de Cu (II) por dispositivos de MLSFH sin/con la presencia de 12 mg/L de Ácidos Húmicos (AH).	38
Figura 20. a) Influencia de la concentración de AH en la extracción de Cu (II) por <i>S. acutus</i> , b) Cinética de extracción de Cu (II) con/sin la presencia de 12 mg/L de Ácidos Húmicos (AH).	39
Figura 21. Cantidad de Cu ²⁺ libre en la fase donadora en cada experimento (A-P) del diseño experimental 2 ⁴ de la Tabla 5, cuantificado por ESI de cobre (arriba) y diagrama de Pareto normalizado donde muestra la influencia de los diversos factores en la abundancia de Cu ²⁺ libre en la fase donadora (abajo).	40
Figura 22. Gráfica de correlaciones bivariadas de la cantidad de Cu (II) internalizado para los tres sistemas bajo estudio (MLSFH, <i>P. subcapitata</i> y <i>S. acutus</i>) y de la cantidad de Cu ²⁺ libre determinado por el ESI. ...	42
Figura 23. Influencia del pH sobre la cantidad de Cu (II) en (a) dispositivos de MLSFH y (b) microalgas (Donde int=internalizado)	43
Figura 24. Diagrama de abundancia relativa de las especies de Cu (II) presentes a distintos valores de pH. ([Cu (II)]=1E-05M, T=25°C, I= 0.01).	44
Figura 25. Influencia de 5 ligantes inorgánicos sobre la internalización de Cu (II) en a) dispositivos de MLSFH y b) <i>S. acutus</i> y <i>P. subcapitata</i> (Donde int=internalizado).	45
Figura 26. Cantidad de Cu ²⁺ libre bajo la presencia de 5 ligantes inorgánicos	45
Figura 28. Cinéticas de extracción (internalización) de Zn (II): a) dispositivos de MLSFH y b) <i>S. acutus</i> y <i>P. subcapitata</i>	48
Figura 29. Cantidad de Zn (II) internalizado y gráficos de Pareto obtenido después del análisis del diseño experimental 2 ⁴ mostrado en la Tabla 9 para los dispositivos de MLSFH y microalgas.....	51
Figura 30. Análisis de correlación de Pearson para la cantidad de Zn (II) internalizado del diseño experimental 2 ⁴ entre las microalgas y los dispositivos de MLSFH.....	54
Figura 31. Influencia individual del pH sobre la cantidad de Zn (II) internalizado por <i>P. subcapitata</i> , <i>S. acutus</i> y dispositivos de MLSFH (a); diagrama de abundancia relativa de especie para zinc a diferentes valores de pH (b)	56
Figura 32. Diagrama de abundancia relativa de las especies de Zn (II) presentes a distintos valores de pH ([Zn (II)]=1E-05M, T=25°C, I= 0.01).	56
Figure 33. Influencia individual de ligantes inorgánicos sobre la cantidad de Zn (II) internalizado por las dos especies de microalgas.....	57

Figure 34. Cinéticas de internalización de Zn (II) en los dispositivos de MLSFH bajo la presencia de ligantes inorgánicos (donde int=internalizado).....	58
Figure 35. Influencia de cationes metálicos sobre la cantidad de Zn (II) internalizado para las dos especies de microalgas y los dispositivos de MLSFH	60
Figura 36. Comportamiento de extracción de Cu (II) en las PIMs, empleando Kelex-100 como agente extractante (Donde KH= Kelex-100, ac=acuoso y mem= membrana)	62
Figura 37. Comportamiento de extracción de las membranas evaluadas en la Tabla 15 ([Cu (II)]= 1×10^{-5} M, [HCOOH]=0.01M, pHStrip=2.0, [MES]=0.01 M, pH feed=6.6).....	64
Figura 38. Apariencia física de las membranas con la composición química mostrada en la Tabla 15 (antes y después de la extracción)	64
Figura 39. Extracción de Cu (II) empleando a) 5% y b) 10% de agente extractante (Kelex-100) en la matriz polimérica.....	65
Figura 40. Plastificantes empleados en las PIM para la extracción de Cu (II).....	66
Figura 41. Influencia del tipo de Plastificante en la extracción de Cu (II).....	66
Figura 42. Influencia de la concentración de Kelex-100 sobre la extracción de Cu (II) empleando TEHP como agente plastificante. A) 10% de Kelex-100 y b) 5% de kelex-100	67
Figura 43. Influencia del pH y de la [HCOOH] en la eficiencia de extracción de Cu (II) por las PIM	68
Figura 44. Influencia de la cantidad de CTA en la eficiencia de extracción de Cu (II).....	69
Figura 45. Estudio de la estabilidad de las PIM por medio de la evaluación de 4 ciclos de extracción.....	70
Figura 46. Cinéticas de extracción de Cu (II) bajo la presencia de cationes metálicos concomitantes	71
Figura 47. a) Dispositivo empleado para la preconcentración de Cu (II) con PIMs y b) colocación del dispositivo en la fase donadora para la extracción del Cu (II)	72
Figura 48. Influencia del tipo de celdas empleadas en la cinética de extracción de Cu (II).....	73
Figura 49. a) Factor de Preconcentración (F) de Cu (II) obtenido al disminuir el volumen de la disolución aceptora, b) Fracción mol de Cu (II) en la fase donadora	74

Índice de Tablas

Tabla 1. Criterio de concentraciones máximas permisibles de metales pesados que no alteran la Vida acuática (EPA) ²¹	1
Tabla 2. Componentes del medio Bristol modificado ^{75, 76}	30
Tabla 3. Condiciones Optimizadas para la extracción de Cu (II)	34
Tabla 4. Flujos iniciales (J_0) y tiempo de muestreo determinados para MLSFH y microalgas por ajuste de la ecuación 11	35
Tabla 5. Diseño experimental 2^4 empleada para el estudio de la influencia de 4 factores en la cantidad de Cu (II) internalizado. Valores codificados y reales de las variables son indicadas	36
Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson obtenidos del análisis del diseño experimental 2^4 para Cu (II)	42
Tabla 7. Condiciones optimizadas para la extracción de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH	47
Tabla 8. Flujos iniciales (J_0) de Zn (II) y tiempo de muestro utilizados en los experimentos de internalización de Cu (II) por los dispositivos de MLSFH y las dos especies de microalgas.....	49
Tabla 9. Diseño experimental 2^4 empleado para estudiar la influencia de 4 factores en la cantidad de Zn (II) internalizado. Valores codificados y reales (paréntesis) de cada factor son mostrados.	50
Tabla 10. Análisis de especiación del diseño experimental presentado en la tabla 9, empleando el software CHEAQS. (Donde Cit=Citrato)	53
Tabla 11. Análisis de correlación bivarada de Pearson entre la cantidad retenida de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH o internalizada por los sistemas biológicos y la concentración de las diferentes especies químicas de zinc presentes en la solución donadora a pH= 5.5 y 9.9 del diseño experimental mostrado en la Tabla 9 (Donde Cit=Citrato).	53
Tabla 12. Coeficientes de correlación de Pearson obtenidos del análisis del diseño experimental 2^4 para Zn (II)	55
Tabla 13. Flujos iniciales y cantidad máxima internalizada de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH bajo la presencia de 5 Ligantes inorgánicos (donde $C_{int\ max}$ = máxima cantidad internalizada).	58
Tabla 14. Análisis de especiación de zinc bajo la presencia de 0.01 M de ligantes inorgánicos empleando el software Hydra-MEDUSA (pH solución de alimentación=6.6, $[Zn (II)]=10^{-5}$ M), donde ac=acuoso.....	59
Tabla 15. Composición de las membranas estudiadas (modificando concentración de Kelex-100 y NPOE)	63
Tabla 16. Valores experimentales y calculados del Factor de preconcentración (F), Eficiencia de extracción (E) y Recuperación (R). Donde exp=experimental y cal=calculado.....	74

Abreviaturas

22DD	1,10-Didecil-1,10-diaza-18-corona-6 éter
ANOVA	Análisis de varianza
BLM	Modelo del Ligante Biótico
CE-50	Concentración Efectiva 50
CL-50	Concentración letal 50
CMC	Criterio máximo de concentración
CTA	Triacetato de Celulosa
D2EHPA	Ácido di (2-etilhexil) fosfórico
DGT	Gradiente de difusión en película delgada
DMP	Dimetilftalato
EDTA	Ácido etiléndiamintetracético
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ESI	Electrodo selectivo de iones
EUA	Estados Unidos de América
FIAM	Modelo de la actividad del ion libre
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
KELEX-100	7-(4-Etil-1-Metiloctil)-8-Hidroxiquinolina
KH	Kelex-100
ML	Membranas Líquidas
MLS	Membranas Líquidas Soportadas
MLSFH	Membranas Líquidas Soportadas de Fibra Hueca
NPOE	2-Nitrofenil Octil éter
PIM	Membranas Poliméricas de Inclusión
ppb	Partes por billón
PVC	Policloruro de vinilo
SED	Simple Equilibrium Diagrams
SMAVs	Valores agudos del promedio de las especies
TBEP	Tris (2-Butoxietil) fosfato
TEHP	Tris (2-etilhexil) fosfato
VRA	Voltamperometría de redisolución anódica

Resumen

La biodisponibilidad de Zn (II) y Cu (II), fue determinada usando un sistema de membrana líquida soportada de fibra hueca (MLSFH) y dos especies de microalgas (*Scenedesmus acutus* y *Pseudokirchneriella subcapitata*) como organismos biológicos de referencia. A través de un diseño experimental 2^4 , se determinó y comparó la influencia de diferentes factores en la biodisponibilidad de ambos metales en aguas sintéticas. Algunos de estos factores evaluados fueron: presencia de materia orgánica, ligantes inorgánicos, cationes metálicos concomitantes y pH del medio acuoso.

El análisis del diseño experimental mostró que el pH en la solución acuosa (donadora) fue el factor principal que modificó significativamente la biodisponibilidad de Cu (II) y Zn (II) en los sistemas biológicos y en los dispositivos de MLSFH; el aumento del pH en el rango de 5.5 a 9.0, disminuyó significativamente la biodisponibilidad de Cu (II) por la especie *S.acutus* y el sistema químico, sin embargo, contrario a lo observado para este metal, la biodisponibilidad de Zn (II) aumentó significativamente con el incremento del pH, tanto en los sistemas biológicos como en el dispositivo de MLSFH. Esta diferencia observada se atribuyó a la posible presencia de otras especies metálicas biodisponibles como el $ZnOH^+$.

La presencia de citrato en la fase acuosa, disminuyó significativamente la biodisponibilidad de Cu (II) y de Zn (II) en las dos especies de microalgas evaluadas, mientras que la presencia de materia orgánica, como los ácidos húmicos redujo la biodisponibilidad únicamente para Cu (II).

El estudio de la influencia de ligantes inorgánicos en la internalización de estos cationes metálicos, reveló que los iones carbonatos y fosfatos deben de ser considerados en los estudios de biodisponibilidad de Cu (II), así como la presencia de los aniones sulfatos y fosfatos en la evaluación de la biodisponibilidad de Zn (II), debido a que estos ligantes disminuyen significativamente la cantidad de metal internalizado.

A través de un análisis de correlación entre los sistemas biológicos o químicos y la especie libre de Cu^{2+} , fue posible encontrar una alta dependencia de esta especie con la biodisponibilidad del metal en la especie *S. acutus* y en los dispositivos de MLSFH en todos los experimentos realizados, el cual, de acuerdo al modelo de la actividad del ion libre, esta especie metálica resulta ser la más tóxica de todas. Sin embargo, un análisis de especiación de Zn (II) en las aguas sintéticas mostró que a pH=9.0, tanto la especie libre como especies lábiles tienen una contribución importante en la internalización de este metal, mientras que a pH=5.5, la especie libre es la que contribuye principalmente en su internalización.

Con el objetivo de desarrollar un muestreador pasivo y selectivo para cobre empleando como agente extractante al compuesto comercial 7-(4-Etil-1-Metiloctil)-8-Hidroxiquinolina (Kelex-100), se desarrolló y optimizó una membrana polimérica de inclusión (PIM por sus siglas en inglés), la cual, es considerada como otro tipo de membrana líquida, cuya composición no solo favorece la estabilidad de la membrana, sino que también puede incrementar enormemente la selectividad del metal. Se estudió la influencia de diferentes factores en la eficiencia de extracción de cobre, como son: tipo de agente plastificante, concentración de agente extractante, pH de la solución aceptora y concentración de ligante en la fase aceptora. Como resultados se obtuvieron altas

eficiencias de extracción de cobre (~97%) con la disminución del pH en la fase aceptora, el empleo de Tris (2-etilhexil) fosfato (TEHP por sus siglas en inglés) como agente plastificante y la reducción de la concentración de Kelex-100 en la matriz polimérica. Con respecto a los estudios de estabilidad y selectividad, estas membranas mostraron ser estables en el tercer ciclo de uso y selectivas bajo la presencia de Fe (II), Zn (II) y Cd (II). Además, se alcanzaron factores de preconcentración de 31 con la reducción del volumen de la fase aceptora. Estos resultados muestran que es posible emplear a las PIMs como un nuevo método para la preconcentración selectiva de Cu (II) sin la alteración de la composición química del medio acuoso bajo estudio.

Abstract

Zn (II) and Cu (II) bioavailability was determined through the use of a hollow fiber supported Liquid membrane (HFSLM) as a chemical surrogate and two microalgae species (*Scenedesmus acutus* y *Pseudokirchneriella subcapitata*) as biological-references. Through the use of a 2⁴ experimental design it was possible to study and compare the influence of various factors on the bioavailability of these heavy metals in synthetic waters. Some of these factors were: presence of organic matter, inorganic ligands, concomitants metal cations and pH of the aqueous feed solution. The experimental design analysis shown that the pH in the feed solution was the more significant factor on the bioavailability of Cu (II) and Zn (II) in the biological microorganisms and the chemical surrogate. An increase in the bioavailability of Zn (II) was observed with the augment of pH (5.5 to 9.0) in the feed solution, but, on the other hand, the bioavailability of Cu (II) decreased with the increase of this factor. A possible explanation for this behavior was attributed to the presence of others bioavailable species as the ZnOH⁺ species.

The presence of citrate in the aqueous medium decreased the bioavailable fraction of Cu (II) and Zn (II) in both microalgae species; however, high concentrations of humic acids diminished the bioavailability of Cu (II) but not for Zn (II). Concerning to the influence of inorganic ligands, this study showed that it is necessary to consider the presence of carbonates and phosphates to evaluate the bioavailability of Cu (II), as well as, the presence of sulfates and phosphates to study the bioavailability of Zn (II), because these ligands decrease significantly the amount of internalized metal.

A high dependency of free copper concentration with the bioavailability was found through the use of correlation analysis between the free species and the bioavailability of this metal in the biological systems and the chemical surrogate, in accordance with the free ion activity model (FIAM), which argues that the free metal is the most toxic species in the aquatic systems. A speciation analysis of Zn (II) of the experimental design 2⁴ shown a high dependence of free species buffered at pH=5.5, however a significant contribution of labile species was observed at pH=9.0.

Another type of liquid membrane, known as polymer inclusion membrane (PIM) was optimized for the selective extraction of Cu (II) using 7-(4-Etil-1-Metiloctil)-8-Hidroxiquinolina (kelex-100) as carrier. Different factors were evaluated, such as: kind of plasticizer, carrier concentration, pH and ligand concentration in the strip solution. High extraction efficiency (97%) was obtained with the decrease in pH of the strip solution, Tris (2-ethylhexyl) phosphate (TEHP) as plasticizer and low concentration of kelex-100 in the polymeric matrix.

These membranes were stable over three functioning cycles and were selective under the presence of Fe (II), Zn (II) and Cd (II). In addition, the membranes achieve enrichments factor of 31 with the reduction of the volume in the strip solution. All these results obtained allow the use of this PIM as a new method to preconcentrate Cu (II) without the modification of the aqueous composition medium

Introducción

Aunque no se tiene una clara definición del término “biodisponibilidad” de contaminantes químicos en la evaluación de riesgos humanos y ecológicos, este término es usado para indicar que en muchas ocasiones no todas las especies químicas presentes en los diferentes medios naturales (como agua y suelo) contribuyen en la toxicidad sobre distintos organismos biológicos¹. De acuerdo a la IUPAC la biodisponibilidad se puede definir como la capacidad que tiene una sustancia de ser tomada por un organismo y atravesar su membrana biológica. Este nuevo parámetro de estudio en medios naturales como índice de contaminación ambiental está cobrando cada vez mayor relevancia en distintos países de la comunidad Europea y en EUA, donde se comienzan a desarrollar programas de investigación para evaluarlo^{2,3}. Algunos de los contaminantes de mayor estudio y con gran impacto ambiental son los metales pesados; aunque actualmente es posible evaluar la concentración total de estos contaminantes a nivel de ultratrazas en medios naturales, hasta la fecha son poco los métodos biológicos y químicos que se han empleado para determinar la biodisponibilidad de estos metales en medios acuosos; de entre los métodos biológicos empleados actualmente, los de mayor relevancia son los estudios de toxicidad o cantidad de metal internalizado en indicadores biológicos (truchas, moluscos, microalgas, etc.)⁴⁻⁶, mientras que de entre los métodos químicos los más empleados son: gradiente de difusión en película delgada (DGT por sus siglas en inglés)⁷, voltamperometrías de redisolución⁸ y recientemente sistemas de membrana líquida soportada (MLS)⁹. Este último método presenta una gran ventaja con respecto a los demás métodos, debido a su fácil manipulación, corto tiempo de análisis, alta selectividad, posibilidad de automatización, aplicación en tiempo real, aplicación a un amplio rango de metales y altos factores de preconcentración¹⁰. Además de que estos métodos pueden ser empleados para análisis *in situ*, se ha demostrado que las membranas líquidas presentan la característica de emular la respuesta biológica de bio-toma de cationes metálicos en ambientes acuosos, y de distinguir la presencia de determinadas especies metálicas (libres, lábiles e inertes)⁸, lo cual, ha permitido el reciente empleo de este tipo de sistemas de membranas como método para evaluar la biodisponibilidad y especiación de metales en sistemas biológicos como las microalgas¹¹.

Aunque el cobre y el zinc son elementos esenciales para la vida, debido a que ambos juegan un papel importante en el crecimiento, metabolismo y actividad enzimática, se han observado efectos tóxicos en algunos organismos biológicos sensibles, como las microalgas, a concentraciones tan bajas como 4 mg/L para el caso de Cu (II) y de 10 mg/L para Zn (II)^{12,13}. Debido a la importancia que tienen estos microorganismos en ambientes acuáticos, es una prioridad en el análisis ambiental, el desarrollo de métodos analíticos capaces de predecir la biodisponibilidad de estos compuestos bajo determinadas condiciones químicas del sistema acuoso.

En este trabajo se realizó una comparación del comportamiento de la internalización de Zn (II) y Cu (II) usando un sistema de membranas líquidas soportadas como muestreadores pasivos y dos especies de microalgas como sistemas biológicos de referencia (*S. acutus* y *P. subcapitata*). Debido a que la especiación y la biodisponibilidad de metales es influenciada por una gran variedad de factores ambientales, se empleó un diseño experimental 2⁴, donde se evaluó el efecto de estas variables y sus interacciones sobre la biodisponibilidad de zinc y cobre. Algunos

de estos factores estudiados fueron: pH del medio acuoso, dureza del medio acuoso (presencia de CaCO_3), materia orgánica disuelta (ácidos húmicos) y presencia de diversos ligantes complejantes (citrato y aniones inorgánicos diversos). Este estudio es una de las primeras comparaciones de un sistema químico y dos referencias biológicas para la determinación de la biodisponibilidad de zinc y cobre en medios acuosos complejos, empleando una aproximación multivariable que emula a los sistemas acuosos naturales.

El agente extractante Kelex-100 (7-(4-Etil-1-metiloctil)-8-hidroxiquinolina) es una quinolina capaz de formar complejos estables con una gran variedad de cationes metálicos, sin embargo, se ha demostrado que es posible realizar una extracción selectiva de algunos metales, variando las condiciones de extracción¹⁴, además de esto, se ha encontrado que es posible preconcentrar el metal en los dispositivos de membranas líquidas en varios órdenes de magnitud empleando este agente extractante (cientos a miles de veces)¹⁵, lo cual permitiría una determinación selectiva del metal a bajas concentraciones (ppb).

Debido a las propiedades de las membranas poliméricas de inclusión (PIM por sus siglas en inglés), como son su alta estabilidad y selectividad, en este trabajo se desarrolló y optimizó una nueva PIM empleando este agente extractante para la extracción selectiva de Cu (II), con el objetivo de que pueda ser empleado como un nuevo método para la preconcentración y el análisis de este metal en medios acuosos.

Dedicado a

A Jehová Dios por ser mi roca fuerte en los momentos difíciles

A mi esposa Michelle y a mi hija Amanda por todo su cariño y alegría que han traído a mi vida

A mis padres Raúl y Catalina por continuar conmigo a pesar de las adversidades y la distancia que nos separa

A mis hermanos Raúl, Ramón y Adán quienes siempre llevo en el corazón y son mi inspiración para seguir superándome

“El Don del poder mental, proviene de Dios, el ser divino, y si concentramos nuestras mentes en la verdad, estaremos en sintonía con este gran poder”.

Nikolas Tesla

1. Antecedentes

1.1 Metales pesados y medio ambiente

Los metales pesados son definidos como elementos metálicos que tienen una alta densidad relativa comparada con el agua (5 g/cm^3)¹⁶, sin embargo, una de las principales propiedades de estos elementos es su elevada toxicidad o ecotoxicidad. Recientemente, ha crecido el interés en la evaluación de riesgos ecológicos provocado por algunas de estas especies metálicas presentes en medios naturales (p. ej. suelo y agua), de entre los cuales se encuentran principalmente: Hg, Cd, Pb, Cr (Hexavalente), Co, Ni, Cu y Zn, así como el arsénico (As), el cual es un metaloide¹⁷⁻²⁰.

Aunque en los sistemas naturales es común encontrar trazas de estos elementos, la actividad antropogénica ha liberado en los diversos ecosistemas una gran cantidad de especies metálicas que pueden o no resultar tóxicas a diversos organismos biológicos, y no únicamente a los seres humanos; debido a esto, la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) ha establecido un criterio de concentraciones máximas permitidas de diversos contaminantes químicos, en la cual, aparentemente no debe de existir un riesgo tóxico significativo en la mayoría de las especies biológicas presentes en los sistemas acuáticos (**Tabla 1**)²¹. Sin embargo, como se demuestra en algunos estudios de impacto ambiental realizado a diversas especies metálicas; la captación y toxicidad de los metales pesados por los organismos acuáticos no sólo está influenciada por su concentración, sino también por el tiempo de exposición, así como por factores bióticos y abióticos del ambiente.

Tabla 1. Criterio de concentraciones máximas permisibles de metales pesados que no alteran la Vida acuática (EPA)²¹

Metal	Agua dulce		Agua salada	
	µg/L	M	µg/L	M
Arsénico	340	4.5E-06	69	9.2E-07
Cadmio	1.8	1.6E-08	33	2.9E-07
Cromo (VI)	16	3.1E-07	1100	2.1E-05
Cobre	2.337	3.7E-08	4.8	7.6E-08
Plomo	65	3.1E-07	210	1.0E-06
Mercurio	1.4	7.0E-09	1.8	9.0E-09
Níquel	470	8.0E-06	74	1.3E-06
Zinc	120	1.8E-06	90	1.4E-06

La evaluación del riesgo ambiental de contaminantes metálicos es un tema difícil de estudiar, debido a que estos elementos y sus derivados tienen características únicas que tienen que ser consideradas cuando se evalúa este parámetro. Un ejemplo de esto es que muchas de estas especies metálicas tienden a reaccionar químicamente con diversos compuestos presentes en los sistemas naturales, e incluso pueden ser metabolizados por sistemas biológicos, dando lugar a otras especies químicas que pueden resultar más tóxicas o menos tóxicas que la especie de la cual se originaron (p. ej. Metilmercurio²²). Es por eso que es necesario el desarrollo de técnicas analíticas que no sólo nos permitan estudios de especiación química, sino que también logren predecir la biodisponibilidad o toxicidad de estas formas químicas en la mayoría de los organismos acuáticos.

Debido a que existen una gran variedad de estudios toxicológicos de estos elementos metálicos en diversos sistemas biológicos, lo cual, resultaría imposible de resumir para cada metal pesado, en este trabajo nos centraremos únicamente en cobre y zinc, los cuales son nuestros elementos de estudio.

1.1.1 Cobre en ambientes acuosos

Este elemento es encontrado en ambientes acuáticos de forma natural y por actividad antropogénica; de entre las principales fuentes naturales de cobre se encuentran: depósitos geológicos, actividad volcánica y erosión de rocas y suelos, mientras que las fuentes antropogénicas son principalmente: minería, agricultura, manufactura eléctrica, pesticidas, etc.²³. De acuerdo a Bowen et al.²⁴, es posible encontrar concentraciones naturales de cobre que van desde 0.03 a 0.23 µg/L (4.7E-10 a 3.6E-09 M) en agua marina y de 0.2 a 30 µg/L (3.1E-09 a 4.7E-07 M) en agua dulce. Sin embargo, López et al.²⁵ y Nriagu et al.²⁶ et al., reportan concentraciones de 100 µg/L (1.6E-06 M) en sitios con alta actividad antropogénica, mientras que en zonas mineras, Davis y Ashenberg²⁷ reportan concentraciones tan altas como 200, 000 µg/L (3.1E-03 M) de cobre.

La actividad tóxica de este metal depende de varios factores fisicoquímicos tales como: temperatura, compuestos orgánicos disueltos, partículas suspendidas, pH, así como la presencia de varios cationes y aniones inorgánicos, incluyendo compuestos que le proporcionan dureza al agua (p. ej. Mg y Ca), de los cuales la mayoría de ellos influyen en la especiación de este metal y por lo tanto en su toxicidad^{28,29}.

Debido a que todos estos factores fisicoquímicos son importantes para el estudio de la toxicidad de metales, se han desarrollado modelos para predecir la toxicidad de diversos cationes metálicos bajo determinadas condiciones ambientales, entre ellos, principalmente encontramos: el modelo del ligante Biótico (BLM por sus siglas en inglés)^{30,31} y el modelo de la actividad del ion libre (FIAM por sus siglas en inglés)³², los cuales como mencionaremos más adelante, tratan de predecir la toxicidad de diversos cationes metálicos a través del estudio de la química en disolución acuosa. La EPA por medio del modelo del ligando biótico ha establecido un criterio de concentraciones máximas permitidas de determinados contaminantes metálicos que en principio no tendrían un

efecto negativo en la vida de la mayoría de las especies acuáticas (que pueden incluir especies vertebradas o invertebradas e inclusive organismos unicelulares como las microalgas).

De acuerdo a la EPA la toxicidad de un metal se puede evaluar por medio de la Concentración letal 50 (CL50) normalizada a determinada dureza del medio acuoso para cada especie biológica, sin embargo, es posible promediar todas estas CL50 normalizadas para todas las especies biológicas involucradas para determinar los valores agudos del promedio de las especies (SMAVs por sus siglas en inglés), el cual, a su vez, puede hacerse específico para cada género.

Por medio de las CL50 se determinaron SMAVs en un rango de 2.37 $\mu\text{g/L}$ ($3.7\text{E-}08$ M) para las especies más sensibles (p.ej. *Daphnia magna*) a 107, 860 $\mu\text{g/L}$ ($1.7\text{E-}03$ M) para las especies menos sensible (p. ej. *Notemigonus crysoleucas*)²¹.

Por medio del modelo del ligando biótico también es posible establecer el criterio máximo de concentración (CMC), que se puede definir como la concentración más alta de un químico en el agua a la cual la mayoría de los organismos acuáticos pueden ser expuestos sin causarles un efecto adverso. Empleando este modelo, la EPA determinó una CMC de 2.337 $\mu\text{g/L}$ ($3.7\text{E-}08$ M) de cobre en agua dulce y de 4.8 $\mu\text{g/L}$ ($7.6\text{E-}08$ M) para agua salada (**Tabla 1**).

Con respecto a los estudios de toxicidad de cobre sobre diversas especies de microalgas (que se caracterizan por ser altamente sensibles a contaminantes metálicos) se han reportado concentraciones efectivas 50 (CE50) que van desde 40 hasta 400 $\mu\text{g/L}$ ($6.3\text{E-}07$ M a $6.3\text{E-}06$ M) para *P. subcapitata*, observándose efectos significativos sobre las células, como son: disminución de la densidad celular y volumen celular, principalmente²³. Mientras que los estudios de toxicidad para las especies de *S. acutus* han mostrado una reducción del crecimiento celular a partir de concentraciones de 630 $\mu\text{g/L}$ ($9.9\text{E-}06$ M)³³.

1.1.2 Zinc en ambientes acuosos

Al igual que el cobre, el zinc pertenece al grupo de elementos esenciales para los organismos vivos, sin embargo, ambos metales pueden resultar ser tóxicos en organismos acuáticos a concentraciones mucho más altas que las requeridas por estos sistemas, produciendo alteraciones en la reproducción, actividad enzimática, metabolismo e inclusive la muerte³⁴.

El zinc y el cobre son algunos de los metales que se emplean en mayor cantidad para consumo humano en comparación al Cadmio o el Plomo (**Figura 1**); la producción minera de zinc a nivel global en el año 2015 fue de 13.4 billones de toneladas, México produjo alrededor de 660 millones de toneladas de este metal, siendo uno de los mayores productores de zinc en América Latina³⁵.

De entre los principales usos de zinc se encuentran: galvanizado, aleaciones de zinc, latón y bronce, principalmente. Compuestos de zinc son usados principalmente en la agricultura, productos químicos, pintura e industria del caucho. Aunque no se tiene un estimado del reciclaje de este metal a nivel mundial, en Estados Unidos de Norteamérica se considera que se recupera alrededor de un 37 % de este metal³⁵.

El zinc en forma natural es encontrado como sulfuro, óxido o carbonato, pero no en forma libre³⁶. Al igual que el cobre, la predicción de la toxicidad es complicada debido a que existen diversos factores fisicoquímicos en el medio acuoso que pueden influenciar en este parámetro, como es el caso de la dureza del agua. Sin embargo es posible establecer un rango de concentración tóxica (CL50) dependiente de la especie biológica, para el caso de pescado de agua dulce se han encontrado rangos que van de 93 a 35,500 $\mu\text{g/L}$ ($1.4\text{E-}06$ M a $5.4\text{E-}04$ M)^{36,37}. Sin embargo, la EPA estableció una concentración de 120 $\mu\text{g/L}$ ($1.8\text{E-}06$ M) en agua dulce y de 90 $\mu\text{g/L}$ ($1.4\text{E-}06$ M) para agua salada de acuerdo al criterio de máxima concentración (CMC) permisibles de metales pesados que no alteran la vida acuática para el caso de zinc (**Tabla 1**).

Para la microalga *P. subcapitata* se han encontrado efectos alguicidas a concentraciones de 700 $\mu\text{g/L}$ ($1.1\text{E-}05$ M) e inhibición del crecimiento en rangos que van desde 30 hasta 120 $\mu\text{g/L}$ ($4.6\text{E-}07$ M a $1.8\text{E-}06$ M)³⁶, en cambio para la especie *S. acutus* se han observado inhibición del crecimiento en rangos que van de 2, 500 a 5000 $\mu\text{g/L}$ ($3.8\text{E-}05$ M a $7.6\text{E-}05$ M)⁴.

Aunque ambos metales (Cu y Zn) resultan ser mucho menos tóxicos que otros de mayor relevancia ambiental (p.ej. Cd y Pb), la alta producción y liberación de ambos metales en ambientes naturales puede alterar significativamente la vida de una gran variedad de especies biológicas, lo cual puede desencadenar un grave problema ambiental, es por ello, que es necesario tener un seguimiento adecuado de la presencia de estos elementos o sus derivados en sistemas naturales para tomar las medidas preventivas adecuadas en las zonas ambientales con alto riesgo ecológico.

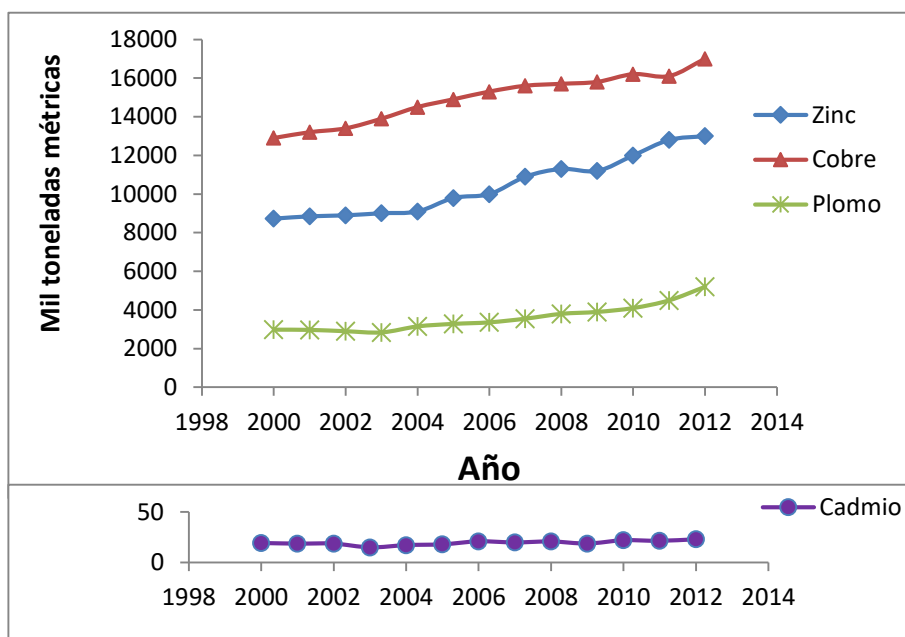


Figura 1. Producción mundial de zinc, cobre, cadmio y plomo desde el año 2000 hasta 2012³⁵

1.2 Biodisponibilidad y especiación de metales pesados

De acuerdo a la IUPAC, la biodisponibilidad se puede definir como la capacidad que tiene una sustancia de ser tomada por un organismo biológico y atravesar su membrana biológica.

El estudio de la biodisponibilidad de diversos contaminantes químicos es una excelente alternativa en la evaluación de riesgo ecológico en sistemas naturales, debido a que este parámetro nos indica con mayor confiabilidad el grado tóxico que puede presentar un determinado contaminante en algún ecosistema, en comparación a la cuantificación de la concentración total de metal en una columna de agua. Sin embargo, para una mejor determinación de este parámetro es necesario el empleo de métodos analíticos que nos permitan el estudio de las especies biodisponibles. En la actualidad solamente se han utilizado ampliamente dos tipos de sensores dinámicos para la especiación y biodisponibilidad de metales, uno de ellos consiste en la preconcentración del metal por medio del empleo de resinas de intercambio iónico, conocido como gradiente de difusión en películas delgadas de gel (o DGT por sus siglas en inglés) y el otro consiste en el empleo de microelectrodos de gel integrado combinado a sistemas voltamperométricos o cronopotenciometría de redisolución. En este trabajo se propone el empleo de los sistemas de membranas líquidas como una alternativa a los estudios de especiación y biodisponibilidad de metales.

1.2.1 Mecanismo de bio-captación (biouptake) de metales por organismos biológicos

Como mencionamos anteriormente, en aguas naturales, la biodisponibilidad de metales está relacionada a su capacidad para cruzar la barrera biológica (p.ej. membranas plasmáticas), y puede ser predicha por medio de la concentración o flujo del metal internalizado, sin embargo, el proceso de bio-captación (biouptake en inglés) no solamente depende de la ruta de internalización, sino también de los diversos factores fisicoquímicos que están presentes en los diferentes sistemas ambientales, como por ejemplo: pH, dureza del agua (CaCO_3), presencia de ligantes orgánicos e inorgánicos, etc.^{38,39}, así como también del tamaño y naturaleza del microorganismo.

De acuerdo a Worms et al.⁴⁰, para el estudio de la biodisponibilidad de metales en ambientes acuáticos por organismos biológicos es necesario tomar en cuenta 3 etapas principales en el proceso de bio-captación: el comportamiento de las especies metálicas durante su transporte desde el medio acuoso a la interface biológica, el transporte de las especies químicas a través de la membrana biológica y por último el papel de los organismos en la modificación química y biológica de los procesos de bio-captación como mecanismo de defensa celular.

En la **Figura 2**, se muestran estas principales etapas descritas por Worms et al.⁴⁰ que deben tomarse en cuenta en el proceso de bio-captación de metales por los organismos biológicos en ambientes acuosos, y que pueden ser descritas de la siguiente manera:

1. La primera etapa involucra al proceso de difusión de las especies metálicas desde el medio externo a la superficie del organismo, en la que se pueden llevar a cabo una gran variedad de reacciones químicas con los diversos ligantes presentes en el medio acuoso; estas reacciones químicas pueden dar lugar a dos tipos de complejos: inertes o lábiles. En el primero, las velocidades de interconversión entre el metal (M) y el complejo (M-L) son pequeñas, mientras que, en los complejos inertes, las velocidades de asociación y disociación son rápidas; estas velocidades de disociación modifican significativamente la internalización de metal.
2. En la segunda etapa de bio-captación, los metales pueden reaccionar con un sitio activo presente en la membrana biológica (adsorción/desorción), seguido por el transporte del metal a través de la membrana biológica hasta llegar al interior celular (o proceso de internalización); este etapa de internalización es el paso clave en el proceso total de bio-captación de metales, el cual puede llevarse a cabo por difusión pasiva o mediada por proteínas específicas (por ejemplo, metaloproteínas). En el primer tipo de difusión, únicamente moléculas neutras o no polares pueden ser internalizadas, mientras que, en el segundo tipo de difusión pueden ser transportadas especies hidrofílicas; estas últimas, en la mayoría de los casos resultan ser las de mayor relevancia ambiental.
3. La etapa 3 consiste en los mecanismos de protección de los organismos contra agentes externos, entre los cuales incluyen: la secuestación o enlace intracelular por agentes metal-complejantes, el transporte de metales a compartimentos celulares (p.ej. vacuolas), mecanismos de eflujo y secuestación extracelular. En la secuestación intracelular varias clases de agentes quelantes metálicos intracelulares pueden participar, tales como: glutatión, aminoácidos, fitoquelatinas, metalotioninas, ácidos orgánicos y tiorredoxinas, que una vez unidos al metal pueden facilitar los mecanismos de desintoxicación. Una vez secuestrados o acomplejados los metales, éstos pueden ser almacenados en compartimentos como las vacuolas o cloroplastos por medio de proteínas transportadoras. El segundo método de protección de agentes externos es el eflujo, en el cual los organismos exportan los metales tóxicos desde su citoplasma al espacio extracelular por medio de bombas de expulsión (proteínas). Por último, los microorganismos pueden también excretar compuestos que pueden acomplejarse con iones metálicos en el medio extracelular para reducir su biodisponibilidad.

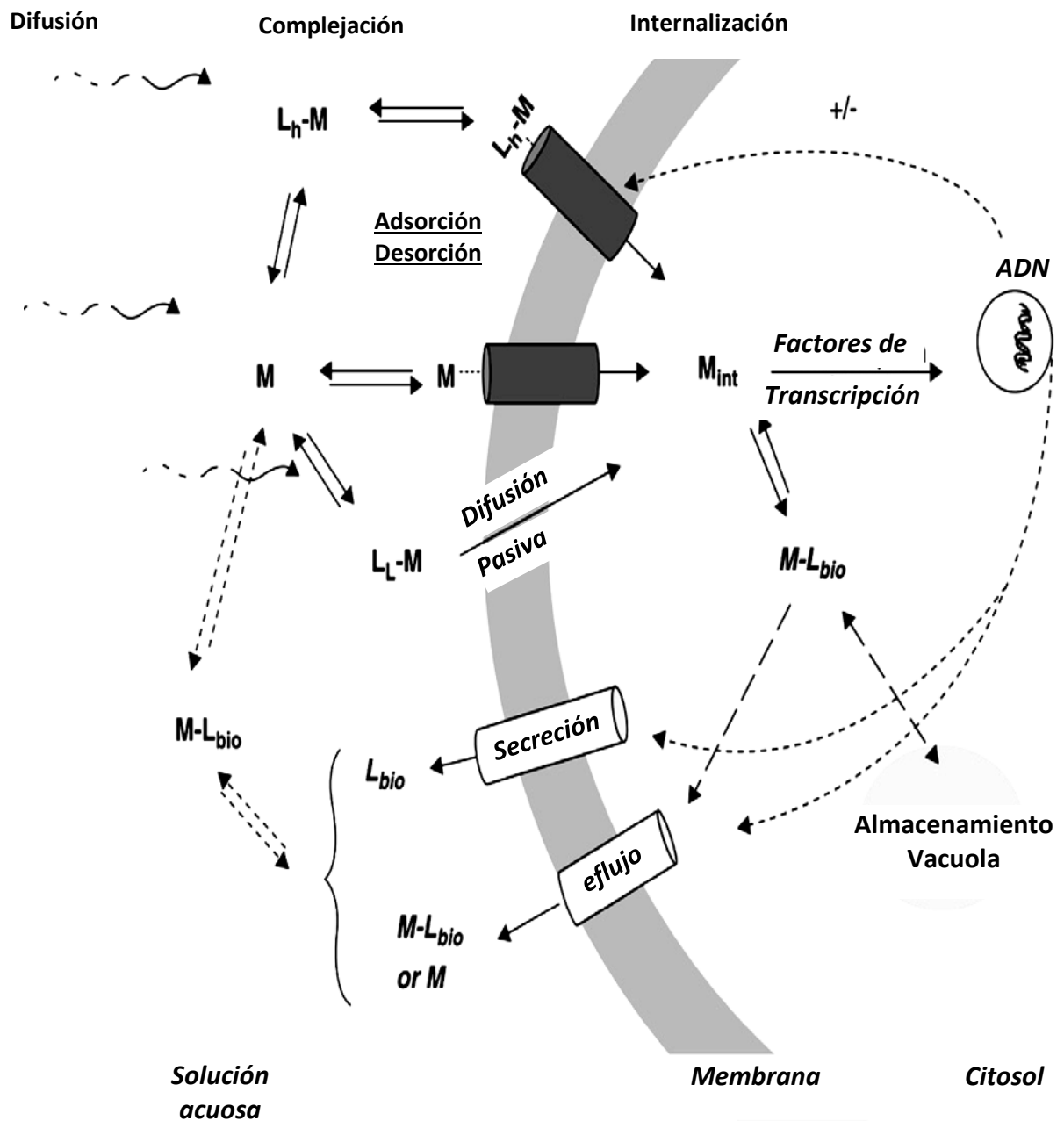


Figura 2. Modelo conceptual de algunos procesos fisicoquímicos involucrados en la toma de metales por microorganismos (Donde L = Ligantes, M = metal), los sufijos (L = lipofílico, h =hidrofílico, bio =biológico e int =internalizado) * (Adaptación de Worms, et al.⁴⁰).

1.2.2 Métodos principales empleados para la determinación de la toxicidad o biodisponibilidad de metales pesados

Aunque estrictamente la definición de toxicidad y biodisponibilidad son distintos, ambos conceptos tienen en común la evaluación de los riesgos ecológicos ocasionados por los diferentes contaminantes químicos presentes en los sistemas ambientales. Es por ello que la determinación de estos dos parámetros o alguno de ellos nos permiten un análisis mucho más preciso del posible efecto desfavorable de estos contaminantes sobre los diferentes organismos biológicos. De acuerdo a la literatura, los métodos principales para la determinación de la toxicidad y la biodisponibilidad de los metales se pueden dividir en tres tipos: métodos biológicos, métodos químicos y modelos teóricos.

1.2.2.1 Métodos biológicos para el estudio de la toxicidad y biodisponibilidad de metales

Este primer método consiste en el empleo de indicadores biológicos, los cuales son organismos con características específicas, cuya sensibilidad o toxicidad al metal puede ser demostrada por cambios significativos en su comportamiento, reproducción, crecimiento e inclusive por la alteración en la producción de algún compuesto químico vital para el organismo (p.ej. la clorofila). Aunque la principal ventaja de este método es el estudio directo con un sistema biológico real (indicador biológico) y, por lo tanto, de la evaluación directa del efecto tóxico del contaminante, de entre sus principales desventajas se encuentran: el amplio tiempo invertido en el análisis y la poca especificidad hacia otros contaminantes presentes en el ambiente, así como también la variabilidad del efecto tóxico de un contaminante en distintas especies biológicas. Entre los principales indicadores biológicos empleados para estudios de toxicidad de metales se encuentran diversas especies de peces (p.ej. truchas), crustáceos (p.ej. *Daphnia magna*) y organismos unicelulares como las microalgas (p. ej. *P. subcapitata*)^{41- 43}.

Una de las formas de cuantificar el efecto tóxico de los diversos metales en organismo biológicos es a través de la determinación de la concentración letal-50 (CL-50), que se refiere a la concentración de compuesto que induce la muerte del 50% de la población, sin embargo, existen otras formas de evaluar este parámetro como la concentración efectiva media (CE-50), la cual representa un efecto específico no letal para los organismos pero que es necesario para su supervivencia (p.ej. movilidad).

Como mencionamos anteriormente, aunque estrictamente la toxicidad no es lo mismo que la biodisponibilidad, debido a que pueden existir compuestos que son biodisponibles, pero no tóxicos, generalmente se relacionan ambos conceptos, debido a que la mayoría de los metales pesados que llegan a internalizarse tienen un efecto tóxico a determinadas concentraciones en los sistemas biológicos.

Franklin et al.^{12,44} estudiaron la relación que existe entre la toxicidad y biodisponibilidad de cobre sobre dos especies de microalgas, *P. subcapitata* y *Chlorella sp.*, por medio de la cuantificación del cobre internalizado en las especies de microalgas. Determinaron que efectivamente, la

toxicidad es dependiente de la cantidad de cobre extracelular y consecuentemente de la cantidad de cobre intracelular.

Recientemente se han empleado ciertas bacterias (p. e. *A. fischeri*) modificadas genéticamente que bajo la presencia de diferentes contaminantes metálicos se activa el gen que expresa luminiscencia, el cual permite determinar la biodisponibilidad y el grado de toxicidad de algunos metales pesados⁴⁵.

1.2.2.2 Métodos químicos para el estudio de especiación y biodisponibilidad de metales

De acuerdo a publicaciones recientes, los métodos químicos de mayor relevancia para estudios de especiación y biodisponibilidad son principalmente: gradiente de difusión en película delgada (DGT por sus siglas en inglés)^{46, 47} y métodos voltamperométricos⁴⁸; el primero de estos métodos consiste en el empleo de una resina de intercambio iónico (Chelex-100) para la extracción del catión metálico y una capa de hidrogel de poliacrilamida, cuya función principal de esta capa de hidrogel es la de permear por tamaño los iones presentes en el medio acuoso, así como también la modificación del grosor de la capa de interface resina y solución acuosa⁴⁹. Estas características confieren al sistema independencia con respecto a la velocidad de flujo y al pH del medio acuoso en estudio, además de que es posible su aplicación *in situ*; cabe señalar que ya existen en el mercado dispositivos que se emplean para estudios de especiación y biodisponibilidad de cationes metálicos en medios acuosos (**Figura 3**). A diferencia de los métodos biológicos, con estos dispositivos es posible hacer análisis de especiación, distinguiendo principalmente tres tipos de especies químicas presentes en el medio acuoso, los complejos inertes, lábiles y las especies libres^{7, 50}. Los complejos (M-L) son llamados lábiles, no-lábiles o inertes, respectivamente, cuando las reacciones de formación/disociación de ML son muy rápidas (complejos lábiles) o lentas (complejos no lábiles) comparadas con la difusión, sin embargo, cuando la disociación no ocurre a estos complejos se les conoce como inertes. La importancia del estudio de estas especies a nivel ambiental es debida al tipo de interacción que tiene con la membrana biológica, la cual se puede describir de la siguiente manera⁴⁸:

- Especies libres: únicamente pueden pasar a través de la membrana por medio un transportador.
- Complejos lábiles hidrofílicos: en este tipo de complejos la velocidad de disociación es rápida, lo cual permite que el catión metálico puede pasar a través de la membrana después de disociarse y unirse al transportador.
- Complejos inertes lipofílicos: en este tipo de complejos la velocidad de disociación es muy lenta, y por lo tanto su interacción con los transportadores de membrana es baja, sin embargo, algunos de estos complejos metálicos pueden atravesar la membrana por medio de difusión pasiva.

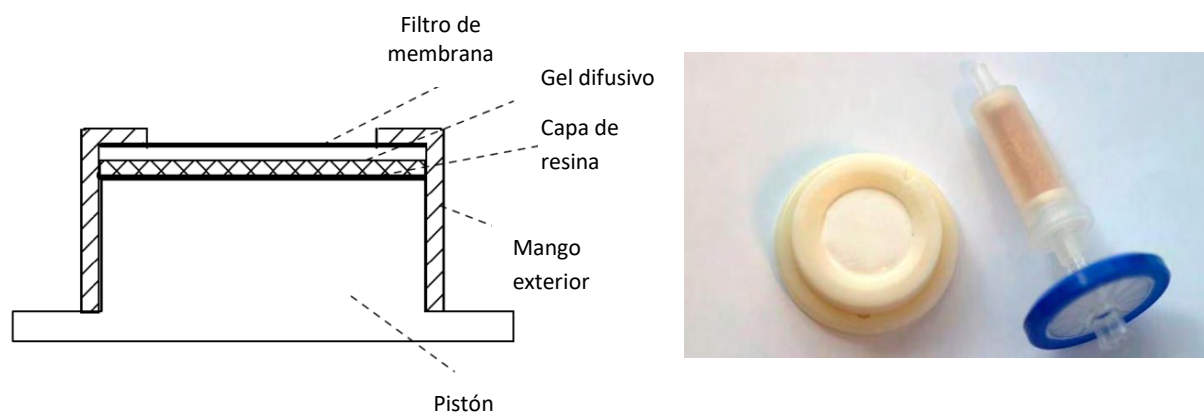


Figura 3. a) Composición de los dispositivos DGT e b) imagen real de un dispositivo DGT

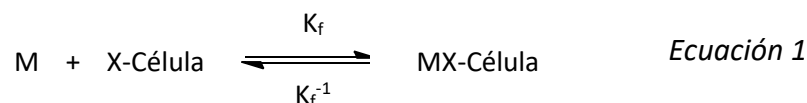
El segundo método hace uso de una reacción electroquímica en la cual un determinado catión metálico es reducido a determinado potencial eléctrico y acumulado dentro del electrodo; la corriente de reducción deriva de los flujos del ion metálico libre y de los complejos dinámicos⁸. Por medio de este método es posible determinar la concentración de las especies presentes en el medio acuoso y en particular las especies libres y lábiles que tienen una influencia directa en la toxicidad. Un ejemplo de este método es la voltamperometría de redisolución anódica (VRA)⁴⁸.

Recientemente el estudio de membranas líquidas como método de preconcentración, especiación y biodisponibilidad ha adquirido una gran importancia, debido a su alto potencial como sensores de metales o compuestos orgánicos. Se ha revisado una gran variedad de publicaciones acerca del tema, que se resumen en los siguientes capítulos.

1.2.2.3 Modelos teóricos para la determinación de la especiación y biodisponibilidad

En la actualidad existen programas computacionales que pueden predecir la toxicidad de determinados metales presentes en diversos medios acuosos para un bioindicador en particular, sin embargo, para hacer esta predicción se han empleado principalmente dos modelos para describir la interacción de las membranas biológicas con distintas especies metálicas presentes en medios acuosos: el modelo de la actividad del ion libre (FIAM por sus siglas en inglés), desarrollado por Morel et al.^{51,52} y el modelo del ligando biótico (BLM por sus siglas en inglés)⁵³.

El modelo de la actividad del ion libre (FIAM) se desarrolla a través del concepto de equilibrio químico entre un catión metálico (M) y un receptor biológico (X-Célula), el cual puede tratarse como un equilibrio de formación del complejo (M-X-Célula), Ecuación 1.



Sin embargo, la constante de equilibrio de formación de este complejo se considera como una constante de formación condicional del complejo metálico con los sitios activos presentes en la

membrana biológica (K_f), la cual permite representar la actividad del complejo superficial {M-X-Célula} por medio de la siguiente expresión:

$$\{M-X-Célula\} = K_f \{X-Célula\} [M] \quad \text{Ecuación 2}$$

En este modelo se considera que se establece un equilibrio rápido entre la especie metálica en el medio acuoso y los sitios activos en la membrana biológica (X-Célula), lo cual hace posible establecer una relación proporcional entre la respuesta biológica (internalización, toxicidad o flujo de internalización) y la actividad del complejo superficial {M-X-Célula} por medio de la Ecuación 3³².

$$RB = k_{int} K_f \{X - Célula\} [M] \quad \text{Ecuación 3}$$

Esta ecuación considera que la respuesta biológica (RB) es dependiente de la concentración de transportadores (sitios activos) en la superficie de la membrana ({X-Célula}) y de la concentración de metal libre presente en la fase acuosa ([M]), donde k_{int} se refiere a la constante de internalización del metal.

El segundo modelo, el modelo del ligando biótico (BLM), es muy semejante matemáticamente al modelo de la actividad del ion libre (FIAM), debido a que ambos modelos asumen que los iones metálicos libres, sus complejos en solución y sus complejos con los sitios transportadores en el sistema biológico se encuentran en equilibrio, sin embargo, este segundo modelo se diferencia del FIAM debido a que considera que la respuesta biológica es directamente proporcional a la actividad del complejo Metal-Receptor biológico (M-X-Célula) en lugar de la especie libre (M), Ecuación 4³².

$$RB = k_{int} \{M - X - Célula\} \quad \text{Ecuación 4}$$

Es importante mencionar que en la actualidad existen programas (p. ej. BLM “software”) que hacen posible la predicción de la especiación y la posible toxicidad de estos metales en diversos tipos de organismos biológicos. Una de las principales desventajas del uso de estos “software” para la determinación de la toxicidad y especiación es la necesidad de la evaluación de una gran variedad de parámetros físicos y químicos en los sistemas bajo estudio para que el programa pueda calcular la especiación y predecir la toxicidad de los metales; algunos de estos parámetros son: Temperatura, pH, carbón orgánico disuelto, concentración de aniones y cationes, principalmente.

A pesar de que estos modelos pueden predecir con gran precisión la toxicidad de determinados cationes metálicos, otra desventaja que presentan estos modelos teóricos es que hasta el momento únicamente es posible hacerlo para determinados indicadores biológicos, además de que se han observado ciertas excepciones al modelo cuando se compara con sistemas biológicos reales.

1.3 Membranas líquidas y estudio de biodisponibilidad

1.3.1 Membranas líquidas

Las membranas líquidas (ML) han surgido como un nuevo método de separación de especies metálicas o diversos compuestos orgánicos e inorgánicos; el transporte que se presenta a través de ellas conlleva procesos de extracción líquida y separación de membrana⁵⁴. Estos sistemas están constituidos principalmente por dos fases homogéneas (líquidos completamente miscibles) conocidos como fase donadora y fase aceptora, los cuales, se encuentran espacialmente separados por una fase de membrana líquida, con la característica de que este líquido es inmisible y prácticamente insoluble con los otros dos⁵⁵ (**Figura 4**).

Existen en la literatura una gran variedad de membranas líquidas, las cuales se pueden clasificar dependiendo de diversas características, como son: tipo de diseño del módulo, mecanismo de transporte, aplicación, tipo de acarreador y tipo de soporte de membrana. Sin embargo, debido a las semejanzas en los procesos de extracción de metales (flujos de internalización) en ambientes acuáticos de las membranas líquidas soportadas (MLS) con los sistemas biológicos¹¹, en este trabajo nos enfocaremos únicamente en este tipo de sistemas de membranas líquidas.

Al igual que todas las membranas líquidas, las MLS membranas consisten en dos fases miscibles y una inmisible, con la característica que esta última es sostenida o soportada por fuerzas capilares presentes en los poros de los polímeros microporosos o película inorgánica, el cual, no solamente permite el ahorro de líquido inmisible, sino que también evita la pérdida del mismo en la fase aceptora o donadora. En este trabajo de investigación se utilizaron soluciones acuosas como líquidos miscibles, mientras que el disolvente orgánico (Fenilhexano) se empleó como líquido inmisible.

1.3.2 Transporte de metales a través de membranas líquidas soportadas (MLS)

Los sistemas de membrana líquida soportada pueden presentar 4 mecanismos básicos de transporte: Transporte simple, transporte simple con reacción química en la disolución aceptora, transporte facilitado (el cual se subdivide en contra-transporte acoplado y co-transporte acoplado) y transporte activo⁵⁵. Sin embargo, con el propósito de emular a los sitios activos presentes en las membranas biológicas (p. ej. metaloproteínas), en este trabajo se utilizó un agente extractante (Kelex-100) para facilitar el transporte.

El flujo global de un catión metálico desde la solución donadora hasta la fase aceptora en el transporte facilitado puede ser descrito principalmente por seis etapas principales:

1. La difusión del catión metálico (M) a través de la solución donadora (bulto)
2. Velocidad de complejación/disociación del complejo metal-Ligantes (M-L) en la capa difusiva

3. Velocidad de complejación/disociación de los complejos metal-acarreador (M-C) en la interface membrana-solución donadora.
4. Transferencia de masa del complejo metal-acarreador (M-C) a través de la membrana
5. Velocidad de complejación/disociación de los complejos metal-ligante (M-A, en la fase aceptora), y
6. Difusión del complejo M-A desde la interface membrana-fase aceptora hasta el bulto de la disolución aceptora, (Figura 4)⁴⁸.

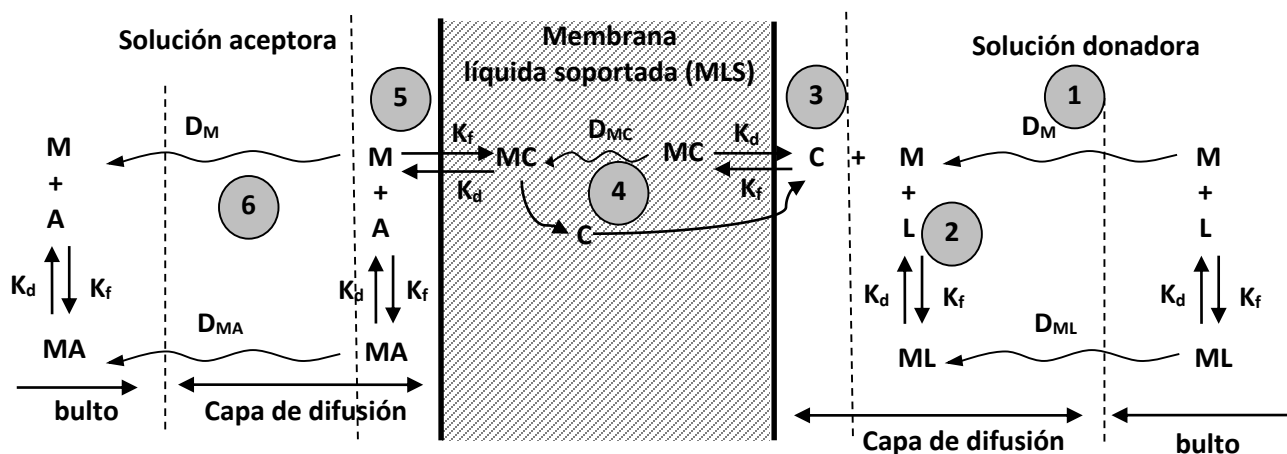


Figura 4. Parámetros fisicoquímicos que controlan el flujo del metal (M) de muestras acuosa a través de las Membranas líquidas soportadas (MLS)⁴⁸. Donde C= acarreador o extractante, D_M= Coeficiente de difusión del metal (M), D_{ML}= Coeficiente de difusión del complejo metal-ligante (ML), D_{MC}= Coeficiente de difusión del complejo metal-acarreador (MC), D_{MA}= Coeficiente de difusión del complejo metal-ligante fase aceptora (MA), K_d= constante de disociación del complejo, K_f= constante de formación del complejo.

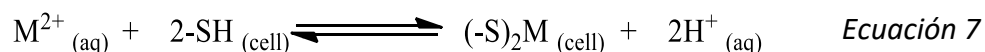
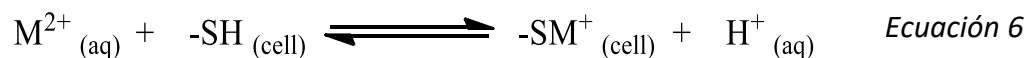
1.3.3 Analogías en los procesos de extracción de metales por dispositivos de MLS y los sistemas biológicos

Aunque la composición de las MLSFH y de las membranas biológicas (microalgas) son muy distintas, ambas membranas presentan analogías en el transporte de diversas especies químicas, debido a que se ha encontrado que diversos factores físicos y químicos presentes en el medio acuoso influyen de manera similar en el transporte del catión metálico ya sea en la solución bulto (solución acuosa que contiene el catión metálico) o a través de la membrana líquida o biológica. Investigaciones realizadas por Bayen et al.⁹ y Slaveykova et al.¹¹ han demostrado que es posible obtener correlaciones lineales al comparar los flujos de extracción en ambos sistemas a concentraciones diferentes de cationes metálicos, lo cual nos indica que efectivamente algunos procesos de extracción en ambos sistemas se ven influenciados de manera similar en ambientes acuáticos bajo la presencia de diversos factores que alteren la especiación química.

De acuerdo a Buffle et al.⁴⁸, las semejanzas principales entre los dispositivos de MLS y microorganismos pueden resumirse en los siguientes puntos:

- 1) En los dispositivos de MLS, la solución aceptora y donadora están separadas por una membrana hidrofóbica, la cual puede mimetizar la membrana biológica de un microorganismo.
- 2) Los transportadores (acarreadores o agentes extractantes) en la MLS tienen la misma función que los sitios activos en los microorganismos.
- 3) El grosor de la capa de difusión en la MLS es de alrededor de 10-100 μm , el cual es similar a la capa de difusión de un microorganismo.
- 4) En ambos sistemas (microorganismos y MLS), los complejos metálicos hidrofóbicos pueden difundir pasivamente a través de la fase orgánica de la MLS y la membrana plasmática.

A pesar de la distinta naturaleza de los sitios activos presentes en la membrana biológica y en los extractantes químicos empleados en los dispositivos de MLS, se han encontrado analogías en las reacciones químicas involucradas entre el catión metálico y los sitios activos presentes en ambas membranas. En la Ecuación 5 se muestra la reacción de complejación involucrada en el mecanismo de transporte facilitado de un catión metálico (M) por un extractante (KH) con propiedades ácido-base, sin embargo, como se mostrará en la siguiente sección, este mecanismo de extracción está acoplado a un contra-transporte de H^+ . De acuerdo al modelo del ligante biótico y al de la especie libre, se ha propuesto un mecanismo de extracción de cationes metálicos por membranas biológicas muy parecido a los sistemas de membrana líquida (Ec.5-7)⁵⁶, en donde algunos sitios activos de las proteínas intercambiadoras transmembranales (p. ej. $-\text{SH}$, **Figura 5**) presentes en las membranas biológicas intercambian H^+ por cationes metálicos provenientes del medio acuoso⁵⁷, formando el complejo (SM), el cual se encarga de transportar el catión metálico hasta el citosol; un mecanismo similar de extracción de metales es propuesto por los sistemas de MLS (**Figura 4**). De esta manera cuando nosotros comparamos la extracción de cationes metálicos en los dispositivos de MLSFH con la membrana biológica, es posible encontrar reacciones similares entre el (los) sitio (s) quelante (s) presente (s) en la superficie celular y el agente extractante presente en las MLS (Ecuación 5-7).



Donde –S designa un sitio quelante bidentado desprotonado, tales como:

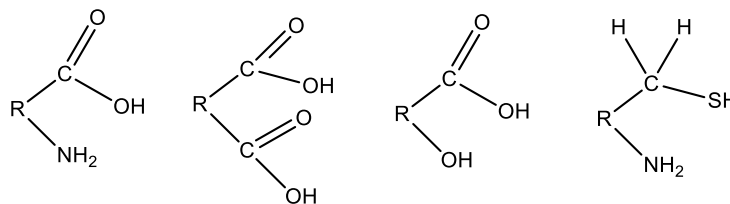


Figura 5. Sitios activos presentes en algunas proteínas transmembranales (Tomado de Xue, H.B et al.⁵⁶)

Además de la semejanza en la interacción de estos cationes metálicos con los sitios activos en ambos sistemas (biológico y químico), se considera que el proceso de extracción del metal en algunos sistemas biológicos (como es el caso de microalga *Chlamydomonas reinhardtii* en la extracción de Cu^{2+}) se lleva a cabo principalmente en 2 pasos: i) el catión metálico es coordinado en la superficie algal de manera rápida y ii) el catión metálico es transferido al interior de la célula de manera lenta⁵⁶. Un comportamiento similar de transporte es considerado en los dispositivos de ML que se emplean para análisis de especiación y estudios de biodisponibilidad, donde el paso rápido ocurre con la formación del complejo M-C (metal-extractante) y el paso lento es el transporte a través de la membrana líquida, que es controlado por difusión. Así, de acuerdo a estas similitudes de transporte observadas entre ambos sistemas (biológicos y químicos) es posible emular la extracción de metales en sistemas biológicos empleando sistemas químicos, como los dispositivos de MLS, siempre y cuando se considere que las especies libres o lábiles interactúan primariamente sobre la superficie celular (**Figura 6**).

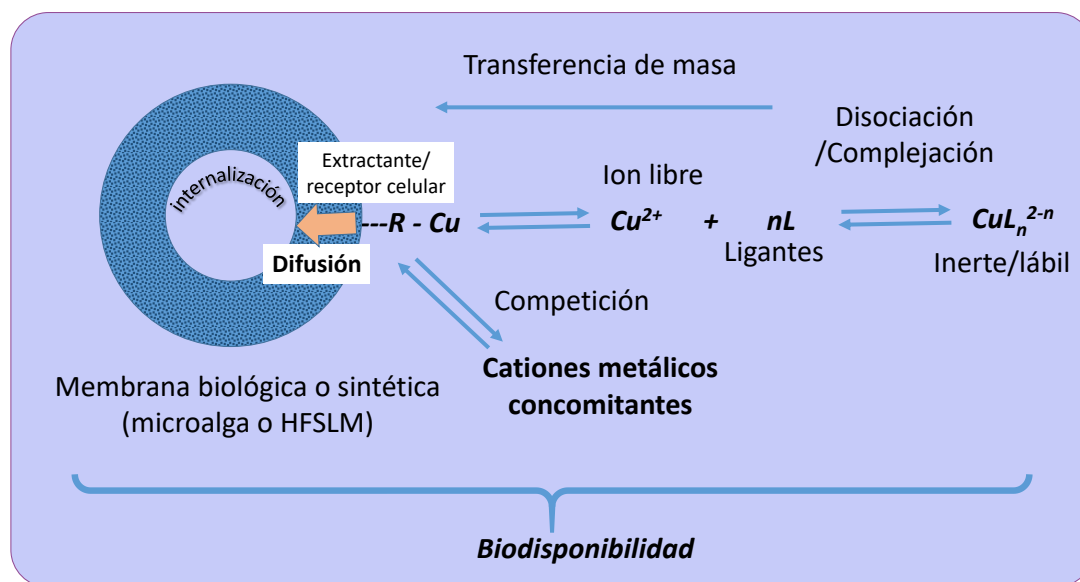


Figura 6. Procesos principales involucrados en la extracción de cationes metálicos por dispositivos de membrana líquida y sistemas biológicos. (Donde R=receptor y L= Ligantes)

1.4 Kelex-100 como agente extractante (acarreador) para estudios de biodisponibilidad

1.4.1 Extracción de metales por Kelex-100

El compuesto 7-(4-Etil-1-Metiloctil)-8-Hidroxiquinolina (**Figura 7a**) registrado comercialmente como Kelex-100 por Sherex Chemical Co., Dublín, Ohio, ahora conocido como Ashland Oil, Inc. es un derivado de la oxina (8-Hidroxiquinolina)^{58,59} principalmente empleado en la industria química como agente quelante para una gran variedad de cationes metálicos⁵⁹ o como intercambiador aniónico en su forma protonada.

Debido a su naturaleza química, el agente extractante Kelex-100 no es un reactivo selectivo por sí mismo y reacciona con una amplia variedad de cationes metálicos, tales como, cadmio, cobalto, cobre, plomo, galio, germanio, paladio, platino, rodio y zinc; sin embargo, su selectividad a cationes metálicos puede ser exitosamente activada por una selección cuidadosa de las condiciones del medio acuoso¹⁴. Un ejemplo del incremento de esta selectividad es observado en el orden de extracción de algunos metales en función del pH (0-6): Cu(II)>Fe(III) >Ni (II)>Zn (II)>Co(II)>Fe(II)>Mn(II)>Mg(II)>Ca(II)⁶⁰(**Figura 7b**).

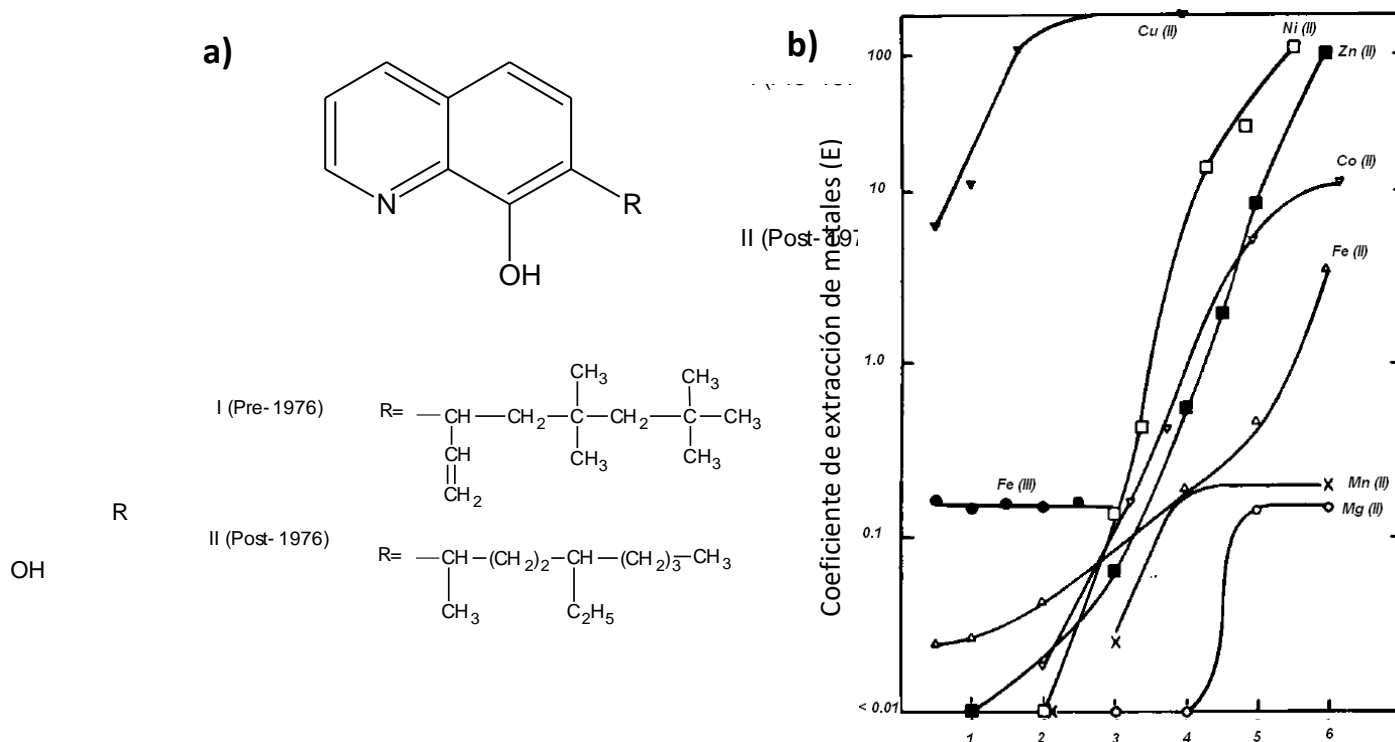


Figura 7. a) Estructura del Kelex-100 y b) Extracción de metales por Kelex-100 en rangos de pH 0.5 a 6.0 (disolución donadora= 5g/L, Kelex-100= 0.5 M, tiempo 5 min, Relación de fases= 3:1, Acuoso/Orgánico) (Adaptado de Ritcey et al.⁶⁰)

1.4.2 Extracción de metales empleando MLSFH y Kelex-100 como agente extractante

De acuerdo a la literatura el proceso de extracción de cationes metálicos (M^{2+}) por Kelex-100 (KH) en medios acuosos empleando sistemas de membranas líquida consiste fundamentalmente en un transporte facilitado acoplado a un contra-transporte protónico⁶¹⁻⁶³. Este tipo de transporte empleando Kelex-100 (KH) como agente extractante se caracteriza principalmente por tres etapas: 1. El agente Kelex-100 (KH) presente en la membrana líquida (fase orgánica) reacciona en la interface membrana-solución donadora con el catión metálico (M^{2+}) presente en la solución donadora en una estequiometría 2:1 para dar lugar al complejo metálico (MK_2) y H^+ como producto de esta reacción, el complejo MK_2 (Hidrofóbico) formado permanece en la fase orgánica, mientras que los iones H^+ se libera en la solución donadora; en la segunda etapa, 2. El complejo MK_2 se difunde a través de la membrana líquida (fase orgánica) hasta llegar a la interface membrana-solución-aceptora, donde reacciona con un ligante presente en la fase aceptora que retiene al catión metálico (etapa 3), regenerando el agente extractante debido a las condiciones ácidas presentes en esta fase (**Figura 8**).

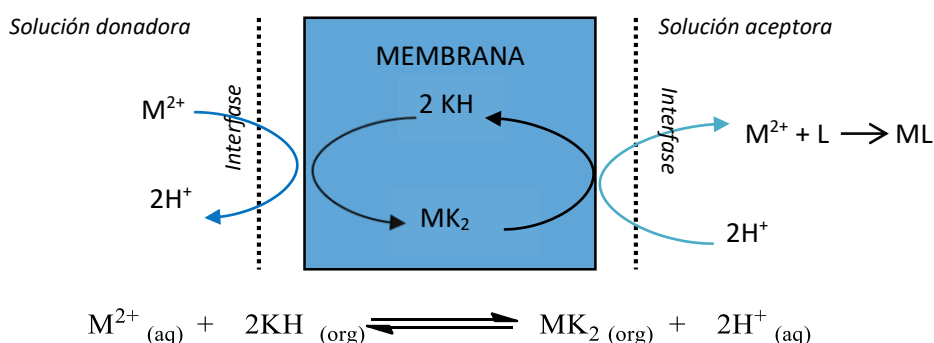


Figura 8. Mecanismo de extracción de un catión metálico (M) por Kelex-100 (KH) empleando una membrana líquida soportada (MLS)

A través de la variación de la composición de la membrana y de la solución aceptora es posible alcanzar altos valores en el factor de preconcentración¹⁵ y selectividad¹⁴ de diversos metales presentes en bajas concentraciones en sistemas acuosos, lo que hace posible el empleo de estos sistemas de membrana líquida con fines analíticos. Un ejemplo de este tipo de membranas son las membranas líquidas soportadas de fibra hueca (MLSFH).

A diferencia de los otros tipos de membranas líquidas soportadas, las MLSFH se caracterizan en tener una conformación cilíndrica y un radio de lumen pequeño (**Figura 9**), lo cual le confiere diversas ventajas, como son: mayor estabilidad, facilidad de acoplamiento en línea (para seguimientos ambientales), altos factores de preconcentración del catión metálico, disminución del uso de solventes orgánicos tóxicos y aumento del área de membrana. Sin embargo, de entre las principales desventajas en el empleo de este tipo de membranas se encuentran: pérdida de extractante, la necesidad del empleo de solventes muy hidrofóbicos para mantener la integridad de la membrana, así como el frecuente ensuciamiento del poro debido a efectos de superficie y a las partículas presentes en el medio acuoso⁵⁵.

Aunque el principal uso de este tipo de membranas líquidas soportadas es en la industria, clínica, farmacéutica y en el ambiente, recientemente ha surgido un interés en el empleo de estas membranas líquidas con fines analíticos, como estudios de preconcentración, biodisponibilidad y especiación de metales.

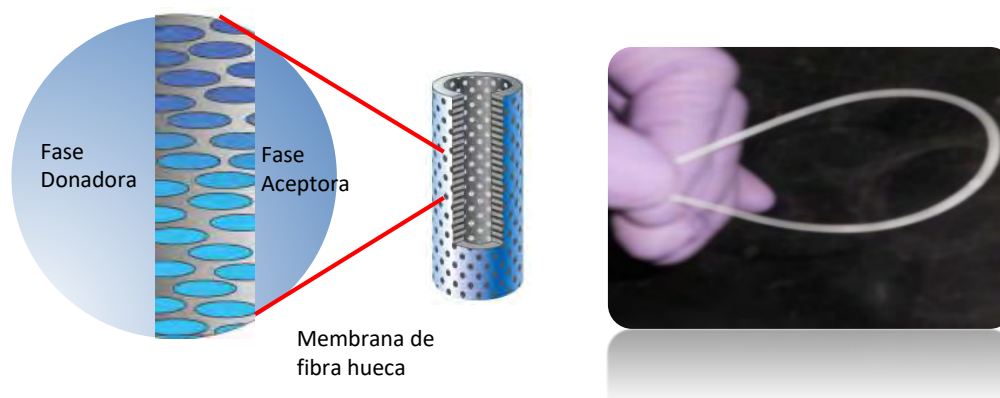


Figura 9. a) Conformación de una membrana líquida soportada de fibra hueca (MLSFH) y b) MLSFH empleadas en este trabajo.

1.4.3 Membranas líquidas soportadas (MLS) empleadas para estudios de preconcentración, especiación y biodisponibilidad

Son relativamente pocos los estudios realizados empleando este tipo de sistemas de membranas para el estudio de la preconcentración y biodisponibilidad de especies metálicas, sin embargo, de los estudios más relevantes se encuentran las investigaciones realizadas por Parthasarathy et al.⁶⁴, quienes por primera vez demostraron la posibilidad de preconcentrar y diferenciar especies metálicas empleando dispositivos de membrana líquida soportada de fibra hueca (MLSFH), alcanzando altos factores de preconcentración (alrededor de 3,000) en intervalos cortos de tiempo (60-120 min). Bautista-Flores et al.¹⁵ obtuvieron factores de preconcentración (E) de alrededor de 17,000 para Pb (II) en medio acuoso, empleando Kelex-100 como agente extractante.

Como método de especiación y biodisponibilidad existen pocas publicaciones acerca del tema, sin embargo, de las investigaciones más relevantes se encuentran las realizadas por Bayen et al.⁹, quienes emplearon membranas líquidas soportadas de fibra hueca (MLSFH) y diversos agentes complejantes, tales como citrato, malonato, nitrilotriacetato y ácidos húmicos, con el propósito de medir los flujos de extracción de Cd a través este tipo de membrana líquida en presencia y en ausencia de estos ligantes. Para lograrlo, utilizaron una mezcla de 1,10-Didecil-1,10-diaza-18-corona-6 éter (22DD) y ácido di (2-etilhexil) fosfórico (D2EHPA) como agente extractante disueltas en una mezcla de tolueno/fenilhexano. A diferencia del Kelex-100, el mecanismo de transporte empleando este agente extractante (D2EHPA) consiste en un transporte facilitado acoplado a un contrartransporte de iones sodio (Na^+). Como resultado de este estudio se encontró que la biodisponibilidad de este metal en el alga *Chlorella kesslerii* presenta una relación hiperbólica del tipo Michaelis-Menten con los dispositivos de PLM, el cual se determinó a través de la

comparación de los flujos en los dispositivos de PLM con los flujos de internalización de las algas evaluadas empleando como ligante orgánico a los ácidos húmicos (**Figura 10 a**).

Una investigación similar fue llevada a cabo por Slaveykova et al.¹¹, quienes por medio de una membrana de hoja plana impregnada con una mezcla de 1,10-Didecil-1,10-diaza-18-corona-6 éter (22DD) y ácido láurico, disueltas en una mezcla de fenilhexano y tolueno, compararon los flujos de extracción de Pb empleando estos sistemas de membranas líquidas con la microalga de agua dulce (*Chlorella kesslerii*) bajo la influencia de diferentes ligantes presentes en el medio acuoso (p. ej. citrato, nitriloacetato, etc.). Como resultado se encontró que los flujos a través del PLM eran directamente proporcionales a la concentración de la especie libre en lugar de la concentración total de metal, además, se encontró una relación logarítmica lineal entre los flujos de internalización por los sistemas biológicos con los flujos de extracción por los sistemas de MLS, el cual puede usarse para predecir la biodisponibilidad de este metal en este tipo de microorganismos (**Figura 10 b**).

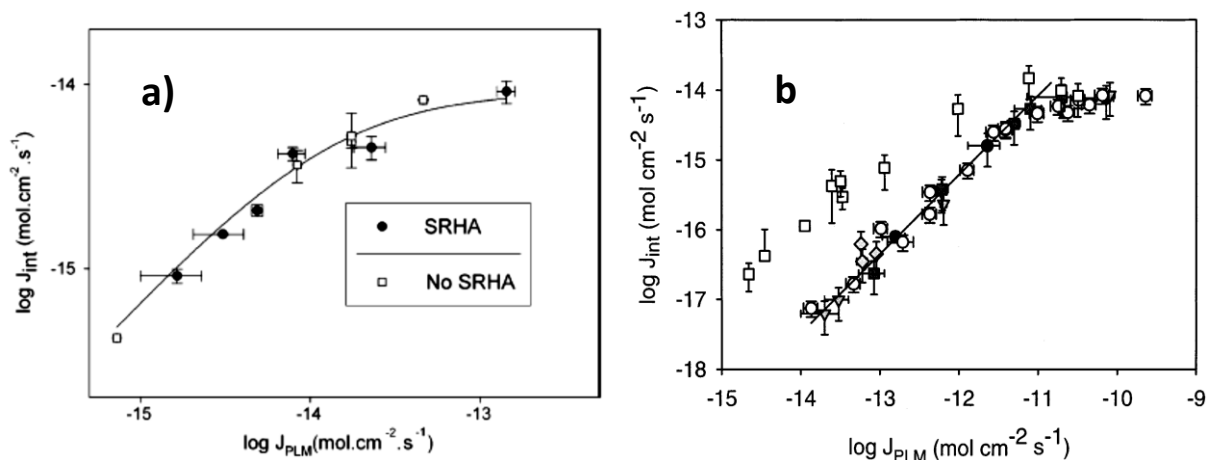


Figura 10. Correlación entre los flujos de internalización (J_{int}) por: a) Dispositivos de MLSFH (Representado como PLM, de las siglas en inglés Permeation Liquid Membrane) y la microalga *C. kesslerii* bajo la presencia/ausencia de ácidos húmicos (SRHA) (Bayen et al.⁹) y b) Dispositivos de membrana de hoja plana (PLM) y la microalga *C. kesslerii* en la ausencia/presencia de diferentes ligantes (ácido nitrilotriacético, ácido cítrico, ácido iminodiacético, ácido malónico y ácidos fúlvicos) (Slaveykova et al.¹¹).

Una aplicación empleando estos dispositivos de MLSFH para la determinación de la biodisponibilidad de cationes metálicos fue llevada a cabo por Slaveykova et al.⁶⁵, quienes por medio de un sistema de membranas líquidas similar al mencionado anteriormente, lograron determinar la concentración de las especies libres de Ni, Cd, Cu y Pb en medio acuoso; sin embargo, en comparación a los dispositivos DGT, la concentración de las especies libres determinadas por esta técnica fueron ligeramente más bajas; además de este resultado, se obtuvo una excelente correlación entre el flujo de internalización de la microalga *Chlorella salina* y los dispositivos de MLSFH, lo cual demuestra su posible empleo como un nuevo método para evaluar la biodisponibilidad de metales pesados en ambientes acuosos.

1.5 Muestreo pasivo y estudios de biodisponibilidad

El muestreo pasivo es definido como una técnica basada en libre flujo de los analitos desde el medio de muestreo hasta una fase aceptora como un resultado de una diferencia entre los potenciales químicos de los analitos entre los dos medios. Es un método analítico que está cobrando cada vez mayor importancia en los seguimientos ambientales debido a que presenta diversas ventajas en comparación a otras técnicas analíticas⁶⁶, tales como:

- Aislamiento selectivo del analito
- Altos factores de preconcentración
- Posibilidad de estudios de especiación
- Simplificación de las operaciones analíticas
- Eliminación de la necesidad del gasto energético y
- Posibilidad de miniaturización para análisis *in situ*
- Alteración mínima de la muestra

Los métodos de muestreo pasivo pueden ser clasificados de acuerdo al medio de muestreo, régimen de operación y el tipo de analito de estudio (**Figura 11**)

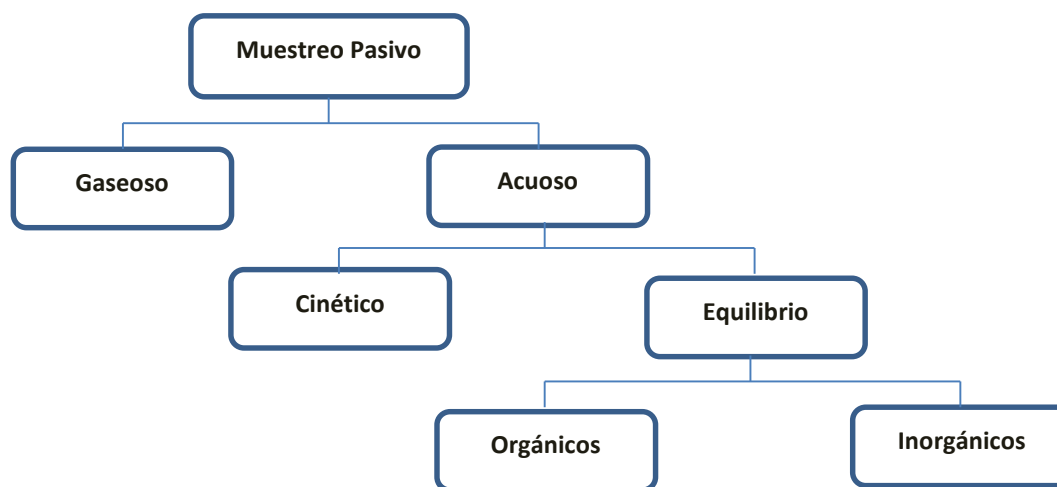


Figura 11. Clasificación de los muestreadores pasivos

Las cinéticas de intercambio entre un muestreador pasivo y la fase acuosa pueden ser descritas por una cinética de primer orden, **Figura 12** (Ecuación 8).

$$C_{S(t)} = C_w \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde $C_s(t)$ representa la concentración del analito en el muestreador a tiempo de exposición t , C_w es la concentración del analito en la fase acuosa, y k_1 y k_2 son las constantes de velocidad de toma y descarga, respectivamente. Sin embargo, durante todo el proceso cinético de extracción dos principales regímenes pueden ser distinguidos en la operación de un muestreador pasivo durante su aplicación en el campo, uno de ellos es el régimen cinético y el otro es el régimen en el equilibrio. En el primero, se asume que la velocidad de transferencia de masa a la fase aceptora es linealmente proporcional a la diferencia entre la actividad química de los contaminantes en la fase donadora y la fase aceptora, por lo que hace posible la simplificación de la ecuación 8 a:

$$C_{s(t)} = C_w K_1 t \quad \text{Ecuación 9}$$

En el régimen de equilibrio, se asume que el tiempo de exposición es suficientemente largo para permitir un equilibrio entre la fase donadora y la fase aceptora. Esto reduce la ecuación 8 a la siguiente ecuación:

$$C_{s(t)} = C_w \frac{K_1}{K_2} = C_w K \quad \text{Ecuación 10}$$

El conocimiento del coeficiente de partición (K) permite la estimación de la concentración del analito disuelto. Sin embargo, cualquiera de los regímenes puede emplearse para el muestreo pasivo. En este trabajo se empleó el muestro pasivo en el régimen del equilibrio^{66,67}.

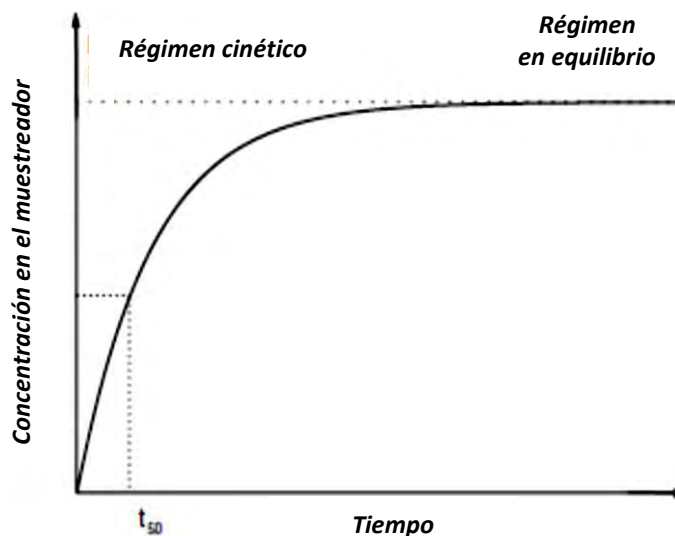


Figura 12. Cinética de primer orden observado en los muestreadores pasivos

Los sistemas de membrana líquida y en particular los sistemas de MLSFH son candidatos perfectos para estudios de biodisponibilidad por muestreo pasivo debido a que este tipo de sistemas pueden mimetizar la extracción de metales por membrana biológica en ambientes acuosos.

1.5.1 Membranas líquidas y muestreo pasivo

El empleo de las membranas líquidas soportadas como método de muestreo pasivo tiene como ventaja principal la manipulación de la composición de la membrana y de la fase aceptora para la separación selectiva de algunas especies químicas, lo cual no sólo permite hacer estudios de especiación, sino también hace posible la obtención de altos factores de preconcentración de estos cationes metálicos en la fase aceptora; recientemente, se han utilizado estos muestreadores pasivos para cuantificar una gran diversidad de cationes metálicos a nivel de trazas, como: Cd, Co, Cu, Ni, Pb y Zn⁶⁸.

Aunque se ha demostrado la alta capacidad de los dispositivos de membrana líquida soportada de Fibra Hueca (MLSFH) para preconcentrar y emular los sistemas biológicos (como se ha mostrado en las secciones anteriores), este tipo de sistemas de membranas líquidas tienen la desventaja principal de ser poco estables en medios acuosos durante intervalos prolongados de tiempo o por agitación vigorosa del medio, debido a la pérdida del extractante⁵⁵; esta característica en particular limita el empleo de este tipo de dispositivos en sistemas de aguas naturales donde las condiciones ambientales pueden ser adversas para el análisis *in situ* del contaminante metálico.

A pesar de ello es posible el empleo de membranas poliméricas de Inclusión (PIM por sus siglas en inglés), las cuales, son otro tipo de membranas líquidas, en donde el agente extractante se encuentra inmerso en la matriz polimérica y no en el disolvente orgánico como en el caso de las membranas líquidas soportadas (MLS); esta propiedad no solo le confiere una mayor estabilidad a la membrana, sino también una posible mejora en la selectividad de la misma. A diferencia de las membranas líquidas soportadas, las PIM son membranas densas y no presentan porosidad. Han sido utilizadas diversas PIM empleando diferentes agentes extractantes para la separación selectiva de diversos cationes metálicos presentes principalmente en medios acuosos. Mora-Tamez, et al.⁶⁹, et al., separó selectivamente Cd (II) empleando ADOGEN como agente extractante, obteniendo alta eficiencia de extracción y selectividad. Aguilar-Cordero, et al.¹⁴, realizó una comparación en la extracción de Cd (II) empleando Kelex-100 y dos tipos de membranas: membranas líquidas soportadas (MLS) y membranas poliméricas de inclusión (PIM); con este estudio encontró que este metal podía separarse selectivamente de Pb (II) únicamente en las membranas poliméricas de inclusión bajo determinadas condiciones presentes en la solución donadora

Recientemente ha surgido un gran interés del empleo de estas membranas poliméricas de inclusión como muestreadores pasivos en la determinación analítica de cationes metálicos en ambientes acuosos, debido principalmente a su alta estabilidad; un ejemplo de la aplicación de esta clase de membranas líquidas en la determinación analítica, es el trabajo realizado por Inês et al.⁷⁰, quienes desarrollaron un muestreador pasivo para zinc presente en agua de residuos urbanos; este muestreador pasivo está constituido de un compartimento que contiene una solución aceptora (ácida) separada de la solución alimentadora por una PIM, la cual está conformado de 40% en peso de ácido di-2-(etilhexil) fosfórico como extractante y 60% en peso de cloruro de polivinilo (PVC), **Figura 13**.

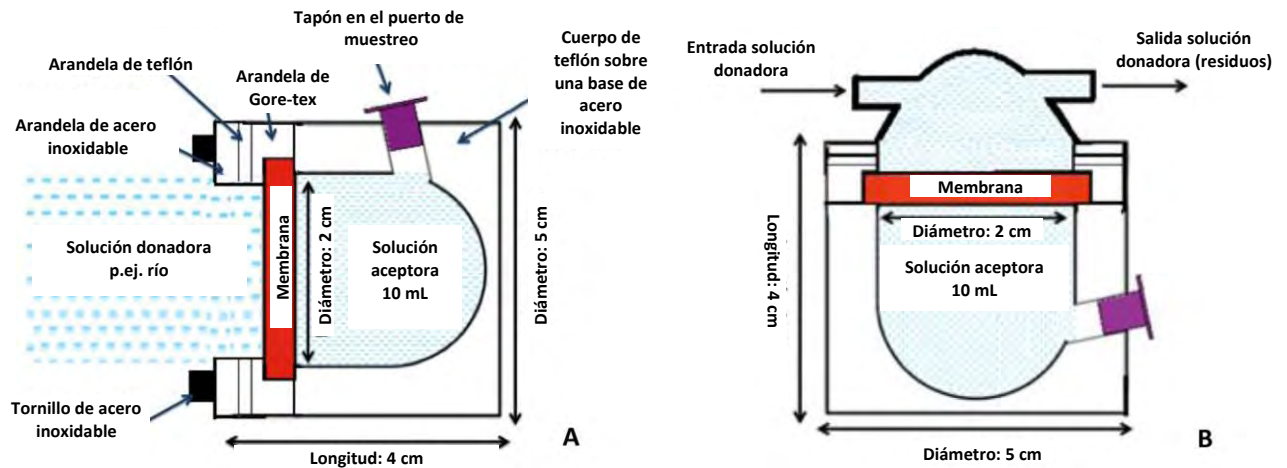


Figura 13. Diseño de un dispositivo a base de membranas poliméricas de inclusión, empleadas como muestreadores pasivos (Adaptación de Inês et al⁷⁰)

1.6 Flujo y eficiencia de extracción

1.6.1 Evaluación del flujo inicial (J_0) y constante de velocidad (c) en los dispositivos de MLSFH y microalgas

Se emplearon los flujos iniciales y la constante de velocidad de internalización del metal como parámetros para caracterizar el comportamiento de los experimentos de extracción en los dispositivos de MLSFH y en los sistemas biológicos estudiados.

Los flujos iniciales se determinaron por sustituir C (Concentración del metal) en la solución aceptora con una función empírica (ψ), la cual describe la concentración en la solución de las especies extraídas durante el periodo total de extracción con el propósito de minimizar la contribución de los errores experimentales^{69,71}. La mayor confiabilidad fue alcanzada por el ajuste de la función ψ (Ec.11) con los conjuntos de datos experimentales de internalización en la solución aceptora.

$$\psi_s = a + b e^{ct} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde ψ_s = función de la concentración de Cu (II) o Zn (II) internalizado en la solución aceptora (al tiempo t), a , b y c son coeficientes empíricos determinados en el ajuste de la función. El valor de $(d\psi_s/dt)_{t=0}$ fue usado para determinar el flujo inicial (J_0) (Ec.12).

$$J(t) = \psi'_s = \frac{d\psi_s}{dt} = c b e^{ct} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde $\Psi'_s = J(t)$ = Función de flujo de Cu (II) o Zn (II) en la solución aceptora (a tiempo t). Por lo tanto cuando $t=0$, $J_0=-cb$, así nosotros podemos obtener la siguiente ecuación (Ec.13)

$$\ln \frac{J_t}{J_0} = \ln \frac{\Psi'_{t,s}}{\Psi'_0} = c t \quad \text{Ecuación 13}$$

En este trabajo el comportamiento de extracción se evaluó a través de los flujos iniciales, los cuales, nos permite comparar con mayor confiabilidad el comportamiento de la extracción en los dispositivos de MLSFH y en los sistemas biológicos.

1.6.2 Evaluación de la eficiencia de extracción en las membranas líquidas soportadas (MLS) y las membranas poliméricas de inclusión (PIM)

Al igual que en los sistemas de extracción por membranas líquidas, la eficiencia de extracción (E) en las membranas poliméricas de inclusión (PIM) puede ser expresada como:

$$E = \frac{n_a}{n_{d0}} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde n_a se refiere a el número de moles de metal acumulado en la fase aceptora y n_{d0} al número de moles iniciales en la fase donadora, sin embargo, cuando ambos compartimentos de la celda tienen volúmenes iguales, la ecuación de la eficiencia de extracción puede ser expresada como: $E = [M_a]/[M_d]_0$, donde $[M_a]$ representa la concentración del metal en la fase aceptora y $[M_d]_0$ representa la concentración inicial del metal en la fase donadora⁷².

Esta eficiencia de extracción puede ser calculada también por medio de la siguiente ecuación:

$$E' = \frac{(n_{d0} - n_w)}{n_{d0}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde n_w es el número de moles que se pierden en la fase donadora ya sea por procesos de extracción o por adsorción en la membrana, por esta razón es posible determinar el recobro (R) del proceso de extracción a través de la comparación de estos dos procesos:

$$R = \frac{E}{E'} \quad \text{Ecuación 16}$$

Si $E=E'$, ningún analito es perdido en el proceso y el recobro es de 100%, pero si $E < E'$ quiere decir que un cierto porcentaje del analito es perdido en el proceso, principalmente por retención del mismo en la matriz polimérica membrana.

En el caso en el que los volúmenes de ambos compartimentos fueran diferente es posible relacionar el factor de preconcentración o enriquecimiento del metal (F) con la eficiencia de extracción (E) por medio de la siguiente ecuación:

$$F = E * \frac{V_d}{V_a} \qquad \text{Ecuación 17}$$

Donde V_d = volumen solución donadora y V_a = volumen solución aceptora donadora, lo cual quiere decir que hay una relación directamente proporcional entre la eficiencia de extracción y el factor de preconcentración; también es posible determinar el factor de preconcentración a través de la razón entre la concentración del analito a determinado tiempo (t) en la fase aceptora y la concentración inicial de la fase donadora (Ecuación 19).

2. Encuadre temático

2.1 Objetivo General

Desarrollar y evaluar un nuevo método analítico para estudios de preconcentración, especiación y biodisponibilidad de Cu (II) y Zn (II) presentes en medios acuosos, por medio del empleo de sistemas de membranas líquidas y dos especies de microalgas (*P. subcapitata* y *S. acutus*) como sistemas biológicos de referencia.

2.2 Objetivos específicos

- Preconcentrar Zn (II) y Cu (II) presente en medio acuoso, a través del empleo de dispositivos de membrana líquida soportada de fibra hueca (MLSFH).
- Evaluar a los dispositivos de MLSFH como método analítico para estudios de especiación y biodisponibilidad de Zn (II) Y Cu (II) en ambientes acuáticos a través del análisis comparativo con dos especies de microalgas (*Scenedesmus acutus* y *Pseudokirchneriella subcapitata*) como sistemas biológicos de referencia.
- Determinar cuáles son los factores físico-químicos principales (ligantes orgánicos, ligantes inorgánicos, cationes metálicos y pH) presentes en el medio acuoso que influyen en la biodisponibilidad de Cu (II) y Zn (II) en los sistemas biológicos y en los dispositivos de MLSFH.
- Encontrar las condiciones óptimas para la extracción de Cu (II) en medio acuoso a través de una membrana polimérica de inclusión (PIM) sin la modificación química de la fase donadora, el cual emula las condiciones de un medio natural.
- Preconcentrar y extraer selectivamente Cu (II) por medio de una membrana polimérica de inclusión como una alternativa de muestreo pasivo para este catión metálico.

2.3 Hipótesis

Debido a las analogías en el transporte de metales pesados presentes en medios acuosos a través de las membranas líquidas soportadas y las membranas biológicas, es posible emplear los dispositivos de membrana líquida (MLs) como método analítico para el estudio de especiación y biodisponibilidad de metales pesados en organismos acuáticos como las microalgas.

3. Desarrollo Experimental

3.1 Reactivos

Las soluciones acuosas sintéticas de Cu (II), Zn (II) y de iones metálicos concomitantes (Pb (II), Cd (II), Cr (VI), Fe (II), Al (III) y Mg (II)) fueron preparadas por dilución de soluciones estándar para espectroscopia de absorción atómica (1000 mg/L, TraCERT® o Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA); carbonato de potasio (K_2CO_3), fosfato de sodio (Na_3PO_4), cloruro de sodio (NaCl), sulfato de sodio (Na_2SO_4), nitrito de sodio ($NaNO_2$), nitrato de sodio ($NaNO_3$), ácido cítrico, todos ellos Sigma Aldrich, y ácido húmico (TraCERT®, R.A) fueron empleados para el estudio de las interferencias de aniones inorgánicos y de la materia orgánica en la biodisponibilidad de Cu (II) y Zn (II). Ácido nítrico (J.T. Baker, R.A, Center Valley, USA), hidróxido de sodio (Aldrich, R.A), ácido 4-morfolina etensulfónico (MES, Sigma, R.A) y tris (hidroximetil) aminometano (Sigma Aldrich, R.A) se usaron para ajustar y amortiguar el pH de la fase donadora y aceptora, respectivamente. Ácido fórmico (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, N.J, USA) fue empleado como solución aceptora, 7-(4-Etil-1-metiloctil)-8-hidroxiquinolina (Kelex 100, Sherex Chemical Co. Inc., Dublin, OH, USA) fue empleado como agente extractante y 1-fenilhexano (Aldrich) como disolvente orgánico en los dispositivos de MLSFH.

Para la preparación de las membranas poliméricas de inclusión (PIM por sus siglas en inglés), fue empleada Triacetato de Celulosa (CTA por sus siglas en inglés), Fluka, como base polimérica; 2-Nitrofenil octil éter (NPOE por sus siglas en inglés), Dimetilftalato (DMP por sus siglas en inglés), Tris (2-etilhexil) fosfato (TEHP por sus siglas en inglés) y Tris (2-Butoxietil) fosfato (TBEP por sus siglas en inglés) todos Aldrich como agentes plastificantes; 7-(4-etil-1-metiloctil)-8-Hidroxiquinolina (Kelex-100 por su nombre comercial) como agente extractante de Cu (II) y Diclorometano como disolvente de elección.

3.2 Instrumentación

Un espectrómetro de absorción atómica de flama (EAAF) Perkin Elmer 3100 (Waltham, MA, USA) se utilizó para la cuantificación de Cu (II), Zn (II) y cationes concomitantes. Un pH Meter 440 (Corning) fue usado para ajustar el pH de la solución aceptora y donadora usando un electrodo combinado de vidrio InLab Expert Pro-ISM (Mettler Toledo). Un agitador de plato orbital (IKA KS 260) fue usado para mantener la disolución homogénea.

Se empleó un electrodo selectivo de Cu^{2+} comercial (HANNA 4108, Hanna Instrument®) acoplado a un potenciómetro comercial (Mettler Toledo Seven Compact pH/Ion) para la cuantificación de la especie libre de cobre. La respuesta del electrodo fue verificada por la medida de la pendiente obtenida de la regresión lineal del potencial vs log de la actividad de Cu^{2+} con respecto a la respuesta Nerstiana esperada para un catión divalente a 25°C (27 ± 4 mV). Los valores reportados son el promedio de 3 mediciones obtenidas una vez estabilizado el electrodo.

3.3 Especiación química y análisis estadístico

La concentración de las diferentes especies químicas en el medio experimental fueron determinados usando el programa Simple Equilibrium Diagrams (SED) incluido en el software MEDUSA, usando las constantes de la base de datos Hydra incluido en el programa⁷³. CHEAQS Pro software fue usado para análisis de especiación de zinc bajo la influencia de ácidos húmicos, usando las constantes de equilibrio de la base de datos del programa⁷⁴. Statgraphics Centurion XVI software (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA) fue usado para determinar la influencia de diferentes factores sobre la cantidad de zinc internalizada a través del ANOVA y los diagramas de Pareto. IBM SPSS Statistics 22 software (IBM, Armonk, NY, USA) fue usado para determinar la correlación de Pearson entre la cantidad de Zn (II) internalizado por las microalgas y los dispositivos de MLSFH.

3.4 Preparación de los dispositivos de MLSFH

Los dispositivos de MLSFH fueron preparados de acuerdo al método descrito por Bautista-Flores¹⁵, una membrana de fibra hueca hidrofóbica de Polipropileno 50/280 Accuarel (Membrane GmbH, Wuppertal, Alemania) fue cortada en trozos de 15 cm, se llenó el lumen con la solución aceptora (ácido fórmico 0.01 M, pH=2.2) y fue impregnado con 1-fenilhexano que contenía el acarreador 7-(4-etil-1-metiloctil)-8-hidroxiquinolina (Kelex-100) a una concentración de 1×10^{-3} M; el dispositivo fue colocado en el medio experimental bajo estudio (solución donadora) durante un periodo de 2 horas bajo agitación constante, posteriormente la solución aceptora fue retirada del dispositivo y diluida para su análisis por espectroscopia de absorción atómica de flama (EAAF).

3.5 Preparación de las membranas poliméricas de inclusión (PIM)

El método empleado para la preparación de las PIMs consistió en una variación del método optimizado por Aguilar-Cordero et al.¹⁴, en el cual 23% w/w de CTA fueron pesados y mezclados con 22% w/w de plastificante (NPOE, DMP, TEHP o TBEP) y con 55% w/w de Kelex-100 en diclorometano (Cl_2CH_2) durante 1 hora a temperatura ambiente, después de que la mezcla quedara homogénea fue vaciada en cajas Petri de vidrio hasta la polimerización del CTA; una vez evaporado el disolvente se retira la membrana y se procede con los experimentos de extracción.

3.6 Cuantificación de metal internalizado por microalgas

En esta parte experimental se eligieron dos especies de microalgas *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) que se han empleado como indicadores de la toxicidad de cationes metálicos en sistemas acuáticos debido a su alta sensibilidad en comparación a otros microorganismos acuáticos^{4,5} (Figura 14).

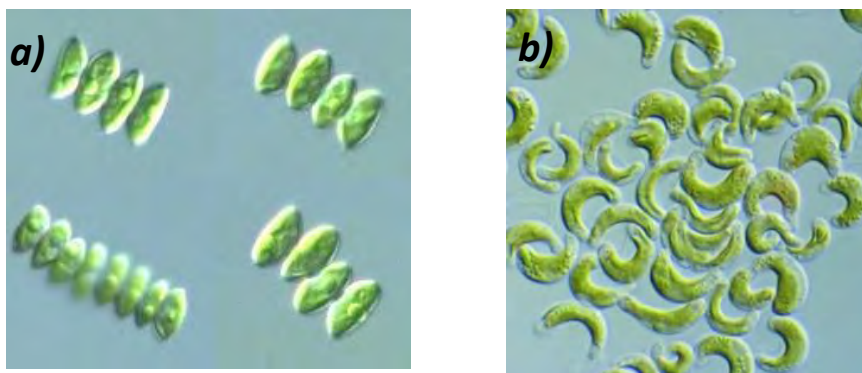


Figura 14. Especies de microalgas empleadas en los estudios de biodisponibilidad de metales: a) *Scenedesmus acutus* y b) *Pseudokirchneriella subcapitata*

La biodisponibilidad (internalización) de Cu (II) o Zn (II) por ambas especies de microalgas fue determinada por medio de la cuantificación de la concentración del metal internalizado y el área superficial celular. Las especies *P. subcapitata* y *S. acutus* fueron obtenidas de la University of Texas at Austin y cultivadas en medio Bristol estéril modificado con Proteasa-peptona (**Tabla 2**) (Bold)^{75,76} en un ciclo 12:12 h (luz: oscuridad) a 24°C bajo agitación constante hasta alcanzar la media fase de crecimiento logarítmico. Las microalgas fueron separadas por centrifugación (2,500 revoluciones por minuto) durante 3 minutos y resuspendidas en el medio experimental; después de la exposición al metal, las microalgas fueron lavadas con EDTA 0.01 M a pH=6.0 durante 2 min y digeridas con HNO₃ ultrapuro⁷⁷ (Merck). La cantidad de metal intracelular fue determinada por espectroscopia de absorción atómica de flama (Perkin Elmer 3100).

Tabla 2. Componentes del medio Bristol modificado^{75,76}

Componente	Cantidad	Disolución Stock	Concentración final en el medio
NaNO₃	10 mL/L	10 g/400 mL H₂O	2.94 mM
CaCl₂·2H₂O	10 mL/L	1 g/400 mL H₂O	0.17 mM
MgSO₄·7H₂O	10 mL/L	3 g/400 mL H₂O	0.3 mM
K₂HPO₄	10 mL/L	3 g/400 mL H₂O	0.43 mM
KH₂PO₄	10 mL/L	7 g/400 mL H₂O	1.29 mM
NaCl	10 mL/L	1 g/400 mL H₂O	0.43 mM

3.7 Cuantificación de metal internalizado por dispositivos de MLSFH

La biodisponibilidad de Cu (II) o Zn (II) en los dispositivos de MLSFH fue determinada por medio de la cuantificación del metal en la fase aceptora y el área superficial de la membrana líquida; la cantidad de Cu (II) o Zn (II) presente en la solución aceptora y donadora se determinó por espectroscopia de absorción atómica de flama (Perkin Elmer 3100); cada uno de los experimentos fueron realizados por triplicado.

3.8 Experimentos de extracción con PIM

La extracción se realizó en celdas (las cuales consisten en 2 compartimentos, la fase donadora, la cual contiene el catión metálico bajo estudio (en nuestro caso cobre) y la fase aceptora, la cual contiene un ligante que recibe el catión metálico proveniente de la solución donadora (**Figura 15**); las condiciones de extracción empleadas fueron las mismas que en los dispositivos de MLSFH (**Tabla 3**, sección 4.2).

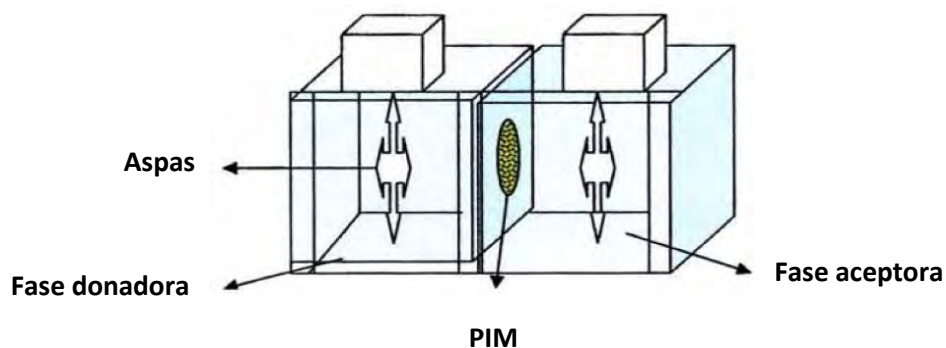


Figura 15. Celdas empleadas en la extracción de Cu (II) con PIM

3.9 Determinación de la cantidad de metal internalizado y factor de preconcentración (F)

Los experimentos de internalización de Cu (II) y Zn (II) para los dispositivos de MLSFH y las microalgas fueron realizadas empleando una $[Cu(II)]_{tot}$ y $[Zn(II)]_{tot} = 1 \times 10^{-5} M$ en $10^{-2} M$ de MES a pH= 6.6. Con fines comparativos, la cantidad de Cu (II) internalizado se generalizó para ambos sistemas bajo estudio (MLSFH y microalgas) y se determinó a partir de la cantidad (mol) de Cu (II) y Zn(II) en la fase aceptora en los dispositivos de MLSFH o intracelular en las microalgas dividida entre unidad de área superficial (cm^2)⁷⁸, Ecuación 18.

$$C_{int} = \frac{n_{aceptora \text{ ó interior celular}}}{A_m} \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde C_{int} = cantidad de metal internalizada, n = número de moles del metal en la fase aceptora o en el interior celular y A_m = área de la membrana polimérica o biológica.

Otra forma en la que se determinó la eficiencia de extracción de los dispositivos de MLSFH fue a través de la evaluación del factor de preconcentración o factor de enriquecimiento (F), el cual se puede determinar a partir de la Ecuación 19, este factor nos indica el número de veces que es posible concentrar el analito en estos dispositivos, comparada con la concentración inicial de la fase donadora.

$$F = \frac{C_{aceptora}(t)}{C_{donadora}} \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde $C_{aceptora}(t)$ = cantidad de metal en la fase aceptora al tiempo (t) y $C_{donadora}$ = cantidad de metal en la fase donadora inicial⁶⁴.

4. Resultados y discusión

4.1 Cinéticas de crecimiento microalgal

Un estudio realizado por Franklin et al.¹² demostró que existe una influencia de la densidad celular sobre la biodisponibilidad y la toxicidad de Cu (II) en bioensayos con microalgas; con el objetivo de determinar la fase media logarítmica de crecimiento y la fase estacionaria de ambas especies de microalgas (*P. subcapitata* y *S. acutus*), se estudiaron sus cinéticas de crecimiento celular.

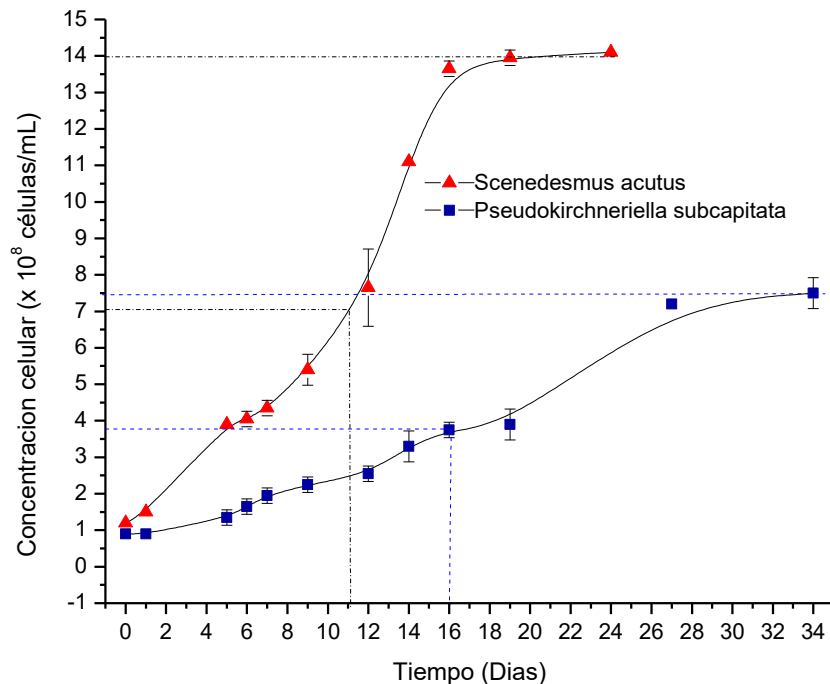


Figura 16. Cinética de crecimiento celular de *S. acutus* (rectángulos) y *P. subcapitata* (cuadrados)

Las cinéticas de crecimiento se siguieron a partir de un inóculo de 1×10^8 cel/mL durante un periodo de 34 días para ambas especies de microalgas. En la **Figura 16** se observa que el crecimiento celular es más rápido para la especie *S. acutus* que para *P. subcapitata* bajo las condiciones nutricionales empleadas en estos experimentos (**Tabla 2**), alcanzando el primero a los 11 días la mitad de la fase logarítmica, mientras que el segundo a los 16 días, estos datos se emplearon como marco de referencia de nuestro procedimiento experimental debido a que en la fase media logarítmica es cuando las células presentan su mayor actividad metabólica.

4.2 Preconcentración y biodisponibilidad de Cu (II) empleando los dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas (*S. acutus* y *P. subcapitata*)

De acuerdo a estudios realizados por Bautista-Flores¹⁰, en la extracción de metales pesados empleando dispositivos de MLSFH y Kelex-100 como agente extractante, las condiciones óptimas de extracción de estos cationes metálicos se muestran en la **Tabla 3**. Aunque es posible obtener mayores factores de preconcentración modificando principalmente el pH en la fase donadora y aceptora, en este trabajo se mantuvieron estas condiciones experimentales debido a la depleción del metal en la fase donadora es menor al 5%⁷⁹; un incremento de la depleción mayor al 5% modificaría las condiciones iniciales del sistema y variabilidad en la respuesta del dispositivo.

Tabla 3. Condiciones Optimizadas para la extracción de Cu (II)

Membrana	[Kelex-100]=0.03 M, Fenilhexano
Solución donadora	[Cu (II)]= 1×10^{-5} M, [MES]= 0.01 M, pH= 6.6
Solución aceptora	[HCOOH]=0.01 M, pH= 2.2
Tiempo de muestreo	120 minutos

4.2.1 Cinéticas de internalización de Cu (II) por dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas (*S. acutus* y *P. subcapitata*)

En la **Figura 17a** se muestra el estudio de las cinéticas de extracción (internalización) de Cu (II) por los dispositivos de MLSFH bajo las condiciones experimentales mostradas en la sección anterior, en el cual se determinó que la cantidad máxima de Cu (II) internalizado por los dispositivos de MLSFH fue de aproximadamente 4.7×10^{-8} ($\pm 4.9 \times 10^{-9}$) mol/cm² a partir de los 120 min de extracción, tiempo en el cual se alcanzó un factor de preconcentración (F) de ≈ 2500 , bajo un régimen de depleción despreciable. Este tiempo fue empleado en los experimentos posteriores para el muestreo pasivo de Cu (II) empleando los dispositivos de MLSFH.

Bajo las mismas condiciones experimentales de la solución acuosa (fase donadora) fueron evaluadas las cinéticas de internalización de este metal en los sistemas biológicos en un intervalo de tiempo de 0 a 300 min. El comportamiento cinético de internalización de Cu (II) en ambas especie de microalgas fueron muy similares entre sí; la especie *P. subcapitata* alcanzó un valor máximo de $Cu_{int} \approx 4.5 \times 10^{-10}$ ($\pm 5.2 \times 10^{-11}$) mol/cm² y la especie *S. acutus* alcanzó el valor máximo de $Cu_{int} \approx 5.5 \times 10^{-10}$ ($\pm 2.7 \times 10^{-11}$) mol/cm² alrededor de los 240 minutos para ambas especies de microalgas (**Figura 17 b**). Como se observa en la **Tabla 4**, el flujo de internalización fue mayor para los dispositivos de MLSFH que en las especies de microalgas, esto es debido a que los dispositivos son optimizados para obtener altos factores de preconcentración, mientras que la extracción de diversos compuestos por sistemas biológico son dependientes de proceso metabólicos celulares, además de que presentan un sistema de defensa celular que puede impedir la internalización de algunos componentes tóxicos; este resultado evidencia la capacidad de los dispositivos de MLSFH para preconcentrar los cationes metálicos en intervalos de tiempo corto, lo cual es ideal para la determinación de analitos por muestreo pasivo. El estudio de los flujos iniciales de internalización

de Cu (II) por los sistemas biológicos demuestra la similitud de la cinética de extracción de Cu (II) entre ambas especies de microalgas (**Tabla 4**).

MLSFH

a) b)

Figura 17. Cinéticas de extracción (internalización) de Cu (II) por: a) dispositivos de MLSFH y b) *S. acutus* y *P. subcapitata* (Donde int=internalizado).

Tabla 4. Flujos iniciales (J_0) y tiempo de muestreo determinados para MLSFH y microalgas por ajuste de la ecuación 11

Sistema	J_0 (mol cm ⁻² s ⁻¹)	Tiempo de muestreo Pasivo (min)
MLSFH	7.45E-10	120
<i>S. acutus</i>	5.76E-12	240
<i>P. subcapitata</i>	5.46E-12	240

4.2.2 Diseño experimental 2⁴ para evaluar la influencia de distintos factores en la internalización de Cu (II)

La toxicidad y la biodisponibilidad de los metales en ambientes acuáticos son influenciadas por una gran variedad de factores físico-químicos presentes en las aguas naturales, por esta razón en este trabajo se estudió la influencia de 4 factores principales en la internalización de Cu (II), los cuales de acuerdo en la literatura influyen en la toxicidad y biodisponibilidad de una gran variedad de cationes metálicos presentes en sistemas acuáticos. Los factores evaluados fueron pH, dureza del agua (presencia de calcio), presencia de materia orgánica como ácidos húmicos (AH) y presencia de ligantes orgánicos (ácido cítrico)^{30, 38, 80}. Este análisis fue llevado a cabo por medio del empleo de un diseño experimental 2⁴ (dos niveles y 4 factores), que consistió de 16 experimentos realizados por triplicado (**Tabla 5**) y dos concentraciones para cada factor, una concentración alta y una baja (los niveles altos fueron seleccionados de acuerdo a investigaciones realizadas de

toxicidad de diversos metales bajo la influencia de estos factores^{30, 38, 80}). Este tipo de diseños experimentales nos permiten determinar los factores principales o sus interacciones que afectan de manera significativa la respuesta a través de un análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 5. Diseño experimental 2⁴ empleada para el estudio de la influencia de 4 factores en la cantidad de Cu (II) internalizado. Valores codificados y reales de las variables son indicadas

EXPERIMENTO	pH	[Calcio] mM	[Ácidos húmicos] mg/L	[Ácido Cítrico] mM
A	-1 (5.5)	1 (0.68)	1 (12)	-1 (0.001)
B	1 (6.7)	-1 (0.081)	1 (12)	-1 (0.001)
C	-1 (5.5)	-1 (0.081)	-1 (1)	1 (0.1)
D	-1 (5.5)	1 (0.68)	-1 (1)	-1 (0.001)
E	-1 (5.5)	1 (0.68)	1 (12)	1 (0.1)
F	1 (6.7)	-1 (0.081)	-1 (1)	-1 (0.001)
G	1 (6.7)	1 (0.68)	-1 (1)	-1 (0.001)
H	-1 (5.5)	-1 (0.081)	1 (12)	-1 (0.001)
I	-1 (5.5)	-1 (0.081)	1 (12)	1 (0.1)
J	-1 (5.5)	1 (0.68)	-1 (1)	1 (0.1)
K	-1 (5.5)	-1 (0.081)	-1 (1)	-1 (0.001)
L	1 (6.7)	1 (0.68)	1 (12)	-1 (0.001)
M	1 (6.7)	-1 (0.081)	1 (12)	1 (0.1)
N	1 (6.7)	1 (0.68)	-1 (1)	1 (0.1)
O	1 (6.7)	-1 (0.081)	-1 (1)	1 (0.1)
P	1 (6.7)	1 (0.68)	1 (12)	1 (0.1)

El análisis de las respuestas obtenidas del diseño experimental 2⁴ en los dispositivos de MLSFH (**Figura 18**) por medio del ANOVA y gráficos de Pareto normalizados determinaron que la presencia de ligantes orgánicos (ácidos húmicos y cítrico), así como el incremento del pH en la fase donadora disminuyen significativamente la internalización de Cu (II), mientras que la presencia de Ca (II) no influye significativamente la internalización de este metal. El estudio individual de la cinética de extracción de Cu (II) bajo la presencia de ácido húmico corroboró que efectivamente la cantidad de Cu (II) internalizado disminuye considerablemente bajo la presencia de este ligante orgánico (**Figura 19**). Como veremos en la sección 4.3.3, este resultado fue diferente al obtenido para zinc, en el cual se observó que la presencia de los ácidos húmicos no tuvieron una influencia significativa en la internalización de este metal. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Smith²⁰, quién encontró que los ligantes orgánicos se unen con algunos cationes metálicos en el siguiente orden de enlace (en orden descendente): Pb>Cr>Cu>Ni>Cd>Zn. Esto quizás debido a que las constantes de formación de los complejos de cobre con los grupos carboxílicos presentes en los ácidos húmicos son más grandes que para el zinc.

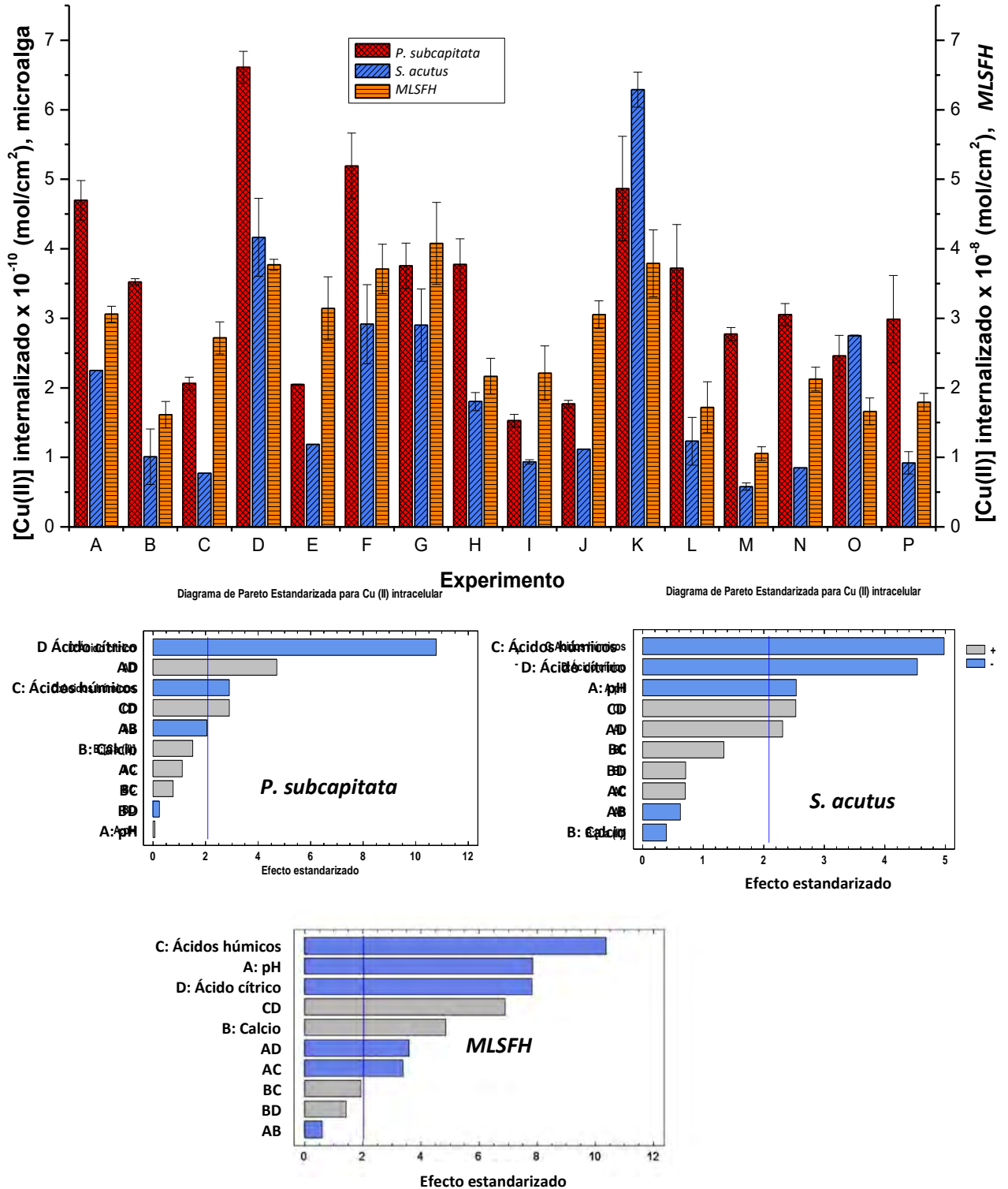


Figura 18. Cantidad total de Cu (II) internalizado y gráficos de Pareto obtenido después del análisis del diseño experimental 2⁴ mostrado en la Tabla 2 para los dispositivos de MLSFH y microalgas. (Empleando las condiciones de extracción mostradas en la Tabla 3).

Figura 19. Cinética de extracción de Cu (II) por dispositivos de MLSFH sin/con la presencia de 12 mg/L de Ácidos Húmicos (AH).

Resultados similares a los obtenidos por los dispositivos de MLSFH fueron observados del análisis del diseño experimental para la microalga *S. acutus* a través de ANOVA y gráficos de Pareto normalizado mostrados en la **Figura 18**, donde se observa una influencia negativa en la respuesta (disminución de la cantidad de Cu (II) internalizada) debido a la presencia de ligantes orgánicos (ácido húmico y ácido cítrico) y al incremento del pH de la solución donadora. El resultado obtenido de la influencia de los ácidos húmicos se complementó a través de la evaluación individual de la cantidad de Cu (II) internalizado por incrementos sucesivos de la concentración de ácidos húmicos en un intervalo de 2 a 14 mg/L, así como la evaluación de su cinética de extracción en presencia de este ligante orgánico (**Figura 20**). En la **Figura 20a**, se observa la disminución progresiva del Cu (II) internalizado con el aumento de la cantidad de AH en la solución acuosa hasta mantenerse prácticamente constante a $[AH] \approx 10$ mg/L, de la misma manera la cinética de extracción de Cu (II) demuestra una clara disminución del cobre internalizado en función del tiempo (**Figura 20b**). Estos resultados muestran que la internalización de Cu (II) se ve afectada de manera similar por la influencia de diferentes factores físico-químicos, tanto en los sistemas biológicos como en los dispositivos de MLSFH.

a)

b)

Figura 20. a) Influencia de la concentración de AH en la extracción de Cu (II) por *S. acutus*, b) Cinética de extracción de Cu (II) con/sin la presencia de 12 mg/L de Ácidos Húmicos (AH).

El análisis del mismo diseño experimental aplicado a la microalga *P. subcapitata* mostró al igual que los dispositivos de MLSFH y la especie *S. acutus* una disminución de la cantidad de Cu (II) internalizado en presencia de estos dos ligantes orgánicos, sin embargo, a diferencia de estos, el pH resultó ser un factor que no influye significativamente en el rango estudiado (5.5-6.7) como se analizará en la sección 4.2.4. Estos resultados obtenidos están en conformidad con algunos estudios reportados para la especie *P. subcapitata*, los cuales han mostrado que la toxicidad de cobre efectivamente decrece bajo la presencia de materia orgánica disuelta, y por el contrario incrementa con el aumento del pH de la solución acuosa²⁹. A pesar de que la dureza del agua (presencia de CaCO₃) disminuye la toxicidad en diversas especies de microalgas, Schamphelaere et al.²⁹ reportan que no se observó ninguna influencia en la toxicidad de Cu (II) a diversas concentraciones de CaCO₃ e inclusive aseguran que por el contrario se ha observado un incremento de la misma para *P. subcapitata*.

En la literatura no existen estudios de toxicidad de cobre en la microalga *S. acutus* bajo la influencia de estos factores.

4.2.3 Influencia de la especie libre en la internalización de cobre y análisis de correlación bivariada

Con el propósito de estudiar la influencia de la especie de Cu^{2+} libre en la fase aceptora con cada uno de los resultados obtenidos en ambos sistemas evaluados (biológicos y MLSFH), se determinó la cantidad de la especie libre presente en cada experimento del diseño experimental por medio de un electrodo selectivo de iones (ESI), obteniéndose los resultados mostrados en las gráficas de la **Figura 21**. El ANOVA y la gráfica de Pareto demostraron que efectivamente la cantidad de Cu^{2+} libre se ve influenciada principalmente por estos 3 factores: pH, ácidos húmicos y ácido cítrico, debido a que disminuyen considerablemente la concentración de esta especie en la fase donadora.

Este resultado obtenido sugiere como primer análisis una influencia directa de la especie libre sobre la respuesta de los dispositivos de MLSFH y la especie *S. acutus* (cantidad de metal internalizado), el cual si lo vemos desde el punto de vista de toxicidad es aplicable el modelo de la actividad del ion libre (Free Ion activity model, FIAM por sus siglas en inglés), que nos indica que la especie libre resulta ser la especie más tóxica en sistemas acuosos⁵¹; como veremos posteriormente a pH más altos este modelo no puede explicar el incremento de la cantidad de Cu (II) intracelular para la especie *P. subcapitata* (Sección 4.2.4).

Cobre ESI

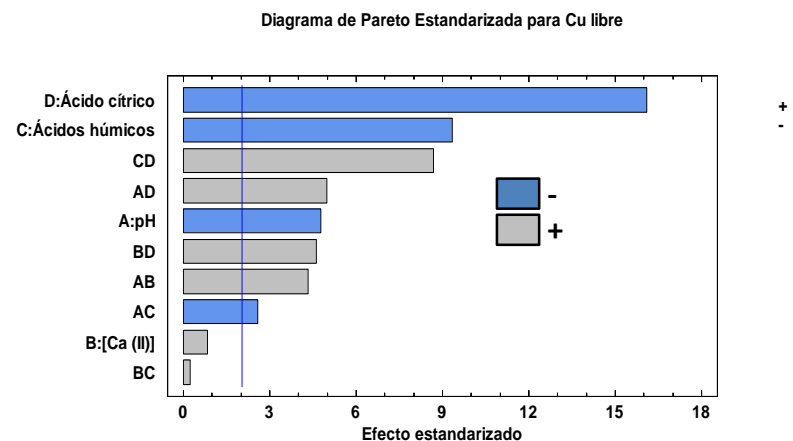


Figura 21. Cantidad de Cu^{2+} libre en la fase donadora en cada experimento (A-P) del diseño experimental 2⁴ de la Tabla 5, cuantificado por ESI de cobre (arriba) y diagrama de Pareto normalizado donde muestra la influencia de los diversos factores en la abundancia de Cu^{2+} libre en la fase donadora (abajo).

Se realizó un análisis estadístico de la influencia de la especie libre en las respuestas obtenidas en el diseño experimental 2^4 por los dispositivos de MLSFH y ambas especies de microalgas a través de un análisis de correlación bivariada de Pearson empleando el programa estadístico IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corp.), **Figura 22** y **Tabla 6**; el análisis de Pearson es una técnica estadística que nos permite determinar el tipo de correlación que existe entre las respuestas (cantidad de metal internalizada) de nuestros sistemas evaluados (MLSFH y microalgas); a través de este análisis estadístico es posible establecer los siguientes estatutos:

- Se observa una correlación positiva significativa entre las dos especies de microalgas ($R=0.627$). Este resultado nos indica diferencias significativas en la internalización del metal por los microorganismos con los cambios en las condiciones químicas del ambiente acuoso.
- Se observa una correlación positiva significativa entre la especie libre y la cantidad de metal internalizado para todos los sistemas evaluados, incluyendo los biológicos ($R_{S.acutus}=0.827$ y $R_{P.subcapitata}=0.735$) y el dispositivo de MLSFH ($R_{MLSFH}=0.753$), este resultado se acopla bien al modelo de la actividad del ion libre (FIAM), como se había discutido anteriormente.
- Se observa una correlación significativa positiva cuando comparamos la biodisponibilidad medida por los dispositivos de MLSFH y la microalga *S. acutus* ($R_{S.acutus}=0.690$), mientras que la comparación entre los dispositivos de MLSFH y la microalga *P. subcapitata* ($R_{P.subcapitata}=0.485$) indican que el comportamiento de internalización no puede ser adecuadamente modelado por el dispositivo en este caso.

El primer estatuto nos indica que existen diferencias significativas en la biodisponibilidad del metal aun cuando ambos organismos biológicos estudiados fueron microalgas, este resultado nos indica que debemos de tener cuidado para evaluar la biodisponibilidad si contamos con más de un indicador biológico para su evaluación, debido a que se pueden presentar diferencias significativas en los indicadores estudiados. El segundo estatuto claramente apoya el modelo de la actividad del ion libre, la cual nos indica que la especie libre resulta tener la mayor influencia en la toxicidad del metal, esto es observado particularmente para la especie *S. acutus* y los dispositivos de MLSFH. El último estatuto claramente indica que el dispositivo de MLSFH no puede emular ambos sistemas biológicos, debido a que este dispositivo emula mucho mejor el comportamiento de una microalga en particular (*S. acutus*); este comportamiento es atribuido a diferencias significativas entre ambas especies de microalgas como son: estructura y composición de proteínas transmembranales entre ambas especies de microalgas, así como diferencias debidas por necesidades nutricionales o por densidad celular¹².

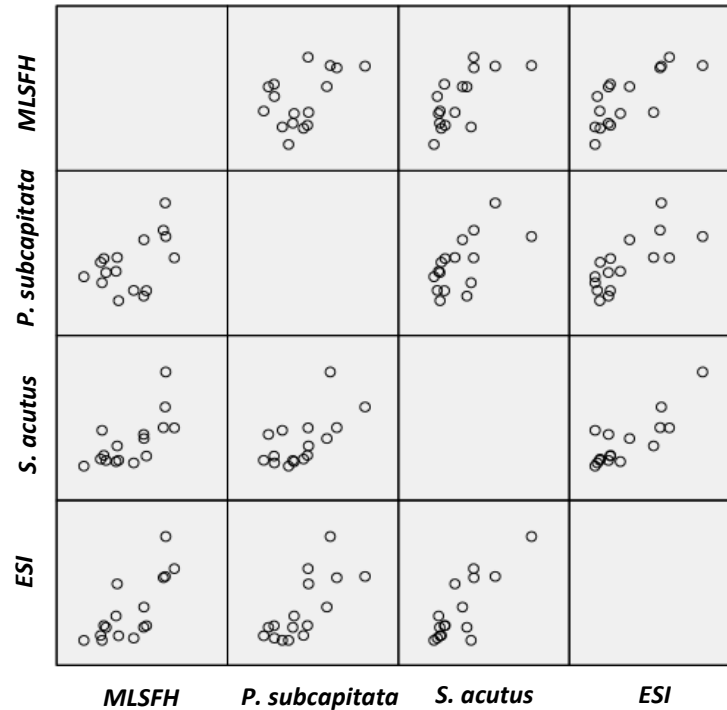


Figura 22. Gráfica de correlaciones bivariadas de la cantidad de Cu (II) internalizado para los tres sistemas bajo estudio (MLSFH, *P. subcapitata* y *S. acutus*) y de la cantidad de Cu²⁺ libre determinado por el ESI.

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson obtenidos del análisis del diseño experimental 2⁴ para Cu (II)

		Correlaciones			
		MLSFH	<i>P. subcapitata</i>	<i>S. acutus</i>	ESI
<i>MLSFH</i>	Correlación de Pearson	1	.485	.690**	.753**
	Sig. (bilateral)		.057	.003	.001
	N	16	16	16	16
<i>P. subcapitata</i>	Correlación de Pearson	.485	1	.627**	.735**
	Sig. (bilateral)	.057		.009	.001
	N	16	16	16	16
<i>S. acutus</i>	Correlación de Pearson	.690**	.627**	1	.827**
	Sig. (bilateral)	.003	.009		.000
	N	16	16	16	16
ESI	Correlación de Pearson	.753**	.735**	.827**	1
	Sig. (bilateral)	.001	.001	.000	
	N	16	16	16	16

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Estos conjuntos de resultados nos indican que el grado de biodisponibilidad del metal en el sistema químico y biológico está altamente relacionado con la química del agua, lo cual nos permite hacer uso de los dispositivos de MLSFH para predecir la biodisponibilidad empleando como indicador biológico a la microalga *S. acutus*.

4.2.4 Influencia del pH en la internalización de Cu (II)

Debido a que el pH es un factor importante en los estudios de biodisponibilidad de metales, se evaluó el efecto del pH de la solución aceptora en un intervalo de 5.5 a 9.0 para los dispositivos de MLSFH y las dos especies de microalgas. En la **Figura 23a** se observa que la cantidad de Cu (II) internalizado en los dispositivos de MLSFH decrece conforme el pH de la disolución aumenta, lo cual corrobora los resultados obtenidos en el diseño experimental 2⁴. Resultados similares fueron obtenidos para la microalga *S. acutus*, en el cual, se observó un decremento del Cu (II) internalizado al aumentar el pH (**Figura 23b**). Este comportamiento observado en ambos sistemas muestra una gran dependencia de la abundancia de la especie libre (Cu^{2+}) en la cantidad de Cu (II) internalizado, debido a que conforme la cantidad de Cu^{2+} libre disminuye con el aumento del pH, la internalización del metal en los dispositivos de MLSFH y la microalga *S. acutus* también decrece; en la **Figura 24** se muestra el diagrama de abundancia relativa de las especies de cobre en función del pH (Programa Hydra-MEDUSA). A diferencia de los resultados anteriormente presentados, el análisis de la influencia del pH para la microalga *P. subcapitata* resultó distinto a lo observado en los dispositivos de MLSFH y la microalga *S. acutus*, debido a que se observó la presencia de dos máximos a $\text{pH} \approx 6.5$ y a $\text{pH} \approx 8.5$ (**Figura 23b**) con respecto a la cantidad de Cu (II) internalizado, que indican posiblemente el predominio de especies químicas de Cu (II) que atraviesan la membrana con facilidad; cabe mencionar que resultados similares se obtuvieron cuando se evaluó la biodisponibilidad de Zn (II) en ambos sistemas evaluados, la cual se atribuyó a la especie ZnOH^+ (Ver sección 4.3.4).

a)

b)

MLSFH

Figura 23. Influencia del pH sobre la cantidad de Cu (II) en (a) dispositivos de MLSFH y (b) microalgas (Donde int=internalizado)

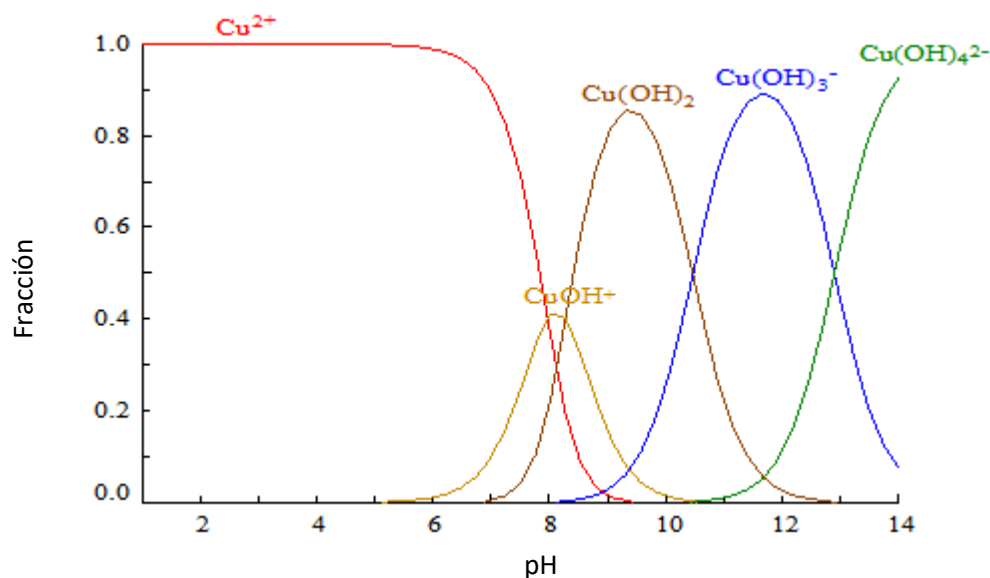


Figura 24. Diagrama de abundancia relativa de las especies de Cu (II) presentes a distintos valores de pH. ([Cu (II)]=1E-05M, T=25°C, I= 0.01).

El pH del agua es un factor importante que afecta la toxicidad de los metales en microalgas de agua dulce, sin embargo, se ha discutido que la relación entre pH y toxicidad es ampliamente dependiente de la especie biológica, debido a varios factores como son: cambios en la predominancia de especie, un decremento ocasionado por la competencia entre el catión metálico y los H⁺ por los sitios activos presentes en la superficie celular con el incremento del pH y un incremento del número de sitios cargados negativamente presentes en la superficie celular con el incremento del pH^{81, 82}.

4.2.5 Influencia de ligantes inorgánicos en la internalización de Cu (II)

Se estudió la influencia de 5 ligantes inorgánicos: cloruros, sulfatos, fosfatos, carbonatos y nitratos (a una concentración de 50 mg/L) sobre la internalización de Cu (II) en los dispositivos de MLSFH y en las dos especies de microalgas; de acuerdo a los resultados obtenidos para los dispositivos de MLSFH y la microalga *S. acutus* (**Figura 25**) se observó una disminución significativa de la cantidad de Cu (II) internalizado en presencia de carbonatos y fosfatos (F-test, P<0.05), sin embargo para la especie *P. subcapitata* no se observó una disminución significativa bajo la presencia de estos iones carbonatos, sino únicamente con la presencia de iones fosfatos (F-test, P<0.05).

Por medio de un electrodo selectivo de iones (ESI) se demostró la importancia del predominio de la especie Cu²⁺ libre en la internalización del metal; en la **Figura 26** se observa que la presencia de fosfatos y carbonatos disminuyen significativamente la cantidad de Cu²⁺ libre presente en la solución donadora (≈10⁻⁷ M), mientras que con los demás ligantes inorgánicos (Cloruros, sulfatos y nitratos) la cantidad de Cu²⁺ libre se encontraba alrededor de 3x10⁻⁶ M de una concentración total de Cu (II) de 1x10⁻⁵ M, lo cual demuestra la dependencia de la especie libre en la

internalización del metal en los dispositivos de MLSFH y en la microalga *S. acutus*, sin embargo, para la especie *P. subcapitata* no se observó esta dependencia bajo la presencia de iones carbonatos quizás debido a la posible formación de complejos hidróxido (por el incremento del pH al final de la extracción), lo cuales contribuyen a la internalización de Cu (II) en esta especie.

S. acutus
P. subcapitata
MLSFH

Figura 25. Influencia de 5 ligantes inorgánicos sobre la internalización de Cu (II) en a) dispositivos de MLSFH y b) *S. acutus* y *P. subcapitata* (Donde int=internalizado).

Cobre ESI

Figura 26. Cantidad de Cu²⁺ libre bajo la presencia de 5 ligantes inorgánicos

Son relativamente pocos los estudios que se han realizado de la influencia de ligantes inorgánicos en la toxicidad o extracción de metales por MLS, la mayoría de los estudios realizados sobre sistemas biológicos se centran en la evaluación del efecto de la dureza del agua (presencia de Ca y Mg) sobre la toxicidad del metal. En ellos se ha observado una clara disminución de la toxicidad a altas concentraciones de estas sales, sin embargo, la mayoría de los experimentos se han llevado a cabo empleando CaCO_3 , el cual, una vez disuelto en medio acuoso puede establecerse un equilibrio competitivo de los iones Cu (II) por los iones carbonatos, disminuyendo de esta forma la toxicidad de Cu (II), sin embargo, es posible también que exista una competencia de los iones Ca^{2+} y Cu^{2+} por los sitios activos de la membrana biológica, disminuyendo de esta forma la toxicidad del metal. En este trabajo se procuró trabajar de manera individual la influencia de los iones Ca (II) y de los iones carbonatos, con el objetivo de estudiar el efecto individual de cada ion sobre la internalización de Cu (II); de acuerdo a los resultados presentados en esta sección, se determinó que la cantidad de Cu (II) internalizada no disminuye debido a la presencia de iones Ca^{2+} en el medio acuoso, sino principalmente por la presencia de iones carbonatos presentes en la disolución acuosa, debido a que forma complejos estables con Cu^{2+} , disminuyendo de esta forma la abundancia de la especie libre y por lo tanto la toxicidad de este metal.

Muchos cationes metálicos divalentes, tales como Cu^{2+} , forman complejos muy fuertes con los iones carbonatos en aguas naturales. La formación de estos complejos decrece la concentración de Cu^{2+} libre que es tóxico para el fitoplancton⁸³. Debido a esto y de acuerdo a los resultados obtenidos, para la estimación de la biodisponibilidad de cobre en medios acuosos es necesario incluir una evaluación del contenido de carbonato presente en el medio.

Además de los iones carbonatos, los iones fosfatos han mostrado una reducción efectiva de la biodisponibilidad de diversos cationes metálicos en los seres humanos, como el caso del Plomo⁸⁴. Estos resultados indican que la biodisponibilidad del cobre es afectada también por este ligante y su contenido debe de ser evaluado al igual que el carbonato.

4.2.6 Influencia de cationes metálicos en la internalización de Cu (II)

Se evaluó la influencia individual de 5 cationes metálicos (Zn (II), Fe (II), Mg (II), Al (III) y K) a una concentración de 1×10^{-5} M en la internalización de Cu (II) en microalgas y dispositivos de MLSFH. Como resultado se determinó que ninguno de los cationes metálicos evaluados a esa concentración tiene alguna influencia significativa en la internalización de Cu (II) en ambos sistemas biológicos evaluados (*S. acutus* y *P. subcapitata*) como en los dispositivos de MLSFH (Figura 27).

Hasta el momento no existen suficientes estudios que nos indiquen la influencia de estos cationes metálicos en la toxicidad de Cu (II) para alguna de estas microalgas evaluada.

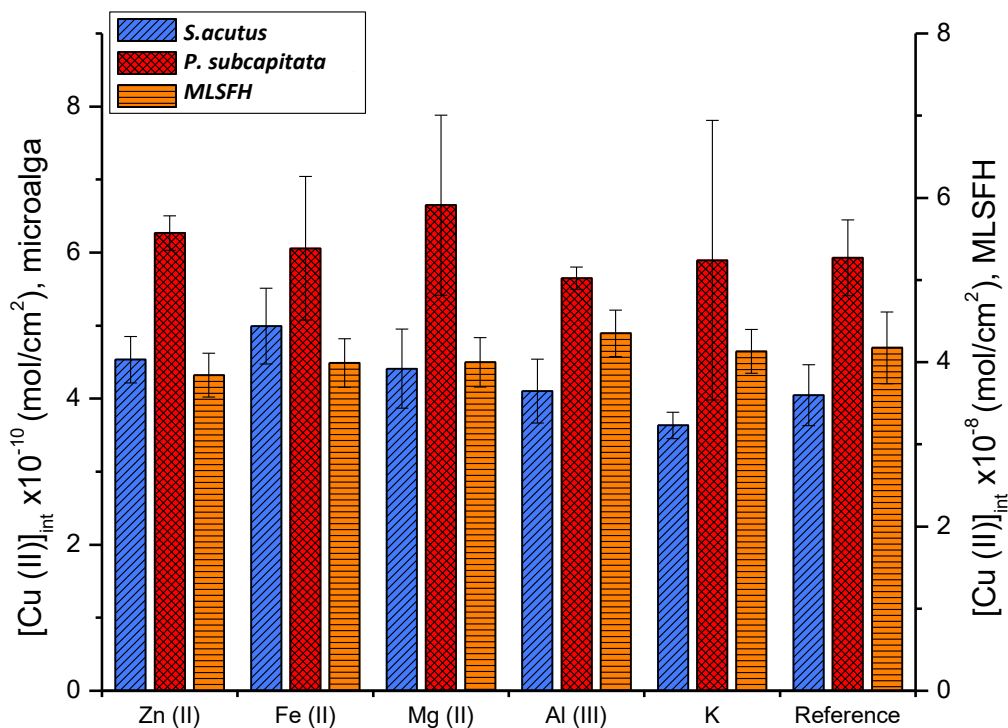


Figura 27. Influencia de cationes metálicos en la internalización de Cu (II) por dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas (*P. subcapitata* y *S. acutus*), dónde int=internalizado.

4.3 Preconcentración y biodisponibilidad de Zn (II) empleando los dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas (*S. acutus* y *P. subcapitata*)

4.3.1 Optimización de la extracción de Zn (II) por dispositivos de MLSFH

Estudios previos de la influencia de diversos factores en la extracción de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH fueron realizados⁷⁹, con el propósito de encontrar las condiciones óptimas de extracción de este metal bajo las condiciones de depleción despreciable (<5%). Las condiciones óptimas de extracción se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Condiciones optimizadas para la extracción de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH

Membrana	[Kelex-100] =0.03 M, Fenilhexano
Solución donadora	[Zn (II)]= 1x10⁻⁵ M, [MES]= 0.01 M, pH= 6.6
Solución aceptora	[HCOOH]=0.01 M, pH= 2.2
Tiempo de muestreo	40 minutos

4.3.2 Extracción de Zn (II) por dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas (*S. acutus* y *P. subcapitata*)

Las cinéticas de internalización (biodisponibilidad) fueron evaluadas para Zn (II) en ausencia de ligantes usando los dispositivos de MLSFH durante 40 minutos, bajo un régimen de depleción despreciable. Las condiciones presentadas en la **Tabla 7** se usaron para la evaluación de la biodisponibilidad en los sistemas biológicos y en los sistemas de MLSFH; se muestra en la **Figura 28a** que los dispositivos de MLSFH alcanzaron una cantidad máxima de Zn^{2+} internalizado de 4.7×10^{-8} ($\pm 1.4 \times 10^{-9}$) mol/cm² alrededor de los 30 minutos de extracción con un factor de preconcentración (F) de 800. Aunque valores más altos de factor de enriquecimiento fueron obtenidos a pH=1.0 en la solución aceptora, este valor no fue usado, debido a que el porcentaje de depleción de la solución donadora incrementaba alrededor del 20% y debido a que se requería 24 horas para alcanzar el equilibrio químico, en comparación a los 40 minutos de exposición empleando un pH=2.2 en la solución aceptora.

Figura 28. Cinéticas de extracción (internalización) de Zn (II): a) dispositivos de MLSFH y b) *S. acutus* y *P. subcapitata*.

El análisis de los flujos iniciales de internalización y de la cantidad de Zn (II) internalizado para cada microalga ($C_{\text{int max}}$, **Tabla 8**) indica que la especie *P. subcapitata* obtuvo valores más altos de Zn (II) internalizado que la especie *S. acutus* en un intervalo de tiempo más corto, debido a que el equilibrio se alcanzó alrededor de 120 minutos para *P. subcapitata* y de 200 minutos para *S. acutus* (**Figura 28b**).

Una comparación de la $C_{int\ max}$ calculada usando los dispositivos de MLSFH y las dos especies de microalgas mostró que el sistema químico internalizó entre 500 y 700 veces más zinc que los sistemas biológicos. Este hecho se explica considerando que este tipo de membranas líquidas son optimizadas para la preconcentración de este metal. Las diferencias observadas en la extracción de zinc por las dos especies de microalgas pueden ser atribuidas a cambios en la morfología, aclimatación⁸⁵, densidad¹² e inclusive necesidades nutricionales en cada microorganismo.

Tabla 8. Flujos iniciales (J_0) de Zn (II) y tiempo de muestro utilizados en los experimentos de internalización de Cu (II) por los dispositivos de MLSFH y las dos especies de microalgas

Sistema de membrana	J_0 (mol cm ⁻² s ⁻¹)	Tiempo de muestreo (min)
<i>MLSFH</i>	3.9×10^{-9}	40
<i>P. subcapitata</i>	3.4×10^{-12}	120
<i>S. acutus</i>	0.88×10^{-12}	200

4.3.3 Evaluación de los factores significativos en la internalización de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH y las dos especies de microalgas

Al igual que el cobre, la toxicidad y biodisponibilidad de Zn (II) se ve ampliamente influenciada por una gran variedad de factores presentes en aguas naturales, tales como: pH, ligantes inorgánicos y orgánicos, cationes metálicos concomitantes, etc. Por esta razón también se decidió evaluar la influencia de estos factores en la internalización de Zn (II) entre los dos sistemas estudiados (biológico y MLSFH) y comparar si la influencia de estos factores tenían el mismo efecto que fue observado para el caso de Cu (II); para ello se realizó un diseño experimental 2⁴ (dos niveles y cuatro factores) mostrado en la **Tabla 9**, en donde los factores evaluados fueron los mismo que se estudiaron para el caso del Cu (II): pH, calcio, ácidos húmicos y ácido cítrico, debido a que se ha observado que la toxicidad en una gran variedad de organismos acuáticos es afectada por la variación, presencia o ausencia de estos factores.

Tabla 9. Diseño experimental 2^4 empleado para estudiar la influencia de 4 factores en la cantidad de Zn (II) internalizado. Valores codificados y reales (paréntesis) de cada factor son mostrados.

Experimento	pH	Calcio (mM)	Ácidos húmicos (mg/L)	Ácido cítrico (mM)
1	-1 (5.5)	1 (1.36)	-1 (1)	-1 (0.001)
2	-1 (5.5)	-1 (0.068)	1 (12)	1 (0.1)
3	1 (9.0)	1 (1.36)	-1 (1)	-1 (0.001)
4	-1 (5.5)	1 (1.36)	1 (12)	-1 (0.001)
5	-1 (5.5)	-1 (0.068)	-1 (1)	1 (0.1)
6	1 (9.0)	-1 (0.068)	-1 (1)	1 (0.1)
7	-1 (5.5)	-1 (0.068)	1 (12)	-1 (0.001)
8	1 (9.0)	-1 (0.068)	1 (12)	-1 (0.001)
9	1 (9.0)	1 (1.36)	1 (12)	-1 (0.001)
10	-1 (5.5)	1 (1.36)	1 (12)	1 (0.1)
11	1 (9.0)	-1 (0.068)	1 (12)	1 (0.1)
12	1 (9.0)	1 (1.36)	-1 (1)	1 (0.1)
13	-1 (5.5)	-1 (0.068)	-1 (1)	-1 (0.001)
14	-1 (5.5)	1 (1.36)	-1 (1)	1 (0.1)
15	1 (9.0)	-1 (0.068)	-1 (1)	-1 (0.001)
16	1 (9.0)	1 (1.36)	1 (12)	1 (0.1)

Después de realizar los experimentos mostrados en la **Tabla 9**, se analizó el diseño experimental 2^4 empleando el software Statgraphic Centurion XVI. Los gráficos de Pareto y el ANOVA se usaron para determinar la influencia de los factores significativos en la respuesta (cantidad de zinc internalizada) para cada sistema. El análisis de las respuestas obtenidas del diseño experimental de todos los sistemas estudiados mostró que el pH en la solución donadora fue el factor principal con la mayor influencia sobre la cantidad de zinc internalizada, observándose un incremento de Zn (II) internalizado con el aumento del pH en la solución donadora (**Figura 29**). Es importante resaltar que estos resultados obtenidos fueron muy diferente a lo observado en el análisis del diseño experimental para Cu (II), en el cual, se observó una disminución de la cantidad de metal internalizado con el aumento del pH del medio acuoso para los dispositivos de MLSFH y la especie *S.acutus* (Ver sección 4.2.2).

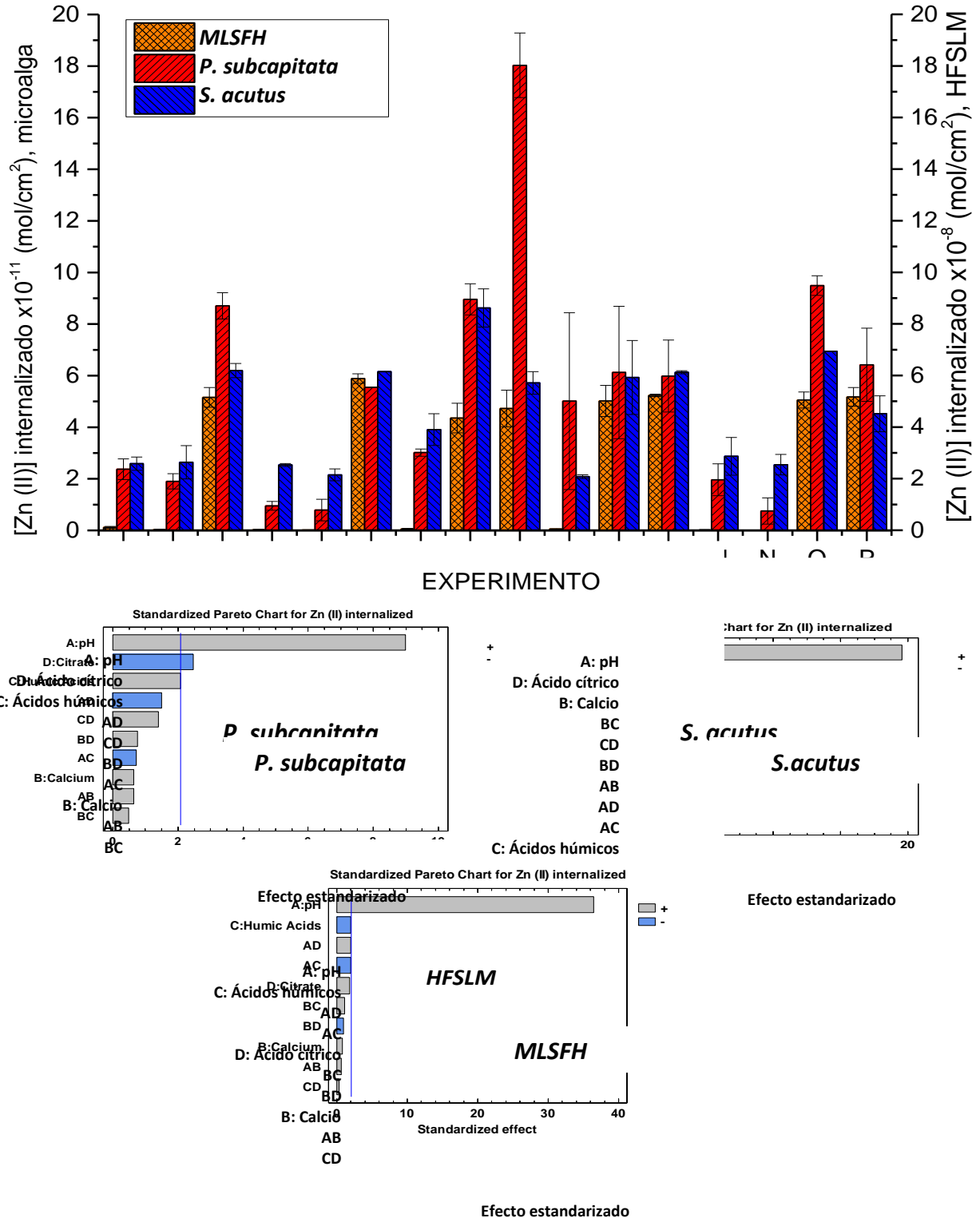


Figura 29. Cantidad de Zn (II) internalizado y gráficos de Pareto obtenido después del análisis del diseño experimental 2⁴ mostrado en la Tabla 9 para los dispositivos de MLSFH y microalgas

A diferencia del Cu (II), la presencia de ácidos húmicos no tuvo una influencia significativa sobre la cantidad de Zn (II) internalizada en todos los sistemas estudiados; aunque es difícil definir una constante de estabilidad de metales con los ácidos húmicos (debido a que son una mezcla de diversos ácidos orgánicos), Smith²⁰ estableció el siguiente orden de enlace de estos ligantes orgánicos con distintos cationes metálicos: $Pb > Cr > Cu > Ni \geq Cd > Zn$, el cual concuerda con los resultados obtenidos en el diseño experimental 2⁴ para Zn (II) y Cu(II). Sin embargo, la presencia de citrato en el medio acuoso, ocasionó un decremento en la respuesta en ambas especies de microalgas, mientras que en los dispositivos de MLSFH este factor no resultó significativo.

Referente al análisis de influencia de los iones Ca (II) sobre la cantidad de Zn (II) internalizada, se observó una mayor variabilidad en la respuesta de los sistemas biológicos que los otros factores evaluados, observándose una influencia negativa (disminución del Zn (II) internalizado) sobre la especie *S. acutus*, pero no significativa para la especie *P. subcapitata* y los dispositivos de MLSFH; como se ha mencionado anteriormente, estas diferencias de resultados entre los sistemas biológicos pueden ser atribuida a las diferentes necesidades nutricionales de cada especie de microalga.

Para evaluar la importancia de las especie libres y lábiles presentes en la solución donadora sobre la cantidad de Zn (II) retenido por los dispositivos de MLSFH; a través de un análisis de correlación de Pearson se comparó las principales especies presentes en la fase donadora en cada experimento del diseño experimental mostrado en la **Tabla 9** (Zn^{2+} , $ZnOH^+$ y especie lábiles, determinada con CHEAQS software) con la cantidad internalizada de este metal en los sistemas de membrana evaluados (**Tabla 10 y 11**). Como resultado, se encontró que hay una fuerte correlación positiva (0.910) entre la cantidad de zinc retenido por estos dispositivos y la concentración de la especie libre presente en cada experimento realizado a pH=5.5; sin embargo, a pH=9.0 el análisis de correlación mostró una fuerte dependencia de la concentración de la especie libre y lábiles sobre la cantidad de zinc retenido por los dispositivos de MLSFH ($r=0.910$). Este análisis de especiación demuestra la capacidad de estos sistemas químicos para extraer tanto las especies lábiles como libres en sistemas acuosos complejos y por lo tanto la dependencia de la biodisponibilidad con el predominio de ambas especies químicas.

De manera similar que los dispositivos de MLSFH, el análisis de correlación entre las especies químicas presentes en la solución donadora y los sistemas biológicos, mostró una alta dependencia de la cantidad de metal internalizada con la concentración de la especie libre a pH=5.5 ($r=0.922$ para *S. acutus* y $r=0.954$ para *P. subcapitata*), sin embargo, a pH=9.0 la cantidad de metal internalizado es dependiente de la suma de las especies libre y lábiles presentes en la solución acuosa ($r=0.947$ para *S. acutus* y $r=0.900$ para *P. subcapitata*), ver **Tabla 11**. Resultados similares fueron obtenidos por DeForest et al.⁸⁶, cuando desarrollaba el modelo del ligante biótico (BLM) para predecir la toxicidad crónica y aguda de zinc, debido a que se encontró que a pH>7.5 no era posible predecir la toxicidad de este metal únicamente empleando la especie libre y que la inclusión de una constante de enlace de la especie $ZnOH^+$ con los sitios activos de la membrana biológica mejoraba notablemente el BLM. Estos autores concluyen que al parecer la toxicidad de los complejos hidróxido a pH altos ha sido subestimada y proponen una constante de enlace para $ZnOH^+$. De la misma manera que DeForest, Allen et al⁸⁷, llegó a la conclusión que Zn^{2+} y $ZnOH^+$ deben de ser considerados como especies biodisponibles para explicar los resultados de toxicidad obtenida en bioensayos con algas.

Tabla 10. Análisis de especiación del diseño experimental presentado en la tabla 9, empleando el software CHEAQS. (Donde Cit=Citrato)

Experimento	Zn ²⁺	ZnOH ⁺	Zn(OH) ₂	Zn-Cit
	M	M	M	M
1	9.6E-06	2.6E-09	9.7E-12	2.3E-07
2	1.4E-06	4.1E-10	1.6E-12	6.0E-06
3	8.2E-07	6.9E-07	8.3E-06	2.5E-08
4	7.8E-06	2.0E-09	7.9E-12	2.0E-07
5	1.9E-06	5.5E-10	2.2E-09	7.9E-06
6	5.3E-07	4.9E-07	6.1E-06	2.4E-06
7	4.4E-06	1.4E-09	5.4E-12	2.0E-07
8	2.9E-07	2.8E-07	3.5E-06	1.6E-08
9	7.0E-07	6.0E-07	7.2E-06	2.2E-08
10	2.3E-06	6.3E-10	2.4E-12	6.7E-06
11	2.5E-07	2.3E-07	2.9E-06	1.2E-06
12	6.6E-07	5.6E-07	6.7E-06	2.0E-06
13	9.0E-06	2.8E-09	1.1E-08	3.2E-07
14	2.6E-06	6.9E-10	2.6E-12	7.3E-06
15	6.7E-07	6.4E-07	8.0E-06	3.4E-08
16	5.9E-07	4.9E-07	5.9E-06	1.8E-06

Tabla 11. Análisis de correlación bivarada de Pearson entre la cantidad retenida de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH o internalizada por los sistemas biológicos y la concentración de las diferentes especies químicas de zinc presentes en la solución donadora a pH= 5.5 y 9.9 del diseño experimental mostrado en la Tabla 9 (Donde Cit=Citrato).

Especies		pH=5.5			pH=9.0		
		MLSFH	<i>S. acutus</i>	<i>P. subcapitata</i>	MLSFH	<i>S. acutus</i>	<i>P. subcapitata</i>
Zn ²⁺	Correlación de Pearson	0.910	0.922	0.954	0.743	0.361	0.687
	Sig. (2-colas)	0.011	0.026	0.046	0.090	0.634	0.200
Zn ²⁺ + ZnOH ⁺	Correlación de Pearson	0.910	0.922	0.954	0.730	0.423	0.790
	Sig. (2-colas)	0.012	0.026	0.046	0.099	0.576	0.112
Zn ²⁺ + ΣZnLábil*	Correlación de Pearson	0.016	0.061	0.458	0.912	0.947	0.900
	Sig. (2-colas)	0.976	0.922	0.542	0.011	0.052	0.038

*La cantidad de especies lábiles fue determinada a partir de la suma de las especies químicas ZnOH⁺, Zn (OH)₂ y Zn-Cit

Por medio de un análisis de correlación bivariada de Pearson fue posible establecer las diferentes correlaciones que existen entre la cantidad de Zn (II) internalizado entre los sistemas biológicos y los dispositivos de MLSFH evaluados en los diseños experimentales (**Figura 30, Tabla 12**). De acuerdo con este análisis estadístico es posible establecer con un 99% de confianza las siguientes correlaciones entre los sistemas:

1. **Correlación muy alta y positiva entre *P. subcapitata* y los dispositivos de MLSFH ($r=0.915$).**
2. **Correlación muy alta y positiva entre los dispositivos de MLSFH y la especie *S. acutus* ($r=0.905$).**
3. **Y correlación alta y positiva entre las dos especies de microalgas evaluadas ($r=0.87$)**

Los primeros dos resultados demuestran que es posible emplear los sistemas de membranas líquidas como sustitutos de los sistemas biológicos para análisis de biodisponibilidad, debido a las altas correlaciones obtenidas entre ambos sistema; el tercer punto demuestra similitud en la biodisponibilidad de Zn (II) por ambas especies de microalgas, sin embargo a diferencia de la comparación con el sistema químico, la correlación entre ambos sistemas biológicos resultó ser más baja, lo cual podría ser debido a distintos factores, como son: diferencia en la composición de la membrana biológica, densidad celular, metabolismo celular, etc.

Estos resultados demuestran que es posible hacer uso de los dispositivos de MLSFH para monitorear la biodisponibilidad de metales pesados en sistemas acuáticos naturales empleando a las microalgas como sistemas biológicos de referencia.

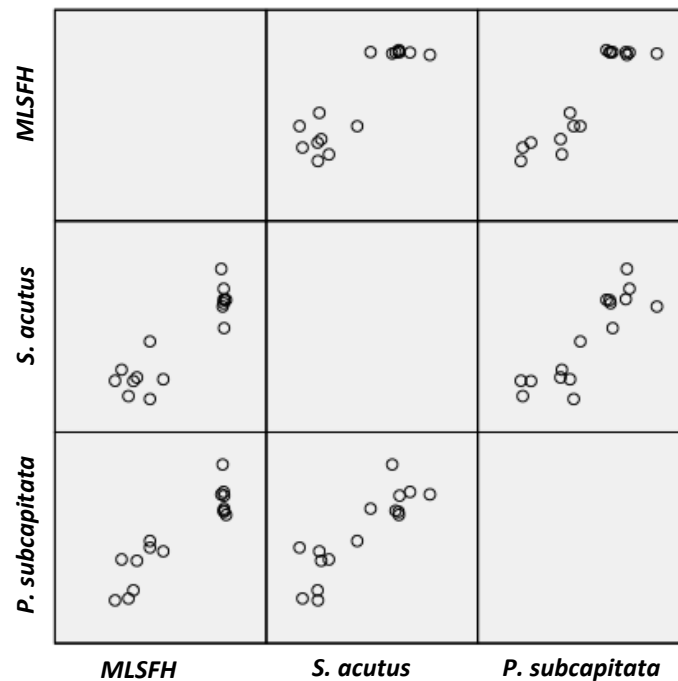


Figura 30. Análisis de correlación de Pearson para la cantidad de Zn (II) internalizado del diseño experimental 2^4 entre las microalgas y los dispositivos de MLSFH

Tabla 12. Coeficientes de correlación de Pearson obtenidos del análisis del diseño experimental 2⁴ para Zn (II)

		Correlaciones		
		<i>MLSFH</i>	<i>S. acutus</i>	<i>P. subcapitata</i>
<i>MLSFH</i>	Correlación de Pearson	1	,905**	,915**
	Sig. (bilateral)		,000	,000
	N	16	16	16
<i>S. acutus</i>	Correlación de Pearson	,905**	1	,870**
	Sig. (bilateral)	,000		,000
	N	16	16	16
<i>P. subcapitata</i>	Correlación de Pearson	,915**	,870**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	
	N	16	16	16

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

4.3.4 Influencia del pH en la internalización de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH y dos especies de microalgas

En la sección anterior fue demostrado por medio de un diseño experimental 2⁴ que el pH de la solución alimentadora fue el factor más importante en la extracción de Zn (II) por los sistemas biológicos y los dispositivos de MLSFH, debido a esto se evaluó la influencia individual del pH sobre la cantidad de Zn (II) internalizada en un rango de 5.5 a 9.0. En la **Figura 31** se observa un incremento de la internalización de Zn (II) para los dispositivos de MLSFH, con el incremento del pH hasta permanecer constante a partir de un pH~7.0; para los sistemas biológicos se observó un crecimiento progresivo de la cantidad de metal internalizado con el incremento del pH en la solución donadora, sin embargo, a diferencia de los dispositivos de MLSFH se puede apreciar la presencia de dos máximos a pH=7.0 y pH=8.5 para ambas especies de microalgas. Un comportamiento similar fue observado en la extracción de Cu (II) por la especie *P. subcapitata* a diferentes valores de pH en la solución donadora.

El incremento de la internalización de Zn (II) bajo la influencia del pH entre ambos microorganismos puede ser racionalizada considerando que la toxicidad de un metal es dependiente de varios factores como son: cambios en la predominancia de la especie libre con el pH, la disminución del efecto competitivo entre el catión metálico y los H⁺ por los sitios activos de la membrana con el incremento del pH, así como el incremento del número de sitios activos cargados negativamente sobre la superficie celular con el incremento del pH, lo cual da como resultado un incremento del metal enlazado⁸².

La presencia de tales máximos puede ser explicada, considerando la predominancia de diferentes especies lábiles de zinc (II) que podrían ser internalizadas simultáneamente (**Figura 32**). Resultados similares fueron obtenidos para *Chlorella sp.* por Wild et al.⁸², quienes demostraron que la toxicidad de zinc incrementa 50 veces cuando el pH incrementa de 5 a 8.

Figura 31. Influencia individual del pH sobre la cantidad de Zn (II) internalizado por *P. subcapitata*, *S. acutus* y dispositivos de MLSFH (a); diagrama de abundancia relativa de especie para zinc a diferentes valores de pH (b)

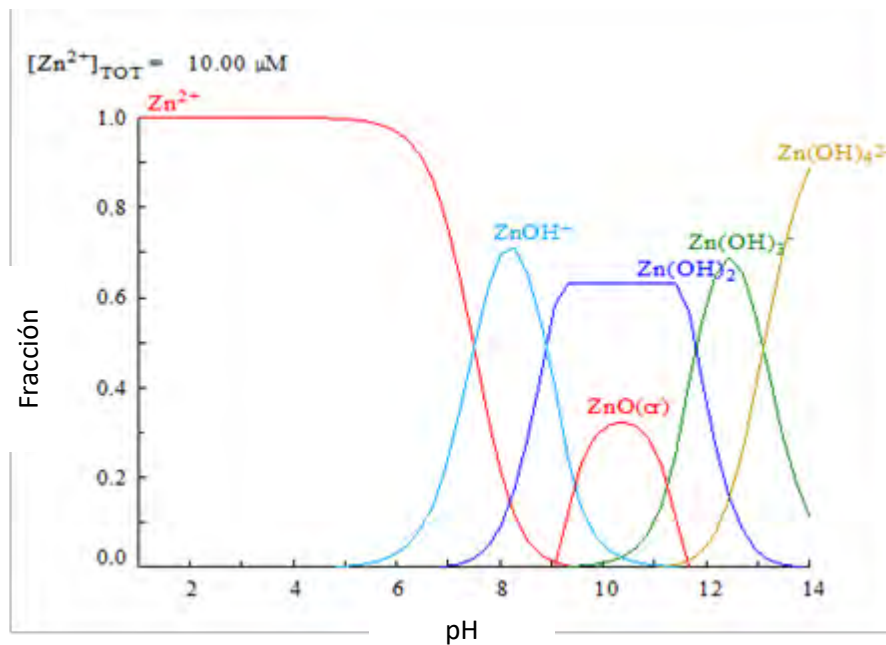


Figura 32. Diagrama de abundancia relativa de las especies de Zn (II) presentes a distintos valores de pH ($[Zn(II)] = 1E-05M$, $T = 25^\circ C$, $I = 0.01$).

Una posible explicación a este comportamiento puede ser dado, considerando la co-participación de la especie $ZnOH^+$ (la cual es una especie que se encuentra en concentraciones significativas a esos valores de pH de la solución donadora, **Figura 32**) como se sugirió en experimentos empleando los dispositivos de MLSFH⁷⁹ (ver la sección anterior).

4.3.5 Influencia de ligantes inorgánicos en la internalización de Zn (II)

Se evaluó la influencia en la internalización de Zn (II) en los sistemas biológicos y químicos de 5 ligantes inorgánicos comunes en medios acuosos naturales: cloruros, sulfatos, fosfatos, nitratos y carbonatos, a una concentración de 0.01 M. Los resultados son mostrados en la **Figura 33**. El ANOVA para *S. acutus* (F-test, $P < 0.05$) mostró que 3 ligantes tuvieron una influencia significativa sobre la internalización de Zn (II) en el siguiente orden descendente: sulfatos, fosfatos y carbonatos, mientras que para la especie *P. subcapitata* se observó una influencia significativa de los siguientes ligantes inorgánicos: sulfatos, fosfatos y nitratos (en orden descendente).

P. subcapitata
S. acutus

Figure 33. Influencia individual de ligantes inorgánicos sobre la cantidad de Zn (II) internalizado por las dos especies de microalgas

Resultados similares a los obtenidos para especie *S. acutus* han sido observado en pruebas de toxicidad acuosa para ciertas especies de carpas cabezonas (*Pimephales promelas*) y pulgas de agua (*Daphnia magna*), para las cuales la concentración letal 50 (CL50) para sulfato de zinc han sido reportados en ordenes de magnitud más bajas que la observada con la forma de carbonato⁸⁸. Además, se ha reportado un efecto directo de diversas fuentes de fosfato (p. ej. KH_2PO_4) sobre la biodisponibilidad de zinc en determinadas plantas⁸⁹.

Con el objetivo de estudiar la influencia de estos ligantes inorgánicos en la internalización de Zn (II) en los dispositivos de MLSFH, se evaluaron sus cinéticas de extracción (**Figura 34**) y se determinaron los flujos de internalización inicial de este metal bajo la presencia de estos ligantes

inorgánicos, como resultado se obtuvo el siguiente orden descendente en los flujos de internalización: **Carbonato > Nitrato > Cloruro > Sulfato > Fosfato (Tabla 13)**. Este resultado nos indica que efectivamente los sulfatos y los fosfatos son los ligantes inorgánicos con mayor influencia en la biodisponibilidad de Zn (II) en todos los sistemas evaluados, disminuyendo considerablemente los flujos de internalización del Zn (II), para lo cual es necesario considerarlos para el estudio de biodisponibilidad de este metal en ambientes acuosos naturales.

Figure 34. Cinéticas de internalización de Zn (II) en los dispositivos de MLSFH bajo la presencia de ligantes inorgánicos (donde int=internalizado).

Tabla 13. Flujos iniciales y cantidad máxima internalizada de Zn (II) por los dispositivos de MLSFH bajo la presencia de 5 Ligantes inorgánicos (donde $C_{int\ max}$ = máxima cantidad internalizada).

Ligantes inorgánicos	$J_{0\text{aceptora}} \times 10^{-9}$ ($\text{mol cm}^{-2} \text{min}^{-1}$)	$C_{int\ max} \times 10^{-8}$ (mol/cm^2)
Carbonatos	5.9	4.4
Nitratos	3.1	4.1
Cloruros	2.4	4.5
Sulfatos	1.2	4.9
Fosfatos	0.56	4.1

Empleando las constantes de formación del software Hydra-MEDUSA se realizó el estudio de especiación de Zn (II) bajo la influencia de estos ligantes inorgánicos (**Tabla 14**) y se comparó con la cantidad de Zn (II) internalizada por los dispositivos de MLSFH y ambas especies de microalgas. Como resultado de este análisis se encontró que para los dispositivos de MLSFH, el comportamiento de internalización es dependiente principalmente de la especie libre ($r = 0.994$, p -valor = $5.76E-3$), con una ligera mejora considerando la especie $ZnOH^+$ ($r = 0.996$, p -valor = $4.33E-3$). Con respecto a la microalga *S. acutus* se encontró una alta correlación positiva entre la especie libre y la cantidad de metal internalizado en presencia de nitrato, sulfato, fosfato y carbonato ($r = 0.978$, p -valor = $2.21E-2$), y al igual que el dispositivo de MLSFH se observó una ligera mejora considerando la especie $ZnOH^+$ ($r = 0.985$, p -valor = $1.536E-2$). De igual forma que los dispositivos de MLSFH y la especie *S. acutus*, la especie *P. subcapitata* mostró una alta dependencia de la especie libre ($r = 0.926$, p -valor < $1E-6$). Estos resultados demuestran que a $pH=6.6$, la especie libre tiene la influencia más alta en la biodisponibilidad de Zn (II), tal y como predice el modelo de la actividad de la especie libre. Sin embargo, es importante resalta que a pH más alto es necesario considerar la presencia de las especies lábiles en los estudios de biodisponibilidad de este catión metálico.

Tabla 14. Análisis de especiación de zinc bajo la presencia de 0.01 M de ligantes inorgánicos empleando el software Hydra-MEDUSA (pH solución de alimentación=6.6, $[Zn(II)]=10^{-5}$ M), donde ac=acuoso.

Ligantes inorgánicos	Especies principales en la solución alimentadora (M)				
Cloruro	$[Zn^{2+}]$ 8.86E-06	$[ZnOH^+]$ 8.8601E-07	$Zn(OH)_2$ (ac) 3.52728E-09	$ZnCl^+$ 8.8601E-07	$ZnCl_2$ (ac) 2.497E-09
Nitrato	$[Zn^{2+}]$ 9.09E-06	$[ZnOH^+]$ 9.0876E-07	$Zn(OH)_2$ (ac) 3.61785E-09	-----	-----
Sulfato	$[Zn^{2+}]$ 2.7525E-06	$[ZnOH^+]$ 2.7525E-07	$Zn(OH)_2$ (ac) 1.09577E-09	$ZnSO_4$ (ac) 6.4473E-06	$Zn(SO_4)_2^{2-}$ 5.2366E-07
Fosfato	$[Zn^{2+}]$ 2.04E-06	$[ZnOH^+]$ 4.4674E-08	$Zn(OH)_2$ (ac) ----	$ZnH_2PO_4^+$ 7.9133E-06	-----
Carbonato	$[Zn^{2+}]$ 2.59E-06	$[ZnOH^+]$ 4.9711E-07	$Zn(OH)_2$ (ac) 3.02086E-06	$ZnCO_3$ (ac) 8.5884E-07	$ZnHCO_3^+$ 2.8127E-06

4.3.6 Influencia de cationes metálicos concomitantes

Fue estudiada la influencia de 6 cationes metálicos concomitantes (Co (II), Ni (II), Cu (II), Cr (VI), Pb (II) y Cd (II) a una concentración de 10^{-5} M) sobre la internalización de Zn (II) en los sistemas biológicos y en los dispositivos de MLSFH. Como resultado se observó un efecto sinérgico en la extracción de zinc, bajo la presencia de Cu (II) para la especie *S. acutus*, sin embargo, la presencia de este catión metálico no mostró una influencia significativa en la especie *P. subcapitata* (**Figura 35**); resultados similares han sido reportados por Ahsanullah et al.⁴² para otras clases de organismos biológicos, como una especie de camarón *Callinassa australiensis*, en el cual se observó un incremento de la cantidad de Zn (II) biodisponible bajo la presencia de Cu (II) en el

medio acuoso; de la misma forma, Utgikar et al.⁹⁰ observaron este incremento para ciertas especies de bacterias como *Vibrio fischeri*.

Resultados distintos fueron obtenidos para la especie *P. subcapitata*, donde se observó una influencia significativa (decremento de la cantidad de Zn (II) internalizada) bajo la presencia de 3 cationes metálicos: Pb (II), Cd (II) y Ni (II), mientras que en los dispositivos de MLSFH se observó una disminución de la cantidad de Zn (II) internalizado bajo la presencia de Cu (II), Pb (II) y Cd (II). Estos resultados muestran que la exposición simultánea de otros cationes metálicos puede influir en la biodisponibilidad de zinc (II), esto quizás por diferencias significativas en las necesidades nutricionales en cada especie de microalga o por la competencia de estos cationes concomitantes por los sitios activos presentes en las membranas biológicas. Se encuentran reportadas en diversas publicaciones diferencias significativas a la sensibilidad de metales en algunas especies biológicas, una vez que estas han sido expuestas a otros cationes metálicos. Un ejemplo de esta variabilidad ha sido demostrada en algunas especies de algas aisladas de ambientes contaminados, las cuales, típicamente muestran una mayor tolerancia a los metales que aquellas obtenidas de los laboratorios, debido a que desarrollan una tolerancia inducida por la exposición a altas concentraciones de metales⁹¹. Para una mejor determinación de la biodisponibilidad en ambientes acuosos, es necesario realizar una determinación cuantitativa de estos cationes metálicos que influyen en la internalización de Zn (II).

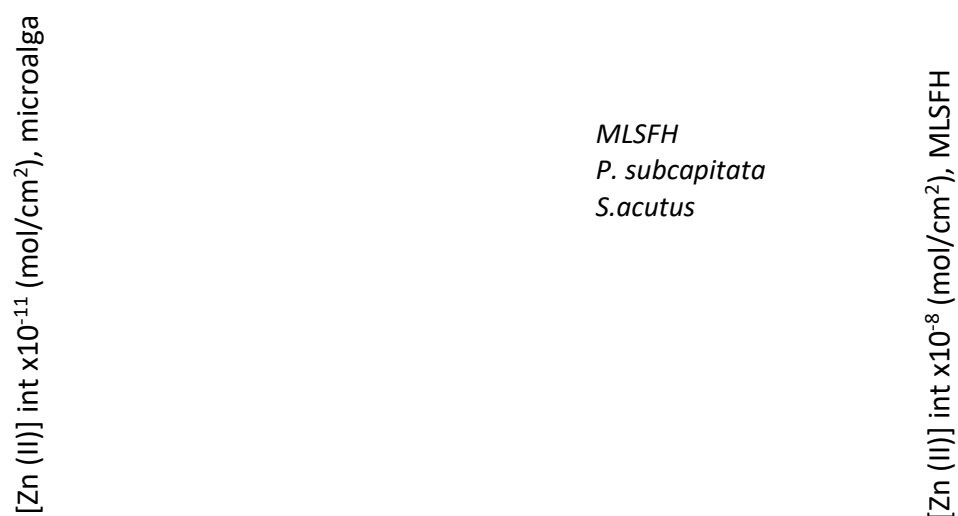


Figure 35. Influencia de cationes metálicos sobre la cantidad de Zn (II) internalizado para las dos especies de microalgas y los dispositivos de MLSFH

4.4 Desarrollo de una membrana polimérica de inclusión para la preconcentración de Cu (II)

4.4.1 Resumen

En esta sección experimental se estudiaron diversos factores que influyen en el proceso de extracción de Cu (II) en medio acuoso empleando membranas poliméricas de inclusión (PIM) y kelex-100 como agente extractante, factores como: pH de la solución aceptora, concentración y tipo de ligante en la fase aceptora, concentración de agente extractante y tipo de plastificante, fueron evaluados con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas para la extracción de este catión metálico en aguas sintéticas.

Como punto de partida en el desarrollo experimental se emplearon las mismas composiciones químicas optimizadas para los dispositivos de membrana líquida soportada de fibra hueca para la extracción de Cu (II), tanto en la solución donadora como en la solución aceptora (**Tabla 3**). Como resultado de la modificación de estos factores fue posible obtener alta eficiencia de extracción de Cu (II) a las 24 horas de extracción empleando este tipo de sistemas de membranas poliméricas. Se evaluó la estabilidad de estas membranas por medio del estudio de la eficiencia de extracción de Cu (II) en 4 ciclos, al igual que su selectividad bajo la presencia de iones concomitantes metálicos, tales como: zinc, hierro, cadmio y plomo. Por último, se determinó el factor de preconcentración de Cu (II) con la reducción del volumen de la solución aceptora.

4.4.2 Optimización en la extracción de Cu (II) por membranas poliméricas de inclusión (PIM)

4.4.2.1 Cinética de extracción de Cu (II) empleando las PIM

Como una primera aproximación para estudiar la extracción de Cu (II) en medio acuoso empleando este tipo de sistemas de membranas líquidas, se sintetizaron membranas poliméricas de inclusión (PIM) siguiendo el método de preparación empleado por Aguilar-Cordero et al.¹⁴ (Sección 3.5) y se estudió su comportamiento cinético en ausencia de ligantes orgánicos e inorgánicos. En la **Figura 36** se observa claramente un descenso de la concentración de Cu (II) en la solución donadora, mientras que en la fase aceptora solamente se observó un ligero incremento de la concentración de este metal (<5%). La reacción involucrada en el proceso de extracción del Cu (II) por el agente extractante en estos sistemas de membranas es igual al propuesto para los dispositivos de membrana líquida soportada (MLS).

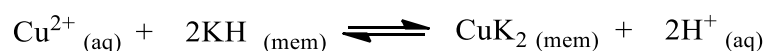


Figura 36. Comportamiento de extracción de Cu (II) en las PIMs, empleando Kelex-100 como agente extractante (Donde KH= Kelex-100, ac=acuoso y mem= membrana)

Este comportamiento nos indica que la mayor parte de Cu (II) presente en la fase donadora se retuvo en la membrana polimérica debido a que las condiciones experimentales empleadas en la fase aceptora o la composición de la PIM no eran las adecuadas para la re-extracción de este metal (alcanzando como máximo un 5% de extracción); esta fuerte retención del complejo $[\text{CuK}_2]$ en la matriz polimérica puede ser explicada debido a tres causas principales:

1. Retención debida a una fuerte interacción del agente plastificante con el complejo metálico formado (CuK_2).
2. Retención ocasionada por la presencia de altas concentraciones del agente extractante en la membrana.
3. Retención debida a una constante de formación baja del Cu (II) con el ligante presente en la solución aceptora.

Debido a estos resultados se decidió variar la composición de la membrana polimérica que permitiera una mejora en el proceso de re-extracción por la fase aceptora pero sin la modificación de la composición química en la fase donadora (la cual emula los sistemas naturales).

4.4.2.2 Influencia de la concentración de Kelex-100 y 2-Nitrofenil-Octil-eter (NPOE por sus siglas en inglés) en la matriz polimérica

Para mejorar la eficiencia de extracción de Cu (II) por las PIM (de acuerdo a la composición de Aguilar-cordero et al.¹⁴) se modificó la concentración del agente extractante (Kelex-100) y del plastificante NPOE en la matriz polimérica, manteniendo constante la cantidad de Triacetato de celulosa (CTA por sus siglas en inglés), para ello se emplearon las composiciones mostradas en la **Tabla 15**. Es importante resaltar que las características físicas de la membrana, como la flexibilidad, es un factor muy importante en el proceso de extracción debido a que una membrana poco flexible puede romperse durante los experimentos de transporte.

Tabla 15. Composición de las membranas estudiadas (modificando concentración de Kelex-100 y NPOE)

PIM	% Kelex-100	% NPOE	CARACTERÍSTICAS
KH-NPOE-1	22	55	Flexible
KH-NPOE-2	36	45	Flexible
KH-NPOE-3	32	32	Flexible
KH-NPOE-4	20	39	Flexible
KH-NPOE-5	13	27	Quebradiza

La primera membrana (KH-NPOE-1) es la que utilizamos de referencia para determinar si existe un aumento o una disminución en la eficiencia de extracción de Cu (II) (el comportamiento cinético de extracción de Cu (II) por esta membrana es la que presentamos en la **Figura 36**). Los resultados de la extracción de Cu (II) de las membranas KH-NPOE-2, KH-NPOE-3 y KH-NPOE-4 se muestran en la **Figura 37**. Debido a que no fue posible obtener membranas estables con composición de NPOE menores o igual al 27% (KH-NPOE-5), se decidió no emplear concentraciones más bajas de este plastificante.

De los resultados obtenidos, únicamente la composición de la membrana de KH-NPOE-4 fue la que mostró una mejora en la eficiencia de extracción de Cu (II) que con las otras membranas evaluadas, demostrando de esta forma que la disminución de la concentración del agente extractante y del plastificante (NPOE) en la matriz polimérica incrementan la eficiencia de extracción de Cu (II); la membrana KH-NPOE-4 alcanzó una eficiencia de 10% a las 6 horas evaluadas, mientras que las otras composiciones de membranas no mostraron eficiencias de extracción mayores al 5 %. Esta baja eficiencia de extracción obtenida para Cu (II) es debida a la acumulación del catión metálico en la membrana polimérica por la formación del complejo K_2Cu , el cual, es visualmente identificable por el cambio de color en la membrana (**Figura 38**).

Figura 37. Comportamiento de extracción de las membranas evaluadas en la Tabla 15 ($[\text{Cu (II)}]=1 \times 10^{-5} \text{M}$, $[\text{HCOOH}]=0.01 \text{M}$, $\text{pHstrip}=2.0$, $[\text{MES}]=0.01 \text{M}$, $\text{pH feed}=6.6$)

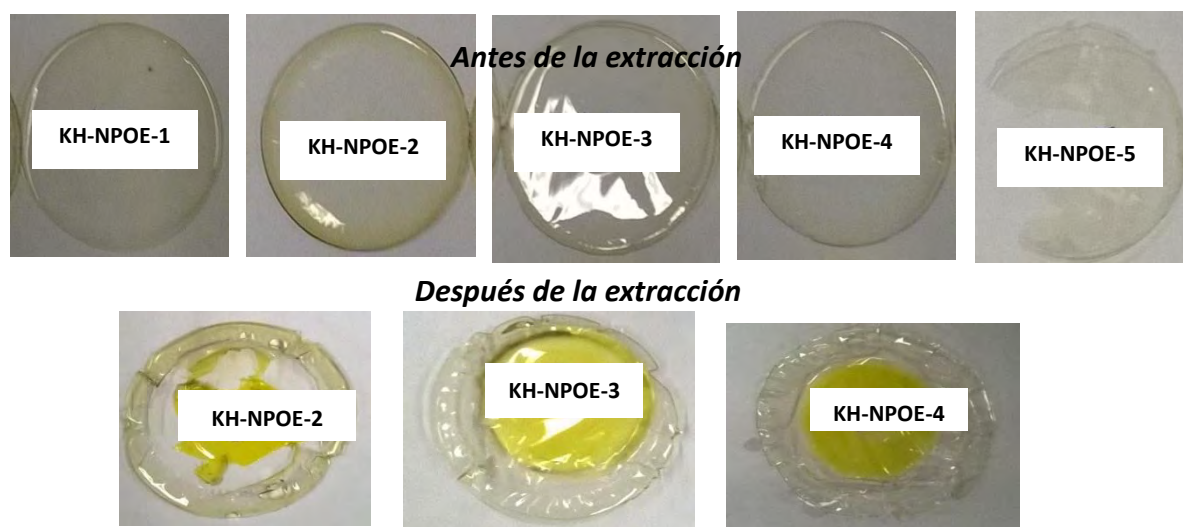


Figura 38. Apariencia física de las membranas con la composición química mostrada en la Tabla 15 (antes y después de la extracción)

Debido a este resultado, se decidió disminuir la concentración de extractante (Kelex-100) manteniendo constante la concentración de plastificante NPOE (39%). Para ello solamente se evaluaron 2 concentraciones de Kelex-100 (10 % y 5%). Los resultados demuestran que existe una mejora en la extracción de Cu (II) con la disminución de la concentración de este agente extractante, alcanzando eficiencias de extracción de alrededor de 23% a las 24 h de extracción con el 5% de Kelex-100 (**Figura 39**).

Membrana NPOE-Kelex-10%

Membrana NPOE-Kelex-5%

Figura 39. Extracción de Cu (II) empleando a) 5% y b) 10% de agente extractante (Kelex-100) en la matriz polimérica

Debido a que se perdía estabilidad de la membrana con la disminución de la concentración de agente plastificante NPOE en la matriz de la membrana polimérica de inclusión, se decidió probar otros tipos de agentes plastificantes en la extracción de este metal.

4.4.2.3 Influencia del tipo de plastificante en la extracción de Cu (II) por PIM

Además de proporcionar plasticidad a la membrana, haciéndola más flexible y menos quebradiza, se ha demostrado que el agente plastificante juega un papel crucial en la extracción de cationes metálicos⁹². Debido a esto, se estudió la influencia del tipo de plastificante en la re-extracción de Cu (II) por PIM en la fase aceptora; para ello se evaluaron cuatro agentes plastificantes comúnmente empleados en la síntesis de membranas poliméricas de inclusión: 2-nitrofenil octil éter (NPOE por sus siglas en inglés), dimetilftalato (DMP por sus siglas en inglés), tris (2-etilhexil) fosfato (TEHP por sus siglas en inglés) y tris (2-Butoxietil) fosfato (TBEP por sus siglas en inglés). La estructura de cada plastificante se muestra abajo en la **Figura 40**.

La composición de cada PIM consistió de 22% extractante (Kelex-100) y 55% Plastificante. (Los resultados de la extracción de Cu (II) empleando NPOE se presentaron en la sección anterior).

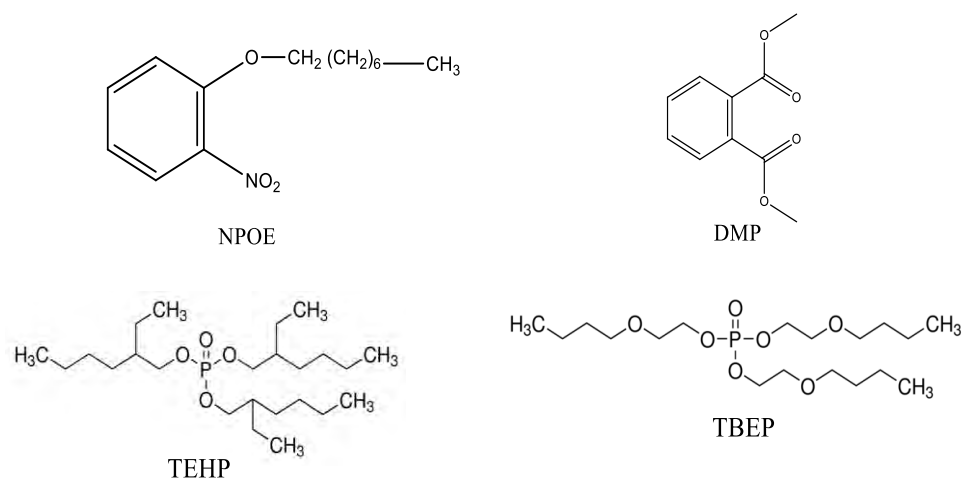


Figura 40. Plastificantes empleados en las PIM para la extracción de Cu (II)

Como se observa en la **Figura 41**, de los cuatro plastificantes evaluados el que presentó una mayor re-extracción de Cu (II) en la fase aceptora fue el plastificante TEHP, el cual obtuvo una eficiencia de extracción del 18% alrededor de las 24 h. Debido a que en experimentos anteriores con NPOE se observó un incremento de la extracción de Cu (II) con la disminución de la concentración de Kelex-100 en la matriz polimérica, se decidió evaluar este parámetro.

Figura 41. Influencia del tipo de Plastificante en la extracción de Cu (II)

4.4.2.4 Influencia de la concentración de Kelex-100 en la extracción de Cu (II) empleando TEHP

Otro factor muy importante en la extracción de metales por PIM es la influencia de la concentración del agente extractante, por esta razón se seleccionó la mejor composición de membrana de acuerdo a los experimentos anteriores y se varió la concentración del agente extractante en la membrana (10% y 5% p/p).

Los resultados de la extracción se muestran en la **Figura 42**, donde se observa una mejoría en la extracción de Cu (II) con la disminución de la concentración de extractante en la matriz polimérica, sin embargo, se observa un mayor incremento de la extracción de Cu (II) en la fase aceptora en comparación del empleo de NPOE como agente plastificante, alcanzando una eficiencia de extracción de Cu (II) de aproximadamente el 65% a las 24 h y observándose todavía una leve acumulación de Cu (II) en la membrana polimérica. Este resultado se debe principalmente a una mayor difusión del complejo K_2Cu ocasionado por la menor viscosidad de este agente plastificante, facilitando la liberación de este metal en la fase aceptora. Este conjunto de resultados nos indica que es posible el empleo de las membranas poliméricas de inclusión como muestreador pasivo para la extracción de Cu (II), sin la modificación de la composición química de la fase donadora, lo cual emula a un sistema acuoso natural.

Membrana TEHP-Kelex-10%

Membrana TEHP-Kelex-5%

Figura 42. Influencia de la concentración de Kelex-100 sobre la extracción de Cu (II) empleando TEHP como agente plastificante. A) 10% de Kelex-100 y b) 5% de kelex-100

4.4.2.5 Influencia de la concentración de ligante y pH de la fase aceptora en la eficiencia de extracción

Debido a que se observó una gran mejoría en la extracción de Cu (II) con la modificación de la matriz polimérica, se decidió evaluar el efecto que tiene la concentración de ácido fórmico (HCOOH) y el pH de la fase aceptora en la eficiencia de extracción, esto se realizó debido a que estudios previos con membranas líquidas soportadas demostraron que el ácido fórmico es el ligante ideal en la fase aceptora para la extracción de diversos cationes metálicos empleando Kelex-100 como agente extractante¹⁴, de igual forma se encontró que la disminución del pH en la fase aceptora incrementa notablemente la eficiencia de extracción de estos cationes metálicos⁸⁰. La modificación de la concentración de ligante en la solución aceptora aumentaría los sitios de unión con los cationes metálicos, promoviendo el desplazamiento de la reacción hacia la formación del complejo con el ácido fórmico y favoreciendo el proceso de extracción, mientras que la disminución del pH en la fase aceptora aumentaría la regeneración del agente extractante y el contra-transporte protónico, favoreciendo de esta forma, la extracción de Cu (II) de acuerdo al diagrama de extracción mostrado en la **Figura 8**.

Para ello se evaluaron 2 concentraciones distintas de ácido fórmico 0.1 M y 0.01 M a 2 distintos valores de pH: 1.0 y 2.2 (en la fase aceptora). Los resultados se muestran en las gráficas de la **Figura 43**, donde se observa claramente que no existe una mejoría en la eficiencia de extracción de Cu (II) con el incremento de la concentración de HCOOH (**Figura 42b y 43b**), este resultado nos conduce a seguir manteniendo la $[HCOOH]=0.01M$ como la concentración óptima para la extracción de Cu (II); por el contrario cuando se evaluó la influencia del pH de 1.0 y 2.2 en la solución aceptora, se observó una clara mejoría en la eficiencia de extracción a $pH=1.0$, alcanzándose un porcentaje de extracción de alrededor de 97% a las 24 hrs, lo cual supera la obtenida a $pH=2.2$, donde la eficiencia de extracción fue de 65% en el mismo intervalo de tiempo.

Figura 43. Influencia del pH y de la $[HCOOH]$ en la eficiencia de extracción de Cu (II) por las PIM

4.4.2.6 Influencia del triacetato de celulosa (CTA) en la extracción de Cu (II)

Se optimizó la composición de la base polimérica de triacetato de celulosa (CTA por sus siglas en inglés) para mejorar la estabilidad física y la eficiencia de transporte de Cu (II) por la membrana polimérica de inclusión (PIM); este estudio se realizó debido a que las condiciones ácidas de la fase aceptora desgastaban rápidamente la membrana y eran más propensas a romperse. Por esta razón se estudió la eficiencia de extracción de Cu (II) cuando se incrementó la concentración de CTA. Se evaluaron 2 diferentes pesos de CTA, el primero de 50 mg de CTA/membrana y el segundo de 70 mg de CTA/membrana. A pesar de que ambas membranas mostraron una gran mejoría en la flexibilidad, en las gráficas de la **Figura 44** se observa que la membrana con el menor porcentaje de CTA (50 mg) alcanzó una mayor eficiencia de extracción que aquella que contiene un mayor porcentaje de CTA (70 mg), debido a que se observa retención del metal Cu (II) en la matriz polimérica con el incremento de la cantidad de CTA, alcanzándose eficiencias de extracción de 88% en comparación del 97% para la membrana con 50 mg de CTA; debido a estos resultados se decidió trabajar con la siguiente composición optimizada para la posterior síntesis de las membranas para la extracción de Cu (II): 39% de CTA, 58.5 % de TEHP y 2.5 % de Kelex-100 (% en peso).

Figura 44. Influencia de la cantidad de CTA en la eficiencia de extracción de Cu (II)

4.4.3 Prueba de estabilidad de la PIM

Una de las principales características de las PIM, lo cual lo hacen muy útiles en procesos de extracción en comparación a las membranas líquidas soportadas es su mayor estabilidad, esta característica es esencial si se desea aplicar este tipo de dispositivos para preconcentrar metales en sistemas naturales, donde factores como la velocidad y el tiempo de agitación puedan provocar pérdidas del extractante y por lo tanto una incorrecta medición del catión metálico en aguas naturales. Por esta razón, se sometieron estas membranas poliméricas de inclusión a 4 ciclos de extracción de 24 horas cada uno para observar si se producía una variación en la extracción en intervalos de tiempo prolongados. Los resultados se muestran en la **Figura 45**.

Se encontró poca variación en la eficiencia de extracción del ciclo 1 al ciclo 3, donde se observó un decremento del 97% al 95% en la extracción de Cu (II), sin embargo, se observó un mayor descenso en el ciclo 4, en cual se obtuvo una eficiencia de extracción del 88%. Estos resultados corroboran que las membranas poliméricas de inclusión tienen una alta estabilidad y que pueden ser empleadas durante grandes intervalos de tiempo sin observarse grandes modificaciones en el proceso de extracción, lo cual son candidatas excelentes para el muestreo pasivo de Cu (II) en ambientes acuosos naturales.

Para el caso de los dispositivos de MLSFH a intervalos de tiempo mayores de 24 hrs se observa pérdida del extractante y decaimiento en el factor de preconcentración.

Figura 45. Estudio de la estabilidad de las PIM por medio de la evaluación de 4 ciclos de extracción

4.4.4 Estudios de la selectividad de la PIM

Otra característica importante que se le atribuye a las PIMs es el incremento de su selectividad ante otros metales en comparación a las membranas líquidas soportadas, por esta razón se evaluó la capacidad de esta membrana a ser selectiva ante metales concomitantes como son: Zn (II), Fe (II), Cd (II) y Pb (II), para ello se emplearon concentración de 10^{-5} M para cada catión interferente y se evaluó sus cinéticas de extracción (**Figura 46**).

Figura 46. Cinéticas de extracción de Cu (II) bajo la presencia de cationes metálicos concomitantes

De los cuatro cationes metálicos concomitantes evaluados, el único metal que presentó una alta eficiencia de transporte (84% a las 24 horas de extracción) resultó ser el Pb (II), debido a que para el caso de Zn (II) solo se transportó un 14%, mientras que para el Cd (II) alrededor de 1.8% a las 24 horas de extracción, sin embargo bajo la presencia de Fe (II) se observó que este metal se quedó retenido en la membrana sin llegar a atravesar a la fase aceptora, a pesar de ello no se observó una gran modificación en el perfil de transporte de Cu (II), lo cual, puede ser útil en la separación selectiva de este catión metálico concomitante. Estos resultados al compararse con los obtenidos en experimentos anteriores con los dispositivos de MLSFH, muestran que la selectividad se ve incrementada enormemente empleando las PIM que los dispositivos de MLSFH.

4.4.5 Influencia del volumen en la fase aceptora en la preconcentración de Cu (II) por la PIM

Una vez encontrada las condiciones óptimas de extracción de Cu (II) con PIMs y conocida su alta estabilidad al tercer ciclo de uso, se procedió a evaluar su capacidad para preconcentrar este metal a través de la variación del volumen de la fase aceptora. Para ello se evaluó el factor de preconcentración de Cu (II) en los siguientes volúmenes: 90 mL, 70 mL, 50 mL, 30 mL, 10 mL, 5 mL y 2 mL. Sin embargo para realizar este tipo de experimentos fue necesario el diseño y construcción de un pequeño dispositivo capaz de preconcentrar en la fase aceptora el catión metálico. El diagrama del dispositivo empleado en este trabajo se muestra en la **Figura 47**.

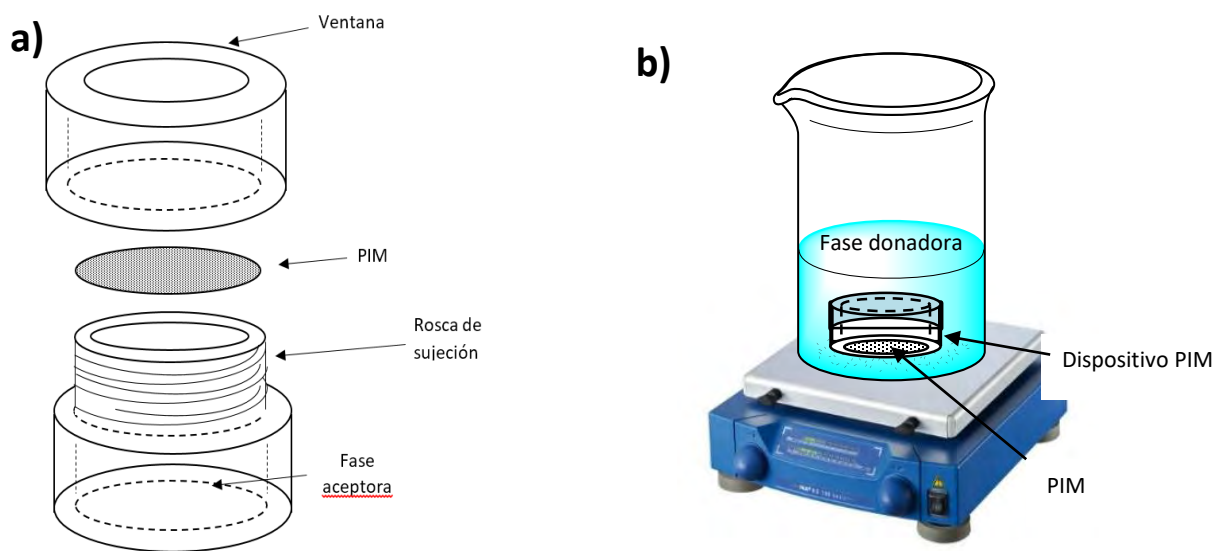


Figura 47. a) Dispositivo empleado para la preconcentración de Cu (II) con PIMs y b) colocación del dispositivo en la fase donadora para la extracción del Cu (II)

El dispositivo se colocó en la fase donadora y a través de agitación del tipo plano orbital se procedió a realizar el experimento de extracción, a diferencia de las celdas comunes de extracción (ver sección 3.8), este tipo de celdas utiliza la agitación por plato orbital, la cual es mucho más parecida al tipo de agitación que se presenta en ambientes acuosos naturales, por lo tanto, la cinética de extracción se ve modificada por este factor, debido a que la agitación empleando motores eléctricos resulta ser mucho más vigorosa, disminuyendo considerablemente el grosor de la capa en la interface membrana y bulto de la solución donadora, lo cual ocasiona una cinética de extracción más rápida para la celdas que utilizan agitación por motor eléctrico que por plato orbital. Este fenómeno se observa claramente en las gráficas de la **Figura 48**.

Figura 48. Influencia del tipo de celdas empleadas en la cinética de extracción de Cu (II)

Los resultados de la influencia del volumen de la fase aceptora en el factor de preconcentración y en la eficiencia de extracción son presentados en la **Tabla 16** y en la **Figura 49**, donde se observa que el factor de preconcentración experimental incrementa con la disminución del volumen de la fase aceptora casi de manera idéntica al valor determinado con la Ecuación 17 (Sección 1.6), observándose una desviación de los factores de preconcentración a volúmenes mucho más pequeños en la fase aceptora (5 mL y 2 mL). Esta ligera disminución en el factor de preconcentración experimental al esperado es debido principalmente a la acumulación de Cu (II) en la membrana polimérica a volúmenes más pequeños, lo cual se comprueba con el valor calculado de la fracción de recuperación (R), donde a volúmenes de 5 y 2 mL se obtienen recobros de 84 y 65 %, respectivamente, lo cual nos indica una retención de Cu (II) de 16 y 35 % de Cu (II) por la membrana a estos volúmenes de la fase aceptora; sin embargo a pesar de esta ligera acumulación del metal en la membrana se obtuvieron altos factores de preconcentración experimentales de alrededor de 31 a un volumen de 2 mL, lo que posibilita el empleo de este

dispositivo para preconcentrar Cu (II) en medios acuosos. También es importante resaltar que a diferencia de los dispositivos de MLSFH la cantidad de metal remanente en la solución donadora es prácticamente 0 a las 24 horas de extracción con los dispositivos PIM en todas las extracciones realizada. Esto indica que la depleción no es despreciable al volumen de fase donadora empleada, sin embargo, se espera que en sistemas de aguas naturales, la depleción sea prácticamente despreciable, debido a los grandes volúmenes de agua presentes en estos sistemas.

Figura 49. a) Factor de Preconcentración (F) de Cu (II) obtenido al disminuir el volumen de la disolución aceptora, b) Fracción mol de Cu (II) en la fase donadora

Tabla 16. Valores experimentales y calculados del Factor de preconcentración (F), Eficiencia de extracción (E) y Recuperación (R). Donde exp=experimental y cal=calculado.

Volumen	F _{exp}	F _{cal}	E	E'	R
90	1	1.0	1.01	0.96	1.05
70	1.27	1.3	0.99	0.95	1.04
50	1.79	1.8	1.00	0.98	1.02
30	2.76	3.0	0.92	0.99	0.93
10	8.8	9.0	0.98	1.00	0.98
5	15	18.0	0.84	1.00	0.84
2	31.2	45.0	0.65	1.00	0.65

5. Conclusiones y perspectivas

5.1 Conclusiones

- La comparación de la biodisponibilidad de Cu (II) en los dispositivos de MLSFH y las dos especies de microalgas indicó una fuerte relación entre estos dos sistemas y la abundancia de la concentración de Cu^{2+} libre presente en el medio acuoso. El análisis obtenido, a través del diseño experimental 2^4 reveló que los dispositivos de MLSFH emulan con mayor correlación a la especie *S.acutus* que a la especie *P. subcapitata*.
- Una reducción en la biodisponibilidad de Cu (II) fue observada con el incremento de ácido húmico (2-14 mg/L), ácido cítrico (10^{-4} a 10^{-6} mol/L) y contenido de fosfato (50 mg/L), así como una variación de este parámetro con el incremento del pH (5.5 a 9.0) en todos los sistemas estudiados. Mientras que la presencia de 50 mg/L de sulfato, nitrato y 1×10^{-5} M de cationes concomitantes (Zn (II), Fe (II), Mg (II), Al (III) y K) no mostraron una influencia significativa en la biodisponibilidad de Cu (II).
- Por medio del mismo diseño experimental de 2^4 de cuatro factores principales en la internalización de zinc en los sistemas biológicos y en los dispositivos de MLSFH. Como resultado del análisis del diseño experimental se determinó que de los cuatro factores evaluados, el único factor principal con mayor influencia en la internalización de zinc en todos los sistemas evaluados fue el pH del medio acuoso, debido a que se observó un incremento de la internalización de Zn (II) con el aumento del pH del medio acuoso; este resultado fue contrario a lo observado en el análisis para Cu (II), lo cual demuestra en gran parte que la internalización de estos metales en los sistemas de membrana líquida pueden emular la internalización en sistemas biológicos. De la misma manera que en el caso de cobre se determinó por medio de un análisis de correlación de Pearson que la especie libre juega un papel importante en la biodisponibilidad del metal a pH ácidos, sin embargo, se encontró que a pH básico también las especies lábiles incrementan la internalización de zinc.
- Se optimizó una membrana polimérica de inclusión (PIM) para la extracción de Cu (II) en medios acuosos naturales a una concentración de 1×10^{-5} M, con una eficiencia de 97% a las 24 horas de extracción. A través de un experimento de estabilidad por ciclos de extracción de 24 horas fue posible determinar que las membranas optimizadas pueden ser reutilizadas para extraer al Cu (II) por lo menos 4 veces más sin la modificación significativa de la eficiencia de extracción, lo cual lo hace un buen candidato para la aplicación en medios naturales. Por medio del estudio de la selectividad de Cu (II) bajo la presencia de cationes metálicos concomitantes fue posible determinar que el único metal que se extrae junto con el Cu (II) resulta ser el Pb (II) de los 4 metales estudiados. Se aplicó

de manera eficiente un dispositivo de PIM para la preconcentración de Cu (II) en aguas sintéticas, alcanzando factores de preconcentración de 31. Este conjunto de resultados posibilita el empleo de las membranas poliméricas de inclusión (PIM) para preconcentración selectiva de cationes metálicos en medios acuosos.

5.2. Perspectivas

- Sintetizar una membrana polimérica de inclusión (PIM) para la extracción selectiva de zinc (II) en medios acuosos empleando Kelex-100 como agente extractante.
- Evaluar la influencia de diversos factores como pH, presencia de ligantes orgánicos e inorgánicos, así como de cationes metálicos concomitantes sobre la extracción de Cu (II) y Zn (II) por medio del empleo de membranas poliméricas de inclusión (PIM).
- Evaluar la correlación que existe entre los sistemas biológicos (microalgas) y los dispositivos de membrana polimérica de inclusión (PIM) en la extracción de cobre y zinc.
- Realizar un estudio comparativo de la biodisponibilidad de ambos metales empleando los dispositivos de MLSFH, las PIM y DGT como método analítico de referencia.

6. Referencias Bibliográficas

1. Peijnenburg, W. J. G. M. and Jager, T. 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56, pp. 63–77.
2. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2007. Framework for Metals Risk Assessment. Risk Assessment Forum, Washington, DC. Disponible Online en: www.epa.gov/osa.
3. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2003. Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. Risk Assessment Forum, Washington, DC.
4. Morsi Abd-El-Monem, H., Corradi, M. G. and Gorbi, G. 1998. Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environ. Exp. Bot.*, 40, pp. 59–66.
5. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 1980. The *Selanastrum capricornutum* printz algal assay bottle test. Experimental design, application and data interpretation protocol. Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological. Corvallis Oregon. EPA-600/9-78-018.
6. Gaw, S., Northcott, G., Kim, N., Wilkins, A. and Jensen, J. 2012. Comparison of earthworm and chemical assays of the bioavailability of aged 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene, 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane, and heavy metals in orchard soils. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31, pp. 1306–1316.
7. Zhang, H., Davison, W., Sciences, E. and La, L. 2000. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Anal. Chem.*, 72, pp. 4447–4457.
8. Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., Buffle, J., Cleven, R. F.M.J., Davison, W., Puy, J., Van Riemsdijk, W.H. and Sigg, L. 2005. Dynamic Speciation Analysis and Bioavailability of Metals in Aquatic Systems. *Environ. Sci. Technol.*, 39, pp. 8545–8556.
9. Bayen, S., Worms, I., Parthasarathy, N., Wilkinson, K. and Buffle, J. 2006. Cadmium bioavailability and speciation using the permeation liquid membrane. *Anal. Chim. Acta.*, 575, pp. 267–273.

10. Bautista-Flores, A. N. 2011. Desarrollo de un dispositivo de membrana líquida soportada de fibra hueca (MLS-FH) para la preconcentración de Plomo (II) y metales concomitantes de soluciones acuosas. Tesis Doctoral. UNAM. Ciudad de México.
11. Slaveykova, V. I., Parthasarathy, N., Buffle, J. and Wilkinson, K. J. 2004. Permeation liquid membrane as a tool for monitoring bioavailable Pb in natural waters. *Sci. Total Environ.*, 328, pp. 55–68.
12. Franklin, N. M., Stauber, J. L. and Apte, S. C. 2002. Effect of Initial Cell Density on the Bioavailability and Toxicity of Copper in Microalgal Bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, pp. 742–751.
13. Bodar, C.W.M. 2007. Environmental risk limits for zinc. RIVM letter report 11235/2007. Environmental National Institute for Public Health and the Environment. Bilthoven, the Netherlands.
14. Aguilar-Cordero, J. C., Sánchez-Castellanos, M., Rodríguez De San Miguel, E. and De Gyves, J. 2001. Cd (II) and Pb (II) extraction and transport modeling in SLM and PIM systems using Kelex 100 as carrier. *J. Memb. Sci.*, 190, pp. 107–118.
15. Bautista-Flores, A. N., Rodríguez de San Miguel, E., De Gyves, J. and Jönsson, J. 2010. Optimization, evaluation, and characterization of a hollow fiber supported liquid membrane for sampling and speciation of lead (II) from aqueous solutions. *J. Memb. Sci.*, 363, pp. 180–187.
16. Fergusson, J.E. 1990. *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Oxford: Pergamon Press.
17. Jonnalagadda, S. B. and Rao, P. V. V. P. 1993. Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106, pp. 585–595.
18. Agbenin, J. O. and Welp, G. 2012. Bioavailability of copper, cadmium, zinc, and lead in tropical savanna soils assessed by diffusive gradient in thin films (DGT) and ion exchange resin membranes. *Environ. Monit. Assess.*, 184, pp. 2275–2284.
19. Sánchez-Marín, P. and Beiras, R. 2012. Quantification of the increase in Pb bioavailability to marine organisms caused by different types of DOM from terrestrial and river origin. *Aquat. Toxicol.*, 110–111, pp. 45–53.
20. Smith, S. R. 2009. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environ. Int.*, 35, pp. 142–156.
21. Environmental Protection Agency: www.epa.org.

22. Leopold, K., Foulkes, M. and Worsfold, P. 2010. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters-A review. *Anal. Chim. Acta.*, 663, pp. 127–138.
23. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2007. Aquatic life ambient freshwater quality criteria-Copper. 2007 Revision. EPA/822/R/07/001.
24. Bowen, H.J.M. 1985. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 1, Part D: The natural environment and biogeochemical cycles. Springer-Verlag, New York. pp. 1-26.
25. López, J.M. and Lee, G. 1977. Environmental chemistry of copper in torch lake, Michigan. *Water, Air Soils Pollut.*, 8, pp. 373.
26. Nriagu, J.O. 1979. Copper in the Environment. Part I: Ecological Cycling; Part II: Health Effects. Wiley and Sons, Inc. New York, NY.
27. Davis, A. and Ashenberg, D. 1989. The aqueous geochemistry of the Berkeley Pit, Butte, Montana, U.S.A. *Appl. Geochemistry.*, 4, pp. 23–36.
28. Hyne, R. V, Pablo, F., Julli, M. and Markich, S. J. 2005. Influence of water chemistry on the acute toxicity of copper and zinc to the cladoceran *Ceriodaphnia cf dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, pp. 1667–1675.
29. De schamphelaere, K. A. C. and Janssen, C. R. 2006. Bioavailability Models for Predicting Copper Toxicity to Freshwater Green Microalgae as a Function of Water Chemistry. *Environ. Sci. Technol.*, 40, pp. 4514–4522.
30. Pagenkopf, G. K. 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.*, 17, pp. 342–347.
31. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2007. The Biotic Ligand Model: Technical Support Document for Its Application to the Evaluation of Water Quality Criteria for Copper. Health and Ecological Criteria Division Washington, D.C.
32. Brown, P. L. and Markich, S. J. 2000. Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: Extension of the conceptual model. *Aquat. Toxicol.*, 51, pp. 177–194.
33. Sandmann, G. and Böger, P. 1980. Copper Deficiency and Toxicity in Scenedesmus. *Z. Pflanzensphysiol. Bd.*, 98, pp. 53–59.
34. Simon-Hettich, B., Wibbertmann, A., Wagner, D., Tomaska, L. and Malcolm, H. 2001. Zinc (Environmental Health Criteria 221). World Health Organization (WHO), Geneva.

35. Ober, J. A. 2016. Mineral Commodity Summaries 2016. U.S. Geological Survey. pp. 164–165.
36. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 1978. Zinc: Ambient Water Quality Criteria. Washington, D.C.
37. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 1996. Water Quality Criteria Documents for the Protection of Aquatic Life in Ambient Water. EPA-820-B-96-001. Washington, D.C.
38. Stokes, P. M., Bailey, R. C. and Groulx, G. R. 1985. Effects of acidification on metal availability to aquatic biota, with special reference to filamentous algae. *Environ. Health Perspect.*, 63, pp. 79–87.
39. Campbell PG, S. P. 1985. Acidification and Toxicity of Metals to Aquatic Biota. *Can J. Fish Aquat. Sci.*, 42, pp. 2034–2049.
40. Worms, I., Simon, D. F., Hassler, C. S. and Wilkinson, K. J. 2006. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie.*, 88, pp. 1721–1731.
41. Eisler, R. 1988. Contaminant Hazard Reviews Arsenic Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates : a Synoptic Review. *Contam. Hazard Rev.*, 85, pp. 1–65.
42. Ahsanullah, M., Negilski, D. S. and Mobley, M. C. 1981. Toxicity of Zinc, Cadmium and Copper to the Shrimp *Callinassa australiensis*. III. Accumulation of Metals. *Mar. Biol.*, 64, pp. 311–316.
43. Monteiro, C. M., Fonseca, S. C., Castro, P. M. L. and Malcata, F. X. 2011. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *J. Appl. Phycol.*, 23, pp. 97–103.
44. Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P. and Petocz, P. 2002. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, pp. 2412–2422.
45. Futra, D., Heng, L. Y., Surif, S., Ahmad, A. and Ling, T. L. 2014. Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in alginate microspheres for monitoring heavy metal toxicity in environmental waters. *Sensors*. 14, pp. 23248–23268.
46. International Network for Acid Prevention. 2002. Diffusive Gradients in Thin-films (DGT).
47. Buzier, R., Tusseau-Vuillemin, M. H. and Mouchel, J. M. 2006. Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater. *Sci. Total Environ.*, 358, pp. 277–285.

48. Buffle, J., Horvai, G. 2000. In situ monitoring of aquatic systems: chemical analysis and speciation. John Wiley & Sons, Ltd. England.
49. Zhang, H. and Davison, W. 1995. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Anal. Chem.*, 67, pp. 3391–3400.
50. Zhang, H. and Davison, W. 2001. In situ speciation measurements. Using diffusive gradients in thin films (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals. *Pure Appl. Chem.*, 73, pp. 9–15.
51. Campbell, P. G. C. 1995. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. New York, NY, USA, John Wiley & Sons.
52. Morel, F.M.M. 1983. Principles of Aquatic Chemistry. Wiley, New York, pp. 300–309.
53. Campbell, P. G. C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V. P. and Vigneault, B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton--applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 133, pp. 189–206.
54. Lightfoot, E. N. 1996. Membrane separations technology: Principles and applications. *Chem. Eng. Sci.*, 51, pp. 325–326.
55. Kislik, V. S. 2015. Liquid Membranes: Principles and applications in chemical separations and wastewater Treatment. Elsevier.
56. Xue, H., Stumm, W. and Sigg, L. 1988. The binding of heavy metals to algal. *Wat. Res.*, 22, pp. 917–926.
57. Crist, R. H., Oberholser, K., Schwartz, D., Marzoff, J., and Ryder, D. 1988. Interactions of metals and protons with algae. *Environ. Sci. Technol.*, 22, pp. 755–760.
58. Demopoulos, G. P. and Distin, P. A. 1983. On the structure and composition of Kelex 100. *Hydrometallurgy*. 11, pp. 389–396.
59. Fleck, H.R and Ward, A. 1933. The determination of metals by means of 8-hydroxyquinoline. Part I. The effect of pH on the precipitation of magnesium, zinc, cobalt, nickel, copper and molybdenum from acetate solutions. *The Analyst*. 688, pp. 388-395
60. Ritcey, G.M. and Ashbrook, A. W. 1984. Solvent extraction. Principles and applications to process metallurgy Part I. Elsevier.

61. Harrison, G., Lakshmanan, V. I. and Lawson, G. J. 1976. The extraction of Zinc (II) from Sulphate and Chloride solutions with Kelex-100 and Versatic 911 in kerosene. *Hydrometallurgy*, 1, pp. 339–347.
62. Kyuchoukov, G., Zhivkova, S., Borowiak-resterna, A. and Szymanowski, J. 2000. Separation of Copper (II) and Zinc (II) from Chloride Solutions with Alkyl-8-hydroxyquinoline in Various Stages of Extraction : Stripping Process. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39, pp. 3896-3900.
63. Mcculloch, J.K., Perera, J.M., Kelly, E.D., White, L.R., Stevens, J.W. and Grieser, F. 1996. A Kinetic Study of Copper Ion Extraction by Kelex 100 at a Heptane–Water Interface. *J. Colloid Interface Sci.*, 184, pp. 406-413.
64. Parthasarathy, N., Pelletier, M. and Buffle, J. 1997. Hollow fiber based supported liquid membrane: a novel analytical system for trace metal analysis. *Anal. Chim. Acta.*, 350, pp. 183–195.
65. Slaveykova, V. I., Karadjova, I. B., Karadjov, M. and Tsalev, D. L. 2009. Trace Metal Speciation and Bioavailability in Surface Waters Trace Metal Speciation and Bioavailability in Surface Waters of the Black Sea Coastal Area Evaluated by HF-PLM and DGT. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 1798–1803 (2009).
66. Vrana, B., Mills, G.A., Allan, I.J., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G. and Greenwood, R. 2005. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends Anal. Chem.*, 24, pp. 845–868.
67. Mayer, P., Tolls, J., Hermens, J.L.M. and Mackay, D. 2003. Equilibrium Sampling Devices. *Environ. Sci. Technol.* American Chemical Society.
68. Miguel, E. R. de S., Liu, J., Mayer, P. and Jönsson, J. A. 2008. Multivariate Analysis of Selected Metal Ion Transport through a Hollow-Fiber Supported Liquid Membrane Device used for Passive Sampling Monitoring. *Solvent Extr. Ion Exch.*, 26, pp. 602–623.
69. Mora-Tamez, L., Rodríguez de San Miguel, E., Briones-Guerash, U., Munguía-Acevedo, N. M. and De Gyves, J. 2014. Semi-interpenetrating hybrid membranes containing ADOGEN 364 for Cd (II) transport from HCl media. *J. Hazard. Mater.*, 280, pp. 603–611.
70. Almeida, M. I. G. S., Chan, C., Pettigrove, V. J., Cattrall, R. W. and Kolev, S. D. 2014. Development of a passive sampler for Zinc (II) in urban pond waters using a polymer inclusion membrane. *Environ. Pollut.*, 193, pp. 233–239.
71. St John, A. M., Cattrall, R. W. and Kolev, S. D. 2013. Determination of the initial flux of polymer inclusion membranes. *Sep. Purif. Technol.*, 116, pp. 41–45.

72. Jönsson, J. A. and Mathiansson, L. 2000. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. *Trends*. 18, pp. 318-324.
73. Puigdomenech, I., 2004. MEDUSA software, Inorganic Chemistry, Royal Institute of Technology, Stockholm, 669 Sweden.
74. Wilko, V. 2015. Chemical Equilibria in Aquatic Systems (CHEAQS Pro software). National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands.
75. University of Texas: www.utex.com.
76. Bold, H.C. 1942. The cultivation of algae. *The botanical review*. Vol.3, No.2
77. Hassler, C. S., Slaveykova, V. I. and Wilkinson, K. J. 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr. Methods.*, 2, pp. 237–247.
78. Slaveykova, V. I. and Wilkinson, K. J. 2002. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.*, 36, pp. 969–975.
79. Rodríguez-Morales, E. 2012. Preconcentración de Zinc (II) usando membranas líquidas soportadas de fibra hueca que contienen como acarreador Kelex-100. Tesis Doctoral, UNAM. Ciudad de México.
80. Koukal, B., Guéguen, C., Pardos, M. and Dominik, J. 2003. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*. 53, pp. 953–961.
81. Campbell, P.G. and Stokes, P. M. 1985. Acidification and Toxicity of Metals to Aquatic Biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42, pp. 2034–2049.
82. Wilde, K. L., Stauber, J. L., Markich, S. J., Franklin, N. M. and Brown, P. L. 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella sp*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, pp. 174–185.
83. Millero, F. J., Santana-Casiano, J. M. and González-Dávila, M. 2010. The formation of Cu (II) complexes with carbonate and bicarbonate ions in NaClO₄ solutions. *J. Solution Chem.*, 39, pp. 543–558.
84. Yang, J. and Mosby, D. 2006. Field assessment of treatment efficacy by three methods of phosphoric acid application in lead-contaminated urban soil. *Sci. Total Environ.*, 366, pp. 136–142.

85. Lavoie, M., Fortin, C. and Campbell, P. G. C. 2012. Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: The protective effect of trace zinc and cobalt concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31, pp. 1445–1452.
86. Deforest, D. K. and Van Genderen, E. J. 2012. Application of U.S. EPA guidelines in a bioavailability-based assessment of ambient water quality criteria for zinc in freshwater. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31, pp. 1264–1272.
87. Allen, H. E., Hall, R. H. and Brisbin, T. D. 1980. Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. *Environ. Sci. Technol.*, 14, pp. 441–443.
88. Erten-unal, M., Wixson, B. G., Gale, N. and Pitt, J. L. 1998. Evaluation of toxicity, bioavailability and speciation of lead, zinc and cadmium in mine/mill wastewaters. *Chemical speciation and bioavailability*. 10, pp. 37–46.
89. Zwonitzer, J. C., Pierzynski, G. M. and Ganga, M. 2003. Effects of Phosphorus Additions on Lead, Cadmium, and zinc bioavailabilities in a metal-contaminated soil. *Water. Air. Soil Pollut.*, 143, pp. 193–209.
90. Utgikar, V. P., Chaudhary, N., Koeniger, A., Tabak, H.H., Haines, J.R. and Govind, R. 2004. Toxicity of metals and metal mixtures: Analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Res.*, 38, pp. 3651–3658.
91. Johnson, H.L., Stauber, J.L., Adams, M.S. and Jolley, D.F. 2007. Copper and zinc tolerance of two tropical microalgae after copper acclimation. *Environ. Toxicol.*, 24, pp. 234-244.
92. Rodríguez de San Miguel, E., Aguilar, J. C. and De Gyves, J. 2008. Structural effects on metal ion migration across polymer inclusion membranes: Dependence of transport profiles on nature of active plasticizer. *J. Memb. Sci.*, 307, pp. 105–116.

7. Glosario de términos

Abióticos. Factor no biológico que es fundamental en un ecosistema e influye en los seres que viven en él.

Acarreador (extractante). Sustancia presente en cantidades apreciables que cuando se asocia con una sustancia traza específica, acarreará la sustancia traza por medio de un proceso físico o químico.

Analito. Es un componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra.

Antropogénico. Se refiere a los efectos, procesos o materiales que son el resultado de actividades humanas a diferencia de los que tienen causas naturales sin influencia humana.

Biocaptación. Proceso en el cual se lleva a cabo la toma de elementos metálicos o cualquier otro compuesto químico del medio acuoso por organismos biológicos.

Biodisponibilidad. Capacidad de una sustancia química proveniente del ambiente para cruzar la membrana celular de un organismo.

Bióticos. De organismos vivos o relacionado a ellos.

CL50. Es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de la CL50 se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (miligramos por litro, mg/L).

Complejación. Reacción química que tiene lugar entre un ion metálico y una entidad molecular o iónico conocido como un ligando que contiene al menos un átomo con un par de electrones no compartidos.

Complejos inertes. Complejos cuya velocidad de disociación es muy lenta, y por lo tanto su interacción con los transportadores de membrana es baja.

Complejos lábiles. Complejos cuya velocidad de disociación es rápida, lo cual permite que el catión metálico pueda pasar a través de la membrana después de disociarse y unirse al transportador.

Concomitante. Que acompaña a otra cosa o está asociada a ella.

Depleción. Disminución de la concentración de un analito en el medio acuoso.

DL50. Dosis de una sustancia o radiación que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba.

Ecotoxicidad. Se refiere a la posibilidad de que factores biológicos, químicos o físico afecten a los ecosistemas.

Eflujo. Sistema de defensa de algunos organismos, en el cual se exportan algunos compuestos tóxicos desde su citoplasma al espacio extracelular por medio de bombas de expulsión.

Elemento traza. Cualquier elemento que tiene una concentración promedio de menos de 100 partes por millón de átomos (ppm) o inferior a 100 mg por g.

Fase aceptora. Solución acuosa que recibe el catión metálico proveniente de la solución donadora.

Fase donadora. Solución acuosa que contiene el catión metálico.

Fitoquelatinas. Familia de péptidos de bajos pesos moleculares involucrados en la acumulación, desintoxicación y metabolismo de ciertos metales pesados.

Galvanización. Recubrimiento de un metal con una capa de cinc para evitar que se oxide.

In situ. Es una expresión latina que significa “en el sitio” o “en el lugar”.

Indicador biológico. Organismos con características específicas, cuya sensibilidad o toxicidad al metal puede ser demostrada por cambios significativos en su comportamiento, reproducción, crecimiento e inclusive por la alteración en la producción de algún compuesto químico vital para el organismo.

Internalización (celular). Proceso en el cual las células introducen elementos, moléculas o partículas hasta su interior celular.

Lumen. Espacio interior de una estructura tubular, como en una arteria o intestino.

Metaloproteínas. Es una proteína que contiene un ion metálico como cofactor.

Metalotioninas. Constituyen una familia de metaloproteínas ricas en cisteína, generalmente de bajo peso molecular (entre 6000 y 10000 Da). Se encuentran en el aparato de Golgi de las células (en el caso de vertebrados). Las metalotioninas tiene la capacidad de unirse a metales pesados

tanto fisiológicos (zinc y cobre) como xenobióticos (como cadmio, mercurio y plata), a través de los grupos tiol (-SH) de sus residuos de cisteína.

Mimetizar. Imitar o comportarse de forma similar

Preconcentración. Operación o proceso que da como resultado de que la relación de la concentración o la cantidad de microcomponentes (elementos traza) y microcomponentes (matriz) aumente.

Quelante. Es una sustancia que forma complejos con iones de metales pesados.

Recobro. Término que se utiliza en química analítica y preparativa para indicar la fracción de la cantidad total de una sustancia recuperable después de un procedimiento químico.

Tiorredoxinas. son proteínas que actúan como antioxidantes, facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína.

Trazas. Concentraciones de analitos en el orden de partes por millón (ppm)

Ultratrazas. Concentraciones de analitos en el orden de partes por billón (ppb)

Voltamperometría. Categoría de métodos electroanalíticos utilizados en química analítica y en diversos procesos industriales, principalmente en el análisis de compuestos trazas.

8. Anexos



Evaluation of the measurement of Cu(II) bioavailability in complex aqueous media using a hollow-fiber supported liquid membrane device (HFSLM) and two microalgae species (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus acutus*)

Erik A. Rodríguez-Morales, Eduardo Rodríguez de San Miguel*, Josefina de Gyves

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2015
Received in revised form
5 August 2015
Accepted 9 August 2015
Available online xxx

Keywords:

Bioavailability
Copper
Chemical surrogate
Hollow fiber
Microalgae

ABSTRACT

The environmental bioavailability of copper was determined using a hollow-fiber supported liquid membrane (HFSLM) device as a chemical surrogate and two microalgae species (*Scenedesmus acutus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*). Several experimental conditions were studied: pH, the presence of organic matter, inorganic anions, and concomitant cations. The results indicated a strong relationship between the response given by the HFSLM and the microalgae species with free copper concentrations measured by an ion selective electrode (ISE), in accordance with the free-ion activity model (FIAM). A significant positive correlation was evident when comparing the bioavailability results measured by the HFSLM and the *S. acutus* microalga species, showing that the synthetic device may emulate biological uptake and, consequently, be used as a chemical test for bioavailability measurements using this alga as a biological reference.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Currently, the study of metal ion bioavailability in natural systems is important for the determination of water quality because the concept focuses specifically on the amount of metal that is capable of crossing biological membranes and not on the total amount of metal in the medium (McGeer et al., 2004). The different chemical forms in which the metal ions might be present in aqueous environments lead to different types of interactions with biological membranes, affecting the bioassimilation and the toxicity of such species (Slaveykova and Wilkinson, 2003; Wilkinson and Buffle, 2004; De Schampelaere and Janssen, 2006). Bioavailability is a concept for which no simple generic definition can be formulated (Cui et al., 2013), although a large number of definitions can be found in the literature. The definition given in ISO 11074 (ISO, 2005) that “bioavailability is the degree to which chemicals present in the soil may be absorbed or metabolized by human or ecological receptors or are available for interaction with biological systems” implies that the metals migrate

from the environment into the organism through a boundary zone, i.e., it relates the environmental availability measured by chemical methods and the toxicologic bioavailability measured by biological procedures (Harmsen, 2007). By crossing this zone, the metals released by the soils are taken up by organisms, and for this reason, having an estimation of the magnitude of the process is necessary to evaluate the impact of the sorption performed by the organism. Common ways to make such measurements are to quantify the amount of internalized metal, evaluate the internalization fluxes, or determine the toxicity as a function of metal amount in the biological systems (Franklin et al., 2002; Slaveykova et al., 2009). Numerous bioavailabilities could be measured depending on the type of target organisms and time scales using methods that are usually time consuming because of the manipulation of biological entities. For this reason, chemical measurements made in environmental matrices are usually employed to determine a fraction of a well-defined class of contaminants assumed to be available for specific receptors, e.g., free, labile, inert (Parthasarathy and Buffle, 1994), and lipophobic (Parthasarathy et al., 2010) fractions. Some of these methods include diffusion gradients in thin films (DGT) (Zhang and Davison, 2000; Han et al., 2014), voltamperometry (Buffle and Tercier-Waeber, 2000) and supported or permeation liquid membranes (SLM, PLM, respectively) (Parthasarathy et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: erdsimg@unam.mx (E. Rodríguez de San Miguel).

1997; Slaveykova et al., 2004)). PLM and SLM techniques have not only been used for in situ analyses but also as a means to emulate the response of biological systems in the presence of free, labile, and inert species (Van Leewen et al., 2005) and to perform speciation analysis in aqueous media by simultaneously concentrating the analytes hundreds/thousands of times using a hollow fiber configuration (Bautista-Flores et al., 2010, 2011). These systems have been shown to emulate cation bioassimilation and have been used in the prediction of internalization fluxes of microalgae under specific chemical conditions (Bayen et al., 2006). However, cation speciation is greatly influenced by different environmental variables, and metal ion bioavailability is expected to be dependent on such conditions as well. In this study, a comparison of copper bioavailability, as measured using a hollow fiber supported liquid membrane (HFSLM) and two microalgae species (*Scenedesmus acutus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*), is performed under several experimental conditions: pH, presence of organic matter, inorganic anions, and concomitant cations. Copper is widely distributed in water since it is a naturally occurring element. Copper levels in surface water range from 0.5 to 1000 ppb, with a median of 10 ppb; seawater contains < 1–5 ppb, and concentrations of copper in estuarine and coastal water in the United States were 0.3–3.8 and 0.1–2.5 ppb. However, the concentrations in these systems might be higher due to overflow outfalls within combined sewer systems, e.g., combination of domestic and industrial waste water plus storm water (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004). Copper is an essential metal for biological life because of the role that it plays in growth, metabolism and enzymatic activity; however, concentrations of copper as low as 4 µg/L have been shown to be toxic for microalgae at initial cell densities at a range of 10^2 – 10^5 cells/mL (Franklin et al., 2002). Because of the importance of these microorganisms in aquatic environments, it is a priority in the area of environmental analysis to identify simple analytical methods capable of predicting bioavailability under different chemical conditions, performing in situ analyses, and concentrating the metal such that very low detection limits are attainable. To the best of our knowledge, this study is the first comparison of chemical and biological systems that measure bioavailability using synthetic and natural membranes as boundary zones, respectively, performed by a multivariate approach using two biological references.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and equipment

Synthetic aqueous solutions of the different metal ions were prepared from 1000 mg/L AAS standard solutions from Fluka. Potassium carbonate, sodium phosphate, sodium chloride, sodium sulfate, sodium nitrite, sodium nitrate, citric acid and humic acid (Sigma Aldrich A.R.) were used when evaluating the influence of inorganic and organic compounds on copper bioavailability. Nitric acid (J.T. Baker, A.R.), sodium hydroxide (Aldrich, A.R.), 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES, Sigma, A.R.) and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Sigma Aldrich, A.R.) were used for pH adjustment. Formic acid (Mallinckrodt, A. R.) was used as an acceptor solution in the HFSLM modules using 7-(4-Ethyl-1-methyloctyl)-8-hydroxyquinoline (Kelex 100, Sherex Chemical Co. Inc., Dublin, OH, USA) as the carrier dissolved in 1-phenylhexane (Aldrich, A. R.). Metal ion quantification was performed by flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS, Perkin Elmer 3100, Waltham, MA, USA) at the conditions reported by the manufacturer. A 440 pH meter (Corning) coupled to an InLab Expert Pro-ISM combined glass electrode assembly (Mettler Toledo) was used for pH measurements. An orbital shaker (IKA KS 260) was used to

perform all experiments. Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA) and IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corp.) software packages were employed for data analyses.

2.2. Quantification of Cu(II) internalized by *S. acutus* and *P. subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*)

Copper bioavailability was determined from the amount of internalized metal in the microalgae and their superficial areas (Slaveykova and Wilkinson, 2002). The *P. subcapitata* and *S. acutus* species were obtained from the University of Texas at Austin and grown in sterilized Bristol medium (Bold, 1942; UTEX Scientific Website) using 12:12 h light: dark cycles at 24 °C under constant agitation until the logarithmic growth phase. *P. subcapitata* and *S. acutus* were selected because they have been previously used as biological references for toxicity studies of metals in aquatic systems (Miller, 1978; Morsi Abd-El-Monem et al., 1998). The microalgae were centrifuged (2500 rpm) for 3 min and resuspended in the experimental medium. After exposition, the microalgae were washed with a 0.01 M EDTA solution at pH = 6.0 for 2 min to remove any superficial metal and then digested with ultrapure HNO₃ (Merck, 99,999%) (Hassler et al., 2004). FAAS was used to measure the internalized metal. For each treatment, 3 experimental replicates and one blank sample were measured.

2.3. Quantification of internalized Cu(II) by HFSLM

The bioavailability of the synthetic modules was measured using the amount of copper in the acceptor solution and the hollow fiber area. These assemblies were prepared according to the method reported by Bautista-Flores et al. (2010), i.e., a hydrophobic 50/280 Accuarel hollow fiber (Membrane GmbH, Wuppertal, Germany) was cut into 15 cm pieces, filled with the acceptor solution (0.01 M formic acid at pH = 2.2, 6 µL), sealed, and impregnated with a 1×10^{-3} M solution of Kelex-100 in phenylhexane. The modules were then immersed in the experimental media (100 mL) for 2 h under constant orbital agitation, after which the acceptor solution was removed and diluted (about 1–2 mL) for further FAAS analysis. Triplicate experiments were performed at 24 °C.

2.4. Quantification of Cu²⁺ using ISE

A commercial HANNA 4108 copper ISE (Hanna Instrument®) coupled to a Mettler Toledo Seven Compact pH/Ion potentiometer was used to measure free copper in the experimental media. The response of the electrode gave a 27 ± 4 mV Nernstian slope for the potential vs. log Cu²⁺ activity calibration plot at 25 °C. Reported values correspond to the average of 3 measurements recorded after the electrode was stabilized.

The bioavailability experiments were mainly performed using a total copper concentration of 1×10^{-5} M in a 10^{-2} M MES solution at pH = 6.6, unless otherwise indicated. This copper concentration was selected based on pilot dose–response experiments with another microalga, in which a range of different exposure concentrations of 0, 8, 25, 55 and 125 µM was analyzed (Jamers et al., 2013). Good's N-substituted aminosulfonic acids buffers have shown no modification in copper toxicity up to a concentration of 750 mg/L conducted in bioassays with the *P. subcapitata* green alga (De Schampelaere and Janssen, 2006).

3. Results and discussion

Bioavailability is a dynamic process comprising three steps (Harmsen, 2007): (i) availability of the contaminant in the soil (i.e., environmental availability), (ii) uptake of the contaminant by the

organism (i.e., environmental bioavailability), and (iii) the accumulation and/or effect of the contaminant within the organisms (i.e., toxicologic bioavailability). In general, two complementary methods are used to assess this third parameter: chemical measurements used in the soil matrix that predict the amount of contaminants taken up by the organisms and biological measurements using organisms exposed to soil or soil eluates to monitor the effects (Luo et al., 2014). If environmental bioavailability (i.e., uptake of the contaminant) for an organism or a group of organisms in a soil can be mimicked by a chemical process, then a chemical test can be used as a surrogate for the biological test. For this reason, the search for relevant chemical tests constitutes a major effort for practical and fast environmental analyses (Harmsen, 2007). An additional issue arises because of the two forms in which bioavailability is expressed: bioavailability defined in terms of flux or rate ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and bioavailability defined in terms of content (mol kg^{-1}). Theoretically, the content-based bioavailability is obtained by integrating the rate- or flux-based bioavailability over a period of interactions. In practice, the rate of processes is difficult to directly measure, and the flux- or rate-based bioavailability is estimated from content-based bioavailability. Therefore, the content-based bioavailability is of primary importance from an evaluation point of view (Harmsen, 2007). In this work, the amount of metal internalized over a certain period of time, i.e., content-based bioavailability, was used as the indicator of environmental bioavailability (Van Leeuwen et al., 2005).

3.1. Cu(II) internalization kinetics through HFSLM and microalgae

The internalization kinetics of the synthetic and biological systems are shown in Fig. 1. Experimental conditions were $[\text{Cu}]_{\text{tot}} = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ in 10^{-2} M MES at $\text{pH} = 6.6$. It was observed that the amount of internalized copper in the HFSLM is approximately $4.7 \times 10^{-8} \text{ mol/cm}^2$ once equilibrium was reached ($t > 120 \text{ min}$). Based on these results, subsequent experiments were performed for 2 h. The preconcentration factor, defined as the ratio of metal in the acceptor phase and the initial metal content, is approximately 2500, which allows the determination of copper in the donor phase to be in the ppb range. The amount of sorbed metal is low enough to guarantee a negligible depletion operation mode of the device, which is suitable for speciation analysis (Bautista-Flores et al., 2011). The results obtained with the biological systems show similar profiles, with maximum internalization values of

$4.7 \times 10^{-10} (\pm 5.2 \times 10^{-11})$ and $4.5 \times 10^{-10} (\pm 8 \times 10^{-11}) \text{ mol/cm}^2$ for *P. subcapitata* and *S. acutus*, respectively. Equilibrium was reached at approximately 240 min and subsequent experiments were performed using this exposure time. The HFSLM module concentrated copper to a larger extent than the microalgae, as was expected, considering the optimized conditions in which the module operates were established for such a purpose (Bautista-Flores, 2011).

3.2. Effects of pH, calcium, humic acid and citric acid contents

A 2^4 factorial experimental design was used for evaluating the influence of pH, calcium, humic acid and citric acid contents on copper internalization. These factors have been shown to have a significant effect on metal bioavailability in several organisms (Stokes et al., 1985; Campbell and Stokes, 1985; Pagenkopf, 1983; Koukal et al., 2003). The lower and upper levels of the array are shown in Table 1. The analyses of the experimental results using Pareto charts (Fig. 2) indicated that the presence of organic ligands and the increase in pH significantly decreased copper internalization in the HFSLM, while the presence of Ca(II) increased copper internalization, perhaps due to interactions with the organic ligands. The kinetic study of copper internalization in the presence of humic acid (12 mg/L) showed that the internalization time is greatly influenced by the presence of organic matter: a slower internalization time is observed when organic matter is present in the medium (Fig. 3a).

The interactions between the pH and the humic acid content, as well as citric and humic acids points out to the acidic/basic properties of the ligands, and a possible obstruction to complexation that leads to an increase in metal internalization. Considering the microalga *S. acutus*, the same effects observed in the HFSLM experiments (humic and citric acids and solution pH) were found to be significant for copper internalization. Additional experiments were run to further investigate the influence of the humic acid content, as this ligand has been shown to reduce the impact of metals on the environment (Smith, 2009). Fig. 3b shows the effect of 12 mg/L of humic acid. The kinetics of complexation are greatly slowed by the presence of the organic ligand. When varying the organic content in the 2–24 mg/L range at equilibrium (Fig. 3c), copper internalization is reduced with the increase in humic acid content and becomes nearly constant at approximately 10 mg/L.

With respect to *P. subcapitata*, the variables humic acid and citric acid as well as the interaction between them played a similar role in

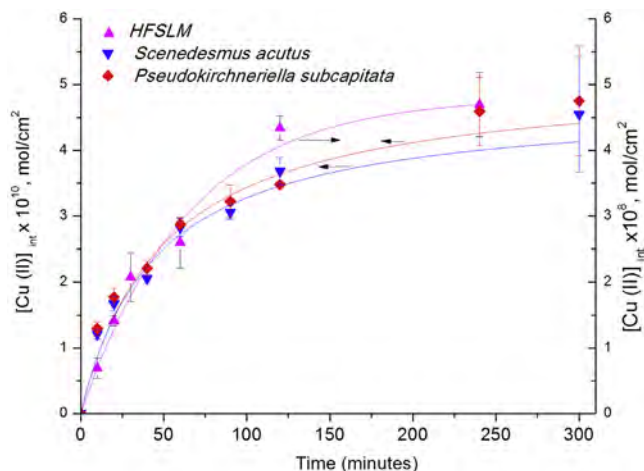


Fig. 1. Cu(II) internalization kinetics of the HFSLM device, *Scenedesmus acutus* and *Pseudokirchneriella subcapitata* microalgae.

Table 1

2^4 experimental design employed to study the influence of four factors on the amount of internalized Cu(II). Coded and real (parenthesis) values of the variables are presented.

Experiment	pH	[Ca (II)] mg/L	[Humic acid] mg/L	[Citric acid] M
A	-1 (5.5)	1 (100)	1 (12)	-1 (10^{-6})
B	1 (6.7)	-1 (12)	1 (12)	-1 (10^{-6})
C	-1 (5.5)	-1 (12)	-1 (1)	1 (10^{-4})
D	-1 (5.5)	1 (100)	-1 (1)	-1 (10^{-6})
E	-1 (5.5)	1 (100)	1 (12)	1 (10^{-4})
F	1 (6.7)	-1 (12)	-1 (1)	-1 (10^{-6})
G	1 (6.7)	1 (100)	-1 (1)	-1 (10^{-6})
H	-1 (5.5)	-1 (12)	1 (12)	-1 (10^{-6})
I	-1 (5.5)	-1 (12)	1 (12)	1 (10^{-4})
J	-1 (5.5)	1 (100)	-1 (1)	1 (10^{-4})
K	-1 (5.5)	-1 (12)	-1 (1)	-1 (10^{-6})
L	1 (6.7)	1 (100)	1 (12)	-1 (10^{-6})
M	1 (6.7)	-1 (12)	1 (12)	1 (10^{-4})
N	1 (6.7)	1 (100)	-1 (1)	1 (10^{-4})
O	1 (6.7)	-1 (12)	-1 (1)	1 (10^{-4})
P	1 (6.7)	1 (100)	1 (12)	1 (10^{-4})

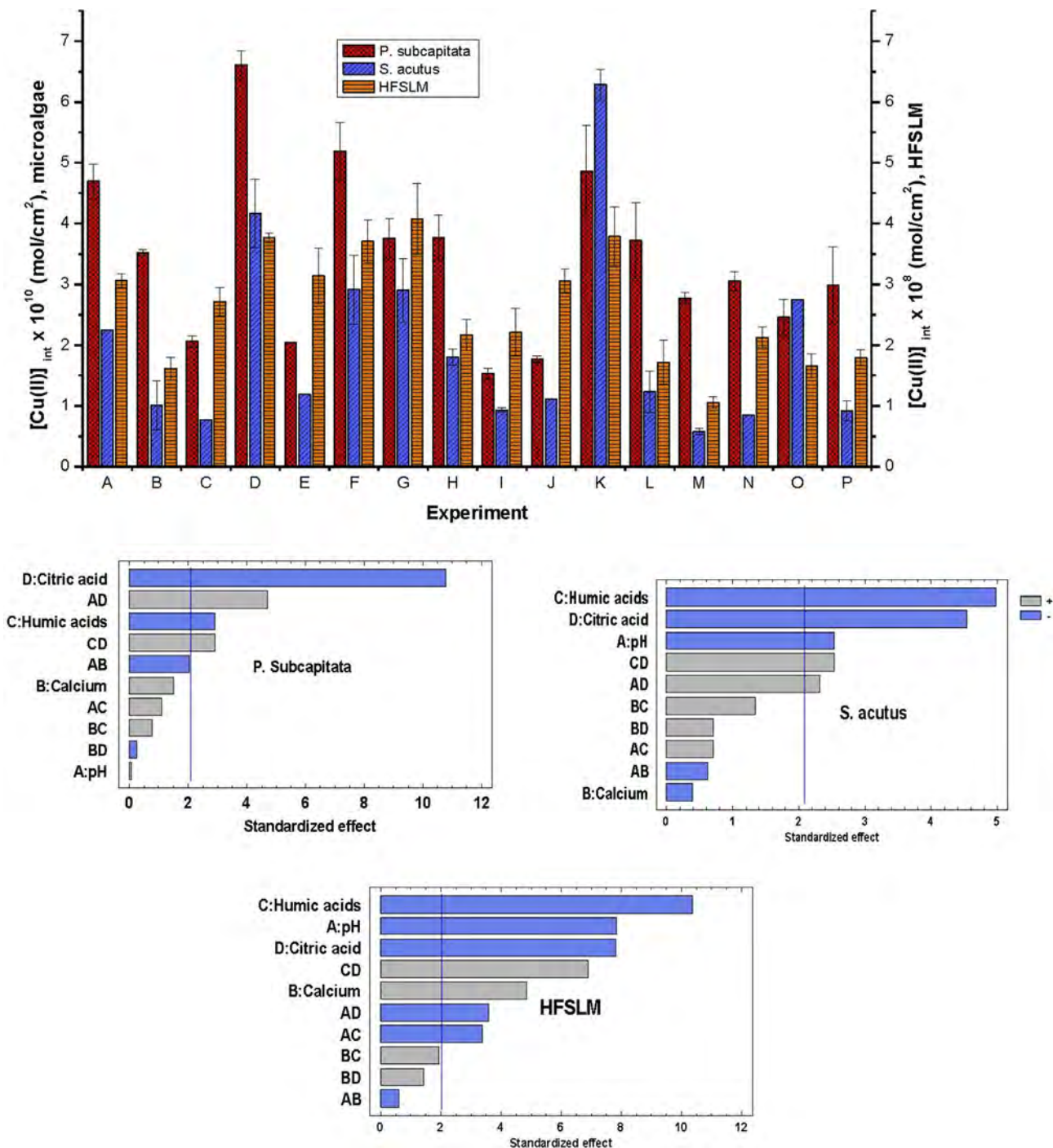


Fig. 2. Internalized Cu (II) and standardized Pareto Chart obtained after analysis of the experimental plan shown in Table 1 for the HFSLM device and the microalgae species.

internalization as with the previous cases. The main difference is that pH, in the studied range, had no significant effect. The complete set of observations partially agree with previous reports on this alga, which indicated that copper toxicity is reduced in the presence of organic matter and is increased with the increase of pH in the aqueous phase (De Schampheleare and Janssen, 2006). Additional experiments that employed both algae were then performed to elucidate the nature of the observed difference.

3.3. Influence of the pH range

Based on our results, the pH range of the donor phase (5.5–9.0)

was extended to further study its effect on copper internalization. The results presented in Fig. 4 suggest the same trend observed with the HFSLM and *S. acutus* systems: a decrease in internalization of the metal with the increase in pH. There is confidence in this result because as the pH of the environment increases, the metal is hydrolyzed, which decreases the fraction of free copper (SI, Figure S1, Puigdomenech, 2004). According to the free-ion activity model (FIAM), free-metal ion concentrations are better predictors of metal bioavailability and toxicity than the total or dissolved metal concentrations (Brown and Markich, 2000), and the reduction of free-metal ions seems to cause the observed behavior in our study. Additional experiments were conducted to

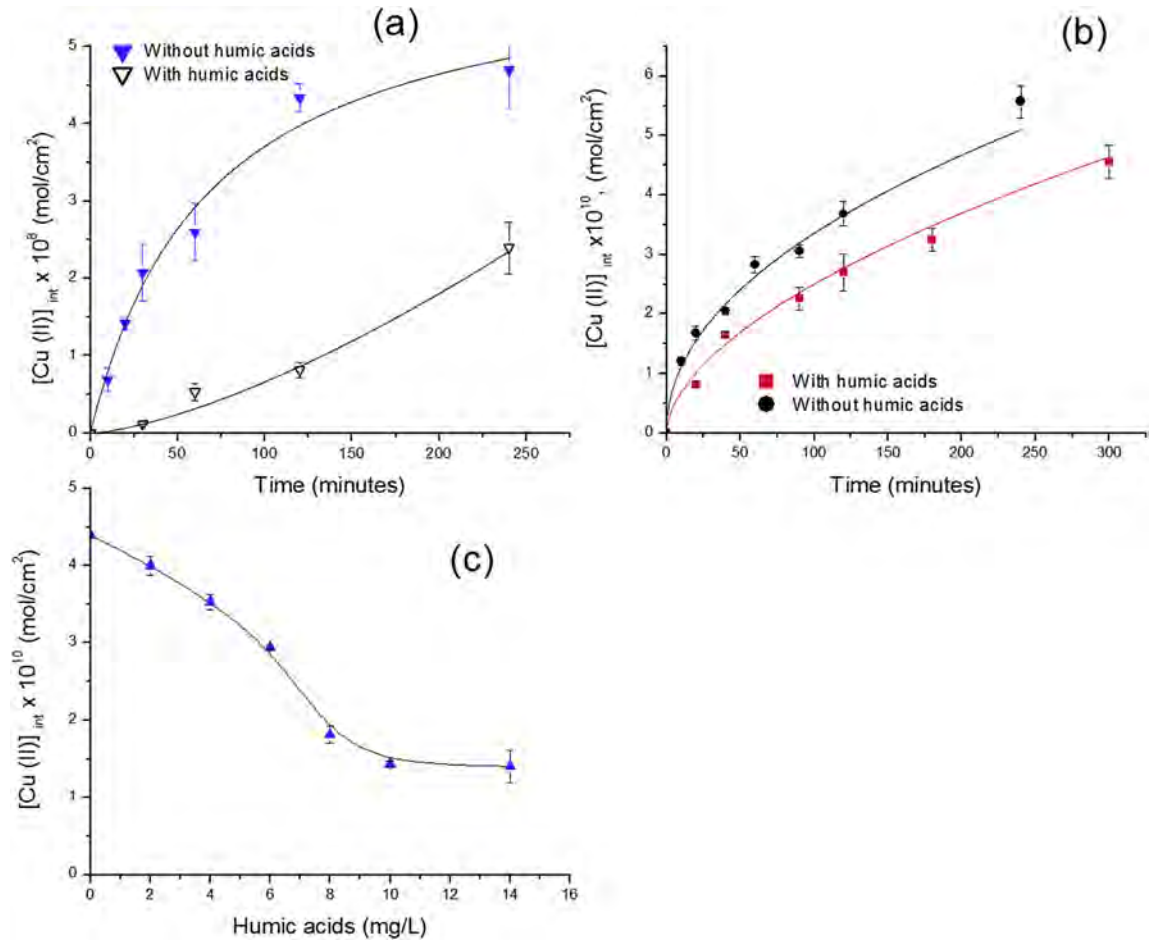


Fig. 3. Cu(II) internalization kinetics in the presence of humic acid in the HFSLM device (a) and *S. acutus* (b). Internalized copper amounts in *S. acutus* with the increase of humic acid (c).

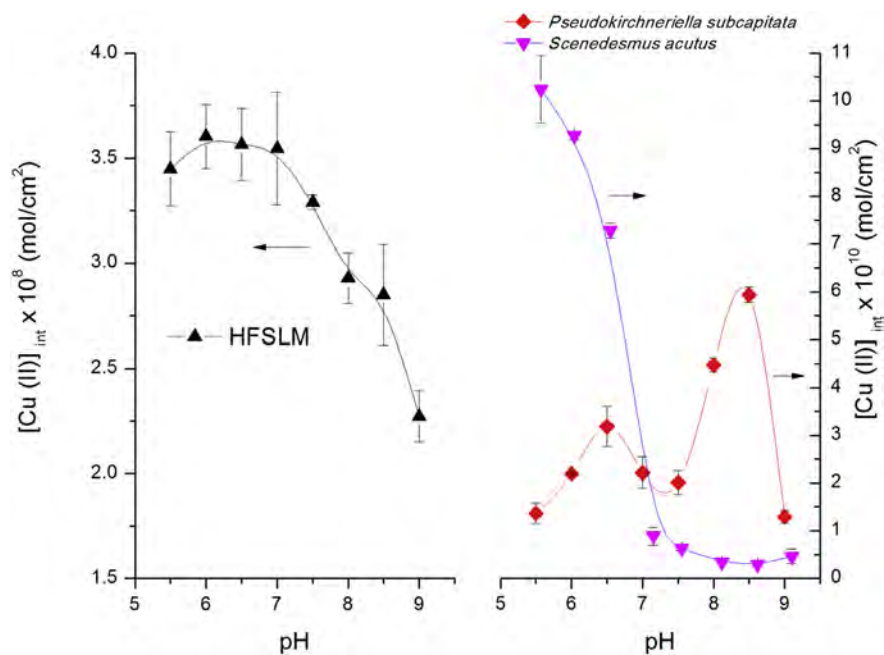


Fig. 4. Influence of pH on the amount of Cu(II) internalized by the HFSLM device (left) and *P. subcapitata* and *S. acutus* microalgae (right).

verify this statement by varying the chemical conditions that impact the free fraction of the metal, and the results are reported below.

A significantly different pattern was observed for the *P. subcapitata* alga: the presence of two maxima was evidenced with the increase in pH at ≈ 6.5 and ≈ 8.5 . The first maximum was not detected by the 2^4 array because of the restriction in the use of linear equations when modeling with this design type. An increase in internalization with the increase in pH is observed in the pH regions adjacent to the maxima, i.e., 5.5–6.5 and 7.5–8.5; thus one should be very cautious when interpreting the data because the conclusions depend on the extent of detail (range and number of points) used to perform the experiments and the type of alga employed. Water pH is an important factor affecting the toxicity of the metals to freshwater microalgae, although it has been discussed that the relationship between pH and toxicity is largely algal species-dependent due to several effects: changes in the predominance of the free metal ion with pH, a decreased competition between the metal ion and H^+ at the cell surface with the increase in pH, and an increasing number of negatively charged sites formed on the cell surface with pH increase resulting in an increase in bound copper (Wilde et al., 2006). However, future work is needed to elucidate the nature of the differences and causes of the observed patterns.

3.4. Influence of free copper concentration and bivariate correlation analyses

To elucidate the role that the free species of metal plays in bioavailability, the free copper concentrations were measured using a copper ISE for all the different chemical conditions depicted in Table 1 (rows A–P). These results were then compared using a bivariate correlation analysis, with the internalization results obtained for the HFSLM and microalgae systems for each condition (SI, Figure S2). This technique allows a paired comparison between HFSLM, *S. acutus*, *P. subcapitata*, and free copper concentrations under all chemical conditions (pH, calcium, humic acid and citric acid concentrations) to be simultaneously performed. From the graph and the Pearson correlations coefficients (SI, Table S1), it is possible, with 99% confidence, to state the following:

- i) There is a significant positive correlation between the two microalgae species. The deviation from one of the values of the Pearson's coefficient ($R = 0.627$) indicates both experimental error and potential differences in internalization of the microorganism with the change in the chemical conditions of the environment.
- ii) There is a significant positive correlation between free copper and metal internalization in all of the systems tested, including the biologicals ($R_{Scenedesmus} = 0.827$ and $R_{Pseudokirchneriella} = 0.735$) and the chemical surrogate ($R_{HFSLM} = 0.753$). This result completely agrees with the FIAM model (Campbell and Peter, 1995).
- iii) There is a significant positive correlation when comparing the bioavailability results measured by the HFSLM and the *S. acutus* microalga ($R_{Scenedesmus} = 0.690$). The comparison between the HFSLM and the *Pseudokirchneriella* alga ($R_{Pseudokirchneriella} = 0.485$) indicates that the internalization behavior cannot be adequately modeled by the surrogate system in this case.

For the first statement, significant differences in metal bioaccumulation are expected for different trophic levels and among species of the same trophic levels for reasons that are not completely understood (Paquin et al., 2003). For the second

statement, the experimental evidence clearly supports the FIAM model. According to calculations the average depletion of the bulk medium is negligible (<5%) assuring no perturbation in the speciation of the system, i.e., no contribution in the uptake due to dissociation of labile species. In addition, it has been observed that similarly supported liquid membranes can respond to free metal concentrations (Slaveykova et al., 2004; Romero et al., 2005). The third statement clearly indicates that the chemical surrogate cannot emulate both biological systems well enough, and, for unknown reasons, the HFSLM module better emulates the behavior of a particular type of algae. Because metal-specific processes, such as protein or sulfur bonding, may be different according to the structure and composition of the cell membranes in microorganisms, a possible explanation for this behavior may be found in this direction. For phytoplankton and lower trophic-level animal species, direct uptake from the water is described by diffusion of the contaminant through cell membranes, and the HFSLM module does the same because of the optimized conditions in which it operates. The results indicate that the degree of metal bioavailability is highly related to water chemistry in the chemical and biological systems, making it possible to use HFSLM to predict the bioavailability of the *S. acutus* microalga species.

Advantages of the use of empirical correlations are that they allow observing the relationships among experimental data for forecasting and describing trends. These relationships and trends have a practical use and in contrast with mechanistic modeling, a complete understanding of the biological, chemical, and/or physical processes is not required. If the objective of modeling is to quantify phenomena by their underlying casual mechanisms, the characteristics of the system should be properly compiled to get the correct values of the chemical rate constants, diffusion coefficients and parameters required for flux computations. The selection of the most appropriate models and parameter values is far from straightforward, as it has been extensively discussed in the literature (Buffle et al., 2007; Zhang et al., 2007). Even though metal flux computations at natural or synthetic interfaces in complex natural mixtures may be theoretically achieved (Alemani et al., 2008a,b), validation of these values has to be appropriately performed. Chemical surrogate methods may be very useful in the screening of metal polluted sites, especially when the target organism to directly measure bioavailability shows a simple relationship in behavior with the chemical surrogate, and the biological differences between organisms, i.e., microalgae, cannot be adequately accounted by mechanistic modeling.

3.5. Influence of concomitant inorganic anions

As free metal ion concentrations are dependent on the available ligands in the medium, besides the organic previously studied, the influences of five common inorganic anions (chloride, sulfate, phosphate, carbonate, and nitrate) at 50 mg/L were evaluated (Fig. 5). In the presence of carbonate and phosphate, a reduction in internalized copper by the HFSLM device is observed (ANOVA-test, $P < 0.05$). This effect was also observed for the *S. acutus* microalga and only for phosphate with the *P. subcapitata* microalga. The difference may be related to dissimilarities between both algae species, as noted before. Many divalent metals, such as Cu^{2+} , form strong complexes with carbonate ions in natural waters. The formation of these complexes decreases the concentration of free Cu^{2+} that is toxic to the phytoplankton (Millero et al., 2010). Because of this, and according to the results, the estimation of copper bioavailability should include an evaluation of the medium's carbonate content.

In addition, phosphate treatments have proven to effectively reduce metal ion bioavailability or human exposure to

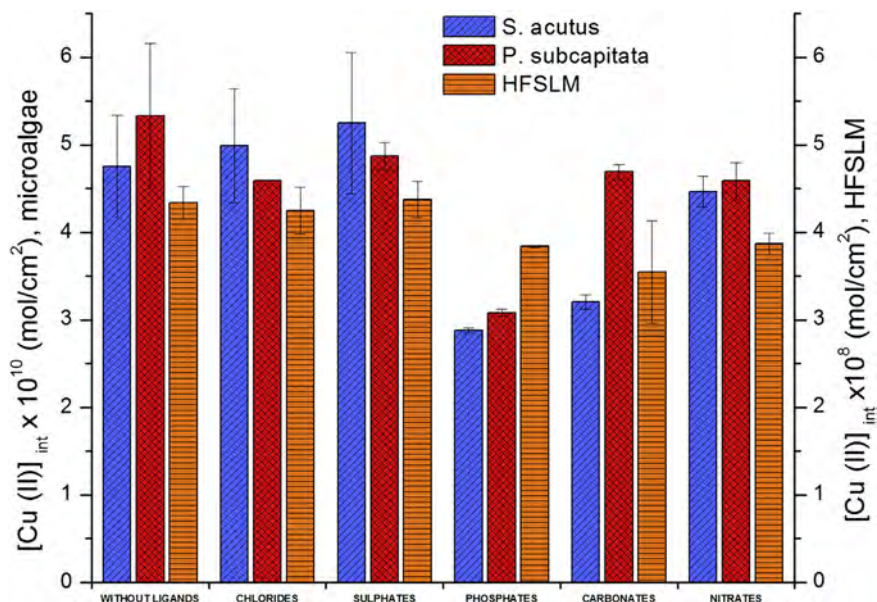


Fig. 5. Influence of inorganic ligands on the amount of internalized Cu (II) by the HFSLM device and microalgae species.

contaminated metals, as in the case of lead (Yang and Mosby, 2006). Our results indicate that copper bioavailability is also affected by this ligand, and its content determines the environmental risk of this metal ion.

3.6. Influence of concomitant metal ions

In the presence of 1×10^{-5} M of Zn (II), Fe (II), Mg (II), Al (III), and K, no modification in copper bioavailability was observed in the chemical and biological systems (SI, Figure S3). This result indicates that there was no competition between the different metal ions and copper at the employed experimental conditions.

4. Conclusions

The comparison of copper content-based environmental bioavailability measured using an HFSLM device, as chemical surrogate, and two microalgae species (*S. acutus* and *P. subcapitata*) indicated a strong relationship among the response given by the HFSLM and the two microalgae species with the free copper concentrations, in accordance with the FIAM model. The analysis of data obtained under several experimental conditions (pH, presence of organic matter, inorganic anions, and concomitant cations) indicates that the chemical surrogate emulates the biological systems in a different extent and the HFSLM module better emulates the behavior of a particular type of algae (*S. acutus*). Such behavior may be due to potential differences in the internalization of copper by the microorganisms with the change in the chemical conditions of the environment, due to variations among species of the same trophic level. A reduction in the bioavailability of the metal was observed with the increase of humic acid (2–14 mg/L), citric acid (10^{-4} – 10^{-6} mol/L) and phosphate (50 mg/L) contents, as well as variations of this parameter with an increase in pH (5.5–9) in all systems, while an increase in the bioavailability was observed with the increase of Ca(II) (12–100 mg/L) content in the HFSLM module. However, the presence of 50 mg/L sulfate and nitrate and 1×10^{-5} M of Zn (II), Fe (II), Mg (II), Al (III) and K did not produce modifications. The results show that the HFSLM technique constitutes a simple analytical method capable of predicting bioavailability under different chemical conditions using the *S. acutus*

microalgae as biological reference, performing in situ analyses, and concentrating the metal with preconcentration factor as high as 2500, which allows the determination of copper in the donor phase to be in the ppb range. It was observed that the amount of internalized copper in the HFSLM is approximately 4.7×10^{-8} mol/cm² once equilibrium was reached ($t > 120$ min), while the results obtained with the biological systems show similar profiles, with maximum internalization values of 4.7×10^{-10} ($\pm 5.2 \times 10^{-11}$) and 4.5×10^{-10} ($\pm 8 \times 10^{-11}$) mol/cm² for *P. subcapitata* and *S. acutus*, respectively ($t > 240$ min). The amount of sorbed metal by the HFSLM device is low enough to guarantee a negligible depletion operation mode suitable for speciation analysis.

Acknowledgments

The authors wish to thank CONACYT (project 2011CB167148) for financial support. Dr. Fernando Montiel Aguirre (UNAM) and M. C. Raquel Ortega Muñoz (UNAM) are also thanked for their assistance with biological methods, Q. Nadia Munguía Acevedo for technical services, and Dra. Martha P. Garcia Camacho (UNAM) for providing the microalgae species. EARM expresses gratitude to CONACYT for the PhD scholarship. Authors are in debt to Prof. Jan Ake Jönsson (Lund University) for the collaboration in the equilibrium sampling through membranes (ESTM) area, which drives the current work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.011>.

References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004. Toxicological Profile for Copper. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service.
- Alemani, D., Buffle, J., Galceran, J., Chopard, B., 2008a. Metal flux and dynamic speciation at (Bio)Interfaces. Part III: MHEDYN, a general code for metal flux computation; application to simple and fulvic complexants. Environ. Sci. Technol. 42, 2021–2027.
- Alemani, D., Buffle, J., Zhang, Z., Galceran, J., Chopard, B., 2008b. Metal flux and dynamic speciation at (Bio)Interfaces. Part IV: MHEDYN, a general Code for metal flux computation; application to Particulate Complexants and their mixtures with the Other natural ligands. Environ. Sci. Technol. 42, 2028–2033.

- Bautista-Flores, A.N., 2011. Development of a Hollow Fiber Supported Liquid Membrane Device (HF-slm) for the Preconcentration of Lead (II) and Concomitant Metals Ions from Aqueous Solutions, Ph.D. dissertation. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.
- Bautista-Flores, A.N., Rodríguez de San Miguel, E., de Gyves, J., Jönsson, A.J., 2011. Nickel (II) preconcentration and speciation analysis during transport from aqueous solutions using a hollow-fiber permeation liquid membrane (HFPLM) device. *Membranes* 1, 217–231.
- Bautista-Flores, A.N., Rodríguez de San Miguel, E., de Gyves, J., Jönsson, J.T., 2010. Optimization, evaluation, and characterization of a hollow fiber supported liquid membrane for sampling and speciation of lead (II) from aqueous solutions. *J. Membr. Sci.* 363, 180–187.
- Bayen, S., Worms, I., Parthasarathy, N., Wilkinson, K., Buffle, J., 2006. Cadmium bioavailability and speciation using the permeation liquid membrane. *Anal. Chim. Acta* 575, 267–273.
- Bold, H.C., 1942. The cultivation of algae. *Bot. Rev.* 3, 69–138.
- Brown, P.L., Markich, S.J., 2000. Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model. *Aquat. Toxicol.* 51, 177–194.
- Buffle, J., Tercier-Waeber, M.L., 2000. In situ Voltammetry: concepts and practice for trace analysis and speciation. In: Buffle, J., Horvai, G. (Eds.), *In Situ Monitoring of Aquatic Systems. Chemical Analysis and Speciation*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 279–405.
- Buffle, J., Zhang, Z., Startchev, K., 2007. Metal flux and dynamic speciation at (Bio) interfaces. Part I: critical evaluation and Compilation of physicochemical parameters for complexes with simple ligands and Fulvic/Humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7609–7620.
- Campbell, P.G.C., Peter, G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free ion activity model. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons, New York, p. 45.
- Campbell, P.G.C., Stokes, P.M., 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 2034–2049.
- Cui, X., Mayer, P., Gan, J., 2013. Methods to assess bioavailability of hydrophobic organic contaminants: principles, operations, and limitations. *Environ. Pollut.* 172, 223–234.
- De Schampelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2006. Bioavailability models for predicting copper toxicity to freshwater green microalgae as a function of water chemistry. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4514–4522.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Apte, S.C., Lim, R.P., 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 742–751.
- Han, S., Zhang, Y., Masunaga, S., Zhou, S., Naito, W., 2014. Relating metal bioavailability to risk assessment for aquatic species: Daliao River watershed, China. *Environ. Pollut.* 89, 215–222.
- Harmsen, J., 2007. Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard methods. *J. Environ. Qual.* 36, 1420–1428.
- Hassler, C.S., Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 2, 237–247.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J.L., Jones, O.A.H., 2013. Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *Biomaterials* 26, 731–740.
- Koukal, B., Guéguen, C., Pardos, M., Dominik, J., 2003. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere* 53, 953–961.
- Luo, W., Verweij, R.A., Van Gestel, C.A.M., 2014. Determining the bioavailability and toxicity of lead contamination to earthworms requires using a combination of physicochemical and biological methods. *Environ. Pollut.* 185, 1–9.
- McGeer, J., Henningsen, G., Lanno, R., Fisher, N., Sappington, K., Drexler, J., 2004. Issue Paper on the Bioavailability and Bioaccumulation of Metals. U.S. Environmental Protection Agency.
- Miller, W.E., 1978. The Selenastrum Capricornutum Printz Algal Assay Bottle Test. EPA, Corvallis Oregon.
- Millero, F.J., Santana-Casiano, J.M., González-Dávila, M., 2010. The formation of Cu (II) complexes with carbonate and bicarbonate ions in NaClO₄ solutions. *J. Solut. Chem.* 39, 543–558.
- Morsi Abd-El-Monem, H., Corradi, M.G., Gorbi, G., 1998. Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environ. Exp. Bot.* 40, 59–66.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17, 342–347.
- Paquin, P.R., Farley, K., Santore, R.C., Kavvas, C.D., Mooney, K.G., Winfield, R.P., Wu, K.-B., Di Toro, D.M., 2003. Metals in Aquatic Systems. A Review of Exposure, Bioaccumulation, and Toxicity Models. SETAC, Pensacola, USA.
- Parthasarathy, N., Buffle, J., 1994. Capabilities of supported liquid membranes for metal speciation in natural waters: application to copper speciation. *Anal. Chim. Acta* 284, 649–659.
- Parthasarathy, N., Pelletier, M., Buffle, J., 1997. Hollow fiber based supported liquid membrane: a novel analytical system for trace metal analysis. *Anal. Chim. Acta* 350, 183–195.
- Parthasarathy, N., Pelletier, M., Buffle, J., 2010. Transport of lipophilic metal complex through permeation liquid membrane in relation to natural water analysis: Cu (II)-8-hydroxyquinoline complex as a model compound. *J. Membr. Sci.* 355, 78–84.
- Puigdomenech, I., 2004. MEDUSA Software, Inorganic Chemistry. Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.
- Romero, R., Liu, J.F., Mayer, P., Jönsson, J.A., 2005. Equilibrium sampling through membranes of freely dissolved copper concentrations with selective hollow fiber membranes and the spectrophotometric detection of a metal stripping agent. *Anal. Chem.* 77, 7605–7611.
- Slaveykova, V.I., Karadjova, I.B., Karadjov, M., Tsalev, D.L., 2009. Trace metal speciation and bioavailability in surface waters of the black sea coastal area evaluated by HF-PLM and DGT. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1798–1803.
- Slaveykova, V.I., Parthasarathy, N., Buffle, J., Wilkinson, K.J., 2004. Permeation liquid membrane as a tool for monitoring bioavailable Pb in natural waters. *Sci. Total Environ.* 328, 55–68.
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2003. Effect of pH on Pb biouptake by the freshwater alga *Chlorella kesslerii*. *Environ. Chem. Lett.* 1, 185–189.
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2002. Physicochemical aspects of Lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* 36, 969–975.
- Smith, S.R., 2009. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environ. Int.* 35, 142–156.
- Stokes, P.M., Bailey, R.C., Groulx, G.R., 1985. Effects of acidification on metal availability to aquatic biota, with special reference to filamentous algae. *Environ. Health Perspect.* 63, 79–87.
- Utex Scientific Website, <http://www.utex.com>.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., Buffle, J., Cleven, R.F.M.J., Davison, W., Puy, J., Van Riemsdijk, W.H., Sigg, L., 2005. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8545–8856.
- Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L., 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 174–185.
- Wilkinson, K.J., Buffle, J., 2004. Critical evaluation of physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In: van Leeuwen, H.P., Koester, W. (Eds.), *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*. John Wiley & Sons, Chichester, p. 447.
- Yang, J., Mosby, D., 2006. Field assessment of treatment efficacy by three methods of phosphoric acid application in lead-contaminated urban soil. *Sci. Total Environ.* 366, 136–142.
- Zhang, H., Davison, W., 2000. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Anal. Chem.* 72, 4447–4457.
- Zhang, Z., Buffle, J., Alemanni, D., 2007. Metal flux and dynamic speciation at (Bio) interfaces. Part II: evaluation and compilation of physicochemical parameters for complexes with particles and aggregates. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7621–7631.



Evaluation of a hollow fiber supported liquid membrane device as a chemical surrogate for the measurements of zinc (II) bioavailability using two microalgae strains as biological references



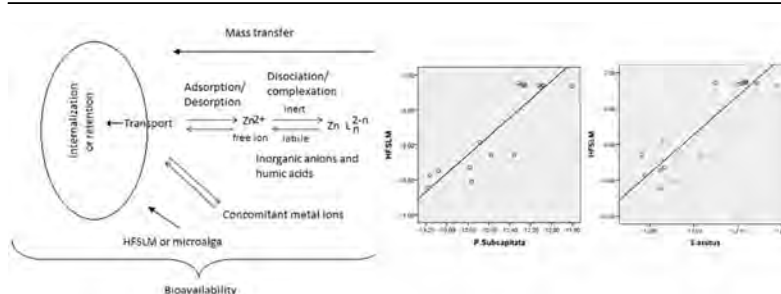
Erik A. Rodríguez-Morales, Eduardo Rodríguez de San Miguel*, Josefina de Gyves

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F., Mexico

HIGHLIGHTS

- The environmental bioavailability of zinc (II) is determined using a chemical device.
- *P. subcapitata* and *S. acutus* serve as references of the chemical surrogate.
- The effect of the free ion and labile species in sampling is elucidated.
- Experimental design strategies assisted in data evaluation and optimization.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2016

Received in revised form

14 December 2016

Accepted 17 December 2016

Available online 19 December 2016

Handling Editor: Petra Petra Krystek

Keywords:

Bioavailability

Zinc

Chemical surrogate

Hollow fiber

Microalgae

ABSTRACT

The environmental bioavailability of zinc (II), i.e., the uptake of the element by an organism, was determined using two microalgae species, *Scenedesmus acutus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, and estimated using hollow fiber supported liquid membrane (HF-SLM) device as the chemical surrogate. Several experimental conditions were studied including the presence of organic matter, inorganic anions and concomitant cations and pH. The results show strong positive correlation coefficients between the responses given by the HF-SLM and the microalgae species ($r = 0.900$ for *S. acutus* and $r = 0.876$ for *P. subcapitata*) in multivariate environments (changes in pH, calcium, humic and citrate concentrations). The maximum amount of zinc (II) retained by the HF-SLM (4.7×10^{-8} mol/cm²) was higher than those for *P. subcapitata* and *S. acutus* (9.4×10^{-11} mol/cm² and 6.2×10^{-11} mol/cm², respectively). The variation in pH (pH 5.5–9) was the variable with the greatest effect on zinc internalization in all systems, increasing approximately 2.5 times for *P. subcapitata* and 5.5 times for *S. acutus* respect to pH = 5.5, while the presence of humic acids did not affect the response. The species' concentration analysis of the experimental design at pH = 5.5 indicated that the amount of internalized zinc (II) by the HF-SLM and both microalgae species is strongly dependent on the free zinc concentration ($r = 0.910$ for the HF-SLM, $r = 0.922$ for *S. acutus* and $r = 0.954$ for *P. subcapitata*); however, at pH = 9.0, the amount of internalized zinc (II) is strongly dependent on the sum of free zinc and labile species ($r = 0.912$ for the HF-SLM, $r = 0.947$ for *S. acutus* and $r = 0.900$ for *P. subcapitata*). The presence of inorganic ligands (chloride, sulfate, phosphate, carbonate, and nitrate) and metal ions (cobalt (II), copper (II), nickel (II), chromium (VI), lead (II) and cadmium (II)) produced different behaviors both in the chemical surrogate and the biological references. The results showed that the synthetic device can mimic biological uptake in the presence of humic acids, nitrate, sulfate, and phosphate, and pH within the range 5.5–9 when *S. acutus*

* Corresponding author.

E-mail address: erdsmsg@unam.mx (E. Rodríguez de San Miguel).

was used as the biological reference, considering the simultaneous contribution of the Zn^{2+} and $ZnOH^+$ labile species depending on the chemical composition of the medium.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Zinc is an essential metal for living organisms and one of the heavy metals more widely used for the production of a great variety of products used by human such as alloys, rubbers, paints, cosmetics, vitamins, etc. Globally, the anthropogenic emission of zinc is around of 700000 to 375000 tons/year (World Health Organization, 2001; Bodar, 2007). Although zinc is considered harmless in high concentrations for human beings, toxic effects (LC_{50}) have been reported at concentrations of approximately 0.058–10 mg/L for aquatic organisms such as microalgae (Bodar, 2007). These toxic effects depend greatly on the metal speciation instead of the total metal concentration, e.g., Allen et al. (1980) observed a negative effect on the cell reproduction of *Microcystis aeruginosa* when the free zinc ion rather than complexes with different synthetic chelators were present in the aqueous medium. For this reason, to account for speciation and migration of the species through interfaces, the term bioavailability has been coined, referring to the extent to which bioaccessible metals are transported across biological membranes of organisms (McGeer et al., 2004).

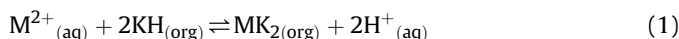
One way to determine the toxic effect of metals in aquatic systems is through the use of bioindicators (e.g., mussels, crabs, fishes, earthworms, microalgae, etc.) (Gaw et al., 2012; Miller, 1978; Morsi Abd-El-Monem et al., 1998). Algae have been extensively used because they are ecologically important organisms in the aquatic food chain and are frequently used in environmental studies for assessing the relative toxicity of various chemicals and/or water dischargers (Lin et al., 2005). A few primary toxic effects observed for microalgae with zinc exposure are decreases in the following: cell division, mobility, ATPase activity and the carotenoid/chlorophyll ratio (Omar, 2002). Alternatively, if environmental bioavailability (i.e., uptake of the contaminant) for an organism or a group of organisms in water or soil can be mimicked by a chemical process, then a chemical test can be used as a surrogate for the biological test. For this reason, the search for relevant chemical tests constitutes a major effort in the identification of practical and fast environmental analyses (Harmsen, 2007). Different chemical alternatives have been employed to gain insight into sample characterization for such purposes, e.g., metal adsorbent (Solbrá et al., 2004), Donnan membrane technique (DMT) (Vega and Weng, 2013), diffusion gradients in thin films (DGT) (Zhang and Davison, 2000), anodic stripping voltammetry (Van Leeuwen et al., 2005), and permeation liquid membranes (PLM) also known as supported liquid membranes (SLM) devices (Bayen et al., 2006; Rodríguez de San Miguel et al., 2008; Slaveykova et al., 2004) for metal ions. The latter technique represents a good alternative for the study of bioavailability of metals because of the advantages it has shown over other methods, i.e., high selectivity, minimum sample handling, real time analysis, application to a wide range of metal ions (Buffle and Horvai, 2000), coupling to electrochemical detectors (Keller and Buffle, 2000), speciation capabilities, and high pre-concentration factors (Bautista-Flores et al., 2010; Chao et al., 2015; Parthasarathy et al., 1997).

In this work, a comparison of the bioavailability of zinc (II) using metal internalization by two microalgae species, *Scenedesmus acutus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, and a hollow fiber

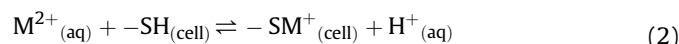
supported liquid membrane (HF-SLM) device as a chemical surrogate is performed. As metal speciation is greatly influenced by different environmental variables, and metal ion bioavailability is expected to be dependent on environmental variables, a multivariate approach is used to account for multiple effects and the interactions on zinc internalization behavior. To the best of our knowledge, this study is the first comparison of a chemical system and two biological references that measures zinc (II) bioavailability in complex aqueous media employing a multivariate approach.

2. HF-SLM devices for bioavailability analysis

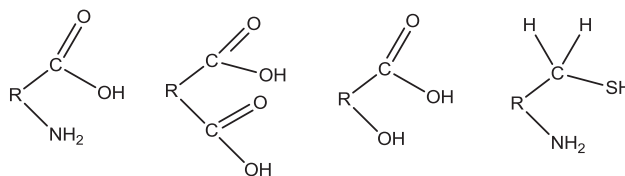
Kelex-100 (KH) is a carrier used in the extraction of a great variety of heavy metals (Aguilar et al., 2001; McCulloch et al., 1996). The main extraction mechanism for M^{2+} in synthetic membranes consists of the counter-transport of protons:



In the literature, some models of metal extraction by biological systems for the estimation of toxicity or bioavailability of metals in several organisms have been reported, the most relevant being the free ion activity model (FIAM) (Brown and Markich, 2000; Campbell, 1995) and the biotic ligand model (BLM) (Slaveykova and Wilkinson, 2005). However, simplifications of the systems descriptions may be used to allow for more simple relationships. Many active sites interchange H^+ on the cell surface and the H^+ present in the aqueous medium can compete with the metal cation for these active sites (Crist et al., 1988). Therefore, when comparing the extraction of metal cations in the HF-SLM with the biological membrane, a similar reaction between the chelating site on the cell surface (Xue et al., 1988) and the carrier in the HF-SLM may be established:



where $-S$ designates a deprotonated, bidentate surface group or chelating site, such as:



When applying this model to the *Chlamydomonas reinhardtii* microalgae for Cu^{2+} , a two-step mechanism is established: i) the metal ion is surface-coordinated to the algal surface, and ii) the metal ion is transferred into the inside of the cell in a slow step (Crist et al., 1988). A similar form of transport can occur in the HF-SLM, where the fast step is the formation of M-C (metal-carrier) and the slow step is the transport through the liquid membrane, controlled by diffusion (Buffle and Horvai, 2000). Therefore, it may be possible to emulate the extraction of metals in biological organisms using microalgae with the HF-SLM, considering that the

free or labile species primarily interact on the surface cell.

3. Materials and methods

3.1. Reagents and equipment

Zinc (II) and concomitant metals ions solutions including those of cobalt (II), copper (II), nickel (II), chromium (VI), lead (II) and cadmium (II) were prepared by dilution of atomic spectroscopy standards (1000 mg/L, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Switzerland); potassium carbonate, sodium phosphate, sodium chloride, sodium sulfate, sodium nitrate, citric acid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Switzerland) and humic acid (Fluka, RA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Switzerland) were employed as interfering ligands. Formic acid (Mallinckrodt, St. Louis, MO, USA) was employed as an acceptor solution, using 7-(4-ethyl-1-methyloctyl)-8-hydroxyquinoline (Kelex 100, Sherex Chemical Co. Inc., Dublin, OH, USA) dissolved in 1-phenylhexane (Aldrich, 97%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Switzerland) as the organic solvent to be impregnated in the hollow fiber. The 50/280 Accurel PP polypropylene hollow fiber tubing (50 μm wall thickness, 280 μm inner diameter and 0.1 μm pore size) was purchased from Membrane GmbH (Wuppertal, Germany) and manually cut into pieces of 15 cm to make the HF-SLM devices. Nitric acid (J.T. Baker, R.A. Avantor Performance Materials, Inc., Center Valley, PA, U.S.A.), sodium hydroxide (Aldrich, R.A. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Switzerland), 4-morpholine ethanesulfonic acid (MES, Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Switzerland) and tris(hydroxymethyl)amino-methane (Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Switzerland) were used to adjust the pH of the solutions. A 3100 Perkin Elmer Atomic Absorption Spectrometer (Waltham, MA, USA) was used for the quantification of zinc in the strip and feed solution. A pH Meter 440 (Corning) with a combined glass electrode InLab Expert Pro-ISM (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) was used for pH measurements. An IKA KS 260 control S1 orbital shaker (Wilmington, NC, USA) was used to maintain a homogeneous solution for all the experiments.

3.2. Extraction and quantification of zinc (II) retained by HF-SLM devices

HF-SLM devices were prepared according to the method described by Bautista-Flores et al. (2010). A polypropylene hollow fiber tubing was cut into pieces of 15 cm; then, the lumen of the hollow fiber was filled with the strip solution (0.01 M formic acid, pH 2.2) using a BD MicroFine syringe, the ends of the hollow fiber were closed and it was then impregnated with phenylhexane containing the carrier 7-(4-ethyl-1-methyloctyl)-8-hydroxyquinoline (Kelex 100). Finally, the module was retracted from the organic phase and manually shaken to remove any excess. The HF-SLM device was immersed (40 min) in the experimental medium (feed solution), which consisted basically of 1×10^{-5} M Zn (II) buffered with 0.01 M MES solution at pH 6.6 or under other conditions, as otherwise indicated, to consider the influence of the different factors specified in the experimental design array (Table 1), i. e. calcium (0.068–1.36 mM), humic acids (1–12 mg/L), citrate (0.001–0.1 mM) and pH (5.5–9, values fixed with NaOH or HCl). The feed solution was buffered with 0.01 M MES or 0.01 M TRIS to evaluate the influence of pH variation. The effect of inorganic ligands (0.01 M) and concomitant metal cations (1×10^{-5} M) were performed at pH = 6.6 (MES 0.01 M) and 1×10^{-5} M of Zn(II). All the experiments were realized under constant agitation for an established period of time, after which the HF-SLM was removed to collect the strip solution for chemical analysis by Flame Atomic

Table 1

2^4 experimental design employed to study the influence of four factors on the amount of internalized zinc (II). 1×10^{-5} M zinc (II) buffered in 0.01 M MES or TRIS (pH = 5.5 or 9.0), under the presence of calcium, humic acids or citrate concentrations as shown in the Table (feed), 0.01 M HCOOH solution at pH 2.2 (strip), and 0.03 M Kelex-100 solution in phenylhexane (membrane). Sampling time: 40 min.

Experiment	pH	Calcium (mM)	Humic acids (mg/L)	Citrate (mM)
1	5.5	1.36	1	0.001
2	5.5	0.068	12	0.1
3	9.0	1.36	1	0.001
4	5.5	1.36	12	0.001
5	5.5	0.068	1	0.1
6	9.0	0.068	1	0.1
7	5.5	0.068	12	0.001
8	9.0	0.068	12	0.001
9	9.0	1.36	12	0.001
10	5.5	1.36	12	0.1
11	9.0	0.068	12	0.1
12	9.0	1.36	1	0.1
13	5.5	0.068	1	0.001
14	5.5	1.36	1	0.1
15	9.0	0.068	1	0.001
16	9.0	1.36	12	0.1

Absorption Spectrometry (FAAS).

3.3. Determination of Zn internalization by the two microalgal strains

The unicellular freshwater algae, *Scenedesmus acutus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, were obtained from the University of Texas at Austin (Utex Scientific, 2015). They were axenically cultured in Bristol medium (Bold, 1942) under a light:dark regime (12:12 h) and constant shaking (150 rpm) at 24 °C. Cells in their middle exponential growth phase were separated from the growth medium by centrifugation (2500 rpm/3 min), and then they were washed three times with deionized water and suspended in the experimental medium, prepared as described in the previous section (Table 1). Once exposed, they were separated by centrifugation and washed with an EDTA solution (10^{-3} M, pH 6.0) for 2 min to remove the metal present on the cell surface (Hassler et al., 2004). The biomass obtained was desiccated until constant weight and later digested with concentrated ultrapure HNO₃ (Aldrich). The amount of zinc in the microalgae and experimental medium was determined by FAAS.

3.4. Experimental 2^4 design array

To determine the influence of different factors on zinc (II) internalization by microalgae or HF-SLM devices, a 2^4 experimental design array strategy was carried out, which consisted of 16 experiments performed in triplicate basis (Table 1). The evaluated factors were pH, calcium, humic acids and citrate concentrations because for a variety of aquatic organisms, the metal toxicity is greatly affected by the variation, presence or absence of these factors (Campbell and Stokes, 1985; Pagenkopf, 1983; Koukal et al., 2003; Stokes et al., 1985).

3.5. Chemical speciation software and statistical analysis

The concentrations of the different chemical species in the experimental media were determined using the Simple Equilibrium Diagrams (SED) program included in the Medusa software using the constants of the Hydra database contained within the software (Puigdomenech, 2004). CHEAQS Pro software was used for zinc speciation under the influence of humic acids, using the

equilibrium constants of the CHEAQS' database (Wilko, 2015). Statgraphics Centurion XVI software (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA) was used to determine the influence of different factors over the amount of internalized or retained zinc (II) through of ANOVA and Pareto charts. IBM SPSS Statistics 22 (IBM, Armonk, NY, USA) software was used to determinate the Pearson's correlations of the amount of internalized or retained zinc (II) by microalgae and HF-SLM devices as a comparative study.

3.6. Evaluation of initial flux

The evaluation of the initial flux in the acceptor medium was used to characterize the performance of the systems. The estimation of the initial flux was based on substituting the actual value of C_{strip} (concentration of the metal in the strip solution) with an empirical function (Ψ) describing the transient solution concentration of the extracted species over the entire extraction period to minimize the contribution of experimental errors (Mora-Tamez et al., 2014; St John et al., 2013). The best reliable fit was obtained with the function shown in Equation (3):

$$\psi_s = a + b e^{ct} \quad (3)$$

where Ψ_s is the function of zinc (II) concentration internalized in the strip solution (at time t), and a , b and c were empirical coefficients determined by the curve-fitting procedure. Once the flux was determined using Equation (4):

$$J(t) = \psi'_s = \frac{d\psi_s}{dt} = c b e^{ct} \quad (4)$$

the value of $(d\Psi_s/dt)_{t=0}$ was used to determine the initial flux, J_0 .

4. Results and discussion

4.1. Standardization of the HF-SLM method for analysis of zinc (II)

Kelex-100 was selected as carrier in the HF-SLM devices as it has shown an excellent extraction efficiency for a great variety of heavy metals in liquid-liquid extraction systems (Aguilar et al., 2001; Bautista-Flores et al., 2010) and, recently, it has been employed for the extraction and speciation analysis of heavy metals using a supported liquid membrane (Bautista-Flores et al., 2010). Moreover, its ability for the counter-transport of protons allows high pre-concentration factors and therefore the detection of low concentrations of metal ions in aquatic systems (Bautista-Flores et al., 2010). 1-Phenylhexane was selected as solvent for Kelex-100 due to the long liquid membrane life time that this solvent has shown in previous studies (Rodríguez de San Miguel et al., 2008).

As SLM transport is affected by a great number of variables, in this part five factors were evaluated for the optimization of zinc (II) extraction, according to previous studies employing similar systems: sampling time, zinc (II) and carrier concentrations and pH in strip and feed solutions (Bautista-Flores et al., 2010).

The Enrichment Factor (E) was employed as variable response for the optimization of zinc (II) extraction, which is defined as:

$$E = \frac{C_{\text{strip}}}{C_{0,\text{feed}}} \quad (5)$$

where C_{strip} stands for the total concentration of the metal in the strip solution at time t and $C_{0,\text{feed}}$ for the total initial concentration of the metal in the feed solution.

The initial conditions employed for the optimization of zinc (II) extraction were based on previously optimized conditions for other

heavy metals using the same kind of system: 100 mL of 0.01 M MES solution at pH 6.6 (feed solution), 0.01 M HCOOH solution at pH 2.2 (strip solution) and 0.03 M Kelex-100 solution (organic phase); the sampling time for each experiment was 120 min (Rodríguez de San Miguel et al., 2008). Experiments were performed at 1×10^{-5} M to fit an average LC_{50} value of zinc (II) content in waters as pointed out in the introduction section. Under the conditions mentioned above a value of E of (800 ± 80) was attained with a negligible depletion of the medium (4.89 ± 0.4 %).

4.1.1. Zinc (II) extraction by HF-SLM

Zinc (II) extraction kinetics in the absence of complexing ligands was evaluated using the HF-SLM device during 120 min under a regimen of negligible depletion (100 mL of feed solution and 6 μ L of strip solution with an average depletion of the metal in the feed solution < 5%). From Fig. 1a it is possible to evaluate that the maximum amount of zinc (II) retained by the HF-SLM (4.7×10^{-8} mol/cm²) was achieved in approximately 30 min of extraction time with $E \sim 800$. Although the highest enrichment factor was obtained when pH = 1.0 was used, this value was not used as the percentage of depletion increased above 20% using this medium and a slower extraction kinetics was observed, i.e. it required c. a. 24 h to reach stationary conditions (Fig. 1b). Further studies were then carried out using 40 min of exposure time.

4.1.2. Effect of feed and strip solution pH

The pH of the strip solution was varied within the range 1.0–3.0 while that of the feed solution within the range 5.5–8.0 maintaining constant the total zinc (II) concentration at 1×10^{-5} M. As observed in Fig. 2a, E values ranging from 400 to 4300 were obtained with the pH variation in the strip solution. The decrease of zinc (II) extraction with the augment of strip pH is clearly due to the reduction of the driving force (H^+ counter-transport) of the transport process. Optimal conditions were then established at pH 2.2 with a (5.0 ± 1.0) % depletion and $E = (808 \pm 98)$. On the other hand, the augment of feed solution pH increases E from 270 to 850, according to Equation (1), up to pH 6.6 where a plateau region is reached (Fig. 2b). This result is similar to that found by Gramlich et al. (2012) for zinc (II) transport in a PLM with lauric acid and Kryptofix 22DD in the $6.0 < \text{pH} < 7.0$ range; however, the fact that the presence of hydrocomplexes of the metal ion at higher pH values (Fig. 2c) does not diminish zinc (II) permeation may be indicative of the participation of labile zinc (II) – OH- species in transport. An experiment was further performed to evaluate the nature of the extraction mechanism through the calculation of the activation energy of the transport process.

4.1.3. Influence of carrier concentration

Kelex-100 concentration was varied within the range 0.03–0.06 M to determine the optimal carrier concentration in the liquid membrane. However, no significant variation in zinc (II) extraction was observed in the studied range. Concentrations higher than 0.06 M decrease the enrichment factor, perhaps due to the increase on the viscosity of organic phase that produces a decrease in the mobility of the migrating species. According to all the results the final optimized conditions for zinc (II) extraction with the HF-SLM device were: 1×10^{-5} M zinc (II) in 0.01 M MES at pH 6.6 (feed), 0.01 M HCOOH solution at pH 2.2 (strip), and 0.03 M Kelex-100 solution in phenylhexane (membrane), using a sampling time of 40 min.

4.1.4. Transport regime

The dependency of E with the temperature was evaluated fitting the data through an Arrhenius-type equation (Bautista-Flores et al., 2010):

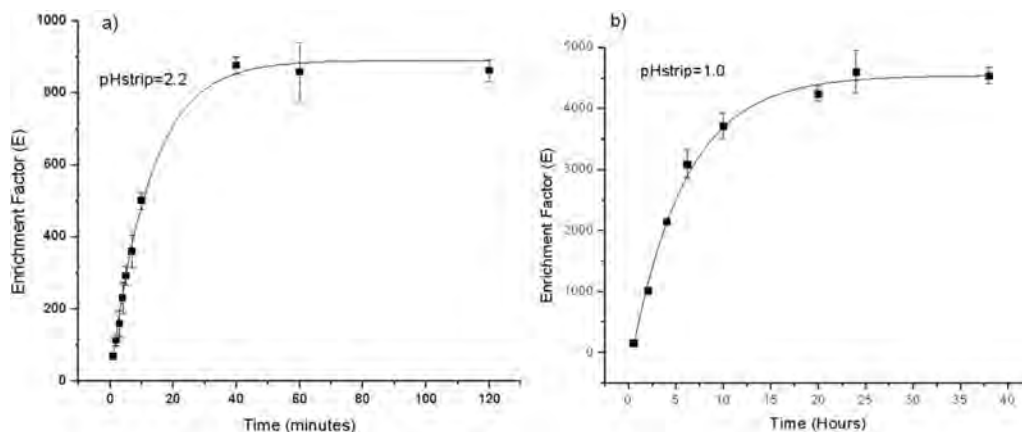


Fig. 1. Kinetic profiles of zinc (II) enrichment factor using two pH values in the strip solution: 2.2 (a) and 1.0 (b).

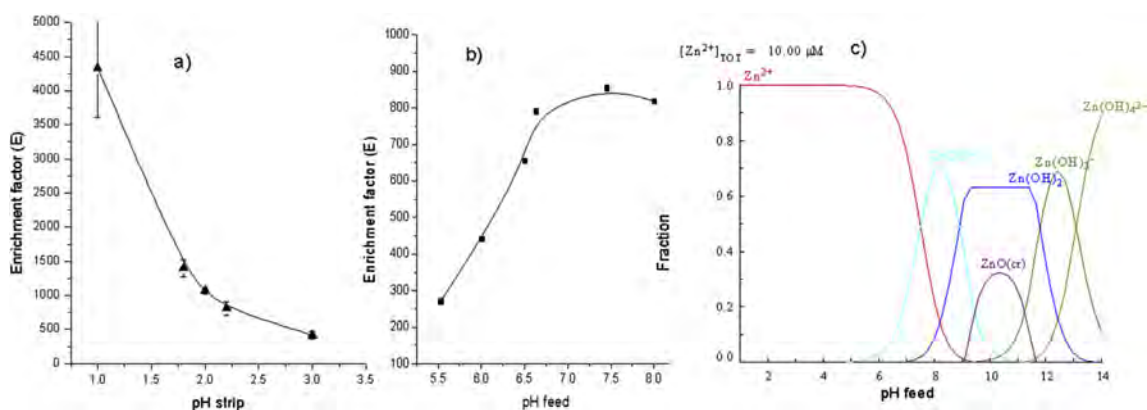


Fig. 2. Influence of pH in the strip solution (a) and feed solution (b) on the enrichment factor, and relative abundance diagram of zinc (II) species as a function of pH (c) (Puigdomenech, 2004).

$$J(t) = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) = kE \quad (6)$$

which was linearly plotted as:

$$\ln E = \ln A - \ln k - \frac{E_a}{RT} \quad (7)$$

where E_a is the apparent activation energy, R the universal gas constant ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T the temperature in Kelvin, A the pre-exponential factor, and k a proportionality constant (Fig. 3).

Interestingly the analysis of Fig. 3 revealed a negative E_a value for the transport process ($-6.16 \text{ kJ mol}^{-1}$), which according to Shimomura et al. (1967) is indicative of some complexity of the process as can be the presence of two simultaneous reactions related to a mixture of two reagent species. This result makes sense considering that two extraction reactions take place involving the co-participation of the Zn^{2+} and ZnOH^+ which are the main species in the transport process. The overall reaction determined by these two simultaneous reactions explains then the pH dependence previously observed.

4.1.5. Zinc (II) flux through the HF-SLM

The proportionality between flux and enrichment factor (Equation (6)) was further revised. As a slope value of 1.1 ± 0.08 ($R^2 = 0.97$) was obtained in the $\log J_0$ (HF-SLM) vs $\log E$ plot, it is possible to use indistinctly E or J_0 in further analyses. However, an

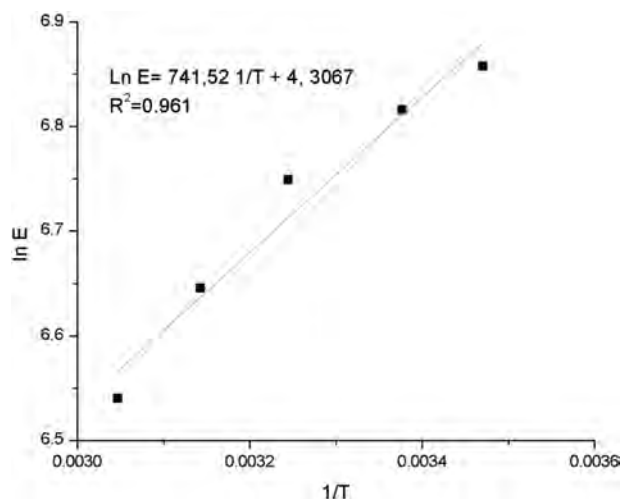


Fig. 3. Arrhenius plot from which the activation energy, E_a , of the permeation process was evaluated.

additional issue arises when comparing the results of the chemical surrogate with the biological reference entities because of the two forms in which bioavailability is usually expressed: bioavailability defined in terms of flux or rate ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and bioavailability defined in terms of content (mol kg^{-1}). Theoretically, the content-

based bioavailability is obtained by integrating the rate- or flux-based bioavailability over a period of interactions. In practice, the rate of processes is difficult to measure directly, and the flux- or rate-based bioavailability is estimated from content-based bioavailability. Therefore, the content-based bioavailability is of primary importance from an evaluation point of view (Harmsen, 2007). For this reason, in the following research, the amount of metal retained in the strip solution by the HF-SLM devices over a certain period of time, i.e., content-based bioavailability was used as the indicator of environmental bioavailability (Van Leeuwen et al., 2005) and all comparisons with the biological references made on such units. Such evaluation was accomplished through the use of Equation (8):

$$C_{ret} = \frac{C_{strip} \cdot V_{strip}}{A_m} \quad (8)$$

where C_{ret} stands for the amount of zinc (II) retained, V_{strip} for the strip solution volume and A_m for the membrane area.

4.1.6. Zinc (II) extraction by HF-SLM devices in the presence of inorganic ligands

There are many factors in natural water that can affect zinc (II) extraction; however, inorganic ligands play a major role, as they can form inert or labile complexes that affect bioavailability. The influence of five inorganic ligands including chloride, sulfate, phosphate, carbonate, and nitrate at 0.01 M on the extraction kinetics in the HF-SLM devices was evaluated (Fig. 4), maintaining the optimized conditions. It can be seen from Table 2 that J_0 decreased in the order of carbonate > without ligands > nitrate > chloride > sulfate > phosphate.

A good correlation between J_0 and the cumulative stability constants of the different ligands with zinc (II) can be established: PO_4^{3-} , $\log \beta_1 = 2.4$, $\log \beta_2 = 1.2$; SO_4^{2-} , $\log \beta_1 = 2.38$, $\log \beta_2 = 1.9$, $\log \beta_3 = 1.7$; Cl^- , $\log \beta_1 = 0.43$, $\log \beta_2 = -0.61$, $\log \beta_3 = 0.61$; NO_3^- , $\log \beta_1 = 0.4$, $\log \beta_2 = -0.3$ (Kotrlý and Sucha, 1985). This trend is explained by considering that the lability of a complex is determined by the free ligand concentration in solution and the stability constant between zinc (II) and a specific ligand (K_{ZnL}) (Gramlich et al., 2012).

A comparison between Zn^{2+} and the sum of Zn^{2+} and $ZnOH^+$

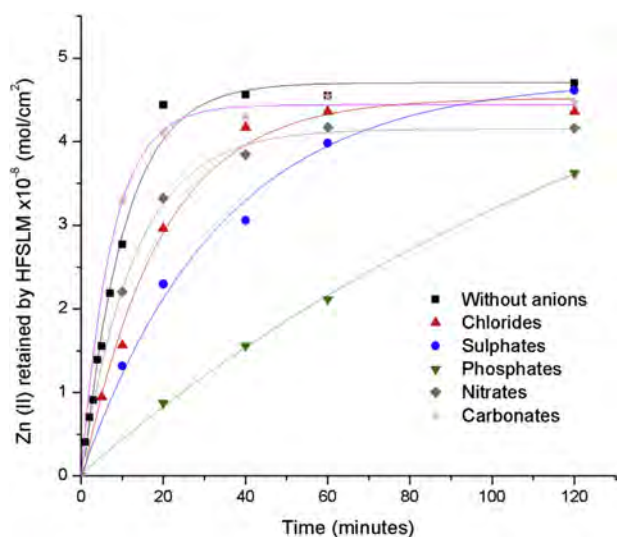


Fig. 4. Zinc (II) extraction kinetics in the presence of inorganic ligands using the HF-SLM device.

Table 2

Zinc (II) initial fluxes (J_0) and maximum internalized amount ($C_{int \max}$) for the HF-SLM device in the absence or presence of different inorganic ligands. (1×10^{-5} M zinc (II) buffered in 0.01 M MES at pH = 6.6, under the presence of 0.01 M of inorganic ligands (feed solution), 0.01 M HCOOH solution at pH 2.2 (strip), and 0.03 M Kelex-100 solution in phenylhexane. Sampling time: 40 min.

Inorganic ligands	$J_{0strip} \times 10^{-9}$ (mol cm ⁻² min ⁻¹)	$C_{int \max} \times 10^{-8}$ (mol/cm ²)
Carbonate	5.9	4.4
None	4.9	4.7
Nitrate	3.1	4.1
Chloride	2.4	4.5
Sulfate	1.2	4.9
Phosphate	0.56	4.1

concentrations and the amount of zinc (II) in the feed solution determined by HF-SLM device was performed (Fig. 5). As observed the inclusion of the $ZnOH^+$ allows to explain better the uptake results of the chemical surrogate in comparison to Zn^{2+} alone, corroborating previous conclusions related to the extraction of both species. From Fig. 5 it is observed that carbonate is the ligand with the highest deviations between measured and calculated concentration, as the amount of zinc (II) determined by the HF-SLM device is higher by a factor of about 5. The same phenomenon was observed by Bayen et al. (2009) for Cu (II), Pb (II) and Cd (II) under the influence of carbonates in a sodium-drive PLM; however, no explanation for this behavior has been given. Further experiments are then necessary to clarify the cause of this phenomenon.

4.1.7. Influence of concomitant cations

The influence of 10^{-5} M of divalent cobalt, copper, nickel, chromium, lead and cadmium on zinc (II) retained by the HF-SLM devices was studied. A decrease in zinc (II) extraction in the presence of copper (II), lead (II) and cadmium (II) was observed, as expected considering the non-selective character of the carrier (Aguilar et al., 2001; Bautista-Flores et al., 2010) (Fig. S1, SI).

4.1.8. Influence of different factors on zinc (II) retained by the HF-SLM device

To study the influence of several factors on the amount of zinc (II) retained in the strip solution by the HF-SLM device under the influence of the variation of different simultaneous variables which emulate variations in natural conditions, the 2⁴ experimental design matrix indicated in Table 1 was applied. Its analysis by Pareto Chart and ANOVA methods indicated that the main factor affecting zinc (II) retained by the HF-SLM devices is the feed pH (Fig. S2, SI). It is important to note that the organic matter (humic

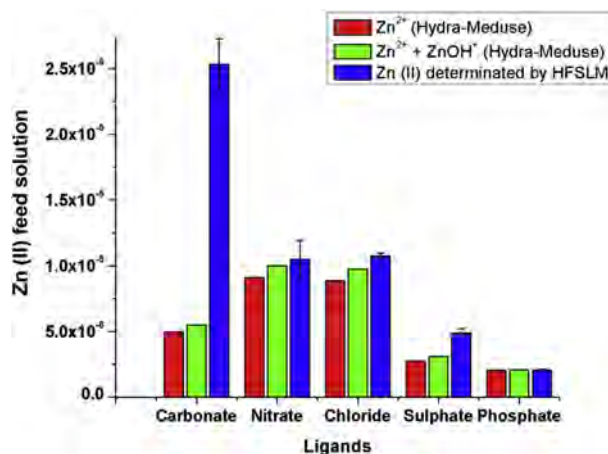


Fig. 5. Comparison of Zn^{2+} and $Zn^{2+} + ZnOH^+$ concentrations in the feed solution and zinc (II) concentration determined by the HF-SLM device.

acids) content does not have a significant influence on the amount of zinc (II) retained. Smith (2009) has established the following bond order of some metals with humic acids: $Pb > Cr > Cu > Ni \geq Cd > Zn$. The results obtained herein are then in agreement with the low capacity of zinc (II) to form complexes with this ligand. As for citrate, it seems that the equilibrium constant of the zinc (II) – carrier complex is high enough with respect to the zinc (II) – citrate constant to avoid any masking effect with this ligand. Calcium showed also no influence on zinc (II) retained, which is explained considering the low affinity of Kelex 100 for its extraction. To evaluate the importance of free zinc and labile species on the amount of metal retained by the HF-SLM device, a speciation analysis of the 2⁴ experimental design was performed using the CHEAQS software and results analyzed through a Pearson's correlation analysis (Table 3). At pH = 5.5 a strong positive correlation ($r = 0.910$) was observed between the retained zinc (II) in the strip solution and the free zinc concentration in the feed solution; however, at pH = 9.0 the analysis showed a strong dependence of the amount of zinc retained and the sum of free zinc and labile species concentrations ($r = 0.912$). This effect can be attributed to the predominance of the hydroxylated species at high pH values, the availability of the HF-SLM device to extract it simultaneously with the free species as pointed out before, a strong bonding of the carrier with the metal ion in comparison with the citrate ligand at this pH value, and the decrease of proton competition for the carrier.

4.2. Biouptake of zinc (II) by two microalgae strains

Bioassays were conducted at initial cell densities of $\sim 1.27 \times 10^6$ cells/mL for *P. subcapitata* and $\sim 2.1 \times 10^6$ cell/mL for *S. acutus*. The analysis of J_0 and the maximum amount of internalized zinc (II) ($C_{int, max}$), showed that *P. subcapitata* presents higher values of these parameters ($J_0 = 3.4 \times 10^{-12}$ mol cm⁻² s⁻¹ and $C_{int, max} = 9.4 \times 10^{-11}$ mol/cm²) than *S. acutus* ($J_0 = 0.88 \times 10^{-12}$ mol cm⁻² s⁻¹ and $C_{int, max} = 6.2 \times 10^{-11}$ mol/cm²), indicating a significant difference in extraction between both strains. A stationary internalization state is attained at approximately 120 min for *P. subcapitata* and 200 min for *S. acutus*, maintaining a depletion lower than 10% in the feed solution (Fig. 6). Accordingly, further experiments were performed using these exposure times.

The differences in zinc (II) extraction between strains can be attributed to changes in cell morphology, acclimation (Fortin and Campbell, 2012), density (Franklin et al., 2002) and nutritional needs.

4.2.1. Assessment of the identification of significant factors in zinc (II) internalization by microalgae

To study the influence of different factors on zinc (II) internalization by the microalgae species, experiments as indicated in

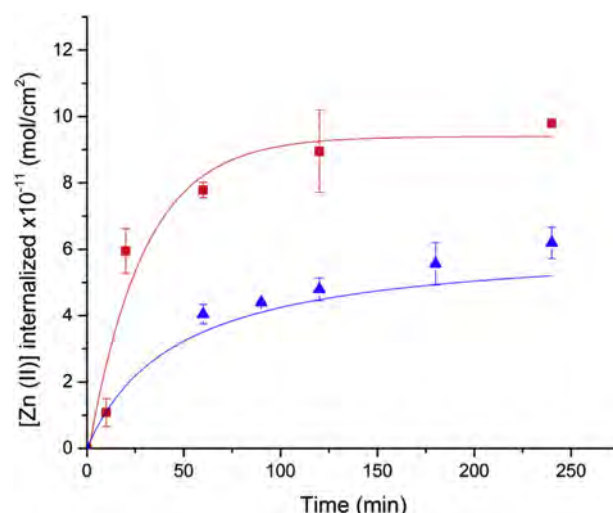


Fig. 6. Zinc (II) internalization kinetics in absence of inorganic ligands for *P. subcapitata* (squares) and *S. acutus* (triangles).

Table 1 were performed. After measuring the response (amount of internalized zinc (II)), the experimental design was analyzed using Pareto charts and ANOVA. Both methods show pH as the factor with the greatest influence; an increase of internalized zinc (II) when the pH in the feed solution is high is observed for both microalgae (Fig. S2, SI). As Zn^{2+} diminish with the augment in pH, this result seems to contradict the Free-ion Activity Model (FIAM), which indicates that the free species is the most toxic or bioavailable species in the aquatic medium. The species' concentration analysis of the experimental design at pH = 5.5 indicated that the amount of internalized zinc (II) by both microalgae species is strongly dependent on the free zinc concentration ($r = 0.922$ for *S. acutus* and $r = 0.954$ for *P. subcapitata*); however, at pH = 9.0, the amount of internalized zinc (II) is strongly dependent on the sum of free zinc and labile species ($r = 0.947$ for *S. acutus* and $r = 0.900$ for *P. subcapitata*) similarly to the behavior observed with the HF-SLM device (Table 3). DeForest and Van Genderenz (2012) when developing an unified zinc BLM that could efficiently predict both acute and chronic toxicity over a wide range of zinc bioavailabilities found a systematic trend between the ratio of predicted to observed toxicity values versus pH, where toxicity was generally underpredicted at $pH > 7.5$. The inclusion of a biotic ligand binding constant for $ZnOH^+$ improved the performance of the unified BLM. Authors conclude that it appears that the toxicity of Zn hydroxide complexes at higher pH was being underestimated and proposed a higher binding constant value for this species. Similarly, Allen et al. (1980) reached the conclusion that Zn^{2+} and $ZnOH^+$ should be considered as bioavailable to explain the toxicity results in algae bioassays.

Table 3

Pearson's correlation analysis of the amount of retained or internalized zinc (II) by the HFSLM or microalgae strains, respectively, and the zinc species concentrations in the feed solution at pH = 5.5 and 9.0 in the experimental conditions reported in Table 1.

Species		pH = 5.5			pH = 9.0		
		HFSLM	<i>S. acutus</i>	<i>P. Subcapitata</i>	HFSLM	<i>S. acutus</i>	<i>P. Subcapitata</i>
Zn^{2+}	Pearson correlation	0.910	0.922	0.954	0.743	0.361	0.687
	Sig. (2-tailed)	0.011	0.026	0.046	0.090	0.634	0.200
$Zn^{2+} + ZnOH^+$	Pearson correlation	0.910	0.922	0.954	0.730	0.423	0.790
	Sig. (2-tailed)	0.012	0.026	0.046	0.099	0.576	0.112
$Zn^{2+} + \Sigma ZnLabile^a$	Pearson correlation	0.016	0.061	0.458	0.912	0.947	0.900
	Sig. (2-tailed)	0.976	0.922	0.542	0.011	0.052	0.038

^a The amount of labile species was determined by the sum of $ZnOH^+$, $Zn(OH)_2$ and Zn-Cit species.

As in the case of the HF-SLM device the organic matter content does not have a significant influence on the amount of internalized zinc (II). However, the presence of citrate showed a significant decrease in the response of both microalgae strains. This behavior may be attributable to the formation of citrate-zinc (II) complexes, which diminish the Zn (II) internalization fluxes possibly due to the lower values of the extraction constants for the microalgae in comparison to Kelex 100. The presence of calcium in the feed solution had a negative influence on *S. acutus* but no effect on *P. subcapitata*; this effect can be explained by the competition of Ca^{2+} for the active sites in the cell membrane.

A comparison in the internalization behavior of both microalgae species under the simultaneous influence of the different factors pointed out in Table 1 was performed. The Pearson's correlation coefficient between internalized zinc (II) for *P. subcapitata* and for *S. acutus* showed a strong positive correlation with $r = 0.929$ (p -value = $5.51\text{E-}7$) denoting similarity in behavior.

4.2.2. Influence of feed pH by two microalgae

In this section, a more detailed study of the aqueous pH is performed in the interval $5.5 < \text{pH} < 9.0$. Fig. 7 summarizes the results obtained. An increase in internalized zinc (II) with the increase in pH was observed, in accordance with the previous experimental results (increasing approximately 2.5 times for *P. subcapitata* and 5.5 times for *S. acutus* respect to pH = 5.5). However, two maxima signals at pH 7.0 and pH 8.5 were noted as being more pronounced for *P. subcapitata* than for *S. acutus*. The presence of such maxima may be explained considering the predominance of different zinc (II) aqueous species that could be simultaneously internalized as discussed before. Similar results are obtained for *Chlorella* sp. by Wild et al. (2006), who demonstrates that zinc toxicity increases 50 times when the pH increases from pH 5 to pH 8. The observed differences in behavior between both microorganisms can be rationalized considering that it has been established that the relationship between pH and toxicity is largely algal species-dependent due to several factors: changes in the predominance of the free metal ion with pH, decreased competition between the metal ion and H^+ at the cell surface with an increase in pH, and an increasing number of negatively charged sites formed on the cell surface with pH increase that results in increased bound

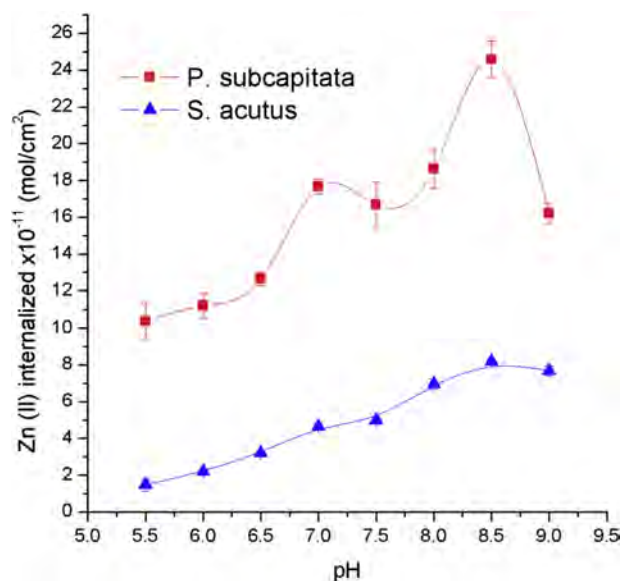


Fig. 7. Influence of pH on the amount of internalized zinc (II) by *P. subcapitata* and *S. acutus*.

metal (Wild et al., 2006).

4.2.3. Zinc (II) internalization in the presence of inorganic ligands by two microalgae species

The results obtained for the microalgae are shown in Fig. 8. ANOVA analysis indicates that for *S. acutus*, three anions have a negative significant influence (F-test, $P < 0.05$) on zinc (II) internalization: sulfate \approx phosphate $>$ carbonate. As for *P. subcapitata*, this analysis indicates a significant influence: sulfate $>$ phosphate $>$ nitrate. The LC_{50} value for zinc sulfate in acute toxicity tests of zinc compounds in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and water fleas (*Daphnia magna*) has been reported to be orders of magnitude lower than that observed with the carbonate form (Erten-Unal et al., 1998), which agrees with the results obtained for *S. acutus*. In addition, changes in plant tissue concentrations due to the phosphorous source (i.e., phosphate rock and KH_2PO_4) and level of addition that can impact zinc bioavailability have been previously reported (Zwonitzer et al., 2003). From Fig. 8 differences in behavior between the two tested microalgae are clearly observed concerning the influence of inorganic anions. Differences in the nutritional needs of the biological references in comparison to the absence of them in the chemical surrogate may be a possible cause for the dissimilar behavior between the biological and the chemical systems. According to these results, the estimation of zinc bioavailability should include an evaluation of anions' type and concentrations.

4.2.4. Influence of concomitant metal ions

The influence of 10^{-5} M of divalent cobalt, copper, nickel, chromium, lead and cadmium on zinc (II) internalization for the biological systems was studied (Fig. S3, SI). A large difference in the amount of internalized analyte between the two microalgae strains under the influence of these concomitant cations was observed. ANOVA analysis indicated a significant influence of copper (II), which considerably increased the metal internalization by *S. acutus*. Similar results are reported by Ahsanullah et al. (1981) when studying the bioavailability of zinc in the *Callinassa australiensis* shrimp. This synergic effect is also observed by Utgikar et al. (2004) when evaluating the toxicity of zinc in *Vibrio fischeri*. The authors attribute this effect to two different mechanisms of toxicity. Results show that the simultaneous exposure to other metals may influence zinc bioavailability, depending on the alga strain evaluated.

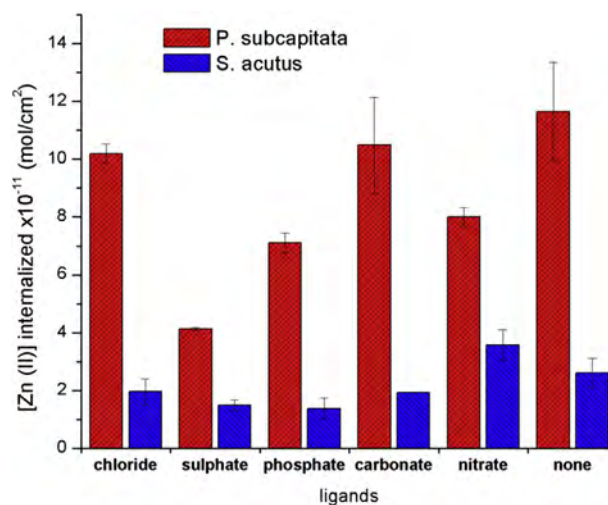


Fig. 8. Influence of inorganic ligands on the amount internalized zinc (II) by *P. subcapitata* and *S. acutus*.

Furthermore, it has been reported that interspecies differences in sensitivities to metals can also be influenced by prior exposure to metals. Algae isolated from polluted environments typically have a higher tolerance to metals than laboratory isolates, due to an induced tolerance from exposure to high metal concentrations (Johnson et al., 2007).

4.3. Comparison of algae and HF-SLM internalization

To allow a comparison of the chemical surrogate with the biological references in the multivariate environment depicted in Table 1, a Pearson's bivariate correlation analysis was performed using the experimental results obtained for all the designs. Interesting positive strong correlations between *P. subcapitata* and *S. acutus* and the HF-SLM device were observed ($r = 0.900$, p -value = $5.21E-6$, and $r = 0.876$, p -value = $8.8E-6$, respectively). These results indicate similarities in the Zn (II) extraction between the microalgae and the surrogated chemical in a complex mixture (as natural water), and hence the capacity of the HF-SLM device to mimic biological behavior.

Finally, to evaluate the contribution of the concentration of the different species in the experimental sampling media this parameter was computed (Table T1, SI) in the presence of inorganic ions, for both, the chemical surrogate and the biological references (data in Figs. 4 and 8) and Pearson's correlation analysis performed. The analysis revealed that at pH = 6.6 the internalization behavior is mainly dependent on the free zinc species for both microalgal strains and the hollow fiber module, although differences were found in relation to the anions present in solution. As for the HF-SLM device a strong positive correlation between retained zinc and the free ion concentration was observed in the presence of chloride, nitrate, sulfate, and phosphate ($r = 0.994$, p -value = $5.76E-3$) with a slightly improvement in correlation as the $ZnOH^+$ species was included ($r = 0.996$, p -value = $4.33E-3$). In relation to *S. acutus* a strong positive correlation between internalized zinc and the free ion concentration was observed in the presence of nitrate, sulfate, phosphate, and carbonate ($r = 0.978$, p -value = $2.21E-2$) with a slightly improvement in correlation as the $ZnOH^+$ species was included ($r = 0.985$, p -value = $1.536E-2$). As for *P. subcapitata* a strong positive correlation between internalized zinc and the free ion concentration was observed in the presence of chloride, nitrate, and phosphate ($r = 0.926$, p -value < $1E-6$). These differences in behavior depending on anion type may be explained considering changes in the lability criteria for each system due to the particular carrier/mechanism responsible for transport.

Taking into account all results, particularly the dependence on pH, and the similarity share between free metal ion concentration in the presence of complexes with three anions when sampling with the HF-SLM and *S. acutus*, it is possible to conclude that the HF-SLM device emulates slightly better the behavior of this microalga than that of *P. subcapitata*. Differences in the constitution of the cell wall have previously explained changes in the rate of penetration of organic compounds (Cyfluthrin) between *S. acutus* and *P. subcapitata* (Sáenz et al., 2012). Consequently, such inherent differences may also be impacting zinc (II) uptake. It has been known that the relatively high metal-binding capacities of microalgae could be attributed to the intrinsic composition of their cell walls, consisting mainly of polysaccharides, proteins, and lipids, which offer several functional groups (e.g., carboxyl, $-COOH$; hydroxyl, $-OH$; phosphate, $-PO_3$; amino, $-NH_2$; and sulfhydryl, $-SH$) that confer a net overall negative charge to the cell surface, i.e., a high binding affinity for metal cations via counterion interactions (Kumar et al., 2015). Then it seems that the function of the HF-SLM is more closely related to the function of the cell wall of *S. acutus* probably due to the characteristic amount and type of constituents

present in its exterior surface.

5. Conclusions

Passive zinc (II) sampling from aqueous solutions with a HF-SLM device using Kelex-100 as the carrier was satisfactorily accomplished. The high pre-concentration factor ($E = 800$), minimum sampling depletion (<5%), and short sampling time (30 min) observed under optimized conditions (1×10^{-5} M zinc (II) in 0.01 M MES at pH 6.6 (feed), 0.01 M HCOOH solution at pH 2.2 (strip), and 0.03 M Kelex-100 solution in phenylhexane (membrane)) allow for its application to *in situ* analysis in natural waters. The study of the HF-SLM zinc (II) internalization results points out towards the presence of two simultaneous reactions involving the extraction of the Zn^{2+} and $ZnOH^+$ species which determine the overall uptake mechanism of the device.

Bioassays conducted with the *P. subcapitata* and *S. acutus* microalgae showed that the former presents higher values of initial fluxes and maximum amount of internalized zinc (II), indicating a significant difference in extraction between strains. Such differences were also noticed concerning the influence that inorganic anions have on zinc (II) biouptake. Since an increase of internalized zinc (II), when the pH in the feed solution rises, was observed for both microalgae, results suggest that Zn^{2+} and $ZnOH^+$ should be considered as bioavailable species, in agreement with toxicity results reported in the literature and the HF-SLM results. The comparison of zinc (II) internalization in microalgae under the influence of a multivariate environment (changes in pH, calcium, humic acid, and citrate concentrations) using a Pearson's bivariate correlation analysis showed a positive moderate correlation between both strains ($r = 0.929$).

A comparison between the capabilities of the HF-SLM device to monitor zinc bioavailability respect to the biological references showed that the chemical surrogate internalized 500 and 700 times more zinc than the biological entities, *P. subcapitata* and *S. acutus*, respectively. Despite this fact, high correlation coefficients between the chemical and the biological systems were observed in complex aqueous media ($r = 0.900$ between *P. subcapitata* and the HF-SLM and $r = 0.876$ between *S. acutus* and the HF-SLM). The species' concentration analysis at pH = 5.5 indicated that the amount of internalized zinc (II) by both microalgae species is strongly dependent on the free zinc concentration ($r = 0.922$ for *S. acutus* and $r = 0.954$ for *P. subcapitata*); however, at pH = 9.0, the amount of internalized zinc (II) is strongly dependent on the sum of free zinc and labile species ($r = 0.947$ for *S. acutus* and $r = 0.900$ for *P. subcapitata*) similarly to the behavior observed with the HF-SLM device. The necessity to calibrate the chemical device with standards that have a pH that is similar to the natural samples was additionally noted. The presence of humic acids in the 1–12 mg/L range did not modify the uptake behavior of the chemical surrogate or the biological entities.

The fact that the influence of inorganic ligands and several concomitant metal ions varies along with the biological and chemical systems, makes it difficult to predict zinc bioavailability. While the HF-SLM device follows the expected behavior, considering the stability constants between zinc and the specific ligands, the microbiological entities share the influence of sulfate and phosphate. As previously discussed, differences in the cell wall structure between both microalgae may be responsible for specific sorption of anions at the cell surface that affects in a different extend zinc (II) uptake depending of the microalga species. In the presence of nitrate, sulfate and phosphate, the results pointed out towards a significant contribution of the zinc free species to the retained or internalized metal in the HF-SLM and *S. acutus* systems. The presence of several concomitant metal ions causes different

internalization patterns in the chemical surrogate and biological entities. In particular *S. acutus* showed an increased bioavailability in the presence of copper (II), which is not present in *P. subcapitata* and cannot be modeled by the chemical surrogate. According to these results, the estimation of zinc bioavailability using the chemical surrogate should include an evaluation of the media composition and a clear definition of the biological reference.

Acknowledgements

The authors want to thank CONACYT (project 2011CB167148) for financial support. Dr. Fernando Montiel Aguirre (UNAM) and M. C. Raquel Ortega Muñoz (UNAM) are thanked for their assistance with biological methods, Q. Nadia Munguía Acevedo for the technical services, and Dra. Martha P. Garcia Camacho (UNAM) for providing the microalgae species. EARM expresses gratitude to CONACYT for the PhD scholarship. Authors are in debt to Prof. Jan Ake Jönsson (Lund University) for the collaboration in the equilibrium sampling through membranes (ESTM) area, which drives the current work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.083>.

References

- Aguilar, J.C., Sánchez-Castellanos, M., Rodríguez de San Miguel, E., de Gyves, J., 2001. Cd (II) and Pb (II) extraction and transport modeling in SLM and PIM systems using Kelex 100 as carrier. *J. Membr. Sci.* 190, 107–118.
- Ahsanullah, M., Negilski, D.C., Mobley, M.C., 1981. Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis* Ill. Accumulation of metals. *Mar. Biol.* 64, 311–316.
- Allen, H.E., Hall, R.H., Brisbin, T.D., 1980. Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 14, 441–443.
- Bautista-Flores, A.N., Rodríguez de San Miguel, E., de Gyves, J., Jönsson, J.A., 2010. Optimization, evaluation, and characterization of a hollow fiber supported liquid membrane for sampling and speciation of lead (II) from aqueous solutions. *J. Membr. Sci.* 363, 180–187.
- Bayen, S., Worms, I., Parthasarathy, N., Wilkinson, K., Buffle, J., 2006. Cadmium bioavailability and speciation using the permeation liquid membrane. *Anal. Chim. Acta* 575, 267–273.
- Bayen, S., Gunkel-Grillon, P., Worms, I., Martin, M., Buffle, J., 2009. Influence of inorganic complexes on the transport of trace metals through permeation liquid membrane. *Anal. Chim. Acta* 646, 104–110.
- Bodar, C.W.M., 2007. Environmental Risk Limits for Zinc. RIVM letter report 11235. National Institute for Public Health and the Environment, Netherlands.
- Bold, H.C., 1942. The cultivation of algae. *Bot. Rev.* 8, 69–138.
- Brown, P.L., Markich, S.J., 2000. Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model. *Aquat. Toxicol.* 51, 177–194.
- Buffle, J., Horvai, G., 2000. In Situ Monitoring of Aquatic Systems Chemical Analysis and Speciation. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, vol. 6. John Wiley & Sons, Ltd. England.
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Wiley, Chichester, pp. 45–102.
- Campbell, P.G., Stokes, P.M., 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 2034–2049.
- Chao, J.B., Zhou, X.X., Shen, M.H., Tan, Z.Q., Liu, R., Yu, S.J., Wang, X.W., Liu, J.F., 2015. Speciation analysis of labile and total Silver(I) in nanosilver dispersions and environmental waters by hollow fiber supported liquid membrane extraction. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14213–14220.
- Crist, R.H., Oberhoiser, K., Schwartz, D., Marzoff, J., Ryder, D., 1988. Interaction of metal and protons with algae. *Environ. Sci. Technol.* 22, 755–760.
- DeForest, D.K., Van Genderenz, E.J., 2012. Application of U.S. EPA guidelines in a bioavailability-based assessment of ambient water quality criteria for zinc in freshwater. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (6), 1264–1272.
- Erten-Unal, M., Wixson, B.G., Gale, N., Pitt, J.L., 1998. Evaluation of toxicity, bioavailability and speciation of lead, zinc and cadmium in mine/mill wastewaters. *Chem. Spec. Bioavailab.* 10, 37–46.
- Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2012. Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: the protective effect of trace zinc and cobalt concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1445–1452.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Apte, S.C., Lim, R.P., 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 1 (21), 742–751.
- Gaw, S., Northcott, G., Kim, N., Wilkins, A., Jensen, J., 2012. Comparison of earthworm and chemical assays of the bioavailability of aged 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene, 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane, and heavy metals in orchard soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1306–1316.
- Gramlich, A., Tandy, S., Slaveykova, V.I., Duffner, A., Schulin, R., 2012. The use of permeation liquid membranes for free zinc measurements in aqueous solution. *Environ. Chem.* 9, 429–437.
- Harmsen, J., 2007. Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard methods. *J. Environ. Qual.* 36, 1420–1428.
- Hassler, C.S., Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extraction. *Limnol. Oceanogr.* 2, 237–247.
- Johnson, H.L., Stauber, J.L., Adams, M., Jolley, D.F., 2007. Copper and zinc tolerance of two tropical microalgae after copper acclimation. *Environ. Toxicol.* 22, 234–244.
- Keller, O.C., Buffle, J., 2000. Voltammetric and reference microelectrodes with integrated microchannels for flow through microvoltammetry. Part II: coupling the microcell to a SLM preconcentration technique. *Anal. Chem.* 72, 943–948.
- Kotly, S., Sucha, L., 1985. *Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Koukal, B., Guéguen, C., Pardos, M., Dominik, J., 2003. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere* 53, 953–961.
- Kumar, K.S., Dahms, H.U., Won, E.J., Lee, J.S., Shin, K.H., 2015. Microalgae – a promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 329–352.
- Lin, J.H., Kao, W.C., Tsai, K.P., Chen, C.Y., 2005. A novel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Res.* 39, 1869–1877.
- McCulloch, J.K., Perera, J.M., Kelly, E.D., White, L.R., Stevens, G.W., Grieser, F., 1996. A kinetic study of Copper ion extraction by Kelex-100 at a Heptane-Water Interface. *J. Colloid Interface. Sci.* 184, 406–413.
- McGeer, J., Henningsen, G., Lanno, R., Fischer, N., Sappington, K., Drexler, J., 2004. *Issue Paper on the Bioavailability and Bioaccumulation of Metals*. U.S. EPA, Washington, D.C.
- Miller, W.E., 1978. *The Selenastrum Capricornutum Printz Algal Assay Bottle Test*. EPA, Corvallis Oregon.
- Mora-Tamez, L., Rodríguez de San Miguel, E., Briones-Guerash, U., Munguía-Acevedo, N.M., de Gyves, J., 2014. Semi-interpenetrating hybrid membranes containing ADOGEN®364 for Cd (II) transport from HCl media. *J. Hazard. Mater.* 280, 603–611.
- Morsi Abd-El-Monem, H., Corradi, M.G., Gorbi, G., 1998. Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environ. Exp. Bot.* 40, 59–66.
- Omar, H.H., 2002. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 50, 95–100.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17, 342–346.
- Parthasarathy, N., Pelletier, M., Buffle, J., 1997. Hollow fiber based supported liquid membrane: a novel analytical system for trace metal analysis. *Anal. Chim. Acta* 350, 183–195.
- Puigdomenech, I., 2004. MEDUSA Software, Inorganic Chemistry. Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.
- Rodríguez de San Miguel, E., Liu, J., Mayer, P., Jönsson, J.A., 2008. Multivariate analysis of selected metal ion transport through a hollow-fiber supported liquid membrane device used for passive sampling monitoring. *Solvent. Extr. Ion. Exch.* 26, 602–623.
- Sáenz, M.E., Di Marzio, W.D., Alberdi, J.L., 2012. Assessment of Cyfluthrin commercial formulation on growth, photosynthesis and catalase activity of green algae. *Pest. Biochem. Physiol.* 104, 50–57.
- Shimomura, T., Tölle, K.J., Smid, J., Szwarc, M., 1967. Energy and entropy of activation of propagation by the free polystyryl anions and their ion pairs. The phenomenon of “negative” activation energy. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 796–803.
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, J., 2005. Predicting the bioavailability of metals and metal complex: a critical review of the Biotic Ligand Model. *Environ. Chem.* 2, 9–24.
- Slaveykova, V.I., Parthasarathy, N., Buffle, J., Wilkinson, K.J., 2004. Permeation liquid membrane as a tool for monitoring bioavailable Pb in natural waters. *Sci. Total. Environ.* 328, 55–68.
- Smith, S.R., 2009. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste compost compared to sewage sludge. *Environ. Int.* 35, 42–156.
- Solbrå, S., Allison, N., Skei, J., Waite, S., Mikhailovsky, S., 2004. Deploying a metal adsorbent in situ: a technique for indicating bioavailable Cd(II) in marine waters. *Water Res.* 38, 1586–1594.
- St John, A.M., Cattrall, R.W., Kolev, S.D., 2013. Determination of the initial flux of polymer inclusion membranes. *Sep. Purif. Technol.* 116, 41–45.
- Stokes, P.M., Bailey, R.C., Groulx, G.R., 1985. Effects of acidification on metal availability to aquatic biota, with special reference to filamentous algae. *Environ. Health. Perspect.* 63, 79–87.
- Utex Scientific. Software for Building Easy to Use NDE Systems [cited 2015

- November 5]. Available from: <http://www.uct.ac.za>.
- Utgikar, V.P., Chaudhary, N., Koeniger, A., Tabak, H.H., Haines, J.R., Govind, R., 2004. Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Res.* 38, 3651–3658.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., Buffle, J., Cleven, R.F.M.J., Davison, W., Puy, J., Van Riemsdijk, W.H., Sig, L., 2005. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8545–8556.
- Vega, F.A., Weng, L., 2013. 2013 speciation of heavy metals in river rhine. *Water Res.* 47, 363–372.
- Wild, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L., 2006. The Effect of pH on the uptake and toxicity of copper and Zinc in a tropical Fresh water (*Chlorella sp.*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 174–185.
- Wilko, V., 2015. Chemical Equilibria in Aquatic Systems (CHEAQS Pro Software). National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands.
- World Health Organization, 2001. Environmental Health Criteria 221. Zinc (Geneva).
- Xue, H., Stumm, W., Sigg, L., 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Res.* 22, 917–926.
- Zhang, H., Davison, W., 2000. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Anal. Chem.* 72, 4447–4457.
- Zwonitzer, J.C., Pierzynski, G.M., Hettiarachchi, G.M., 2003. Effects of phosphorus additions on lead, cadmium, and zinc bioavailabilities in a metal-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 143, 193–209.