

Plan de investigación de Kevin Gabriel Rosales Segovia

1. Título provisional de la tesis

Dynamic and equilibrium metal speciation in aquatic environmental systems elucidated with emerging techniques.

2. Introducción

Los contaminantes generados por el hombre en sus diversas actividades en el transcurso del tiempo han dado lugar a repercusiones muy significativas. Hasta hace algunos años era imposible creer que estas actividades acarrearán desestabilización en el ecosistema.

Los efectos en la biota no solo dependen de las concentraciones totales del contaminante, sino también de su especiación y de las innumerables interacciones en los lugares receptores.

La distribución de un elemento químico en las diferentes formas en las que puede existir en un medio determinado se denomina especiación e incluye tanto los elementos en su forma libre (no complejada), ya sea en forma neutra o ionizada, como también los complejos que pueden formarse con diferentes ligandos (Castañé, Topalián, Cordero, & Saliabán, 2003). A partir de la especiación se espera predecir la disponibilidad del elemento en el medio de estudio.

La contaminación del agua puede deberse tanto a fuentes naturales como antropogénicas. Por ejemplo, se encuentran metales tóxicos en el agua debido a las actividades volcánicas o a la composición geológica de las rocas. Por otro lado, los usos industriales, agrícolas y urbanos son los responsables del vertido de contaminantes como metales (Zn, Cr, Pb, Cd, etc.) y nutrientes (fosfato, nitrato) o compuestos orgánicos al medio ambiente.

Sin embargo, para el caso del suelo, éste último puede actuar como compartimento receptor de metales y otros contaminantes procedentes de diversos flujos que van desde los fertilizantes a los plaguicidas, desde la escorrentía urbana a la deposición atmosférica, etc. Estos flujos están recibiendo nuevas regulaciones debido a la creciente preocupación por la acumulación de metales en los suelos. Por otro lado, los suelos pueden transferir sus contaminantes al medio ambiente (aguas dulces, mar, aire), a las plantas y, finalmente, introducirlos en la cadena alimentaria.

Los paradigmas hegemónicos de la ecotoxicología postulan que alguna fracción disponible de un contaminante específico está mejor correlacionada con su impacto que su cantidad total. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta la especiación del contaminante, es decir, cómo se distribuye la cantidad total de contaminante entre las formas químicas que tienen diferentes propiedades

fisicoquímicas y bioquímicas. En el caso del *Free Ion Activity Model*, FIAM (Anderson, Morel, & Guillard, 1978) o el *Biotic Ligand Model*, BLM (Paquin, y otros, 2002), el papel clave recae en la concentración libre del ion metal. Sin embargo, existen investigaciones que correlacionan los efectos biológicos con alguna fracción biodisponible, por ejemplo, alguna fracción lábil. Por lo tanto, se necesitan técnicas analíticas especiales para medir rutinariamente predictores fiables de biodisponibilidad y captación biológica (Campbell, Errécalde, Fortin, Hirriat-Baer, & Vigneault, 2002).

3. Descripción de los objetivos

El objetivo general de la tesis se enmarca en la necesidad de aplicar y mejorar técnicas que han sido desarrolladas como tecnologías innovadoras para su uso en el estudio, monitorización, análisis y prevención de los metales contaminantes en los sistemas acuáticos. Para ello, los objetivos específicos que se abordan en la tesis son:

- ✓ Adaptar y afinar las técnicas analíticas y los modelos de interpretación a la cuantificación de la especiación y la disponibilidad de tóxicos y nutrientes en los diferentes medios acuáticos.
- ✓ Aplicar las técnicas desarrolladas y mejoradas en esta tesis para medir fracciones relevantes de los metales en el agua del río y en el agua del mar.
- ✓ Integrar los diversos datos proporcionados por las diferentes técnicas, incluyendo la comparación entre ellas y, cuando sea posible, con datos fiables de los sistemas biológicos.

Se ha elegido como caso de estudio el tramo final del río Ebro y la costa frente al delta del Ebro. Estas regiones han sido seleccionadas debido a los aportes específicos al río Ebro como los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, el Hg de la antigua industria cloro alcalina de Flix (Tarragona), los impactos de la navegación fluvial, los altos niveles de materia orgánica disuelta, la disponibilidad de datos de especiación publicados para la última parte del río Ebro, etc. En conclusión, se espera que un conocimiento más profundo de los ciclos de los elementos puede conducir a previsiones más precisas y a decisiones políticas mejor informadas.

4. Material y métodos de estudio

Esta tesis desarrollará y aplicará fundamentalmente (pero no exclusivamente) dos técnicas complementarias: *Donnan Membrane Technique (DMT)* y *Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping (AGNES)*. También se aplicarán (en menor medida) técnicas de flujo como *Diffusion Gradients in Thin films (DGT)* y *Linear Anodic Stripping Voltammetry (LASV)*. De hecho, ninguna técnica puede pretender dar toda la información relevante en todas las matrices y para todos los analitos. Más bien, cada técnica proporciona una información complementaria que debe integrarse juiciosamente en un marco interpretativo sólido para obtener una imagen más representativa del medio analizado.

La técnica de la membrana Donnan (DMT) es un muestreador pasivo que proporciona (cuando se usa una membrana de intercambio catiónico) concentraciones libres de cationes. Dado que la separación por DMT se basa en la carga del ion (y no en ninguna propiedad química del analito) se puede aplicar simultáneamente a gran cantidad de iones, incluso de cargas distintas (Chito, y otros, 2012). Esta técnica es adecuada para la determinación de cationes relevantes para el medio ambiente, como el Al (III), el Fe (III), los elementos de tierras raras, el Co (II) o el Ni (II), cuyas concentraciones libres son difíciles o imposibles de medir con otras técnicas analíticas.

La técnica DMT se diseñó inicialmente para medir concentraciones de cationes libres y, posteriormente, se amplió para medir concentraciones de aniones libres. Su principio es el equilibrio entre el analito objetivo en la solución de la muestra (o donante) y en una solución sintética (aceptor), que están separadas entre sí por una membrana de intercambio iónico (Weng, Temminghoff, Lofts, Tipping, & Van Riemsdijk, 2002). En el caso habitual de una membrana de intercambio catiónico, se favorece la permeabilidad de los cationes, mientras que se dificulta enormemente el paso de los aniones. El conocimiento de la concentración total de equilibrio del analito en el aceptor (mediante análisis elemental, normalmente ICP-MS), junto con los cálculos de especiación teniendo en cuenta la composición del aceptor, conduce -mediante la aplicación de la relación de equilibrio de Donnan- a la determinación de la concentración de iones libres en la muestra.

La técnica DMT puede ser ejecutada mediante dos tipos de celdas: "celdas de laboratorio" y las "celdas de campo". Las "celdas de laboratorio" permiten seguir con precisión la evolución de las concentraciones con el tiempo (en el donante y en el aceptor), mientras que, las "celdas de campo" permiten realizar determinaciones *in situ* (por ejemplo, el despliegue en un río) (Chito, y otros, 2012). La DMT se ha utilizado en una gran variedad de sistemas, desde aguas dulces hasta extractos del suelo. Otra gran característica de la DMT es su capacidad de medir las concentraciones libres de un gran número de analitos al mismo tiempo.

Sin embargo, el punto débil de la DMT es el largo tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, especialmente cuando la concentración libre del analito en el donante se encuentra en niveles sub-traza. De hecho, la solución típica en estos casos ha sido añadir un complejante fuerte (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético EDTA) a la solución aceptora, pero el tiempo de equilibrio resultante suele ser prohibitivo, por lo que se requiere un método de extrapolación. Por lo tanto, un reto científico que se aborda en esta tesis es reducir drásticamente los tiempos de equilibrio para sistemas con concentraciones muy bajas de iones metálicos libres. Un segundo problema relevante en la DMT (también abordado en esta tesis) es que se han detectado contra-iones del analito (es decir, iones con la misma carga que el polímero funcional de la membrana) en el aceptor en equilibrio (especialmente durante tiempos suficientemente largos) debido, por ejemplo, al lento transporte de pares iónicos.

Las técnicas electroanalíticas siempre han tenido un papel muy relevante en la vigilancia del medio ambiente. Sus posibilidades de medición *in situ*, su bajo coste, los bajos límites de detección y la rapidez de los análisis son algunos de sus puntos fuertes. Uno de los puntos débiles es la dificultad en la interpretación de las

medidas (por ejemplo, derivada de espesores inciertos de la capa de difusión o de parámetros fisicoquímicos desconocidos en mezclas complejas). Este no es el caso de la técnica **AGNES** (*Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping*), diseñada y desarrollada en Lleida, ya que asegura una proporcionalidad directa entre la señal medida (ya sea de carga o de intensidad de corriente) y la concentración libre de analito, por lo que la interpretación es muy sencilla (Galcerán, Companys, Puy, Cecilia, & Garcés, 2004).

AGNES se ha aplicado al análisis de sistemas de interés ambiental como el agua de río, el agua de estuario, el agua marina, la solución de suelo, los extractos de raíces, las arcillas, los ácidos húmicos, etc. Recientemente, el grupo de Lleida ha demostrado que AGNES es capaz de medir concentraciones de iones libres de indio, un TCE (*Technology Critical Element*) cuya producción ha aumentado exponencialmente para satisfacer las demandas de los consumidores, como la necesidad de una película conductora transparente en las pantallas de los teléfonos móviles (Wang, Chen, & Jiao, 2009). Parte de esta gran cantidad de indio movilizada por la industria llegará, tarde o temprano, a los compartimentos ambientales. Conocer mejor el comportamiento del indio y sus compuestos será útil para comprender el transporte y el destino del indio.

Dado que AGNES es especialmente adecuado para los estudios de solubilidad, en esta tesis abordaremos la disolución de nanopartículas de In_2O_3 en diversos medios y de $\text{In}(\text{OH})_3$ en agua de mar. Concurrentemente, mejoraremos la metodología basada en el uso del electrodo de disco giratorio, RDE (ya que puede reducir drásticamente el tiempo de deposición requerido para AGNES), de modo que estará lista para ser aplicada también con otros analitos.

5. Plan de trabajo y calendario previsto

A continuación se detallan las actividades previstas a lo largo de la duración de la tesis, en la sección siguiente se incluye un cronograma o calendario donde se muestra gráficamente la planificación temporal de las mismas con una resolución trimestral. Para cada actividad, en la medida de lo posible, se indica una estimación cuantitativa aproximada de su duración y frecuencia, así como una justificación de su planificación temporal.

- a. Recopilación bibliográfica sobre el estado del arte de las técnicas de especiación, con especial énfasis en el DMT y el AGNES, y su aplicación en diversas matrices (con enfoque en aguas naturales).
- b. Aprendizaje práctico, en el laboratorio de Lleida y con soluciones sintéticas, de las variantes estándar de las técnicas AGNES y DMT.
- c. Participación en el curso de una semana "*Speciation and Bioavailability*" en la Universidad de Antwerpen (Bélgica), impartido por científicos europeos de primer nivel.
- d. Participación y asistencia del investigador en formación a diferentes congresos científicos internacionales.

- e. Prácticas (durante 2-3 meses) en un laboratorio extranjero relevante para mejorar el conocimiento del estudiante de doctorado sobre una técnica de especiación. Por ejemplo, podría estar con la Dra. Liping Weng en Wageningen (Países Bajos) para aprender el estado del arte de la DMT. Se considerarán otros laboratorios en el marco de los contactos de Lleida, teniendo en cuenta el progreso de la tesis y la disponibilidad del grupo invitado.
- f. Desarrollo de una nueva estrategia de "convergencia" para la reducción del tiempo de equilibrio en DMT.

Dado el interés medioambiental de medir las concentraciones libres *in situ*, trabajaremos casi exclusivamente con la "celda de campo" (una cámara de aceptor de 6 mL intercalada entre dos membranas de intercambio catiónico). En este montaje, se puede asumir con seguridad que la composición del donante (por ejemplo, el agua del río) no se ve afectada por el intercambio de sustancias con el sensor. Para responder al principal reto de la DMT de reducir su tiempo de equilibrio, explotaremos la conocida propiedad de que un mismo equilibrio puede alcanzarse a través de estados iniciales y vías muy diferentes. Esto significa que la concentración final del analito en el aceptor en el equilibrio es independiente de la concentración inicial del analito en el aceptor. Por lo tanto, podemos ir más allá del paradigma actual en la DMT de empezar sin ningún analito en la solución del aceptor. Esta posibilidad abre el camino para aprovechar la gran experiencia del grupo adquirida con la técnica AGNES al utilizar la llamada estrategia de "dos pulsos". Así, la propuesta de esta tesis es introducir en el aceptor cantidades adecuadas de analito y dejar que la concentración se relaje hacia el equilibrio desde posiciones mucho más cercanas a él, de modo que el tiempo para alcanzarlo se reduzca drásticamente.

- g. Mejoras en la técnica AGNES.

Una de las limitaciones de AGNES es que, cuando se utilizan electrodos HMDE estándar, los tiempos de deposición requeridos para bajas concentraciones pueden ser prohibitivos. Este es el caso de una serie de sistemas de relevancia medioambiental en los que hay que buscar concentraciones de metal libre muy bajas. Esto sucede -por ejemplo- en muchos sistemas de indio debido, tanto a la baja concentración total como a la gran extensión de las reacciones de hidrólisis (incluso a valores de pH muy ácidos). Una forma de abordar este problema (cuando no se está limitado por el volumen de la muestra) es con el uso del electrodo de disco giratorio, en el que se deposita una fina película de mercurio en la punta de un eje giratorio. Debido a la hidrodinámica mejorada, la acumulación en la película es mucho más rápida y el tiempo de deposición de AGNES puede reducirse considerablemente. En esta tesis, implementaremos y desarrollaremos este

ventajoso electrodo para abordar la solubilidad de nanopartículas de indio en nuestro laboratorio.

h. Aplicación de las técnicas mejoradas a las aguas dulces.

Las técnicas y estrategias desarrolladas anteriormente se aplicarán, como caso de estudio, a diferentes puntos seleccionados en el tramo final del río Ebro (Tarragona). Dado que otros grupos han reportado datos de especiación para algunos puntos seleccionados, podremos realizar una comparación y evaluación de tendencias. Para tener una base común, todas las técnicas se aplicarán simultáneamente al mismo medio acuático, bien mediante despliegues *in situ* (DMT) o bien mediante recogida de muestras y posterior análisis en el laboratorio (AGNES). También se comparará con resultados obtenidos con técnicas de flujo (DGT y LASV).

i. Aplicación de las técnicas mejoradas al agua de mar.

Inicialmente, se realizará una comparación multitécnica en el laboratorio con agua de mar sintética adicionada con los analitos relevantes, como Zn, Ni, etc. De este modo, las diferentes técnicas se probarán simultáneamente en las mismas muestras para combinar la información proporcionada por cada una de ellas en una descripción integrada. En particular, siempre que se disponga de datos para el mismo analito, se compararán las concentraciones de iones metálicos libres halladas por AGNES y DMT y se analizará en profundidad cualquier diferencia relevante.

Tras la validación en agua sintética, se abordarán las aguas superficiales naturales. Se realizarán muestreos en el Mar Mediterráneo, justo delante del delta del Ebro, para poder comparar los resultados del agua de mar con los del agua dulce del río Ebro. Estas actuaciones, aunque centradas sobre todo en la aplicación y comparación de técnicas, deberían aportar también información útil sobre las condiciones fisicoquímicas específicas del Mediterráneo en la costa próxima al delta del Ebro

j. Tratamiento de los resultados, interpretación.

k. Redacción de artículos (para revistas de alto factor de impacto) y del documento de tesis.

Calendario del cronograma detallado de actividades

Actividades	Primer año				Segundo año				Tercer año			
	T 1	T 2	T 3	T 4	T 1	T 2	T 3	T 4	T 1	T 2	T 3	T 4
a. Bibliografía	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
b. Aprendizaje técnico laboratorio	X	X			X	X			X	X		
c. Cursos de formación	X		X			X			X			
d. Congresos						X				X		

e. Estancia						X	X	X				
f. Desarrollo de estrategias en DMT	X	X	X	X								
g. Mejoras técnica AGNES			X	X	X	X	X	X				
h. Aplicación de técnicas agua dulce						X	X	X	X			
i. Aplicación de técnicas agua de mar									X	X	X	X
j. Interpretación y tratamiento de resultados		X		X	X		X		X	X	X	X
k. Redacción de tesis y artículos		X				X				X	X	X

6. Referencias bibliográficas

- Anderson, M., Morel, F., & Guillard, R. (1978). Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity . *Nature*, 276, 70-71.
- Campbell, P., Errécalde, O., Fortin, C., Hirriat-Baer, V., & Vigneault, B. (2002). Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model. Comparative Biochemistry and physiology. . *Toxicology and Pharmacology: CBP*, 133 (1-2), 189-206.
- Castañé, P., Topalián, M., Cordero, R., & Saliabán, A. (2003). Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante la toxicidad . *Revista de Toxicología*, 20 (1), 13-18.
- Chito, D., Weng, L., Galceran, J., Companys, E., Puy, J., Riemsdijk, W., & Leewen, H. (2012). Determination of free Zn²⁺concentration in synthetic and natural samples with AGNES (Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping) and DMT (Donnan Membrane Technique). *Science of the total environment*, 421, 238-244.
- Galcerán, J., Companys, E., Puy, J., Cecilia, J., & Garcés, J. (2004). AGNES: a new electroanalytical technique for measuring free metal ion concentration. . *Journal of Electroanalytical Chemistry* 566, 95-109.
- Paquin, P., Gorsuch, J., Apte, S., Batley, G., Bowles, K., Campbell, P., . . . Stubblefield, W. (2002). The biotic ligand model: a historical overview . *Comp. Biochem Physiol C*, 133, 3-35.
- Wang, C., Chen, D., & Jiao, X. (2009). Flower-like In₂O₃ Nanostructures Derived from Novel Precursor: Synthesis, Characterization, and Formation Mechanism. . *J. Phys. Chem. C*, 113 (18), 7714-7718.
- Weng, L., Temminghoff, J., Lofts, S., Tipping, E., & Van Riemsdijk, W. (2002). Complexation with Dissolved Organic Matter and Solubility Control of Heavy Metals in a Sandy Soil. *Environmental Science and Technology*, 36 (22), 4804-4810.

