



Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Química

*Extracción, caracterización de  
sustancias húmicas y su empleo  
en procesos fotoquímicos de  
interés ambiental.*

Pedro M. DAVID GARA

2008



Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Química

*Extracción, caracterización de  
sustancias húmicas y su empleo en  
procesos fotoquímicos de interés  
ambiental.*

Pedro M. DAVID GARA

2008

*El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Exactas ha sido desarrollado en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, bajo la dirección del Dr. Daniel O. Mártire y la Dra. Mónica C. Gonzalez.*

*A mis padres*

*A Jani*

*A Guille y Maxi*

Deseo agradecer a todas las personas que de una forma u otra hicieron posible la realización de este trabajo de tesis:

A mis directores, Mónica y Daniel, quienes hicieron posible esta tesis brindándome todo su conocimiento y apoyo científico y su amistad.

A Jani, por su amor y comprensión, y por su constante ayuda en todo este trabajo de tesis.

A mi familia y mi familia política por todo el apoyo que me brindaron, especialmente a mis padres.

A Gaby, M. Laura, Pau, Vale y Vero por el esfuerzo y la dedicación en la realización de los experimentos que realizamos en conjunto con cada una.

A mis compañeros del grupo LEAR: Janina, Laura, Paula, Verónica, María Laura, Gabriela, Valeria, Marcela, Andrea y Manuel, por su apoyo y dedicación, y por el empuje.

A la gente del primer piso del INIFTA: Gustavo (el Chino), Sebastián, Paula B., Paula J., Larisa, Eugenia, Norma, Lucho, Daniela, Laura D., Gabriela P., Andrés, Carolina, Ezequiel, Alberto, Adela, Carlos y Mario, por los momentos compartidos.

Al personal técnico del INIFTA, que facilitó el desarrollo de esta tesis.

A los Dres. Patricia Allegretti, Mercedes Schiavoni y Jorge Forlong del LADECOR (Dpto. de Química, U.N.L.P.) por su colaboración en la determinación de productos orgánicos de reacción por CG-MS y HPLC-MS.

A la Dra María Teresa Del Panno del CINDEFI (Dpto. de Química, U.N.L.P.), por su colaboración en los ensayos microbiológicos.

A la Dra Sonia Ulic del CEQUINOR (Dpto. de Química, U.N.L.P.), por su ayuda en la medición los espectros de FTIR, y por prestarnos el equipo.

A la Dra. Daniela Hozbor del IBBM (Dpto de Cs Biológicas, U.N.L.P.), por el NBT para la detección de quinonas.

Al Dr. Pedro Balatti del INFIVE (U.N.L.P.), por permitirme utilizar la ultracentrífuga.

Al Prof. Claudio Borsarelli y a Ricardo Mignone del Dpto. Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, U. N. de Santiago del Estero, por las muestras de ácido húmico Aldrich purificado.

Al Dr. Reinaldo Giudici y su grupo de trabajo del Laboratorio de Simulacao e Controle de Processos del Departamento de Engenharia Quimica de la Escola Politecnica da Universidade de Sao Paulo (Brasil), por su colaboración en los experimentos de degradación de clomazone realizados allí.

A los Dres Peter Ogilby y Lars Poulsen, de la Aarhus Universitet (Dinamarca), por la realización de los ensayos de rendimiento cuántico de oxígeno singlete y la observación microscópica de micelas de ácidos húmicos.

A los Dres María del Carmen Michelini y Nino Russo, del Dipartimento di Chimica, Università della Calabria (Italia), por la colaboración en los cálculos teóricos de la reacción con el radical sulfato.

Al Dr Andre Braun del Engler Bunte Institut, Universität Karlsruhe Lehrstuhl Umweltmesstechnik Karlsruhe (Alemania), por los equipos utilizados en los ensayos de degradación de ATCA con radicales inorgánicos.

Al Dr. Renato Zanella del Grupo de Pesquisas em Análises Cromatográficas, Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas de la Universidade Federal de Santa Maria (Brasil), por el envío de su manuscrito: *Study of the degradation of the herbicide clomazone in distilled and in irrigated rice field waters using HPLC-DAD and GC-MS,*

aceptado para su publicación en el Journal of the Brazilian Chemical Society

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP y las del INIFTA, por haber accedido a la realización de mis actividades científicas en sus instalaciones.

A la UNLP, la Fundación YPF y a CAPES, por la financiación recibida durante la realización de este trabajo.

Indice

## **Capítulo I            Introducción.**

<b>I-1</b>	<b>Humus, materia orgánica y sustancias húmicas.</b>	<b>1</b>
<b>I-2</b>	<b>Fotosensibilización y estados excitados.</b>	<b>11</b>
<b>I-3</b>	<b>Métodos oxidativos de degradación de contaminantes.</b>	<b>14</b>
<b>I-4</b>	<b>Fotodegradación de las sustancias húmicas.</b>	<b>16</b>
<b>I-5</b>	<b>Plaguicidas y su dinámica en el medio ambiente.</b>	<b>17</b>
<b>I-6</b>	<b>Objetivos.</b>	<b>21</b>

## **Capítulo II            Métodos y equipos utilizados.**

<b>II-1</b>	<b>Reactivos y preparación de soluciones.</b>	<b>22</b>
<b>II-2</b>	<b>Flash fotólisis convencional y láser.</b>	<b>25</b>
<b>II-3</b>	<b>Fotólisis continua.</b>	<b>28</b>
<b>II-4</b>	<b>Determinación de la concentración en estado estacionario de <math>O_2(^1\Delta_g)</math> y <math>HO\cdot</math></b>	<b>32</b>
<b>II-5</b>	<b>Análisis de productos de reacción</b>	<b>32</b>
<b>II-6</b>	<b>Determinación de carbono total.</b>	<b>34</b>
<b>II-7</b>	<b>Espectros infrarrojos con transformada de Fourier.</b>	<b>34</b>
<b>II-8</b>	<b>Matrices de excitación – emisión de fluorescencia.</b>	<b>35</b>
<b>II-9</b>	<b>Imágenes de pseudomicelas de las sustancias húmicas</b>	<b>36</b>
<b>II-10</b>	<b>Análisis computacional.</b>	<b>37</b>
<b>II-11</b>	<b>Determinación de la constante de velocidad de desactivación de oxígeno singulete.</b>	<b>38</b>
<b>II-12</b>	<b>Determinación del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete por sustancias húmicas.</b>	<b>41</b>
<b>II-13</b>	<b>Ensayos microbiológicos.</b>	<b>42</b>

## **Resultados.**

<b>Capítulo III</b>	<b>Extracción y caracterización de sustancias húmicas.</b>	<b>44</b>
<b>Capítulo IV</b>	<b>Reactividad de las sustancias húmicas con radicales oxidantes.</b>	<b>64</b>
	<b>a.- Radical anión sulfato.</b>	<b>64</b>
	<b>b.- Estudio de la reacción de <math>\text{SO}_4^{\bullet-}</math> con ácido gálico como modelo de las sustancias húmicas.</b>	<b>78</b>
	<b>c.- Radicales <math>\text{Cl}^\bullet</math> y <math>\text{Cl}_2^{\bullet-}</math></b>	<b>89</b>
<b>Capítulo V</b>	<b>Degradación fotoinducida de contaminantes</b>	<b>96</b>
	<b>a.- Clomazone</b>	<b>96</b>
	<b>b.- Ácido tricloroacético</b>	<b>110</b>
<b>Capítulo VI</b>	<b>Fotodegradación de sustancias húmicas.</b>	<b>124</b>
	<b>a.- Experimentos fotoquímicos.</b>	<b>124</b>
	<b>b.- Experimentos microbiológicos</b>	<b>129</b>
<b>Capítulo VII</b>	<b>Conclusiones generales.</b>	<b>136</b>
	<b>Referencias.</b>	<b>140</b>

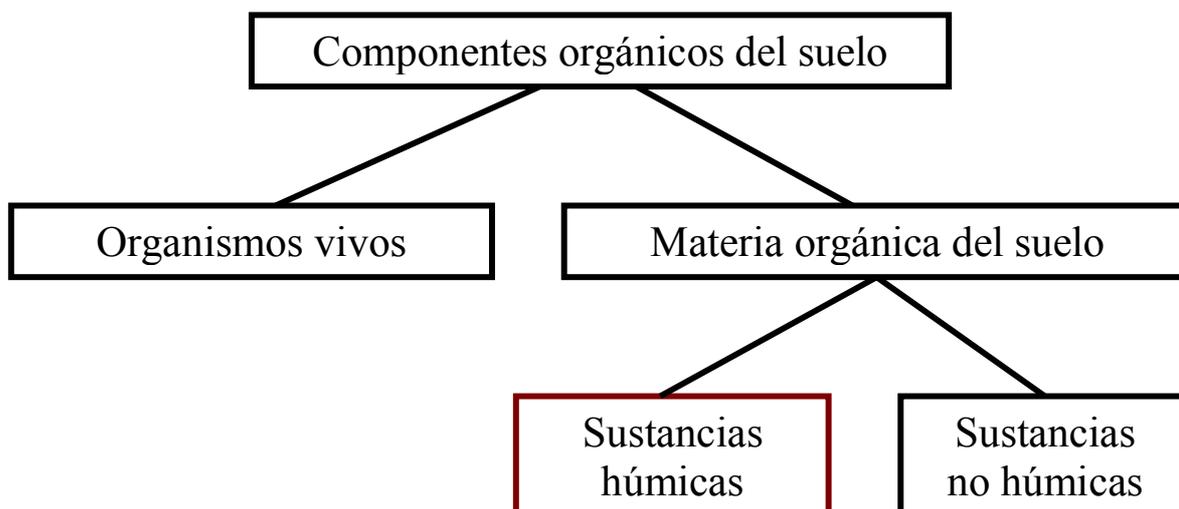
# Capítulo I

## Introducción

### **I-1.- Humus, materia orgánica y sustancias húmicas.**

El suelo es un sistema complejo de muchos componentes (organismos vivos, material orgánico e inorgánico) que interactúan entre sí, y sus propiedades son el resultado de dicha interacción. La materia orgánica del suelo (MOS) es una mezcla heterogénea que incluye tejidos de origen animal y vegetal, sus productos de descomposición parcial resultantes de las transformaciones microbiológicas y químicas del proceso de humificación, material orgánico de alto peso molecular (como por ejemplo polisacáridos y proteínas) y sustancias simples (como aminoácidos, lípidos y monosacáridos).

Suele clasificarse a la materia orgánica del suelo en sustancias húmicas (SH) y sustancias no-húmicas. Estas últimas incluyen todas las sustancias clasificables (carbohidratos, lípidos, péptidos y aminoácidos, etc.), mientras que las sustancias húmicas incluyen el resto del material orgánico. La distribución de la materia orgánica del suelo se muestra en el siguiente esquema:



**Figura 1.1:** Clasificación de los componentes orgánicos del suelo.

Las SH son un conjunto de sustancias coloreadas de alto peso molecular formadas por procesos bioquímicos a partir de residuos de origen animal o vegetal, bastante resistentes a la degradación microbiológica o química (por lo que también se denominan materia orgánica refractaria). El término SH suele utilizarse como nombre genérico para describir al material coloreado del suelo o a las fracciones que se obtienen en base a sus características de solubilidad: ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas. Las SH están compuestas por aproximadamente 50 % de C, entre un 35-45% de O, 5% de H, 3% de N y S [Thurman, 1985; MacCarthy, 2001]. Los principales grupos funcionales presentes incluyen grupos ácidos carboxílicos y OH fenólicos.

Se han empleado numerosos métodos para la caracterización de las SH. El principal problema en la caracterización de su funcionalidad es que la macromolécula debe fraccionarse en unidades más pequeñas. Estas técnicas son generalmente dificultosas y consumen mucho tiempo de análisis, y además alteran la estructura y algunas funciones de las SH, como por ejemplo la adsorción de contaminantes. Por ello, se han utilizado técnicas espectroscópicas para el estudio de su estructura y funcionalidad, las que son más simples y no destructivas [Chin y col., 1994; Hautala y col., 2000; Chen y col., 2002].

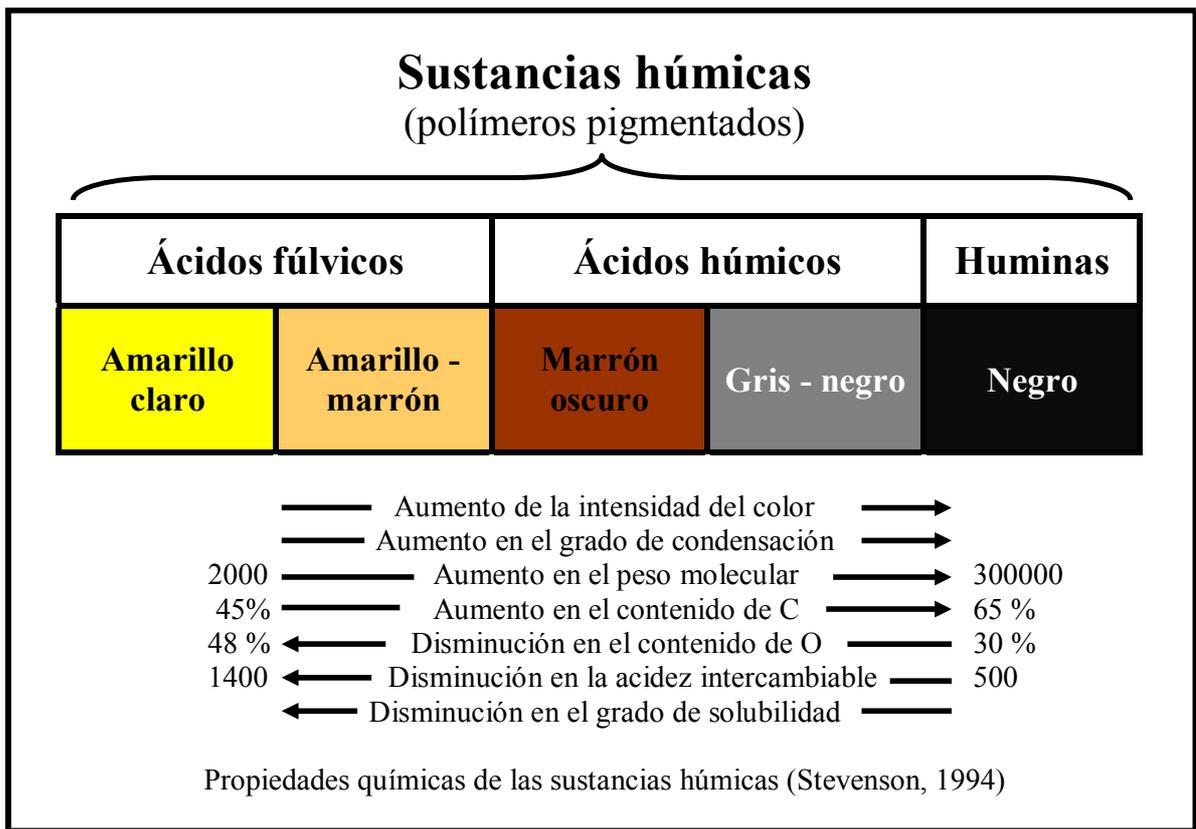
La MOS y la materia orgánica disuelta (MOD) se encuentran en equilibrio dinámico. La MOD presente en las aguas naturales varía según la ubicación, la geoquímica del lugar, la época del año, el tipo de agua, etc. El contenido de carbono orgánico disuelto (COD) en aguas subterráneas y marinas es del mismo orden, siendo los valores medios de 0.7 y 1 mg/L, respectivamente [Thurman, 1985]. Se han observado valores de COD de hasta 15 mg/L en aguas submarinas, mientras que en aguas marinas el intervalo es más acotado, generalmente de 0.3 - 2.0 mg/L. En aguas de lagos y ríos las variaciones en el COD son mucho mayores, pero generalmente las concentraciones están por debajo de los 10 mg/L [Thurman, 1985]. En los ambientes acuáticos, la masa de COD es mayor que la masa de organismos [Thomas, 1997].

La MOD de aguas naturales de la región boreal consiste principalmente de SH, llegando a valores del 90 % de la MOD, mientras que el promedio global es de cerca del 50 % [Thurman, 1985; Kronberg, 1999].

Uno de los inconvenientes en el estudio de estas sustancias es la falta de definiciones precisas en algunos términos, y su utilización como sinónimos. Por ejemplo, se ha empleado el término humus para designar a la MOS, es decir a todo el material orgánico presente en el suelo incluyendo las SH. Sin embargo, en la actualidad es utilizado para representar solamente a las SH.

### *Propiedades de las sustancias húmicas*

Las SH son un conjunto de polímeros de alto peso molecular relacionadas entre sí, y sus diferentes propiedades pueden explicarse por las variaciones en el peso molecular, el tipo y número de grupos funcionales (carboxilo, fenol, etc.) y el grado de condensación. En la Figura 1.2 se muestran las relaciones que existen entre las tres fracciones que la componen. En ella puede verse que el contenido de C y O, la acidez y el grado de condensación cambian sistemáticamente con el peso molecular.



**Figura 1.2:** Propiedades fisicoquímicas de las SH.

**Ácidos Húmicos:** fracción de las SH que no es soluble en soluciones acuosas ácidas ( $\text{pH} < 2$ ) pero sí es soluble a valores mayores de  $\text{pH}$ . Puede extraérselas del suelo con diferentes reactivos. Son la mayor fracción extraíble de las SH del suelo. Presentan una coloración entre marrón oscuro y negro.

**Ácidos Fúlvicos:** fracción de las SH que es soluble en soluciones acuosas a cualquier valor de  $\text{pH}$ . Se las separa de los AH por acidificación, y los AF permanecen en solución. Son de color amarillo-amarronado.

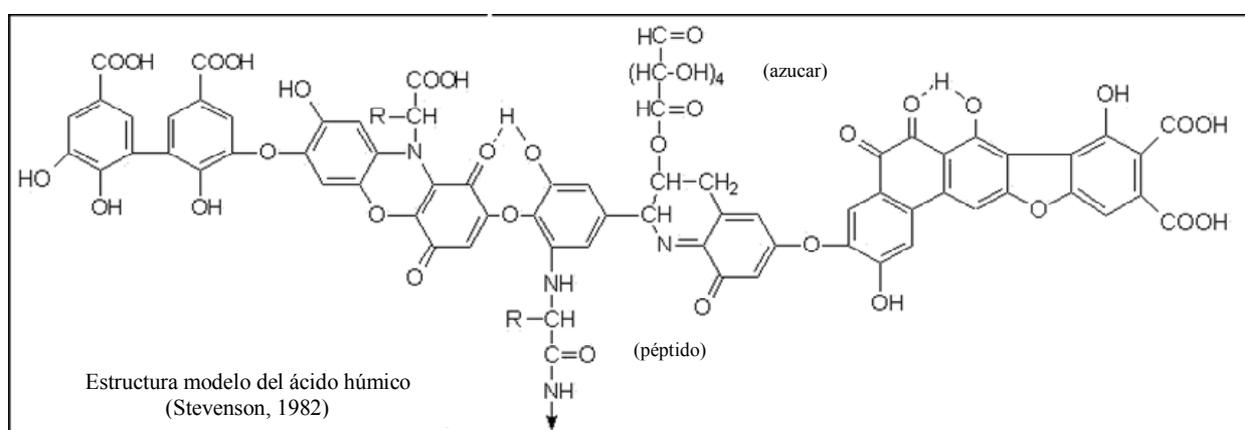
**Huminas:** fracción de SH insoluble en agua a cualquier valor de  $\text{pH}$ . Son de color negro.

Los AF son de menor peso molecular, contienen mayor proporción de O y menor proporción de C que los AH [Thurman, 1985; Karanfil y col., 1996]. Los AF contienen además más grupos funcionales ácidos, principalmente grupos carboxílico (COOH). La acidez total de los AF (900 - 1400 meq/100g) es considerablemente mayor que la de los AH (400 - 870 meq/100g).

Otra diferencia importante es que el oxígeno en los AF se encuentra asociado principalmente a grupos funcionales conocidos (COOH, OH, C=O), mientras que en los AH está en una alta proporción como componente estructural. Los AF son más abundantes que los AH en aguas naturales. Por ejemplo en América del Norte las proporciones de AF y AH respecto al total del COD son 54 - 68% y 13 - 29%, respectivamente [Ma y col., 2001].

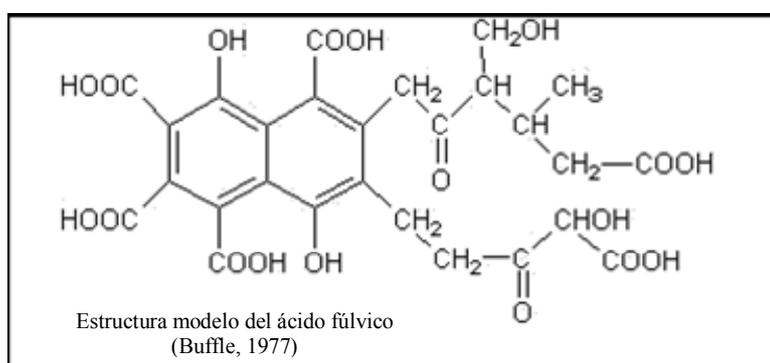
Observaciones de AH extraídos de diferentes suelos realizadas al microscopio electrónico [Drozd, 1978] muestran que éstas poseen estructura polimérica, en forma de anillos, cadenas, y clusters. El proceso de humificación es el principal responsable de la estructura espacial de las SH en la nanoescala y de su tamaño, que se encuentra en el intervalo de 60 a 500 Å. Como ya fue mencionado, las SH consisten de una mezcla heterogénea de compuestos que no pueden englobarse en una fórmula estructural sencilla.

Se postuló para los AH una estructura macromolecular aromática compleja con aminoácidos, azúcares, péptidos y compuestos alifáticos que participan en la unión entre grupos aromáticos. La estructura, que se muestra en la Figura 1.3, contiene grupos OH fenólicos, estructuras quinónicas, N y O como puentes y grupos COOH aromáticos.



**Figura 1.3:** Estructura modelo del AH.

La estructura modelo del AF (modelo de Buffle) contiene estructuras aromáticas y alifáticas, ambas muy sustituidas con grupos funcionales oxigenados, como se ve en la Figura 1.4.



**Figura 1.4:** Estructura modelo del AF.

La composición elemental de las diferentes fracciones de las SH se muestran en la Tabla 1.1 [Kononova, 1966].

Tabla 1.1: Composición elemental de las SH.

Sustancias	% (en base a material seco y sin cenizas)			
	C	H	O	N
Acidos Húmicos	52 - 62	3,0 - 5,5	30 - 35	3,5 - 5,0
Acidos Fúlvicos	44 - 49	3,5 - 5,0	44 - 49	2,0 - 4,0
Huminas	54 - 65	3.2 - 7.6	28 - 32	2.0 - 4.2

### Estructura macromolecular de las SH.

A pesar de la heterogeneidad de las SH, se han encontrado muchas similitudes entre muestras de distintos orígenes. Por ejemplo, la composición elemental de los AH y AF de varios orígenes son similares, a pesar de que las funcionalidades puedan variar mucho entre ellas [MacCarthy, 2001]. La estructura macromolecular secundaria de las SH es muy importante en la sorción y asociación con compuestos orgánicos. Se postuló que la estructura secundaria de las SH contiene dominios pseudomiscelares del tipo de jaulas, de naturaleza hidrofóbica con alto contenido de grupos aromáticos [Wershaw, 1986; Engebretson y von Wandruszka, 1994]. Las pseudomicelas se consideran similares a las micelas verdaderas, pero más grandes y sueltas, con un núcleo hidrofóbico y estructuras hidrofílicas en la superficie. Además, se supone que las pseudomicelas son las responsables de la asociación con los productos químicos orgánicos hidrofóbicos.

La estructura secundaria de las SH se ha demostrado que varía con las condiciones fisicoquímicas del agua en que se encuentran [Ghosh y Schnitzer, 1980; Aho y Lehto, 1984; Tsutsuki y Kuwatsuka, 1984; Engebretson y von Wandruszka, 1994; Ephraim y col., 1995]. En condiciones de baja fuerza iónica, alto pH y baja concentración de MOD, las SH son moléculas extendidas, lineales, flexibles y de alto peso molecular. Mientras que en condiciones de alta fuerza iónica, bajo pH y alta concentración de MOD, las SH son esferas globulares compactas. Además, con el aumento de fuerza iónica, el radio de los coloides disminuye [Warwick y col., 2001]. Las variaciones de tamaño y forma de las SH causadas por los cambios en las propiedades fisicoquímicas de la solución también se han visualizado espectromicroscópicamente [Myneni y col., 1999].

En condiciones alcalinas, los grupos funcionales principales (-COOH, -OH) se encuentran disociados y la repulsión entre las cargas negativas dificulta la formación de los dominios hidrofóbicos [Engebretson y col., 1996]. Cuando la solución se acidifica, se neutralizan las cargas negativas, se forman los dominios hidrofóbicos. Por lo tanto, la adsorción de productos químicos orgánicos a las SH es mayor a bajo pH [Kukkonen, 1991b; Schlautman y Morgan, 1993].

Estudios previos también han demostrado que los efectos de la fuerza iónica dependen de los iones usados para ajustarla y de las propiedades de la MOD. Un aumento en la concentración de NaCl aumenta la asociación con sustancias orgánicas, probablemente debido al efecto de la salinidad de la solución [Gauthier y col., 1986; Jota y Hassett, 1991]. Sin embargo, Schlautman y Morgan [Schlautman y Morgan, 1993] demostraron que la adsorción de hidrocarburos aromáticos policíclicos a SH disminuía con el aumento de la concentración de NaCl, en ensayos a pH fijos entre 4 y 10. Otros estudios también han demostrado la disminución de la asociación por el incremento de la fuerza iónica [Gauthier y col., 1986; Murphy y col., 1994; Jones y Tiller, 1999]. Esta disminución se relaciona con los cambios estructurales que ocurren con el aumento de fuerza iónica, tales como la formación de esferas compactas de SH con el aumento de la concentración de iones en la solución. La formación de esferas compactas obstaculiza el acceso de compuestos orgánicos a los dominios hidrofóbicos e incluso impide la formación de estos dominios.

La adición de iones metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  a la solución, disminuye las fuerzas repulsivas entre los grupos funcionales disociados, expandiendo los dominios hidrofóbicos y aumentando de la adsorción de compuestos orgánicos [Schlautman y Morgan, 1993; Engebretson y col., 1996]. Sin embargo, bajo condiciones ácidas ( $\text{pH} < 4$ ) el efecto de los iones metálicos es despreciable, puesto que los grupos se encuentran sin disociar.

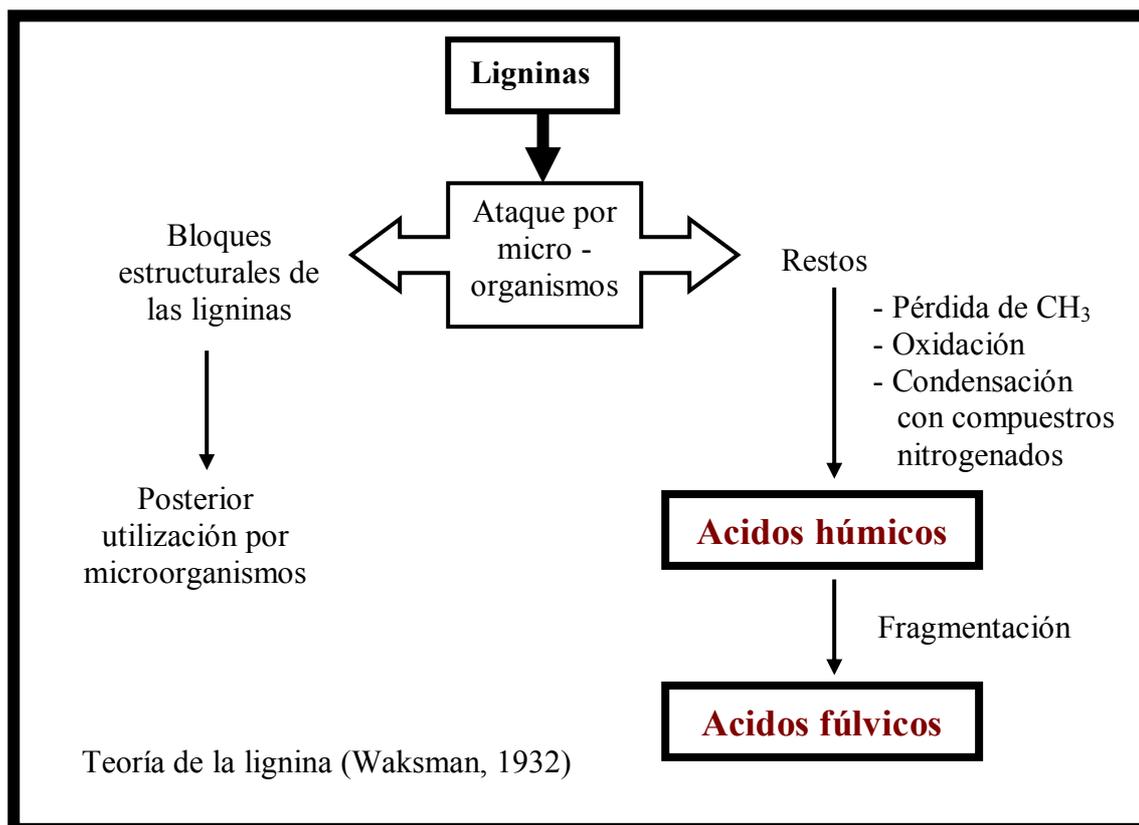
El aumento de la temperatura genera un enrollamiento intramolecular de las SH, que resulta en estructuras pseudomicelares más rígidas [Engebretson y von Wandruszka, 1994]. Se ha demostrado que para la mayoría de los compuestos orgánicos las constantes de asociación a las SH aumentan al disminuir la temperatura [ten Hulscher y Cornelissen, 1996; Lüers y ten Hulscher, 1996], sin embargo su efecto no es muy marcado [Jota y Hassett, 1991]. Los compuestos orgánicos pueden interactuar con las SH de varias maneras, incluyendo intercambio iónico, puentes de hidrógeno, transferencia de carga, unión covalente o la adsorción hidrofóbica y el reparto, dependiendo del tipo de producto químico [Senesi y Chen, 1989; Piccolo, 1994].

### *Formación de las sustancias húmicas.*

Se postularon diferentes teorías para la formación de las SH durante la descomposición de restos de origen animal o vegetal. La teoría clásica postulada por Waksman, sostiene que las SH provienen de la modificación de ligninas. En la actualidad la mayoría de los investigadores apoya los mecanismos que involucran a las quinonas. En la naturaleza deben considerarse los cuatro mecanismos, incluyendo la vía de condensación de azúcares y aminas, como igualmente probables para la síntesis de ácidos húmicos y fúlvicos. Las cuatro vías pueden ocurrir en cualquier tipo de suelo, pero según las condiciones ambientales prevalecerá alguna de ellas sobre el resto. En suelos

poco drenados y en sedimentos húmedos predomina la vía de las ligninas, mientras que en suelos forestados es más importante la vía de los polifenoles.

**Teoría de la lignina:** por muchos años se pensó que las SH se originaban a partir de la descomposición de la lignina. De acuerdo a esta teoría, la lignina es utilizada en forma incompleta por los microorganismos del suelo, y el residuo pasa a formar parte del humus. Entre las modificaciones sufridas en la lignina se incluyen la pérdida de grupos metoxi (OCH<sub>3</sub>) para generar OH fenólicos, y la oxidación de cadenas alifáticas para formar grupos carboxilo (COOH). Este material modificado sufre posteriormente otros cambios para generar primero AH y luego AF. Waksman describe esta teoría, la que se resume en la Figura 1.5, y cita como evidencia para corroborarla que tanto las ligninas como los AH son difícilmente degradados por la mayoría de las bacterias y los hongos, que ambos son parcialmente solubles en alcohol y piridina, precipitan en medio ácido y son solubles en medio alcalino, que ambos presentan grupos metoxi, que ambos son ácidos en medios naturales, que cuando se calientan ligninas en medio alcalino se transforman en AH metoxilados, y que los AH poseen propiedades similares a las ligninas oxidadas.



**Figura 1.5:** Teoría de la lignina.

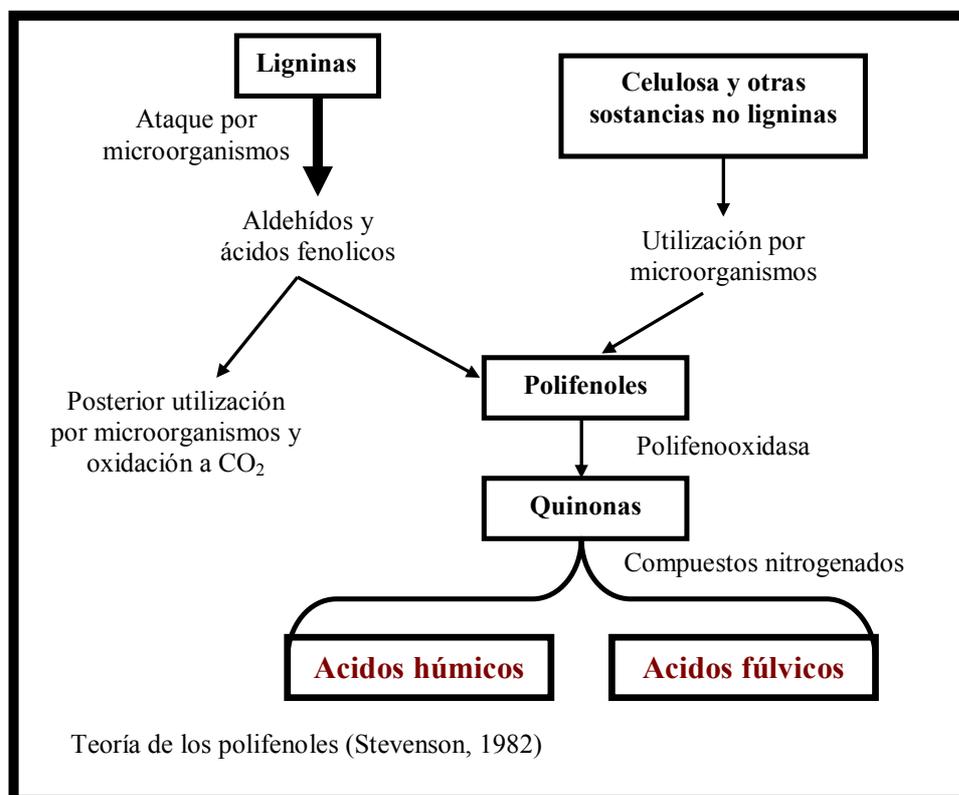
**Teoría del polifenol:** Esta teoría incluye dos mecanismos cuya diferencia es el origen de los polifenoles. En uno de los mecanismos, los aldehídos y ácidos fenólicos, que se generan

durante la degradación de ligninas por los microorganismos del suelo, producen quinonas por reacciones enzimáticas, las que se polimerizan para formar macromoléculas del tipo de las SH.

El otro mecanismo es similar, excepto que los compuestos polifenólicos son sintetizados por microorganismos a partir de sustratos distintos de la lignina (por ejemplo celulosa). Los polifenoles son luego oxidados enzimáticamente a quinonas y posteriormente convertidas en SH. De acuerdo a estos conceptos, las quinonas provenientes de la lignina y las sintetizadas por los microorganismos son los bloques principales a partir de los cuales se forman las SH. La formación de compuestos de color oscuro a partir de reacciones en las que participan quinonas ya fue observado en la formación de melanina.

El rol de los microorganismos en la formación de polifenoles fue enfatizado por Kononova, quien propone que las SH son formadas por mixobacterias que degradan celulosa antes que por descomposición de ligninas. Las etapas que postula Kononova (Figura 1.6) para la formación de las SH son:

- Primero la degradación total por los hongos del suelo de carbohidratos simples, y parcial de proteínas y celulosa de la médula radicular y el cortex de restos de plantas.
- Luego la celulosa del xilema es degradada por mixobacterias aeróbicas. Los polifenoles sintetizados por estas bacterias son oxidados posteriormente a quinonas por la enzima polifenoloxidasas, y por último las quinonas reaccionan con compuestos nitrogenados para formar SH.



**Figura 1.6:** Teoría de los polifenoles.

***Condensación de azúcares y aminos:*** de acuerdo a esta teoría, los azúcares y aminoácidos generados en el metabolismo microbiano, son condensados por una vía no enzimática para generar polímeros pardos del tipo de los formados durante la deshidratación de ciertos productos alimenticios a temperaturas moderadas. La principal objeción a esta teoría es que a temperatura ambiente las reacciones de condensación son muy lentas. Sin embargo, los cambios climáticos y la presencia de ciertos minerales pueden catalizarlas.

La reacción de condensación inicial entre grupos aldehído de los azúcares y las aminos genera glicosilaminas N-sustituidas, las que posteriormente reaccionan para dar 1-amino-desoxi-2-cetosa N-sustituidas, aldehidos y cetonas de 3 carbonos (acetol, diacetilo, etc.), hydroximetil furfurales y enediones o reductonas. Todos estos compuestos son muy reactivos y polimerizan rápidamente en presencia de aminos para generar productos pardos.

### *Funciones de la materia orgánica.*

La materia orgánica contribuye al desarrollo de las plantas por sus efectos en las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo. Tiene funciones:

*Nutricionales:* Es una fuente de N, P y S para el desarrollo de las planta, a través de su mineralización por los microorganismos del suelo. Además afecta el suministro de nutrientes de otras fuentes (por ejemplo, la MOS es una fuente de energía para las bacterias fijadoras de N).

*Biológicas:* La MOS es una fuente de C y energía para los microorganismos y animales. El número de bacterias, hongos y actinomicetes está fuertemente relacionado con el contenido de humus del suelo. Por otro lado, las cantidades de lombrices y otros animales están relacionadas con la cantidad de restos vegetales presentes en el suelo. Algunas sustancias orgánicas del suelo tienen efectos fisiológicos directos en el crecimiento vegetal. Por ejemplo, algunos polifenoles poseen propiedades fitotóxicas. Mientras que otros compuestos, como las auxinas promueven el desarrollo de plantas. Algunos compuestos biológicamente activos, como los antibióticos y ciertos ácidos polifenólicos, promueven la habilidad de algunas plantas de resistir el ataque de microorganismos fitopatógenos. Por otro lado, su incidencia está influenciada por la MOS, prevaleciendo el desarrollo de los microorganismos saprófitos respecto de los patógenos en suelos con alto contenido de MO.

*Físicas y fisico-químicas:* Promueve la estructura del suelo, mejorando su aireación, la retención de agua y su capacidad buffer y de intercambio de iones. La adición de residuos orgánicos fácilmente degradables permite la síntesis de compuestos orgánicos complejos a los que se unen partículas del suelo formando agregados, los que ayudan a mantener la porosidad y la granulosis del suelo. Esto facilita la percolación del agua y el suministro continuo de oxígeno

necesario para el desarrollo de las plantas. Además, las SH aumentan la resistencia del suelo a la erosión. Del total de la capacidad de intercambio catiónico, entre el 20 y el 70 % corresponde a las SH coloidales. La MOD, y especialmente las SH, contribuyen significativamente a la acidez de las aguas naturales. Los ácidos orgánicos de la MOD son los principales responsables del bajo pH de los lagos finlandeses, mientras que en Norteamérica la causa es la lluvia ácida y las actividades antropogénicas [Kortelainen, 1999]. La acidez total de las fracciones de humus aisladas de suelo se encuentra en el intervalo de 300 a 1400 meq/100 g. Las SH exhiben una amplia capacidad buffer, en un amplio intervalo de pH.

*Rol Ecológico.* La MOD atenúa la luz visible y ultravioleta (UV) en aguas naturales [Jones y Arvola, 1984; Huovinen y col., 2000]. La absorción de la luz por SH aumenta a medida que disminuye la longitud de onda [Scully y Lean, 1994], y es más importante en la región UV de alta energía donde sus efectos son más peligrosos. La atenuación de la luz disminuye el desarrollo de organismos autótrofos. Además, durante los procesos fotoquímicos de degradación de la MOD se generan especies reactivas dañinas [Frimmel, 1994]. La degradación fotoquímica de la MOD consume oxígeno, y por lo tanto la luz solar disminuye la oxigenación de las aguas naturales con alto contenido de MOD [Lindell y Rai, 1994]. Sin embargo, la mayor parte de la energía de la luz solar es transformada en calor [Münster y col., 1999]. Como la luz puede penetrar sólo las capas superficiales de los lagos de aguas con alto contenido de MOD, se calienta la capa superficial y se genera una estratificación térmica del agua. Esto disminuye el transporte de oxígeno hacia las capas más profundas, generando una deficiencia de oxígeno cerca del fondo [Eloranta, 1999].

Las bacterias pueden utilizar algunas fracciones de la MOD como fuente de energía [Thomas, 1997], las que se denominan en general materia orgánica (o carbono orgánico) asimilable. Mientras que el color de las aguas superficiales está relacionado con las fracciones de la MOD de mayor peso molecular (>10000 Daltons), la materia orgánica asimilable se relaciona con la de menor tamaño (<1000 Daltons) [Hem y Efraimsen, 2001].

La MOD no es fácilmente removible del agua, y durante el proceso de desinfección y potabilización del agua se generan compuestos tóxicos clorados [Kronberg y Christman, 1989; Matsuda y col., 1992]. Además, durante esta desinfección, la MOD se rompe en unidades más pequeñas, las que son mejores fuentes de energía para los microorganismos [Miettinen y col., 1996]. Sin embargo, en las regiones boreales donde el contenido de MOD del agua potable es mayor, el desarrollo de los microorganismos está limitado por la baja concentración de nutrientes inorgánicos [Miettinen y col., 1996].

La asociación con la MOD afecta la distribución medioambiental de distintos contaminantes. Distintos procesos como el transporte, la solubilidad, la degradación, la

volatilización y la biodisponibilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos, están controlados por la presencia de MOD [Piccolo, 1994].

## ***I-2.- Fotosensibilización y estados excitados. Importancia de estos procesos en aguas naturales.***

El estado energético fundamental de cualquier molécula corresponde a su configuración o distribución electrónica de menor energía. Los estados electrónicamente excitados de las moléculas se forman cuando éstas absorben energía, normalmente en forma de luz. En ellos, las moléculas tienen configuraciones electrónicas diferentes y más energéticas que la del estado fundamental. [Turro, 1991; Braun y col., 1991]. Los estados excitados presentan configuraciones electrónicas que tienen una duración limitada, por lo que tienden a regresar al estado fundamental pasado un corto lapso de tiempo. Este periodo puede tener una duración comprendida entre los milisegundos ( $10^{-3}$  s) y los picosegundos ( $10^{-12}$  s), y está caracterizado por el tiempo de vida ( $\tau$ ), que es el tiempo requerido para que el número de moléculas excitadas caiga a una fracción ( $1/e$ ) de su valor original. El tiempo de vida es característico de cada estado excitado y del medio que circunda a las moléculas.

Una molécula presenta un estado energético de carácter singlete cuando sus dos electrones más externos se encuentran apareados, es decir, cuando tienen números cuánticos de espín opuestos o antiparalelos. Por otro lado, una molécula presenta un estado energético de carácter triplete cuando sus dos electrones más externos se encuentran desapareados o paralelos, esto es, cuando tienen números cuánticos de espín iguales. Típicamente, el estado fundamental de la mayoría de las moléculas orgánicas suele tener carácter singlete ( $S_0$ ), mientras que los estados excitados de cualquier molécula pueden tener carácter singlete ( $S_1$ ) o triplete ( $T_1$ ). Un estado excitado singlete es de mayor energía que su correspondiente estado excitado triplete debido a la energía de apareamiento electrónico necesaria para que los dos electrones más externos tengan espines antiparalelos.

Normalmente, toda molécula que absorbe un fotón de luz de longitud de onda adecuada puede alcanzar alguno de sus estados excitados. Sin embargo, las reglas de la mecánica cuántica establecen que, en ciertos casos, la probabilidad de absorción de un fotón para producir la excitación es muy baja, incluso nula. En estos casos, para poblar el estado excitado es necesario acudir al proceso de transferencia de energía.

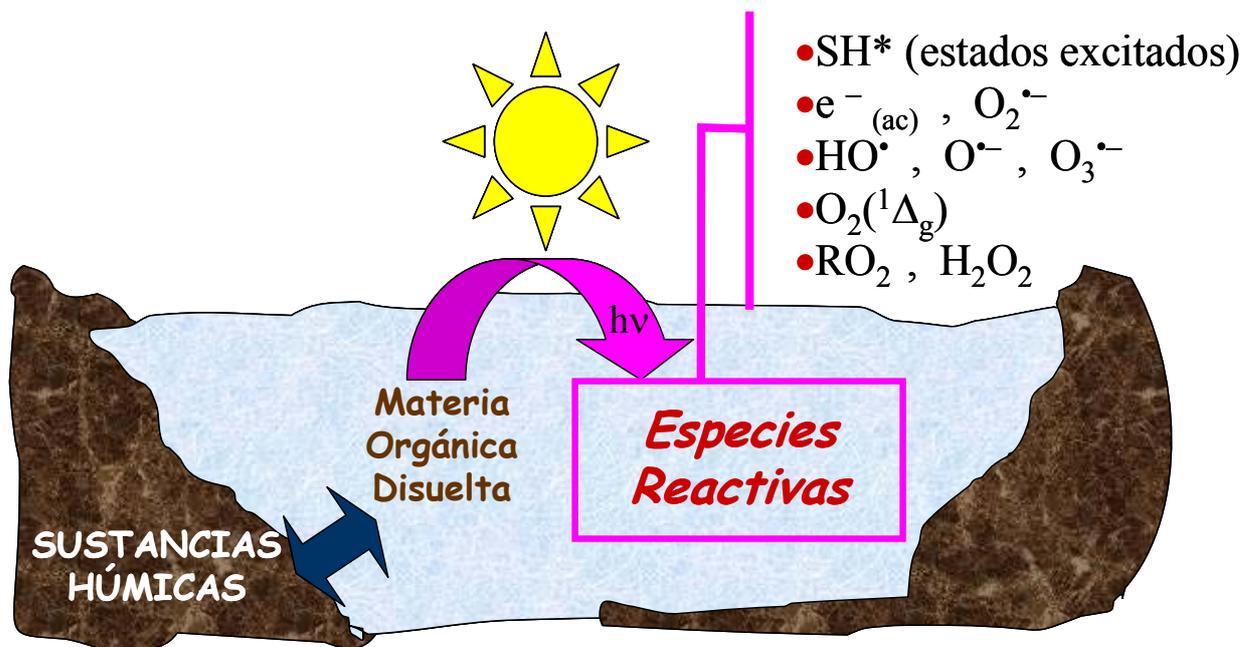
La fotosensibilización supone la generación, mediante absorción de luz, del estado excitado de una molécula, llamada fotosensibilizador, de manera que éste, durante el tiempo de vida de su estado excitado, es capaz de ceder o transferir su exceso de energía a otra molécula

presente en el medio circundante, obteniéndose un estado excitado de la misma. La nueva molécula excitada, durante su tiempo de vida, puede reaccionar con otras especies químicas existentes en el medio, dando lugar a productos de reacción o, en caso de que no lo haga, terminará regresando a su correspondiente estado fundamental tras la liberación de su exceso de energía al medio circundante. El uso de la fotosensibilización para la producción de especies reactivas mediante energía solar permite el desarrollo de nuevas tecnologías fotoquímicas limpias y basadas en energías renovables, aplicables a la desinfección de aguas.

Los procesos fotoquímicos que ocurren en aguas superficiales inducidos por la luz solar afectan la química redox de estas aguas [Zerp, 1980], y la de los contaminantes que se encuentran disueltos en ellas. Las SH constituyen casi la mitad del COD en aguas naturales y son las sustancias que más absorben la luz solar en las aguas naturales. A partir del proceso de absorción de luz UV-visible se generan tripletes de las SH [Zerp y col, 1981; Zerp y col, 1985], los que interaccionan con especies presentes en el agua formando intermediarios reactivos como por ejemplo:

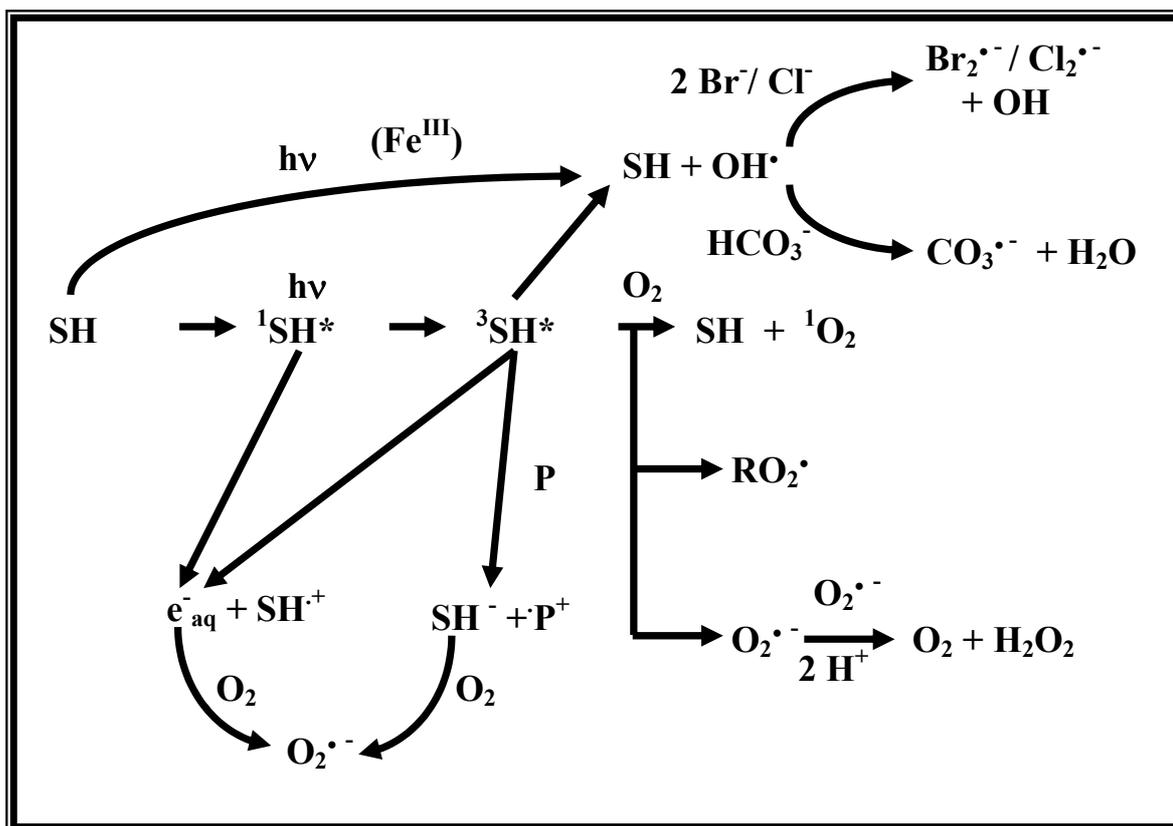
- Oxígeno singulete ( $O_2(^1\Delta_g)$ ) [Zerp y col, 1981; Wolff y col., 1981]
- Radicales alquilperoxido ( $RO_2^\bullet$ ) [Mill y col., 1980; Drapper y Crosby, 1984]
- Radicales hidroxilo ( $^\bullet OH$ ) [Mill y col., 1980; Drapper y Crosby, 1984; Haag y Hoigne, 1985]
- Radicales anion superoxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) [Cooper y Zika, 1983; Drapper y Crosby, 1983]

En aguas naturales, en presencia de iones  $Fe(III)$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$  y  $HCO_3^-$ , se forman también otras especies reactivas como por ejemplo los radicales  $HCO_3^{\bullet-}$ ,  $Cl_2^{\bullet-}$ , y  $Br_2^{\bullet-}$ . Además, datos experimentales indican que las SH fotoionizan y liberan los electrones que posteriormente se hidratan [Fisher y col, 1985; Zerp y col, 1987; Zaifiriou y col, 1984]. Los procesos que generan estas especies reactivas se esquematizan en las Figuras 1.7 y 1.8. Estos intermediarios reactivos son los responsables de la oxidación de contaminantes orgánicos y de la MOD.



**Figura 1.7:** Esquema del proceso de fotosensibilización en aguas naturales.

Las SH pueden absorber luz solar y generar fotorreacciones indirectas con compuestos orgánicos que no absorben la radiación solar. La concentración de los tripletes de las SH en estado estacionario a una profundidad de 1 cm sobre la superficie del agua es del orden de  $10^{-14}$  M. Si el nivel de energía de los tripletes de las SH es de alrededor de 57 kcal/mol, entonces especies contaminantes con tripletes de menores niveles de energía pueden reaccionar por un mecanismo de transferencia de energía mediado por las SH o la MOD. Además, si el potencial de reducción de un intermediario reactivo producido por las SH es más alto que el de un xenobiótico, éste puede oxidarse, si la reacción redox es cinéticamente favorable [Fisher y col, 1987].



**Figura 1.8:** Principales reacciones que tienen lugar en aguas naturales para la generación de especies reactivas por fotosensibilización con SH [Cooper y col., 1989; Hoigne y col., 1989; Haag y Mill, 1990; Aguer y col., 1999; Richard y Canonica, 2005].

### ***I-3.- Métodos oxidativos de degradación de contaminantes.***

La creciente preocupación por los temas relacionados con el medioambiente y la contaminación, han impulsado la búsqueda de métodos más eficientes para la eliminación de las sustancias contaminantes generadas principalmente en la actividad industrial. Entre ellos, la utilización de la radiación solar como fuente para el desarrollo de procesos químicos para oxidar compuestos es una de las más estudiadas. La detoxificación solar se basa en utilizar la luz del sol, o de fuentes luminosas con características de emisión semejantes, para eliminar compuestos orgánicos que estén presentes en efluentes líquidos o en suelos contaminados. Los métodos se dividen entre los que utilizan la radiación solar como fuente de calor para la oxidación térmica de los contaminantes, y aquéllos que utilizan la luz UV-visible para la oxidación fotoquímica de los mismos.

Los primeros requieren dispositivos de alta concentración solar para alcanzar las elevadas temperaturas necesarias, mientras que los segundos no requieren concentración por lo que son más fácilmente aplicables. Los métodos fotoquímicos comprenden los procesos de oxidación avanzada, donde se generan especies fuertemente oxidantes capaces de oxidar compuestos orgánicos no biodegradables y convertirlos en compuestos inorgánicos e inocuos. Como fuente de luz puede

usarse la radiación solar, lámparas de mercurio o xenón de arco de alta presión, en el rango UV-cercano ( $\lambda$  entre 300-370 nm), y lámparas germicidas en el UV-lejano (180-290 nm). El uso de luz solar asegura un considerable ahorro energético, permitiendo a su vez el desarrollo de instalaciones industriales más seguras. Estos procesos se caracterizan por su versatilidad, al poder utilizarse con mezclas complejas de contaminantes, lo que hace que puedan ser empleados para el procesamiento de aguas residuales resistentes a los tratamientos convencionales. Entre los métodos de detoxificación fotoquímica pueden mencionarse la fotocatalisis homogénea o heterogénea, la fotólisis directa, la fotosensibilización, la fotólisis del agua en ultravioleta de vacío (UVV) y la radiólisis.

La oxidación química "in-situ" (ISCO, de su sigla en inglés In Situ Chemical Oxidation) implica la introducción de un oxidante químico en la zona afectada con el fin de transformar los contaminantes del agua o del suelo en especies químicas menos dañinas. Entre los oxidantes más utilizados se encuentran el permanganato de potasio, el peróxido de hidrógeno y el sistema tipo Fenton, el ozono y el peroxodisulfato de sodio. Las tecnologías ISCO basadas en el uso de permanganato se encuentran más desarrolladas que el resto. La oxidación "in-situ" con Fenton es compleja y el desarrollo de la tecnología ha sido más lento. El ozono es un oxidante fuerte pero su uso es mucho más limitado que los anteriores. El tratamiento con  $S_2O_8^{2-}$  es una tecnología relativamente nueva, la cual se ha investigado principalmente en escala piloto.

Todos los oxidantes mostrados en la Tabla 1.2 tienen suficiente poder oxidante como para degradar a la mayoría de los contaminantes orgánicos. El potencial de la oxidación de cada especie reactiva es una medida de la capacidad degradativa, pero no de la velocidad con que reaccionan con los distintos compuestos orgánicos ni de su eficiencia bajo condiciones del campo. Los potenciales de oxidación de las reacciones son dependientes de muchas variables que deben considerarse simultáneamente, incluyendo temperatura, pH, concentración de reactivos, catalizadores, subproductos de la reacción, y otros componentes del sistema (por ejemplo materia orgánica, desactivadores del oxidante, etc.)

El tratamiento químico oxidativo es aplicable a una amplia gama de contaminantes. Las mezclas de contaminantes pueden requerir tratamientos que implican el uso secuencial de tecnologías para lograr el objetivo del tratamiento. La presencia de MOD puede disminuir la eficacia de los métodos oxidativos de decontaminación o de desinfección de aguas naturales, y puede conducir a la formación de productos inorgánicos y orgánicos tóxicos durante el proceso de desinfección del agua potable (por ejemplo organo-halogenados, aldehídos) [Glaze y col., 1993; Renken, 1994; Owen y col., 1995].

**Tabla 1.2:** Principales especies reactivas generadas en los tratamientos ISCO y sus potenciales de oxidación.

Oxidante	Potencial de electrodo
<b>Peroxido de hidrógeno y Fenton</b>	
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ (peroxido de hidrógeno)	1.8 V
$2 \cdot\text{OH} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ (radical hidroxilo)	2.8 V
$\text{HO}_2\cdot + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ (radical perhidroxilo)	1.7 V
$\text{O}_2^{\cdot-} + 4 \text{H}^+ + 3 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ (radical superoxido)	- 2.4 V
$\text{HO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{e}^- \rightarrow 3 \text{OH}^-$ (hydroperoxide anion)	-0.88 V
<b>Ozono</b>	
$\text{O}_3 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (ozono)	2.1 V
$2 \text{O}_3 + 3 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 4 \text{O}_2 + 2 \cdot\text{OH} + 2 \text{H}_2\text{O}$ (radical hidroxilo)	2.8 V
<b>Peroxodisulfato</b>	
$\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{SO}_4^{2-}$ (peroxodisulfato)	2.1 V
$\text{SO}_4^{\cdot-} + \text{e}^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$ (radical sulfato)	2.6 V

En particular, la destrucción de compuestos orgánicos por oxidaciones activadas por peroxodisulfato, directamente o a través del radical anión sulfato, de aguas y de suelos está ganando interés como tecnología de descontaminación química oxidativa [Liang y col., 2004; Gates y Siegrist, 1995; Amarante, 2000; MacKinnon y Thomson, 2002]. La oxidación con peroxodisulfato se realiza generalmente activada por calor, luz, ácidos, bases o iones metálicos, ya que las velocidades del proceso oxidativo son mucho mayores por la participación de especies radicalarias [House, 1962; Anipsitakis y Dionysiou, 2003]. El costo de la destrucción del material orgánico con tecnologías ISCO se relaciona directamente con el contenido del carbono, con la matriz de la zona tratada, y con la posibilidad de reciclaje. Los costos son más altos para residuos muy clorados o con alto contenido de sustancias orgánicas no tóxicas, tales como las SH en suelos y aguas contaminadas, por la desactivación de los radicales sulfato por los iones cloruro o la MO.

#### **I-4.- Fotodegradación de las sustancias húmicas.**

Luego de la irradiación de diversas aguas naturales con luz solar, se ha detectado la producción de sustancias de bajo peso molecular con grupos carbonilo (formaldehído, acetaldehído, acetona, glioxal, glioxalato, piruvato), y ácidos carboxílicos (ácido fórmico, acético, propanoico, glicólico, oxálico, malónico y succínico), los que representan el 10 % del COD [Kulovaara, 1995], así como también pequeñas cantidades de ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono. Diversos autores sugirieron que la degradación fotoquímica de las SH es una de las fuentes principales de compuestos de bajo peso molecular biológicamente activos en las aguas naturales [Kovač y col., 2006]. Luego de más de 120 horas de exposición a la luz solar se observó

que la absorbancia a 254 nm y la cantidad de COD en las muestras irradiadas alcanzan un estado estacionario antes del final del período de la irradiación, con valores de 5 % y 40 % de los iniciales [Kulovaara, 1995]. Se observó además que el pH se mantenía estable durante toda la irradiación, y que luego de 72 horas las muestras perdían su coloración. También se detectaron los siguientes cambios en la distribución del peso molecular: luego de 24 hs de irradiación aumenta la concentración de los compuestos de bajo peso molecular, después de 72 hs aparece un pico cromatográfico de alto peso molecular, el cual desaparece luego de 120 hs, al mismo tiempo aparece un precipitado marrón. La fotodegradación también conduce a la mineralización parcial de la MOD a CO<sub>2</sub>. Las SH de bajo peso molecular son más sensibles a la fotodegradación que las de alto peso molecular.

La degradación de SH con la luz UV es similar que con luz solar, pero ésta es más eficiente en aire que en atmósfera del N<sub>2</sub>. Después de 1 hora de exposición, se observa una disminución del 25 % de la absorbancia a 254 nm, mientras que el contenido del COD se mantiene constante. Cuando se adiciona peróxido de hidrógeno, la absorbancia disminuye un 96 % y el contenido del COD se reduce al 77 %, y el pH varía a tiempos cortos y luego alcanza un estado estacionario [Backlund, 1992]. El aumento en la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (de 90 a 225 mg/l) conlleva a una degradación más eficiente, pero un mayor aumento no tiene efectos en el contenido del COD ni en la absorbancia UV. Los cambios en la distribución en masa son similares a los mencionados en la degradación con luz solar, pero ocurren en forma más rápida. Se encontró que el precipitado tiene contenido mucho más alifático que las SH. Los productos principales de la degradación son: ácido oxálico, acético, malónico y N-butanoico.

### ***I-5.- Plaguicidas y su dinámica en el medio ambiente.***

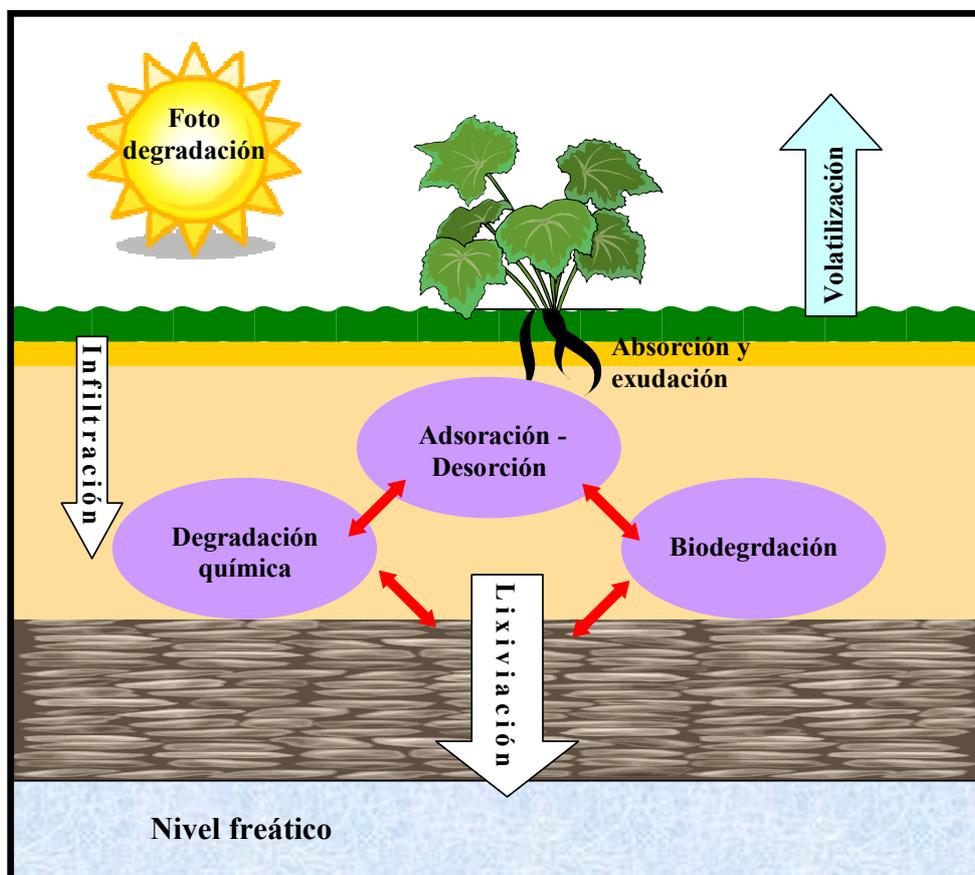
Se denomina plaguicida a todo producto químico utilizado para destruir plagas o controlar su proliferación. En la agricultura es frecuente el uso de herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas y roedenticidas. Considerando la gran variedad y cantidad de plaguicidas que utiliza la agricultura actualmente es significativo el impacto ambiental de sus residuos. Los plaguicidas son extremadamente tóxicos por contar con una elevada capacidad biocida. Los plaguicidas pueden ser contaminantes del suelo como resultado de su persistencia luego del uso, permeabilidad, derrames accidentales, y como residuos de la industria de los mismos. En el ambiente acuático los casos frecuentes de contaminación por plaguicidas se dan como consecuencia del almacenamiento y distribución inadecuados de los productos agroquímicos.

La presencia de plaguicidas en los suelos y aguas naturales se produce por diferentes causas. Dependiendo del método de aplicación, entre un 30 y un 100 % del plaguicida llega

directamente al suelo [Arnold y Briggs, 1990]. Una vez en el suelo, los plaguicidas sufren una serie de procesos físicos, químicos y/o biológicos, los que se encuentran relacionados entre sí y se esquematizan en la Figura 1.9. Estos procesos pueden agruparse en dos categorías: los de transferencia - transporte y los de transformación - degradación, como se detalla en la Tabla 1.3. Los procesos de transporte implican un movimiento del plaguicida entre las diferentes fases del suelo, mientras que en los procesos de transformación existe un cambio en la estructura del compuesto [Cornejo y Moreno, 1998].

**Tabla 1.3:** Procesos que intervienen en la dinámica de los plaguicidas en suelos.

Procesos	
Transferencia y transporte	Adsorción - desorción
	Volatilización
	Difusión y arrastre
	Absorción por las plantas
	Lixiviación
Transformación y degradación	Química
	Fotoquímica
	Biológica



**Figura 1.9:** Procesos que intervienen en la dinámica de los plaguicidas en el ambiente.

Los plaguicidas pueden adsorberse tanto a la matriz inorgánica del suelo (principalmente a la fracción arcillosa) como a la MOS. Con esta última fracción las interacciones son básicamente del tipo hidrofóbicas. Los procesos de adsorción - desorción tienen gran importancia, puesto que al determinar la cantidad de plaguicida presente, controlará otros procesos que afectan la dinámica de los mismos. Por ejemplo, la adsorción del plaguicida puede producir una disminución importante en su fotodegradación [Sukul y Spiteller, 2001], volatilización [Chester y col., 1989], y biodisponibilidad [Walker y col., 1989; Pignatello y Xing, 1996], mientras que la desorción incrementa estos procesos. Por otro lado, los procesos de adsorción pueden catalizar procesos de degradación química [Cox y col., 1994] y fotólisis [Senesi, 1993], pero también pueden proteger de la degradación biótica y fotoquímica [Hermosin y col., 1982; Romero y col., 1998; Aguer y col., 2000].

### *Procesos de degradación de plaguicidas*

Los plaguicidas son afectados por diferentes transformaciones que llevan a su desaparición del medio ambiente [Cheng y Lehman, 1985], y por lo tanto reducen la contaminación. Muchos plaguicidas se disipan rápidamente en los suelos por un proceso de mineralización y el resultado es la conversión del plaguicida en compuestos más simples ( $H_2O$ ,  $CO_2$ , ácidos inorgánicos y  $NH_3$ ).

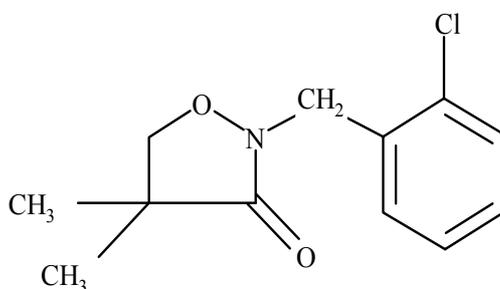
Si bien participan en este proceso reacciones químicas, como por ejemplo hidrólisis, oxidación y fotólisis, el responsable principal de su mineralización es el metabolismo microbiológico. La microbiota del suelo utiliza a los plaguicidas como fuente de carbono y otros nutrientes. Sin embargo, el proceso de degradación química, microbiana o fotoquímica puede llevar a la formación de productos, cuya toxicidad puede ser mayor, igual o menor que la del compuesto original. El tratamiento biológico de degradación de contaminantes, tanto en aguas de desecho como en suelos suele ser el proceso más económico. Sin embargo, cuando los contaminantes son muy tóxicos y persistentes, los procesos biológicos no son eficientes, tal es el caso de los plaguicidas. El efecto de la materia orgánica (MO) en el proceso de biodegradación es antagónico. Por un lado, al adsorber al plaguicida se reduce su biodegradación [Ainsworth y col., 1989; Barriuso y col., 1997; Guo y col., 2000] y por el otro lado, al ser la MO sustrato nutritivo para los microorganismos, aumenta la población microbiana y por ende incrementa la degradación de los plaguicidas biodegradables [Cox y col., 1999; Hole y col., 2001]

La fotodegradación consiste en la descomposición del plaguicida como consecuencia de la energía de la luz solar. Este proceso es importante en los primeros centímetros del suelo, en la superficie de las plantas y en los ecosistemas acuáticos superficiales. Puede dividirse en tres clases: fotodegradación directa, fotosensibilización y fotocátalisis. La fotodegradación directa

resulta de la absorción de luz UV de baja longitud de onda (principalmente UV-A y UV-B), lo que genera estados electrónicos excitados (singuletes o tripletes) de los plaguicidas. Estas especies excitadas pueden sufrir procesos de homólisis, heterólisis y fotoionización [Pusino y col., 1999; Samanta y col., 1999; Aguer y col., 2000; Da Silva y col., 2001]. El proceso de fotosensibilización ya fue explicado previamente, y su ventaja es que utiliza generalmente luz de mayores longitudes de onda [Aguer y col., 2000].

Los procedimientos modernos para la degradación oxidativa de compuestos orgánicos disueltos y /o dispersos en aguas, son técnica y económicamente una alternativa atractiva para el tratamiento de este tipo de desechos. Estos procesos comprenden métodos catalíticos y/o fotoquímicos en los que se generan intermediarios reactivos capaces de iniciar la oxidación de muchos contaminantes orgánicos, como ya fue descrito previamente.

En este trabajo se han empleado dos contaminantes modelo: el clomazone y el ácido tricloroacético (ATCA). El clomazone [2-[(2-clorofenil)metil-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona], cuya estructura se muestra en la Figura 1.10, es un herbicida que se aplica directamente en el suelo para controlar selectivamente a varias hierbas. Actúa inhibiendo la síntesis de clorofila y carotenoides en las plantas sensibles al compuesto, disminuyendo la cantidad de foliaje y su pigmentación [Mervosh y col., 1995].



**Figura 1.10:** Estructura química del clomazone

El ATCA es altamente fitotóxico, y es en parte responsable de la falta de vegetación debajo de los árboles de coníferas debido a su acumulación en las hojas y en los suelos [McCulloch, 2001]. Su alta solubilidad en agua es una de las principales razones de su alta movilidad en suelos, y por lo tanto se lixivia fácilmente a la capa freática [Müller y col., 1996]. Una fuente importante de ATCA en la actualidad es la actividad antropogénica, ya que este contaminante proviene de los efluentes de las plantas de tratamiento oxidativo de aguas residuales [Betts, 1998]. Hay evidencia de que el ATCA se dehalogena por los microorganismos del suelo [McCulloch, 2001]. Su eliminación de las aguas provenientes del tratamiento oxidativo de aguas

de desecho es eficaz solamente por métodos de fotólisis en el vacío del agua [Kruithof y col., 2002; Wörner y col., 1998; Roman y col., 1997], y no puede ser totalmente removido por la fotólisis UVC [Wörner y col., 1998]. Sin embargo, el ATCA es reducido eficientemente por el electrón hidratado [Roman y col., 1997; Hart y Anbar, 1970], por transferencia electrónica con catalizadores de Pt/TiO<sub>2</sub> irradiados [Bae y Choi, 2003], y con electrodos de semiconductores de SiC [Schnabel, 2001]. También se ha publicado la descomposición de ATCA a alta temperatura por ruptura heterolítica de los enlaces C-C [McCulloch, 2001; Hine, 1950].

## **I-6.- *Objetivos de este trabajo de tesis:***

- *Extraer sustancias húmicas de vermicompost y caracterizarlas.*
- *Investigar la capacidad de generar especies reactivas por fotosensibilización.*
- *Estudiar la reactividad de las sustancias húmicas con radicales inorgánicos oxidantes.*
- *Investigar la degradación de contaminantes por métodos fotoquímicos y sensibilizados por sustancias húmicas.*
- *Plantear los mecanismos de reacción involucrados en los dos objetivos anteriores.*
- *Estudiar el rol de las sustancias húmicas y su fotodegradación en el desarrollo de microorganismos aislados del medio ambiente.*

## Capítulo II

# Métodos y equipos utilizados

## II-1. Reactivos utilizados y preparación de soluciones.

En este trabajo se utilizaron las siguientes drogas, tal como se recibieron y sin posterior purificación:

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NaCl}$ , metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), ácido fórmico ( $\text{HCO}_2\text{H}$ ), formiato de sodio ( $\text{HCO}_2\text{Na}$ ), ácido tricloroacético ( $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$ ), ácido gálico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ), isopropanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ) y fenol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ), todos de Merck.

$\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NaN}_3$ , alcohol furfurílico ( $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$ ), glicina ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2\text{N}$ ), histidina ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_3$ ), Rosa de Bengala [3,4,5,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetraiodo fluoresceína disodio] ( $\text{C}_{20}\text{H}_9\text{O}_5\text{Cl}_4\text{I}_4\text{Na}_2$ ) y la enzima Superóxido dismutasa (SOD), todos de Sigma Aldrich.

TMPyP [5,10,15,20-tetrakis (N-metil-4-piridil)-21H, 23H- porfina- tetratoluensulfonato] ( $\text{C}_{72}\text{H}_{66}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}_4$ ) de Aldrich.

$\text{HCl}$  y Tolueno ( $\text{C}_7\text{H}_8$ ) de J.T.Baker.

$\text{NaBH}_4$  de Riedel-de Haën.

$\text{H}_2\text{O}_2$  de Riedel-de Haën o Merck.

$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  de Mallinckrodt

Clomazone [2-(2-clorofenil) metil-4,4-dimetil-3-isoxazolidona] ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{NCl}$ ) de Clariant.

Azul de nitrotetrazolio [Dicloruro de 3,3'-(3,3'-dimetoxi(1,1'-bifenil)-4,4'-diil)bis(2-(4-nitrofenil)-5-fenil)] ( $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}_{10}\text{Cl}_2$ ) de Gibco

El agua destilada utilizada se filtró mediante un sistema Millipore ( $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ,  $< 20$  ppb de carbono orgánico).

Para la determinación de las masas se utilizó una balanza electrónica marca A&D modelo ER-182A cuya precisión es de  $\pm 0,1 \text{ mg}$ .

En todos los casos, se trabajó con soluciones recientemente preparadas de todos los reactivos. Para la completa disolución del clomazone, la solución preparada se mantiene en agitación magnética durante una hora. Para solubilizar al ácido húmico Aldrich purificado, la solución se alcaliniza a pH 8 con  $\text{NaOH}$  y luego se sonica por 2 o 3 horas, con un sonicador ULTRASONIC cleaner modelo 19H.

Las medidas potenciométricas de pH y iones disueltos en solución se realizaron con electrodos selectivos y un analizador multicanal Consort C832.

Las medidas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz Cary 3 UV-Visible (Varian, Australia), con ancho de banda entre 0.2 y 4.0 nm de acuerdo con el ancho de rendija seleccionado. Las celdas utilizadas son de cuarzo de 0.2 o 1.0 cm de camino óptico, dependiendo del volumen disponible. Las absorbancias de las sustancias húmicas se midieron con

soluciones de aproximadamente 20 mg L<sup>-1</sup> cuyo pH se ajustó a 7, y las absorptividades (E) a 280, 465 y 665 nm se calcularon como:

$$E = \frac{\text{absorbancia}}{[\text{HS en g L}^{-1}] \times (\%C/100)}$$

Para regular la concentración de oxígeno disuelto en la muestra se burbujearon durante 15 minutos las soluciones con oxígeno, aire sintético, argón o nitrógeno de alta pureza.

Las sustancias húmicas comerciales que se utilizaron en este trabajo son la sal sódica del ácido húmico Aldrich (AHA) y los ácidos húmico y fúlvico de turba de Waskish de la International Humic Substances Society (AH y AF IHSS). Se compararon los comportamientos de reactividad con el radical sulfato del ácido húmico Aldrich (AHA) comercial y el AHA purificado. Este último fue purificado en el grupo del Prof. Claudio Borsarelli, de la UNSE, según metodología descrita en literatura [Saito y col., 2004]. En esta purificación se remueven las trazas de iones metálicos, el material inorgánico y el material orgánico distinto del ácido húmico. En las siguientes tablas se listan algunas propiedades fisicoquímicas informadas por los proveedores de las mismas.

Tabla 2.1: Composición elemental de las sustancias húmicas comerciales.

Sustancia húmica	Composición elemental %				
	C	H	N	O	S
AHA	51.5	4.8	0.9	37.5	3.3
AH IHSS	54.7	4.0	1.5	38.5	0.4
AF IHSS	53.6	4.2	1.1	41.8	0.3

Tabla 2.2: Distribución funcional del carbono de las sustancias húmicas comerciales.

Sustancia húmica	Composición funcional de carbono (%)			
	alifático	carbohidratos	aromático	carbonílico
AHA	44.8	14.2	32.4	16.1
AH IHSS	21.0	26.5	37.1	14.4
AF IHSS	18.1	21.3	36.2	24.3

Los extractos de materia orgánica a partir de vermicompost de origen comercial se hicieron en el laboratorio modificando la metodología descrita en literatura [Swift, 1996; Tinoco Pastor, 2000; Ganuza Monje, 2001]. El vermicompost posee una alta concentración de sustancias húmicas, composición relativamente uniforme y tamaño de partícula relativamente homogéneo. 40

g del vermicompost tamizado con malla de 0.7 mm se mezclaron con una solución de 250 mL de NaOH a pH 9.0 y la suspensión resultante luego de mantenerla en agitación por una hora, se filtró con papel de filtro banda blanca (589<sup>2</sup>, Schleicher & Scuell) para retener las partículas de tamaño mayor a 12 µm. La solución fue evaporada en rotavapor a 40°C y una presión de entre 30 y 50 torr, para obtener un sólido con alto contenido en sustancias húmicas.

El extracto de suelo utilizado en los ensayos microbiológicos fue obtenido a partir de suelo del Parque Provincial Pereyra Iraola del partido de Berazategui, Prov. de Buenos Aires (34° 52' S, 58° 08' O). Las características de dicho suelo se listan en la Tabla 2.3. Para obtener el extracto, se mezclaron 300 g de suelo con 780 ml de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121 °C en dos ciclos seguidos de 30 min. Luego se filtró con papel de filtro de poro menor a 0.8 µm para disminuir la turbidez. Posteriormente se vuelve a esterilizar en autoclave (30 minutos a 121 °C). El extracto se guardó en heladera a 4 °C hasta su utilización.

**Tabla 2.3:** propiedades del suelo utilizado.

<b>Análisis</b>	<b>Método</b>	<b>Valor</b>
pH		5,6
Carbono orgánico	Walkley-Black	3.60 %
	TOC	3.76
Materia orgánica	% C orgánico x factor 1.724	6.21 %
Nitrógeno total	Kjeldahl	0.296 %
Relación C / N		12.2
Fósforo asimilable	Bray-Kurtz I	4.2 mg/kg
Capacidad de intercambio catiónico	Saturación con acetato de amonio, y cuantificación por volumetría.	23.7 meq/100g
Granulometría	Bouyoucos arcilla (<2µm)	23.9 %
	limo (2-50 µm)	56.1 %
	arena (50-2000 µm)	20.0 %
Clase textural		Franco Limosa

## *II-2. Método de flash fotólisis*

El método de flash fotólisis fue desarrollado por Norrish y Porter en 1948, utilizado para la iniciación y el estudio de procesos fotoquímicos. En esta técnica se crea una situación de no equilibrio en la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo corto, generando intermediarios inestables en concentraciones relativamente altas.

### *Flash fotólisis Convencional (FFC).*

Un equipo convencional de flash-fotólisis consta de tres partes principales: un arreglo experimental para producir un corto e intenso pulso de luz, un reactor o celda de reacción y un sistema de detección, tal como se esquematiza en la Figura 2.1.

El equipo utilizado en este trabajo es un aparato Xenon Co, modelo 720 C, cuya óptica y electrónica fueron modificadas con el objeto de aumentar la sensibilidad de detección [San Román y col., 1980]. El equipo trabaja en modo cinético, es decir, registrando los cambios de absorción en función del tiempo a una longitud de onda fija. Los espectros de absorción de los transientes se obtienen tomando el valor de absorbancia del ajuste de las trazas experimentales a un tiempo determinado para cada longitud de onda de análisis. Las trazas experimentales deben ser tomadas manteniendo las condiciones experimentales.

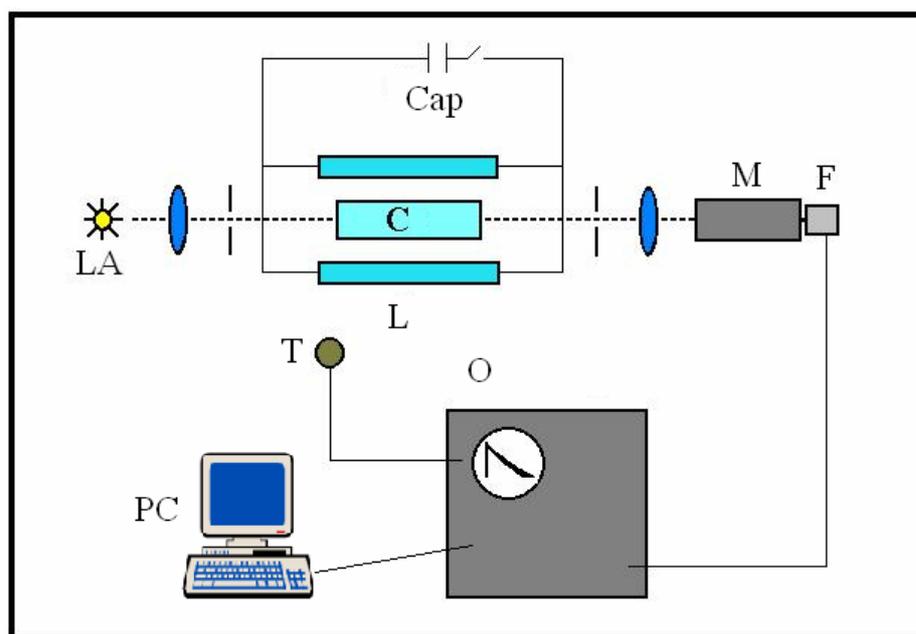
El pulso de luz se logra mediante la descarga de un banco de capacitores (Cap) sobre las lámparas de flash (L) que en nuestro caso, consisten en 2 tubos de cuarzo llenos de xenón a presión moderada (Xenon Co. FP-5-100C) ubicados a ambos lados de la celda de reacción. El disparo está sincronizado con el osciloscopio. Las lámparas emiten entre 210 nm y 600 nm, con un máximo alrededor de los 400 nm. La intensidad de la descarga de los capacitores del flash se encuentra entre los 0,8 y 7,2 kV.

La celda de reacción (C) es un cilindro de cuarzo con una camisa concéntrica del mismo material que puede ser utilizada tanto para la termostatación como para el uso de filtros. La temperatura se controló en  $\pm 0.5$  K por circulación de agua destilada por la camisa con un termostato/criostato Grant modelo GD120 y se midió dentro de la celda de reacción con un termómetro digital celsius calibrado Pt-100 $\Omega$ . Las ventanas de cuarzo de la celda son paralelas y poseen un diámetro interno de 1 cm. Para la realización del presente trabajo y de acuerdo con las condiciones experimentales requeridas se empleó una celda con camino óptico  $l$  de 10 ó 20 cm.

El método de detección empleado fue la espectroscopía de absorción con la que pueden registrarse con alta sensibilidad las especies transientes generadas durante el flash. Se empleó una lámpara de análisis (LA) de Xe de arco corto XBO-75 W/2 (Osram, Alemania). La misma fue alimentada con una fuente regulada que entrega potencia constante para atenuar las fluctuaciones de impedancia que se producen en la lámpara debido a las variaciones de trayectoria que

experimenta el arco entre los electrodos. El haz de análisis proveniente de la lámpara se colimó y enfocó con lentes de cuarzo sobre la celda de reacción, ubicada entre las lámparas de flash.

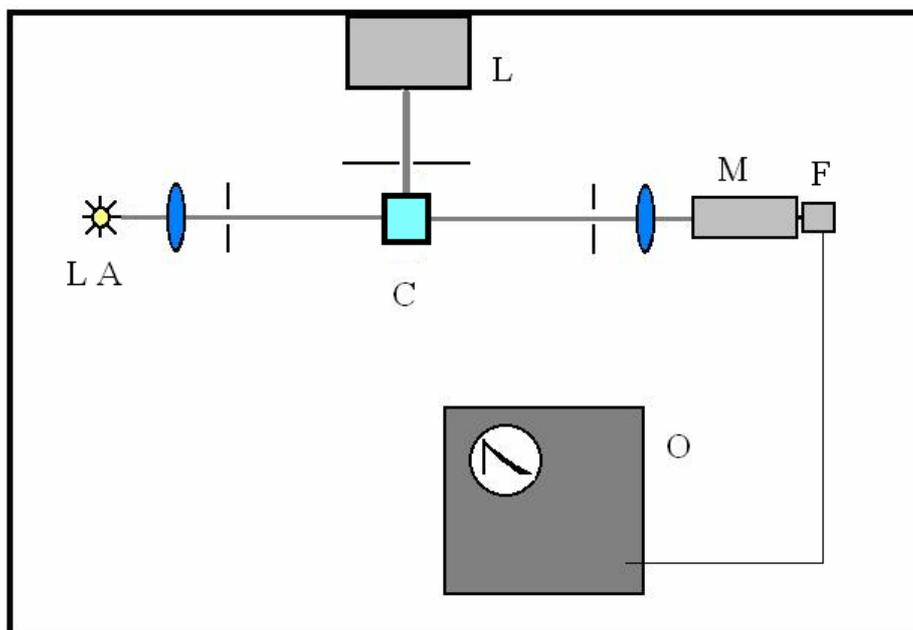
La luz de análisis emergente de la celda se hizo incidir sobre la rendija de un monocromador Bausch & Lomb (M). La detección de la señal luminosa y su conversión en señal electrónica se realizó mediante un fotomultiplicador RCA 1P28 (F). La señal del fotomultiplicador, se envía a la entrada diferencial de un osciloscopio Hewlett Packard HP 54600B (O) de 100 MHz, conectado a una PC por una interfase, permitiendo almacenar los datos para su posterior análisis. A partir de los valores de absorbancia resuelta en el tiempo que se obtienen es posible analizar el comportamiento cinético del proceso en estudio. Para evitar la acumulación de productos, cada solución fue irradiada con un único flash.



**Figura 2.1:** esquema de los componentes básicos de un equipo de flash fotólisis convencional. **LA** lámpara de análisis, **C** celda de reacción, **L** lámparas de flash, **Cap** capacitores, **M** monocromador, **F** fotomultiplicador, **O** osciloscopio, **T** trigger, **PC** computadora.

### *Láser flash-fotólisis (LFP)*

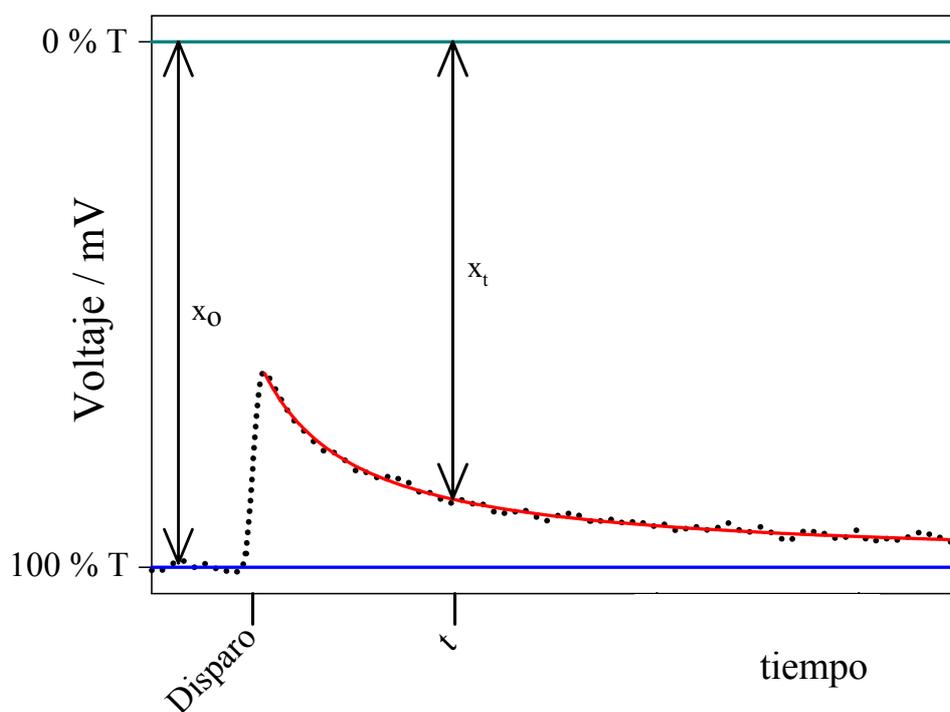
Los experimentos de láser flash fotólisis se realizaron por excitación con el cuarto armónico de un láser de Nd:YAG Litron (2 ns de ancho de pulso y 6 mJ por pulso a 266 nm). Para los ensayos se utilizó una celda de fluorescencia de cuarzo de 1 cm de lado. La luz del láser y la de análisis se disponen en una geometría de 90°. La luz de análisis de una lámpara de arco de Xe de 150 W se hace pasar por la celda y se enfoca luego en el monocromador PTI 1695 que tiene acoplado a un fotomultiplicador 1P28 PTM. Las señales se adquirieron como el promedio de 64 pulsos, con un osciloscopio digital 500 MHz Agilent Infiniium y se transfirieron a una computadora para su posterior análisis. El esquema se muestra en la siguiente figura.



**Figura 2.2:** esquema de un equipo de láser flash fotólisis. **LA** lámpara de análisis, **C** celda de reacción, **L** láser, **M** monocromador, **F** fotomultiplicador, **O** osciloscopio.

*Análisis de las trazas de flash fotólisis.*

En la Figura 2.3 se muestra una traza cinética típica obtenida en los experimentos de fotólisis flash.



**Figura 2.3:** Traza típica obtenida con el equipo de flash fotólisis convencional o láser.

Al analizar los resultados experimentales debemos asegurarnos que se trata del decaimiento de una única especie. Esto puede verificarse si la cinética de decaimiento de la especie transiente es la misma para todas las longitudes de onda donde se estudia el proceso.

Para convertir a absorbancia los valores de voltaje registrados por el equipo de flash fotólisis convencional, se ajusta antes de medir el 100% de transmitancia de la luz de análisis a cada longitud de onda al valor de un voltio utilizando un comparador diferencial conectado al osciloscopio. La respuesta detectada en el osciloscopio  $x$  es proporcional a la intensidad de la luz transmitida  $I = K x$ , donde la constante  $K$  depende de la sensibilidad del detector y la señal  $x$  está expresada en mV. Combinando esta ecuación con la ley de Lambert Beer se obtiene:

$$\Delta A_t = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{x_0}{x_t}\right) = \varepsilon_\lambda l c_t \quad \text{Ec. 2.1}$$

Donde  $\Delta A_t$  es el cambio de la absorbancia al tiempo  $t$  producido por el pulso de luz,  $\varepsilon_\lambda$  es el coeficiente de extinción molar de la especie transiente a la longitud de onda  $\lambda$ ,  $c_t$  es su concentración molar al tiempo  $t$ , y  $l$  la longitud de la celda en centímetros. Como el transiente absorbe solo una pequeña fracción de luz, es necesario amplificar la ganancia del osciloscopio, por lo que la señal correspondiente al 0% de transmitancia no aparece en la pantalla del osciloscopio. Para ajustar el valor de  $x_0$  se toma el promedio de los valores medidos antes del flash,  $\hat{x}_0$ .

$$\Delta A_t = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{\hat{x}_0}{x_t}\right) = \varepsilon_\lambda l c_t \quad \text{Ec. 2.2}$$

En el caso de las señales registradas con el equipo de láser flash fotólisis, no se ajusta el valor de 100% de transmitancia. El valor de  $I_0$  se mide en el osciloscopio y se utiliza la ecuación 2.2 para calcular  $\Delta A_t$ .

### II-3. *Fotólisis continua.*

Para los experimentos de irradiación continua realizados en nuestro laboratorio se utilizó un fotorreactor DEMA (Mangels, Bornheim-Roisdorf, Alemania) de 750 ml y geometría anular, construido en vidrio. El reactor posee un encamisado central dentro del cual se coloca la lámpara de fotólisis empleada, por el que circula agua de refrigeración para asegurar la disipación del calor producido por la lámpara. Se utilizaron dos encamisados, uno construido en vidrio y el otro construido en cuarzo. Utilizando uno u otro es posible filtrar de distinta forma la luz emitida por la lámpara de fotólisis que llega a la solución de medida. En la parte inferior del fotorreactor se encuentra una placa porosa por la cual se inyecta el gas utilizado para el mezclado de la solución dentro del reactor. La extracción de muestras del reactor se efectúa mediante una jeringa provista

de una sonda de teflón a través de una de las bocas superiores. Todo el conjunto se coloca dentro de un Termostato MGW-LAUDA modelo NB-D8/17, que permitió el control de la temperatura de las soluciones durante los experimentos de fotólisis a  $27 \pm 2$  °C.

Se empleó una lámpara Philips HPK 125 W de arco de mercurio de media presión. Este tipo de lámparas presenta una serie de líneas en la región UV/Visible cuyos anchos e intensidades relativas dependen de la temperatura y presión de trabajo. Esta lámpara consta de un tubo de cuarzo que contiene en su interior los electrodos, una cantidad de mercurio, y argón como gas de arranque. Una vez encendida la lámpara el calor liberado en la descarga comienza a evaporar al mercurio. Vaporizado todo el mercurio la lámpara entra en un estado estacionario en donde tanto la potencia emitida como la distribución espectral de la radiación se mantienen constantes a lo largo del tiempo. En esta lámpara se ha estimado un período de 90 seg. para que se alcance del estado estacionario. Con una actinometría con ferrioxalato (Kuhn y col., 2004) se determinó que la lámpara emite  $4.18 \times 10^{14}$  fotones / s a la temperatura de trabajo.

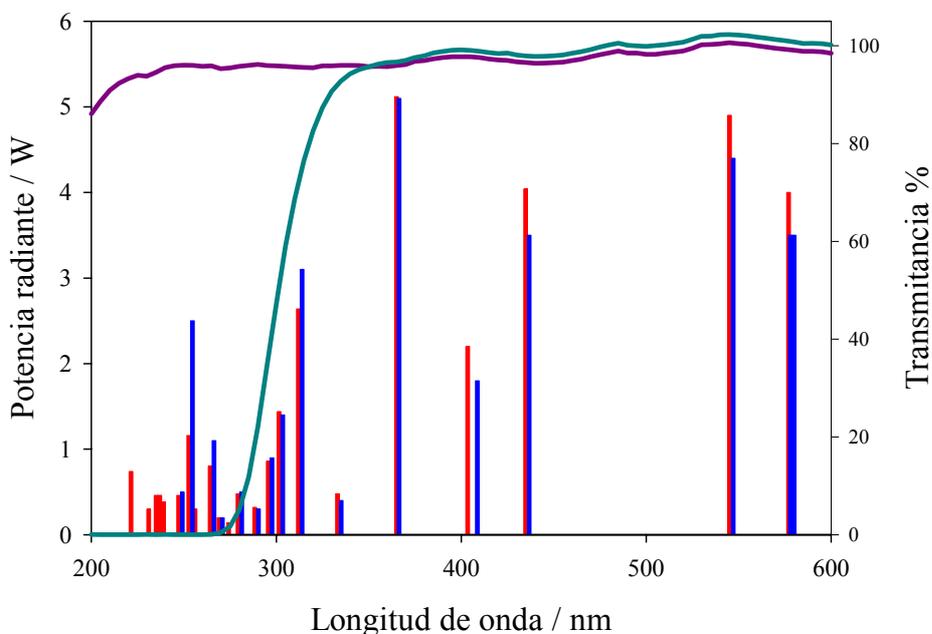
En la Tabla 2.4 se presenta el flujo radiante de la HPK125 para las líneas más importantes (Scaiano, 1989), y en la Figura 2.4 se muestra su espectro en color azul. En la misma figura se graficaron las transmitancias porcentuales de las camisas de cuarzo (en violeta) y de vidrio (en turquesa) empleadas con los reactores.

**Tabla 2.4:** espectro de las lámparas Philips HPK y HPLN utilizadas.

$\lambda$ / nm	Flujo Radiante/W HPK 125	Flujo Radiante/W HPLN 125
248.2	0.5	0.46
253.7	2.5	1.16
265.3	1.1	0.8
269.9	0.2	0.2
280.4	0.5	0.48
289.4	0.3	0.32
296.7	0.9	0.86
302.5	1.4	1.44
313.0	3.1	2.64
334.1	0.4	0.48
365.5	5.1	5.12
407.7 / 407.8	1.8	2.20
435.8	3.5	4.04
546.1	4.4	4.90
577.0 / 579.0	3.5	

Para los experimentos de degradación de clomazone realizados en el Laboratorio de Simulación y Control de Procesos de la Universidad de San Pablo (Brasil), se utilizó un reactor similar al anterior con doble encamisado para el control de la temperatura. El primero, en cuyo

interior se colocó la lámpara, puede ser de cuarzo o de vidrio y permite además seleccionar la longitud de onda con que irradia la solución (las transmitancias de ambas camisas a cada longitud de onda se muestran en la Figura 2.4). El segundo está ubicado en el exterior del reactor. Se utilizó una lámpara de vapor de mercurio Philips HPLN de 125 W, cuyo espectro también se muestra en la Tabla 2.4 y la Figura 2.4, en color rojo.



**Figura 2.4:** Espectros de emisión de las lámpara Philips HPK 125 (en azul) y Philips HPLN de 125 W (en rojo), y porcentajes de transmitancia de las camisas de cuarzo (línea violeta) y vidrio de borosilicato (línea turquesa) utilizadas en los reactores.

En los ensayos con ácido tricloroacético y radicales inorgánicos realizados en el Engler Bunte Institut de la Universidad de Karlsruhe (Alemania), se utilizó una lámpara cilíndrica de Hg de baja presión (Heraeus Noblelight, Germany, NIQ40/18) que emite a 185 y 254 nm. El reactor también posee geometría anular (400 ml, 1 cm de camino óptico anular) y la camisa central es de cuarzo suprasil, que permite el paso de ambas longitudes de onda. La temperatura se controló colocando el reactor en un baño termostático a 25 °C. Para filtrar la línea de emisión de 185 nm, la lámpara se colocó en una camisa de cuarzo.

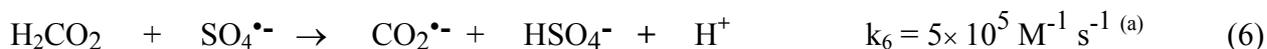
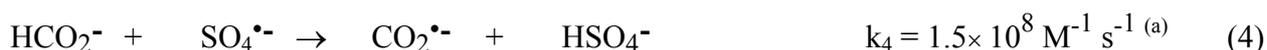
### Generación de los radicales inorgánicos.

Para generar el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  se irradiaron soluciones acuosas de peroxodisulfato de sodio con luz UV ( $\lambda_{\text{exc}} < 300\text{nm}$ ). Los radicales  $\text{Cl}^{\bullet}$  y  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  se generan por las reacciones del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  con el ion cloruro y del átomo de cloro con el ion cloruro, respectivamente, según las siguientes reacciones:



(a) NDRL-NIST Solution Kinetics Database Ver. 3.0 [Ross y col., 1998]

El radical anión dióxido de carbono ( $\text{CO}_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroximetilo ( $^{\bullet}\text{CH}_2\text{OH}$ ) se generaron respectivamente por oxidación de formiato y metanol con  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  u  $\text{HO}^{\bullet}$ , según las siguientes reacciones:



(a) NDRL-NIST Solution Kinetics Database Ver. 3.0 [Ross y col., 1998]

Mientras que el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) y su ácido conjugado ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) se generaron por fotólisis UVC de una solución concentrada de agua oxigenada.



(a) NDRL-NIST Solution Kinetics Database Ver. 3.0 [Ross y col., 1998]

#### II-4. *Determinación de las concentraciones en estado estacionario de $O_2(^1\Delta_g)$ y $HO^\bullet$*

Las concentraciones en estado estacionario de  $O_2(^1\Delta_g)$  y del radical  $HO^\bullet$  se obtuvieron midiendo el decaimiento de compuestos de prueba cuyas constantes de quenching ( $k_q$ ) se conocen [Kohn y Nelson, 2007].

Como compuesto de prueba se usó alcohol furfurílico para  $O_2(^1\Delta_g)$ , y fenol para el radical  $HO^\bullet$ , ambos a una concentración final de  $50 \mu\text{M}$ . Se tomaron alícuotas a intervalos regulares. La concentración de los compuestos de prueba fue monitoreada por HPLC con detección UV (autoinyector Waters 717 plus, detector de arreglo de diodos Waters 2996, bomba binaria Waters 1525), con una columna C18 Symmetry Waters ( $5 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 150 \text{ mm}$ ). Como eluentes se utilizaron acetonitrilo para el alcohol furfurílico y una mezcla de 95% ácido fórmico 2mM y 5% acetonitrilo para el fenol. Las longitudes de onda para la detección fueron 220 nm y 254 nm respectivamente.

#### II-5. *Análisis de los productos de reacción.*

*Reacción del ácido gálico con el radical sulfato:* las soluciones de ácido gálico y peroxodisulfato de sodio, ajustadas a pH 3 ó 5, fueron irradiadas con cinco descargas de las lámparas de flash fotólisis convencional para aumentar la concentración de productos. Estas se analizaron luego por un test colorimétrico para quinonas y por HPLC/MS.

El test de quinonas utilizado fue el ensayo de azul de nitrotetrazolio (NBT) / glicinato descrito por Paz [Paz y col., 1991].  $100 \mu\text{l}$  de la solución irradiada se mezclan a  $4^\circ \text{C}$  con  $300 \mu\text{l}$  de una solución de glicinato de potasio 2M a pH = 10,  $100 \mu\text{l}$  de una solución de borohidruro de sodio 10 mg/ml y 1 ml de una solución de NBT 0.24 mM preparada en glicinato de potasio 2M a pH 10. La reacción se incubó una hora a  $25^\circ$  en oscuridad y se mide la absorbancia a 530 nm con el espectrofotómetro CARY 3.

Para el análisis por HPLC/MS, se utilizó un equipo modular Agilent 1100 LC-MS, de configuración: bomba binaria, detector de arreglo de diodos y detector de masas selectivo con interfase API-ES (electrospray). La columna utilizada es una C18  $5 \mu\text{m}$  Restek Pinnacle II y el solvente una mezcla de metanol y agua de volúmenes iguales, acidificada a pH 3 con ácido acético. El flujo de solvente fue de 1ml/min y el volumen de inyección fue de  $20 \mu\text{l}$ . Los parámetros del detector de masas (MSD) fueron: API-ES en modo positivo (rango de masas 60-400 unidades de masa).

*Degradación de clomazone*: las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Simulación y Control de Procesos de la Universidad de San Pablo, Brasil. La concentración de clomazone se monitoreó por cromatografías líquidas de alta resolución (HPLC) con un equipo Shimadzu 10A con una columna Luna C18(2) 5 $\mu$  y fase móvil metanol-agua 65:35 en un flujo de 1 ml/min, como se describe en bibliografía [Zanella y col., 2003], utilizando un detector de arreglo de diodos. Para el análisis de los productos de degradación se utilizaron un cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC-17A con una columna DB-5ms, acoplado a un espectrómetro de masas QP-5050A, y un cromatógrafo líquido con espectrógrafo de masas Shimadzu 2010A, con una columna Spherisorb ODS-2 5 $\mu$ m, y la fase móvil metanol-agua (65:35, 0.2 ml/min). Para el análisis por CG se utilizaron las siguientes condiciones: el volumen de inyección fue 1.0  $\mu$ L, la temperatura del inyector fue de 250 °C, el gas carrier fue He a una presión constante de 10 psi. El programa de temperatura de la columna fue: 60 °C por 3 min., luego subiendo hasta 200 °C a 15 °C min<sup>-1</sup>, luego a 3°C min<sup>-1</sup> hasta 225 °C y finalmente por 4 min. a 225 °C, con un tiempo total de análisis por muestra de 25 min. Las temperaturas de la interface y del ionizador fueron de 290 y 250 °C, respectivamente. El espectrómetro de masas fue operado en modo de impacto electrónico con un potencial de ionización de 70 eV y los espectros fueron escaneados en un intervalo de m/z entre 50 y 650.

*Reacción del ácido tricloroacético con radicales inorgánicos reductores*: las determinaciones se realizaron en el Engler Bunte Institut de la Universidad de Karlsruhe, Alemania. Los hidrocarburos clorados (CCl<sub>4</sub>, HCCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>CCl<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>, y C<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub>) fueron analizados por cromatografía gaseosa en un equipo HP modelo 6890, con FID y ECD, una columna HP-5 cross-linked 5% fenilmetilsilicona. Se usó He como gas portador. La temperatura se mantuvo constante a 80 °C. Los productos volátiles se extrajeron con *n*-hexano antes del análisis por GC. Los ácidos clorados se descomponen a las temperaturas utilizadas para el análisis por CG, por lo que fueron analizados por HPLC con detección UV.

Los iones cloruro, clorito, clorato, perclorato, formiato y oxalato fueron analizados por cromatografía de intercambio iónico con un equipo DIONEX DX500 con detector electroquímico Dionex ED 40, una columna AS9 HC Dionex, 250 $\times$ 4 mm, con pre-columna AG 9 Dionex (50 $\times$ 4 nm). Se utilizó como eluyente una solución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 8  $\times$  10<sup>-3</sup> M y NaHCO<sub>3</sub> 1.8  $\times$  10<sup>-3</sup> M, con un flujo de 1.2 mL/min y un volumen de inyección de 25  $\mu$ L. Los límites de detección para todos los iones son de 0.5 ppm.

La identificación cromatográfica de todos los compuestos fue realizada por comparación de los tiempos de retención y por coinyección con patrones.

Para las mediciones de Cl<sup>-</sup> disuelto se utilizó un electrodo selectivo RADIOMETER

modelo ISE25Cl con membrana de PVC, con una impedancia de entre 5 y 100 M $\Omega$ , una sensibilidad de  $\pm 0,2$  mV y un límite de detección de  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Como referencia se utilizó un electrodo de calomel construido en el instituto con el Dr. Rodríguez Nieto [Hills e Ives, 1969]. Para las medidas se utilizó un analizador multicanal que posee una resolución de 0,1 mV. Una impedancia de entrada mayor a  $10^{12}$   $\Omega$ , y por lo tanto una corriente menor a 0,5 pA, garantizando medidas en condiciones cercanas al equilibrio.

#### II-6. *Determinación de carbono total.*

Se determinó el carbono total (TC) con un equipo Shimadzu TOC-5000A. Este modelo posee dos canales de análisis. Uno para la determinación del carbono total (TC), donde todo el carbono de la muestra es oxidado a CO<sub>2</sub> catalíticamente en un horno a 680 °C, y luego es transportado por medio de un flujo constante de gas portador al sistema de detección.

En el segundo canal, usado para la determinación del carbono inorgánico (CI), los carbonatos y bicarbonatos presentes en la muestra se convierten a CO<sub>2</sub>, acidificando a baja temperatura la solución con una solución de ácido fosfórico. El CO<sub>2</sub> es llevado al analizador por el mismo gas portador. Dada la relativamente baja temperatura de este canal y la ausencia de catalizador el carbono orgánico contenido en la muestra no es convertido a CO<sub>2</sub>. Antes de entrar la muestra gaseosa en la celda de análisis, el vapor de agua es condensado y removido en el dehumificador.

El analizador utiliza una fuente de radiación infrarroja, que se divide en dos haces. Estos atraviesan las celdas ópticas asociadas a la muestra y la referencia. La celda de muestra recibe el flujo del canal seleccionado que consiste en gas portador que lleva consigo los productos de reacción de la muestra inyectada. La referencia es una celda que contiene N<sub>2</sub>, el que no absorbe en el IR. La radiación infrarroja es absorbida por el CO<sub>2</sub> en la celda de la muestra, y el porcentaje de la radiación absorbida es proporcional al valor de la concentración de CO<sub>2</sub>.

Con el uso de los dos canales del instrumento se determina el carbono orgánico total (TOC) en una muestra, como la resta del valor de TC menos el de CI,  $TOC = TC - CI$ . Para la calibración se utilizaron cuatro soluciones de biftalato de potasio de concentración conocida, preparadas por pesada.

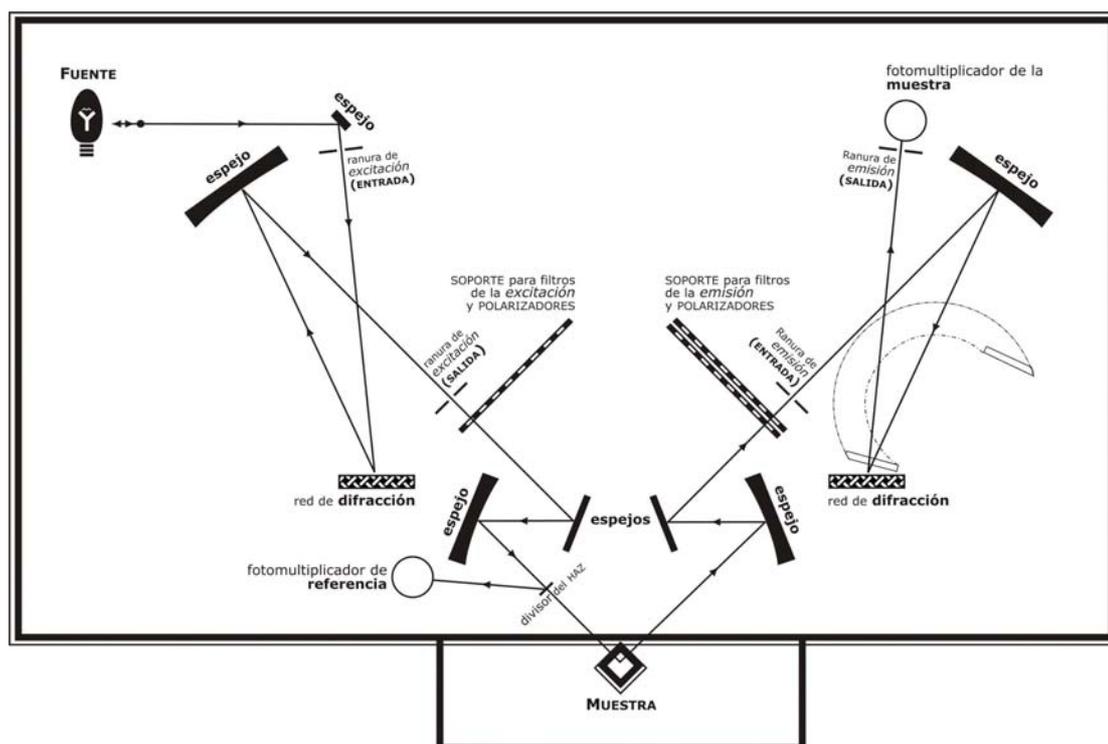
#### II-7. *Espectros infrarrojos con transformada de Fourier.*

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) se obtuvieron con un equipo Bruker EQUINOX 25. Se registraron los espectros entre 4000 y 400 cm<sup>-1</sup> con resolución de

$1 \text{ cm}^{-1}$ . Para la preparación de la pastilla de cada una de las sustancias húmicas, se prensa con una fuerza de 3 ton una mezcla de KBr y la muestra sólida de la sustancia húmica previamente molidas. Para mejorar las señales en relación al ruido, se promedian 64 espectros individuales para cada muestra.

## II-8. Matrices de excitación – emisión de fluorescencia.

Los espectros de fluorescencia para la obtención de las matrices de excitación emisión (MEE) fueron registrados con un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-50B, esquematizado en la Figura 2.5. El equipo cuenta con un monocromador (de excitación) que permite seleccionar una determinada longitud de onda de la fuente de Xe. El haz resultante se focaliza sobre la cubeta. La emisión de la muestra se detecta a  $90^\circ$  con respecto al haz de excitación para evitar interferencias por efecto de la luz dispersada. El espectro de emisión se obtiene por barrido de un segundo monocromador (de emisión). El detector es un tubo fotomultiplicador R928 sensible al rojo. Las rendijas de excitación y emisión se ajustaron a un paso de banda de 5 nm. El espectrofotómetro registra los espectros en unidades arbitrarias (UA) con un máximo de emisión de 1000 UA.



**Figura 2.5:** Diagrama esquemático del sistema óptico del espectrofluorómetro utilizado para la obtención de las matrices de excitación - emisión de fluorescencia.

Los espectros de emisión obtenidos se corrigen por la respuesta del instrumento (la sensibilidad del detector y la eficiencia de los monocromadores varían con la longitud de onda). Para obtener la respuesta del instrumento se divide el espectro publicado de una sustancia de

referencia por el espectro de la misma sustancia registrado en nuestro equipo. Como referencias se utilizaron p-terfenilo [Du y col., 1998], pterina [Thomas y col., 2002] y rodamina B [Du y col., 1998], para obtener la respuesta del instrumento en los intervalos de longitudes de onda de 300 a 420 nm, de 370 a 600 nm, y de 520 a 800 nm, respectivamente. La corrección del espectro de emisión se realiza dividiendo el espectro experimental de cada muestra por la respuesta del instrumento.

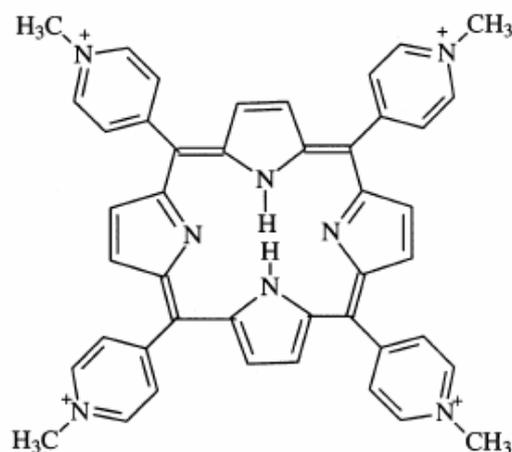
Para registrar las matrices de excitación - emisión de fluorescencia, la longitud de onda de excitación se incremento de a 5 nm, desde 200 a 550 nm. Para cada longitud de onda de excitación se detectó la emisión desde los 300 a los 600 nm, tomando datos cada 0.5 nm a una velocidad de 1000 nm/min. Todas las muestras se prepararon por disolución de los sólidos en agua destilada llegando a una absorbancia a 550 nm ( $A^{550\text{nm}}$ ) de  $0.050 \pm 0.005$ .

#### II-9. *Imágenes de pseudomicelas de las sustancias húmicas.*

Se investigó la formación de pseudomicelas de AHA en agua mediante el empleo de técnicas de microscopía observando la fluorescencia a  $\lambda^{\text{em}} = 650$  nm de la porfirina TMPyP (Figura 2.6), que es soluble en agua y capaz de ingresar a las pseudomicelas. Se prepararon muestras a diferentes pHs y se observó también el efecto de la formación de pseudomicelas en presencia de diversos electrolitos como peroxodisulfato de sodio y sulfato de cobre (II). Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo del Prof. Peter Ogilby en Aarhus, Dinamarca.

El equipo utilizado consta de un microscopio invertido Olympus (modelo IX70) equipado con un detector de InGaAs de arreglo lineal (Princeton Instruments/Roper) [Andersen y col., 2002, y Zebger y col., 2003]. Se empleó luz de  $\lambda^{\text{exc}} = 420$  nm, proveniente de una lámpara continua de Xe de 75 W, que fue acoplada a la muestra a través del objetivo del microscopio usando un espejo dicróico. La luminiscencia resultante fue colectada por el objetivo del microscopio y transmitida a través del mismo espejo dicróico y de un filtro de banda de longitud de onda variable hacia un detector colocado en el plano de la imagen. De esta forma se obtiene un perfil de intensidad de luminiscencia de un corte en planos a través de la muestra. Las imágenes bidimensionales se obtienen trasladando lateralmente la muestra sobre el portaobjetos del microscopio y registrando planos sucesivos. Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 60x.

Las soluciones para las determinaciones se obtuvieron mezclando volúmenes iguales de una solución acuosa de TMPyP ( $A^{420} = 1.14$ ) con otra solución acuosa de 12 mg de AHA en 5 mL de agua.



**Figura 2.6:** 5,10,15,20-tetrakis(N-metil-4-piridil)-21H,23H-porfina (TMPyP)

## II-10. *Análisis computacional.*

### *Análisis de regresión bilineal.*

Los espectros de los intermediarios de reacción, se obtuvieron a partir de los perfiles de absorción a diferentes longitudes de onda, manteniendo el resto de las condiciones experimentales. Por lo tanto la absorbancia es una función de la longitud de onda y del tiempo. Teniendo en cuenta la linealidad entre la absorbancia, la concentración y el coeficiente de absorción, este análisis se aplica a la matriz de absorbancia experimental para obtener información de mínimo número de especies y sus respectivos perfiles de concentración y espectro de absorción [San Román y Gonzalez, 1989].

La absorbancia se escribe en forma matricial  $[A] = [\epsilon] [c]$ , donde  $[A]$ ,  $[\epsilon]$  y  $[c]$  representan las matrices de la absorbancia, coeficiente de absorción molar y concentración, respectivamente. El procedimiento se basa en el cálculo de las matrices  $[\epsilon]$  y  $[c]$  por regresiones lineales múltiples (utilizando la condición de cuadrados mínimos) por iteraciones sucesivas hasta que el sistema converge, o sea se minimizan los elementos de la matriz error. A partir de la matriz error se obtiene la matriz de absorbancia corregida  $[A^c]$ . El número de especies es seleccionada como el mínimo valor que permite una aproximación razonable entre  $[A^c]$  y  $[A]$ .

### *Simulaciones cinéticas.*

Para simular el decaimiento de las especies transientes generadas en los ensayos de flash fotólisis se utilizó un programa basado en el balance de los componentes formulado en términos de un sistema de ecuaciones diferenciales, que se resuelven por el método de Runge Kutta [Gonzalez y Braun, 1995]. Este programa considera al flash como una función delta que produce una

concentración determinada de radical. La concentración de radical inmediatamente después del flash se ingresa como parámetro inicial, a partir de la estimación experimental de la misma. Para esta estimación se realizan ensayos en ausencia de otras sustancias con las que pueda reaccionar. Para validar el método los resultados obtenidos se comparan con resultados experimentales.

#### *Cálculos teóricos.*

La metodología de cálculo utilizada fue la teoría del funcional de la densidad (Density Functional Theory, DFT) con un nivel de teoría B3LYP [Becke, 1993; Lee y col., 1988] y el conjunto de bases extendidas 6-311++G\*\* [Krishnan y col., 1980; Clark y col., 1983; Frisch y col., 1984]. Todos los cálculos se realizaron con el programa GAUSSIAN03 [Gaussian 03, Revision C.02, 2004].

Las estructuras geométricas de todas las especies e intermediarios fueron optimizadas. Luego de cada optimización se realizó un análisis vibracional para confirmar que las estructuras calculadas posean realmente un mínimo de energía y para evaluar las correcciones de la energía vibracional del punto cero (zero-point energy, ZPE) y correcciones térmicas a la energía libre de Gibbs, las que se incluyen en todas las energías calculadas. Para los radicales se utilizó la aproximación de capa abierta irrestricta (unrestricted open-shell), no encontrándose contaminación de spin (el valor de la desviación  $\langle S^2 \rangle$  standard calculado en todos los casos fue menor al 5% del valor teórico esperado).

Los efectos de solvente fueron calculados con el modelo del campo de reacción autoconsistente continuo polarizado (self-consistent reaction field polarized continuum model, SCRF-IEF-PCM) [Miertos y Tomasi, 1982; Cossi y col., 1996; Barone y col., 1997] como lo implementa el programa de cálculo Gaussian03. El programa utiliza el conjunto de radios de hidratación UAO para formar cavidades según la geometría molecular previamente optimizada, la hibridización y la carga de la especie. En este método, el solvente es modelado como un continuo de constante dieléctrica  $\epsilon$ , y el soluto es colocado en la cavidad formada según los parámetros mencionados dentro del solvente. El modelo no considera interacciones específicas entre el soluto y el solvente.

#### II-11. *Determinación de la constante de velocidad de desactivación de oxígeno singulete.*

Para determinar la constante de desactivación global de oxígeno singulete ( $k_t$ ) se registra la fosforescencia resuelta en el tiempo emitida por esta especie a 1270 nm. Esta técnica permite evaluar los tiempos de vida del  $O_2(^1\Delta_g)$  en ausencia ( $\tau_\Delta^0$ ) y en presencia de quencher ( $\tau_\Delta$ ), monitoreando el decaimiento del mismo por fosforescencia a 1270 nm. La intensidad de la señal

( $I$ ) es directamente proporcional a la concentración de  $O_2(^1\Delta_g)$  a cualquier tiempo  $t$  y decae exponencialmente con un tiempo de vida ( $\tau_\Delta$ ), según la Ecuación 2.3.

$$I = I_0 e^{-t/\tau_\Delta} \quad \text{Ec. 2.3}$$

Se realizaron medidas en soluciones con diferentes concentraciones de quencher (Q) para obtener valores de  $\tau_\Delta$  en función de la concentración de quencher. Se utilizó la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 2.4) para obtener una recta graficando  $1/\tau_\Delta$  contra [Q] cuya pendiente es  $k_t$ .

$$\frac{1}{\tau_\Delta} = \frac{1}{\tau_\Delta^0} + k_t \times [Q] \quad \text{Ec. 2.4}$$

Como fuente se utilizó el segundo armónico de un láser Nd:YAG (Litron) con emisión a 532 nm atenuada (2 ns de ancho de pulso y 5 mJ por pulso). La radiación emitida es detectada perpendicularmente a la dirección del láser, usando un detector de Germanio (Judson 116 85p, de 5 mm de diámetro) provisto de un sistema interno de filtros apropiados. La señal eléctrica proveniente del detector es digitalizada por el osciloscopio (500 MHz Agilent Infiniium) y almacenada. Las señales se analizan luego en una computadora.

Las soluciones se prepararon en  $D_2O$  de modo de obtener un valor de  $\tau_\Delta^0$  y  $\tau_\Delta$  mucho mayores que el tiempo de resolución del detector empleado (1  $\mu$ s). Como sensibilizador se utilizó Rosa de Bengala. El pH se ajustó con KOH y los valores de pD se calcularon sumando 0.4 al valor de pH medido [Mártire et al., 1993].

Para la determinación de la constante de velocidad de desactivación reactiva de oxígeno singlete ( $k_R$ ) se comparó el comportamiento cinético del sustrato en estudio (S) respecto de un compuesto de referencia (Ref) cuya constante de velocidad para la reacción con oxígeno singlete ( $k_R^{\text{Ref}}$ ) se conoce. En este trabajo se utilizó el método descrito por Foote y Ching [Foote y Ching, 1975] que consiste en la irradiación sensibilizada de los sustratos S y Ref en condiciones de pseudo primer orden. A partir de soluciones de concentraciones conocidas de ambas sustancias, y manteniendo constante la concentración de sensibilizador y la geometría del sistema, se mide el consumo de  $O_2$  disuelto en función del tiempo de irradiación, que puede describirse con la Ecuación 2.5

$$-d[O_2]/dt = k_r \times [Q] \times [O_2(^1\Delta_g)]_{ss} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Donde Q es la sustancia de estudio o la referencia, y  $[O_2(^1\Delta_g)]_{ss}$  la concentración de  $O_2(^1\Delta_g)$  en estado estacionario. Si esta última se considera constante, al integrar la Ecuación 2.6 se obtiene

$$\ln ([O_2]/[O_2]_0) = -k'_R \times t \quad \text{Ec. 2.6}$$

Al graficar el  $\ln ([O_2]/[O_2]_0)$  contra el tiempo se obtienen líneas rectas, cuyas pendientes son proporcionales a cada constante reactiva. El valor de  $k_R^S$  se calcula de la relación de las pendientes de las rectas para ambas sustancias, según la Ecuación 2.7.

$$\frac{k'^{Ref}}{k'^S} = \frac{k_R^{Ref} \times [Ref]}{k_R^S \times [S]} \quad \text{Ec. 2.7}$$

En estos experimentos las soluciones fueron irradiadas con una lámpara de cuarzo-halógeno de 150W focalizada sobre un reactor cilíndrico de vidrio (125 ml). Entre ambas se interpuso un filtro de corte (410 nm) para que sólo el sensibilizador absorbiera la luz. En la parte superior se colocó un esmeril para el montaje del soporte del electrodo de oxígeno sin que quede aire en el fotorreactor. El soporte del electrodo está provisto de un pequeño buzo magnético colocado aproximadamente 1 cm debajo de la membrana del electrodo.

Las soluciones se prepararon con agua destilada. Como sensibilizador se utilizó Rosa de Bengala. Se monitoreó el consumo de  $O_2$  disuelto con un electrodo polarográfico Orion 97-08-99. La sustancia elegida como referencia fue el aminoácido histidina, cuya constante de velocidad de reacción se conoce ( $k_R^{Ref} = 9.0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  [Miskoski y Garcia, 1993]). Se trabajó con concentraciones de ambos sustratos de  $7.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  para conservar la condición de pseudo primer orden. En estos ensayos no se superó el 15 % de conversión de reactivos, para minimizar la posibilidad de reacción entre los productos y el  $O_2(^1\Delta_g)$ .

En experimentos realizados en las mismas condiciones experimentales, se siguió la cinética de consumo de clomazone por HPLC. Para poder comparar ambos experimentos, se realizaron ensayos midiendo el consumo de ambos. Debido a que el consumo de  $O_2$  disuelto se debe realizar en un recipiente cerrado, se siguió su cinética de consumo, y a distintos tiempos finales se determinó la variación de la concentración de clomazone por HPLC.

II-12. *Determinación del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete por sustancias húmicas.*

La producción de oxígeno singulete ( $O_2(^1\Delta_g)$ ) sensibilizada por SH se detectó empleando como fotosensibilizadores ácidos húmicos de origen comercial (Aldrich, AHA) y extracto alcalino de vermicompost (Ext. OH) en agua deuterada. Debido a los bajos rendimientos cuánticos de producción de  $O_2(^1\Delta_g)$ ,  $\Phi_\Delta$ , debió utilizarse un equipo de muy alta sensibilidad cuya operación se basa en la detección por la técnica de single photon counting (SPC) de la de la emisión en el infrarrojo cercano (1270 nm) producida por el decaimiento del oxígeno del estado excitado  $^1\Delta_g$  al estado fundamental  $^3\Sigma_g^-$ . Estos ensayos se realizaron en colaboración con el laboratorio del Prof. Peter Ogilby en Aarhus, Dinamarca.

La parte principal del arreglo experimental empleado es el láser de Ti:zafiro de femtosegundo (Tsunami 3941; Spectra Physics/Newport.). El láser de Ti:zafiro está bombeado por la frecuencia doblada de un láser de diodo de onda continua Nd:VO<sub>4</sub> (Millennia V, 5W; Spectra Physics/ Newport) que opera a 80 MHz. Este láser bombea un amplificador (Spitfire) cuya función principal es la reducción de la frecuencia de repetición a 1 kHz, la que es adecuada para los experimentos de  $O_2(^1\Delta_g)$  debido a que su tiempo de vida en los sistemas de estudio es del orden del microsegundo.

La longitud de onda de excitación empleada en los experimentos fue 400 nm. Dado que el amplificador no emite por debajo de los 760 nm, la longitud de onda seleccionada fue de 800 nm y su frecuencia fue doblada mediante un cristal delgado de  $\beta$ -borato de bario (BBO). La luz de 400 nm fue luego filtrada con un filtro de banda (400–420 nm) que transmite el segundo armónico y bloquea el haz fundamental de 800 nm. La potencia del láser fue medida con un aparato FieldMax TO; Coherent (Santa Clara, CA).

La fosforescencia de oxígeno singulete ( $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ ) se mide colocando un filtro de banda de 1270 nm en frente del fotomultiplicador (Hamamatsu, modelo R5509-42), el que se usa en el modo de single photon counting y cuyo tiempo de respuesta es de 3 ns. El fotomultiplicador fue enfriado a -80 °C mediante un flujo de nitrógeno gaseoso que había sido bombeado a través de un vaso Dewar con nitrógeno líquido. La salida del fotomultiplicador fue amplificada 25 veces con un preamplificador Stanford Research Systems modelo 445; enviada a través de un filtro casero de paso alto de bloqueo DC a un contador de fotones de dos canales (Stanford Research Systems modelo 400).

## II-13. Ensayos microbiológicos.

Se estudió el efecto de la presencia de sustratos orgánicos ricos en sustancias húmicas y de su fotólisis, en el desarrollo de dos bacterias: una cepa de referencia de *Escherichia coli* (ATCC 4352) y una cepa aislada del mismo suelo del cual se realizaron los extractos. La composición de los medios de cultivo empleados se listan en la Tabla 2.5. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atm. de sobrepresión durante 20 min.

El aislamiento de bacterias del suelo se realizó a partir de 5 gramos de muestras de suelo del horizonte superficial con alto contenido de humus, recolectadas en mayo de 2006 del Parque Pereyra Iraola. Las muestras se enriquecieron en 50 ml de medio de cultivo R2A y se incubaron 24 hs en agitación (180 rpm) a 30°C. Las alícuotas fueron inoculadas en agar cetrimide para aislar selectivamente bacterias del género *Pseudomonas*. Se observaron dos tipos de colonias: Cepa A de colonias color crema, grandes elevadas y difusas, y la Cepa B de colonias con pigmento verdoso, más grandes, difusas y más chatas. Ambas fueron bacilos Gram negativos. Se realizaron replicados en agar R3A [Reasoner y Geldreich, 1985] hasta obtener aislamientos puros. Se eligió continuar los ensayos con la cepa B. Por último se hizo un repique en agar R3A en pico de flauta para guardarla a 4°C.

Para la preparación de los inóculos, cada cepa bacteriana se hizo crecer en caldo R3A, y se incubó a 30°C en un agitador rotatorio a 180 rpm por 24 hs.

Tabla 2.5: composición de los medios de cultivo empleados para los ensayos microbiológicos. Para los medios sólidos, se agregó 15 g de agar agar por litro de medio y luego se esterilizó.

MML		R2A		R3A		Agar cetrimide	
NaCl	5 g	Extracto de	0.5 g	Extracto de	1 g	Digestión	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g	levadura		levadura		pancreática	20 g
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g	Proteasa	0.5 g	Proteasa	1 g	de gelatina	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g	peptona		peptona		Cetrimide	0.3 g
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g	Casamino	0.5 g	Casamino	1 g	MgCl <sub>2</sub>	1.4 g
KNO <sub>3</sub>	3 g	ácidos		ácidos		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g
H <sub>2</sub> O	1 L	Glucosa	0.5 g	Glucosa	1 g	Glicerol	10 ml
		Almidón	0.5 g	Almidón	1 g	Agar agar	15 g
		Piruvato	0.3 g	Piruvato	0.5 g	H <sub>2</sub> O	1 L
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6 g		
		MgSO <sub>4</sub>	0.05 g	MgSO <sub>4</sub>	0.1 g		
		H <sub>2</sub> O	1 L	H <sub>2</sub> O	1 L		

Para los ensayos 1 ml del inóculo a ensayar se agregaron a 50 ml del medio de cultivo suplementado con el respectivo sustrato orgánico, y se incubó en un agitador rotatorio a 180 rpm y 30°C, tomando muestras en el tiempo para seguir el desarrollo microbiano. Se utilizaron dos medios de cultivo, R2A o medio mineral (MML) ajustado a pH 6.5, con la adición de los sustratos orgánicos (extracto de suelo y ácido húmico Aldrich) fotolizados o sin fotolizar. Los mismos se agregaron al medio de cultivo en relación 1 a 1, y se esterilizaron luego en autoclave durante 20 min. a 121 °C y una atm. de sobrepresión. También se ensayaron los sustratos orgánicos solos y los medios de cultivo sin adición de sustrato. La fotólisis de los sustratos orgánicos se realizó en el mismo reactor utilizado para la fotólisis continua, con camisa de vidrio para no dejar pasar luz por debajo de 320 nm. La lámpara utilizada es la Philips HPK 125 y el tiempo de irradiación fue de 90 minutos.

El crecimiento bacteriano se siguió midiendo la atenuancia (D) del medio a 600 nm. Esta se define como el logaritmo en base 10 del poder radiante incidente ( $P^0_\lambda$ ) dividido por el poder radiante incidente ( $P_\lambda$ ). La atenuancia se reduce a la absorbancia si el haz incidente no se refleja ni se dispersa, sólo se transmite o absorbe.

$$D_\lambda = \log\left(\frac{P^0_\lambda}{P_\lambda}\right) = -\log(T_\lambda) \quad \text{Ec. 2.8}$$

Donde  $T_\lambda$  es la transmitancia. La atenuancia se correlaciona con la concentración de bacterias expresada en UFC/ml (unidades formadoras de colonias por ml) determinada en cajas de petri con R3A sólido. La cinética de crecimiento se ajustó con la ecuación de Gompertz [Zwietering y col., 1990].

$$f = y_0 + A \times \exp\left\{-\exp\left(\frac{\mu_{\max} \times e \times (L - t)}{A} + 1\right)\right\} \quad \text{Ec. 2.9}$$

Donde  $f = \ln(D_t / D_0)$ ;  $A = \ln(D_\infty / D_0)$ ;  $\mu_{\max}$  es la velocidad de crecimiento en la fase exponencial; y L es el período de latencia.

## Resultados

## Capítulo III. Extracción y caracterización de sustancias húmicas de vermicompost.

### *Extracción de materia orgánica a partir de vermicompost.*

Se optimizó el proceso de extracción de sustancias húmicas (SH) a partir de vermicompost de origen comercial (Establecimiento Don Astor). El compost es el proceso resultante de la acción de lombrices rojas californianas (*Eisenia foetida*) sobre camas de estiércol de ganado vacuno durante un período de tres meses. En la Tabla 3.1 se listan algunas características fisicoquímicas del compost (determinaciones realizadas en la cátedra de Edafología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP.)

**Tabla 3.1:** propiedades fisicoquímicas del compost comercial.

Análisis	Método	Valor
pH	En pasta	6.2
Conductividad	Conductimetría	5.6
Carbono orgánico	Walkley-Black	18.6 %
Materia orgánica	Incineración.	37.7 %
Fraccionamiento de la MO	Stevenson	Ác. Húmicos
		Ác. Fúlvicos
		Huminas
Nitrógeno total	Micro Kjeldahl	1.5 %
Relación C / N		12.5
Fósforo total	Colorimetría con $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$	0.4 %
Cenizas	Incineración en mufla a 600 °C	62.3 %
Humedad	Secado en estufa a 105 °C	8.3 %

La extracción se realizó suspendiendo 40 g de compost en 250 ml de solución acuosa alcalina ajustada a pH 9.0 con hidróxido de sodio. La suspensión se mantuvo en agitación constante durante 1 hora. Se tomaron 50 ml de la solución y se evaporaron hasta sequedad en rotavapor a presión reducida y 40°C. El sólido obtenido se llevó a peso constante en estufa a 60°C. La masa del sólido seco obtenida a partir de esta alícuota fue de 0.1014 g, y la concentración del extracto es de 2.03 g L<sup>-1</sup>.

### ***Caracterización de las distintas sustancias húmicas utilizadas.***

En este trabajo se emplearon muestras de ácidos húmicos comerciales Aldrich (AHA) y de turba de Waskish de la International Humic Substances Society (AH IHSS), ácido fúlvico de turba de Waskish de la IHSS (AF IHSS), y extractos de vermicompost (Ext. OH) y de suelo (Ext. S). Los contenidos de carbono y nitrógeno de las muestras de SH empleadas se listan en la Tabla 3.2

**Tabla 3.2:** Contenido de carbono de las muestras de SH comerciales y los extractos de materia orgánica.

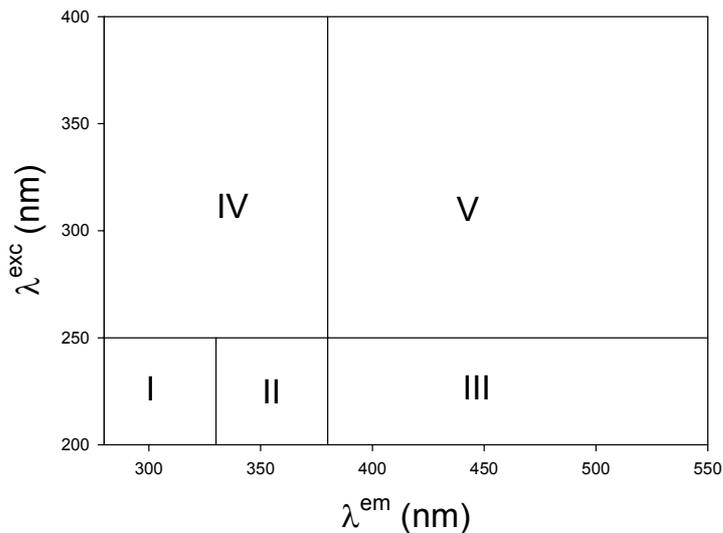
Muestra	% C	% N	C / N
AHA	42 ± 1 <sup>(a)</sup>	0.9 <sup>(b)</sup>	46.7
AHA <sub>puff</sub>	44.1 <sup>(c)</sup>	ND	ND
AH IHSS	46 ± 2	1.5 <sup>(b)</sup>	30.7
AF IHSS	65 ± 2	1.1 <sup>(b)</sup>	59.1
Ext. OH	16 ± 2	ND	ND
Ext. S	29 ± 1	2.5 ± 0.1	11.5

<sup>(a)</sup> Valores en el rango 38.5 - 44.1 fueron informados por Kollist-Siigur y col. 2001, Landgraf y col. 1999. <sup>(b)</sup> Valores suministrados por los proveedores. <sup>(c)</sup> Palazzi y col, 2007. ND: no determinado.

#### Matrices de emisión-excitación de fluorescencia (MEEF):

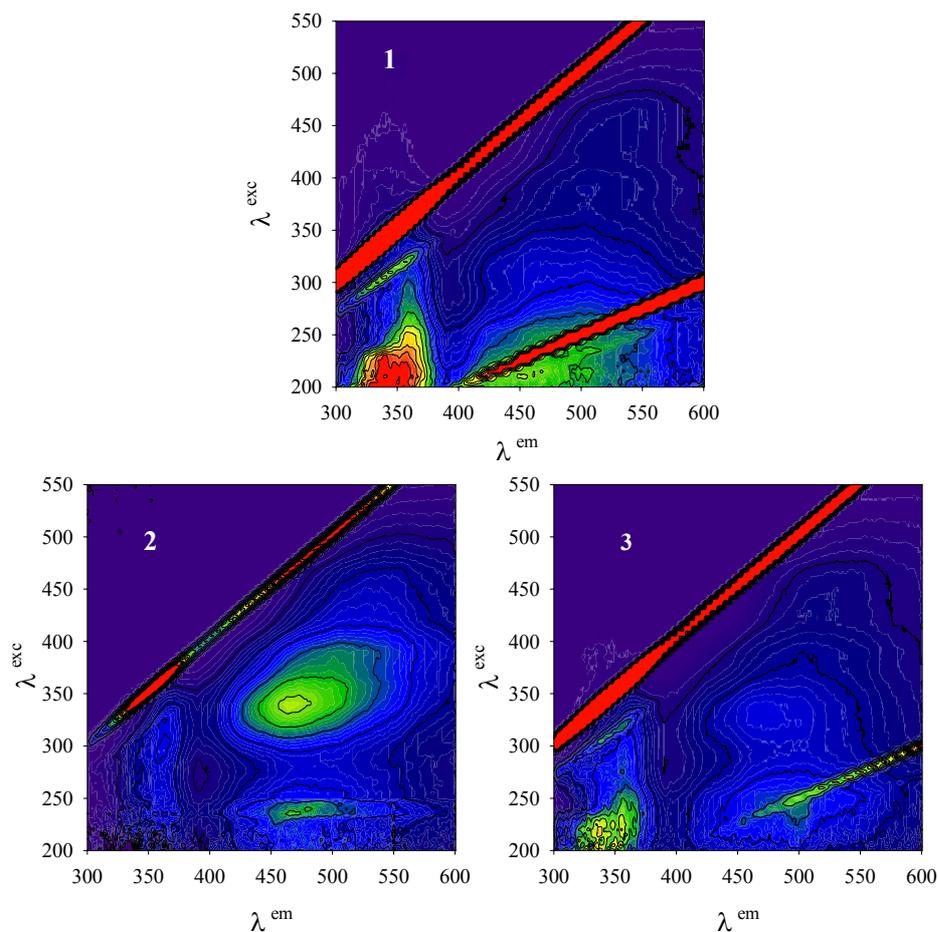
Se prepararon soluciones acuosas de las distintas SH, se ajustó el pH a  $7.0 \pm 0.1$  y la absorbancia a 550 nm a  $0.050 \pm 0.005$ . Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia excitando las muestras a distintas longitudes de onda entre 200 y 550 nm con incrementos de 5 nm. Los espectros obtenidos se corrigen por la respuesta del instrumento y se grafican en 3 dimensiones para obtener las matrices. Las matrices pueden dividirse en 5 regiones (Figura 3.1). Los picos en cada región se han asignado a compuestos orgánicos del tipo húmicos, fúlvicos, tirosínicos, triptofánicos o fenólicos, [Chen y col. 2003; Coble, 1996; Coble y col., 1993; Coble y col., 1990]. En general, picos a longitudes de onda de excitación cortas (<250 nm) y longitudes de onda de emisión cortas (<350 nm) se asocian al aminoácido tirosina y a proteínas simples con alto contenido de este tipo de aminoácidos aromáticos (Regiones I y II) [Ahmad y Reynolds, 1999; Determann y col., 1994]. Picos correspondientes a longitudes de onda de excitación corta (< 250 nm) y a mayores longitudes de onda de emisión se relacionan con los ácidos fúlvicos (Región III) [Mounier y col., 1999 (a)]. Los picos que corresponden a longitudes de onda de excitación intermedias (250-280 nm) y longitudes de onda de emisión cortas (< 380 nm) están relacionados a productos solubles de degradación microbiana (Región IV) [Coble, 1996, Ismaili y col, 1998;

Reynolds y Ahmad, 1997]. Picos a longitudes de onda de excitación más largas ( $> 280$  nm) y también longitudes de onda de emisión más largas ( $> 380$  nm) están relacionados con la presencia de ácidos húmicos (Región V) [Artinger y col., 2000; Miano y col., 1990; Mounier y col., 1999 (b)]. Datos de MEEF para longitudes de onda menores que 240 nm no han sido ampliamente publicados, aunque pueden ser medidos en forma confiable con los avances recientes que proveen fuentes de excitación estable a estas longitudes de onda.

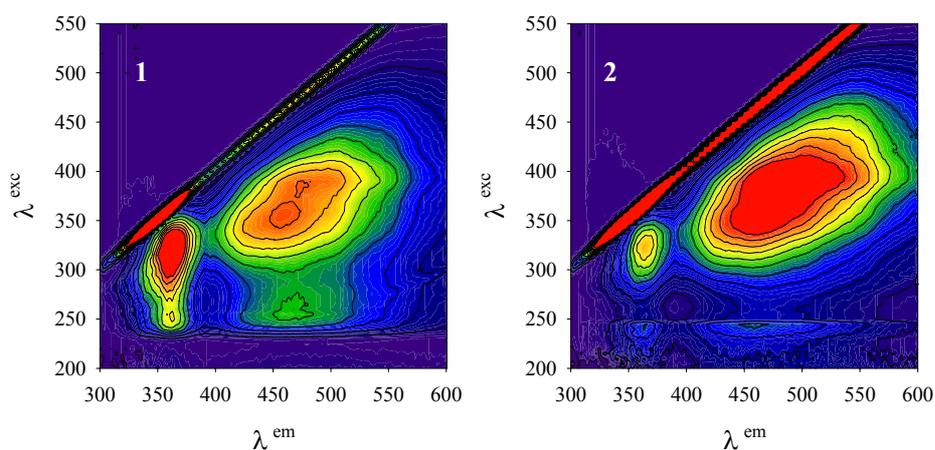


**Figura 3.1:** Regiones de la MEEF mencionadas en el texto.

En las Figuras 3.2 y 3.3 se muestran respectivamente las MEEF obtenidas con las SH comerciales y las extraídas en el laboratorio.



**Figura 3.2:** MEEF de las SH comerciales en solución acuosa a pH 7. 1) AHA, 2) AF IHSS, 3) AH IHSS. Las líneas rojas son luz de excitación de primer y segundo orden y Raman del agua.



**Figura 3.3:** MEEF de las SH extraídas a partir de vermicompost (1) y de suelo (2), en solución acuosa a pH 7. Las líneas rojas son luz de excitación de primer y segundo orden y Raman del agua.

Las matrices de los extractos de vermicompost y de suelo muestran que la principal fluorescencia se enmarca en las regiones IV y V que corresponden a productos solubles del metabolismo microbiano y a los ácidos húmicos, respectivamente. Mientras que las SH comerciales muestran fluorescencia en todas las zonas (incluidas las zonas III y V, correspondientes a los ácidos fúlvicos y húmicos respectivamente).

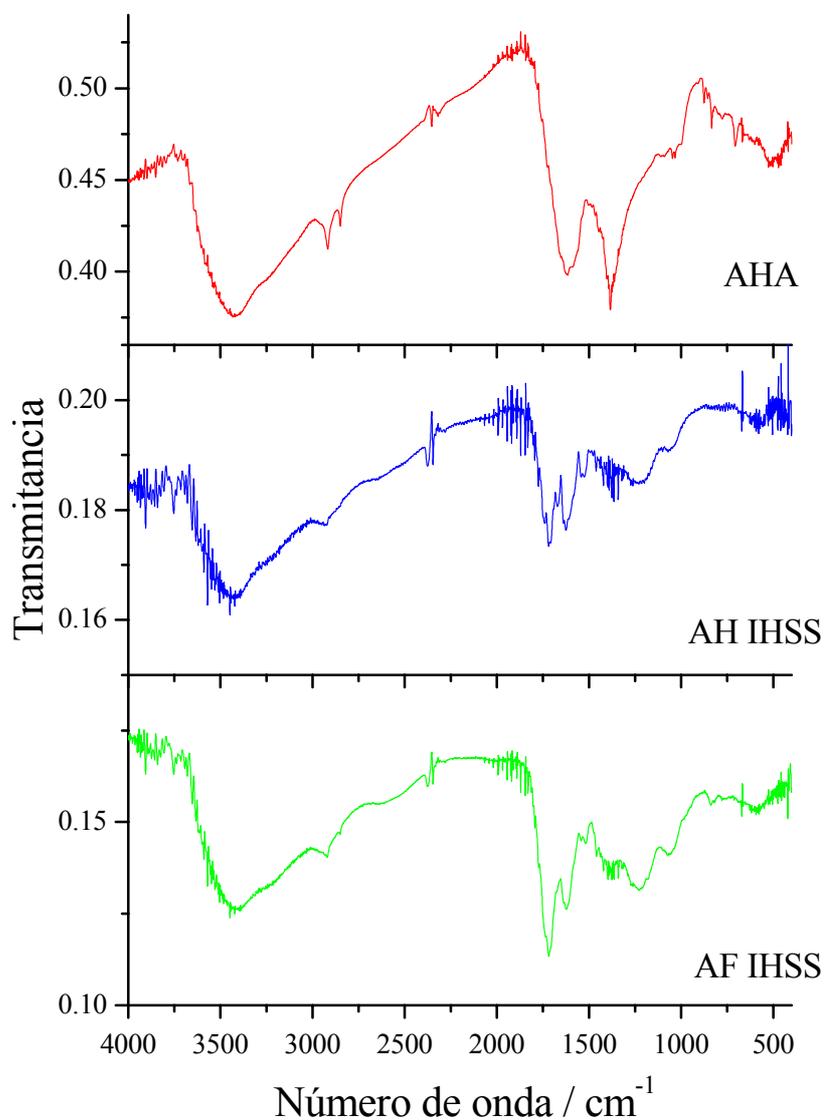
La MEEF del Ext. OH muestra máximos de fluorescencia excitando a 320 nm con emisión entre 350 y 360 nm (región IV) y a  $\lambda^{\text{exc}} = 355$  y  $\lambda^{\text{em}}$  entre 450 y 465 (región V), mientras que para el Ext. S aparece excitando a 390 con emisión entre 475 y 485 nm. Para el AHA el máximo se encuentra en la región de  $\lambda^{\text{exc}} = 205$  nm emitiendo entre 320 y 370 nm. De las SH de la IHSS, el AH muestra una zona de fluorescencia intensa a  $\lambda^{\text{exc}}$  entre 315 y 340 nm con emisión entre 460 y 485 nm, y el AF para  $\lambda^{\text{exc}}$  entre 230 y 240 nm emitiendo entre 460 y 470 nm.

Christl y colaboradores [Christl y col., 2000] investigaron la relación entre la heterogeneidad química de las SH extraídas de suelo en relación con su peso molecular, para lo cual emplearon un esquema de fraccionamiento usando ultrafiltración por fibra hueca obteniendo fracciones de 10-30 kDa, 30-100 kDa, 100-300 kDa y mayores a 300 kDa, y se analizaron las fracciones obtenidas por análisis elemental y distintas técnicas espectroscópicas (espectroscopia UV-Visible, resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , FT-IR, y fluorescencia). Estos autores encontraron que la MEEF de los ácidos fúlvicos exhibe un pico a longitudes de onda de excitación y emisión menores que los ácidos húmicos [Christl y col., 2000]. Este comportamiento se atribuye a la presencia de fracciones formadas por sistemas condensados de alto peso molecular con sustituyentes aceptores de electrones y a un mayor grado de conjugación en los ácidos húmicos [Senesi y col., 1991; Mobed y col., 1996]. En tanto, un bajo grado de policondensación aromática, pequeñas cantidades de cromóforos conjugados y la presencia de sustituyentes dadores de electrones en la estructura de los ácidos fúlvicos contribuyen a las longitudes de onda de excitación y emisión relativamente bajas y altas intensidades de fluorescencia observadas en comparación con los ácidos húmicos [Senesi y col., 1991; Mobed y col., 1996].

Se observa un aumento en las longitudes de onda del máximo de excitación y emisión con la disminución del peso molecular de las distintas fracciones de ácidos húmicos [Christl y col., 2000]. Este corrimiento al rojo de los máximos de fluorescencia con la disminución del peso molecular de las fracciones de ácidos húmicos se corresponde bien con el % de C aromáticos determinado por resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ . La gran diferencia entre los espectros de fluorescencia de las fracciones de menor peso molecular de ácidos húmicos con las de ácidos fúlvicos sugiere entornos químicos diferentes a pesar de que ambas fracciones presentan distribuciones de peso molecular similares.

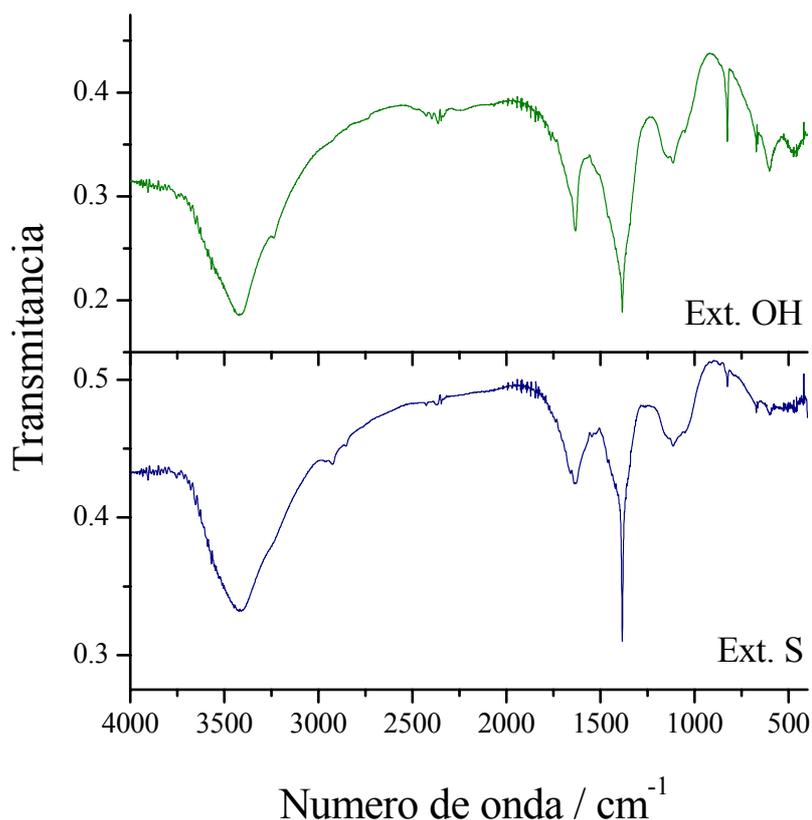
### Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

En las Figuras 3.4 y 3.5 se muestran los espectros de absorción IR obtenidos para las muestras de SH comerciales y extraídas, respectivamente.



**Figura 3.4:** Espectros de FTIR de las muestras de SH comerciales.

En la Tabla 3.3 se listan las principales bandas de absorción en el IR para las SH y su asignación a los diferentes grupos funcionales [Andjelkovic y col., 2006; Song y col., 2001; Amir y col., 2003; Lguirati y col., 2005; Samios y col., 2007].



**Figura 3.5:** Espectros de FTIR de las muestras de SH extraídas.

La banda de absorción IR más importante en todas las muestras analizadas es la que se centra alrededor de los  $3400\text{ cm}^{-1}$  y corresponde al estiramiento del enlace O-H de los grupos alcohol alifático, fenol o ácido carboxílico [Andjelkovic y col., 2006]. Las bandas a  $2920$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  [Andjelkovic y col., 2006; Song y col., 2001] son características de los estiramientos de los enlaces C-H. La absorción a  $1720\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento del enlace C=O de los grupos COOH. Las bandas que aparecen entre  $1600$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  son debidas al estiramiento del enlace C=O en carboxilatos, cetonas y ácidos carboxílicos. El pico a  $1400\text{ cm}^{-1}$  es debido al bending del enlace C-H alifático y al estiramiento asimétrico del  $\text{COO}^-$ . Las bandas en  $1511$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$  son debidas al estiramiento del enlace C=C y a deformaciones del enlace N-H.

**Tabla 3.3:** bandas de IR y su asignación

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación de la banda
775-975	Bending fuera del plano del C–H aromático.
1030-1080	Estiramiento C–O–C de éteres aromáticos, carbohidratos y polisacáridos
1170	Vibraciones del grupo alcohol.
1200-1260	Estiramiento C–OH de grupos aromáticos y estiramiento C–O–C de éteres arílicos y fenoles.
1380-1400	Deformación de los O–H, estiramiento C–O de fenoles, estiramiento anti-simétrico COO <sup>-</sup> y deformación C–H en alifáticos.
1440-1460	Deformación C–H alifáticos en ácidos grasos y grasas durante el proceso de compostaje.
1510- 1540	Estiramiento C-C de aromáticos, deformación N–H.
1580-1600	Estiramiento C=N en amidas secundarias y C=O en quinonas, ácidos cetónicos y amidas
1630- 1650	Estiramiento C=C de aromáticos, estiramiento C=O en quinonas, ácidos cetónicos y amidas primarias.
2680- 2685	Estiramiento de OH con puentes de H.
2850	Estiramiento asimétrico C-H de –CH <sub>3</sub> y –CH <sub>2</sub> – en cadenas alifáticas.
2920-2930	Estiramiento C-H alifático (simétrico y asimétrico) de –CH <sub>3</sub> y –CH <sub>2</sub> –.
3300- 3500	Vibraciones de los grupos O–H de fenoles, alcoholes y ácidos carboxílicos y vibraciones de los N–H de amidas y aminas.

Los valores del grado de aromaticidad pueden calcularse a partir de los cocientes de los picos a 1650/2920 y 1650/2850, y del grado de policondensación (1034/2920, 1034/2850 y 1034/1540) [Amir y col., 2003] para cada una de las muestras se listan en la Tabla 3.4. El pico a 1650 se debe principalmente al estiramiento de los dobles enlaces conjugados de los compuestos aromáticos. Los picos a 1540, 2850 y 2920 cm<sup>-1</sup> se deben a los compuestos alifáticos, y sirven de referencia del contenido de C alifático. El pico en 1034 cm<sup>-1</sup> se asigna fundamentalmente a la presencia de estructuras aromáticas policondensadas del tipo de las ligninas [Amir y col., 2003].

**Tabla 3.4:** relación de las intensidades de absorbancia de los picos en los espectros FTIR obtenidos con las diferentes SH.

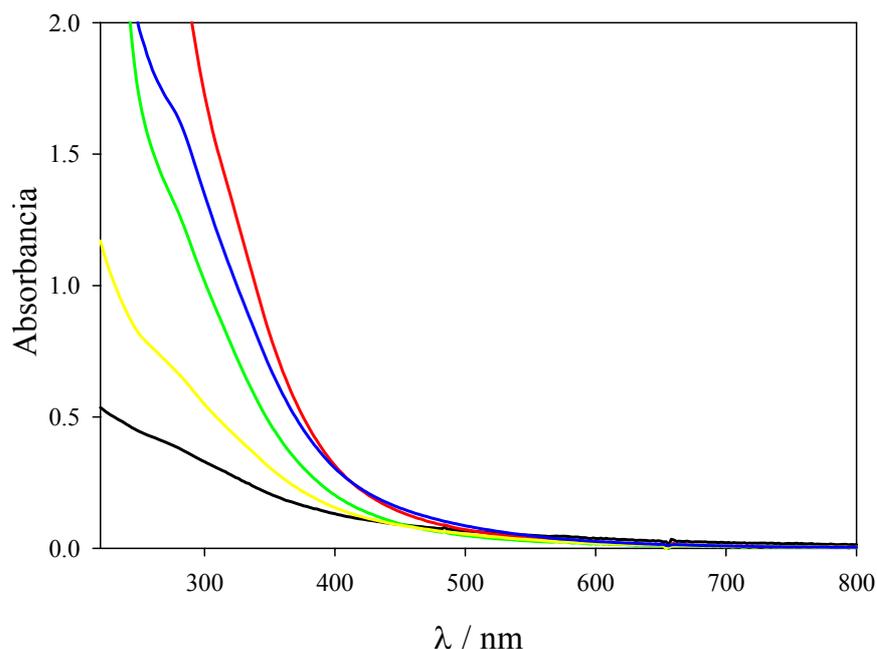
<b>Sustancia Húmica</b>	<b>1034/1540</b>	<b>1034/2850</b>	<b>1034/2920</b>	<b>1650/2850</b>	<b>1650/2920</b>	<b>1511/2920</b>	<b>1650/1540</b>	<b>1720/2920</b>
<b>AHA</b>	0.914	0.902	0.872	1.047	1.012	0.936	1.061	0.884
<b>AF IHSS</b>	1.014	1.020	0.998	1.078	1.055	0.987	1.072	1.109
<b>AH IHSS</b>	0.985	0.968	0.957	1.010	0.999	0.972	1.027	1.013
<b>Ext. OH</b>	0.919	1.009	0.981	1.310	1.273	1.094	1.193	1.032
<b>Ext. S</b>	0.992	0.973	0.938	1.056	1.018	0.940	1.077	0.935

La secuencia de aromaticidad obtenida del análisis de los espectros FTIR es: AH IHSS < AHA  $\approx$  Ext. S < AF IHSS < Ext. OH; mientras que la tendencia en el grado de policondensación es: AHA < Ext. S  $\approx$  Ext. OH  $\approx$  AH IHSS < AF IHSS. Se observó que existe correlación entre el grado de policondensación y la aromaticidad en las muestras analizadas.

#### Espectroscopía UV-visible

En la Figura 3.6 se muestran los espectros UV-visible de las diferentes muestras de SH, obtenidos a pH 7. De los mismos se obtuvo la relación E4/E6, como el cociente entre las absorbancias a 465 nm sobre el valor a 665 nm. Dicho parámetro es muy utilizado en la caracterización de la materia orgánica disuelta y en la comparación de SH de diferentes orígenes. Este cociente es independiente de la concentración de la sustancia húmica en la solución. La absorbancia a mayores longitudes de onda es indicativa de la presencia de moléculas de mayor tamaño, por lo que los valores del cociente E4/E6 se correlacionan inversamente con el peso molecular de las SH [These, 2005] y con el contenido de anillos aromáticos [Lguirati y col., 2005]. Por otro lado E4/E6 correlaciona positivamente con el número de grupos ácidos carboxílicos [Chen y col., 1977].

Como el pH de la solución afecta el peso molecular promedio, el cociente E4/E6 depende del pH y las comparaciones con diferentes SH deben hacerse midiendo los espectros con soluciones a un mismo valor de pH.



**Figura 3.6:** espectros UV-visible de soluciones acuosas de las distintas SH de concentraciones 20 mg L<sup>-1</sup>, ajustadas a pH 7. AHA (negro), Ext. S (rojo), Ext. OH (verde), AH IHSS (amarillo), AF IHSS (azul).

Las relaciones E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> para todas las muestras listados en la Tabla 3.5 siguen la siguiente tendencia: Ext. OH < Ext. S < AHA < AF IHSS < AH IHSS. Se observó una correlación inversa entre el cociente E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> y el grado de policondensación determinado por FTIR.

**Tabla 3.5:** parámetros espectroscópicos de las diferentes SH.

Sustancia Húmica	Conc (mg L <sup>-1</sup> )	A <sup>465</sup>	A <sup>665</sup>	E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub>
AHA	16.1	0.1133	0.0153	7.41
AH IHSS	19.8	0.0923	0.0111	8.32
AF IHSS	23.1	0.1627	0.0174	9.35
Ext. S	18.9	0.1697	0.0332	5.11
Ext. OH	26.3	0.1207	0.0285	4.24

#### Imágenes de pseudomicelas de las sustancias húmicas

Se investigó la formación de pseudomicelas de AHA en solución por microscopía detectando la fluorescencia de TMPyP a  $\lambda^{\text{em}} = 650$  nm. Se prepararon muestras a diferentes pHs y se observó también el efecto de la formación de pseudomicelas en presencia de diversos

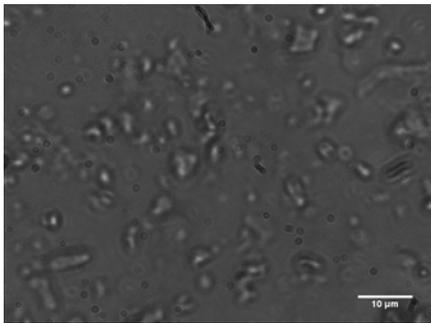
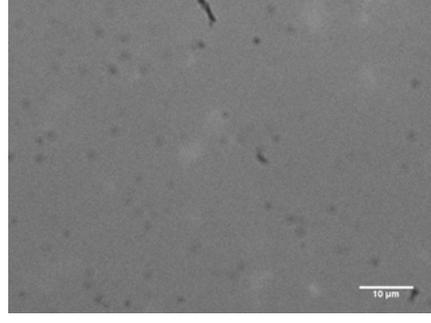
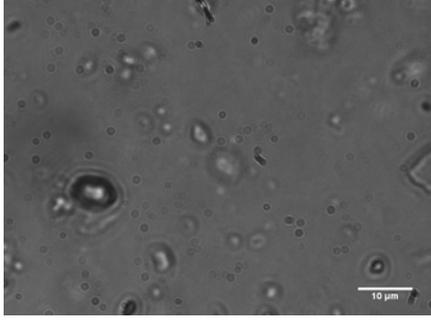
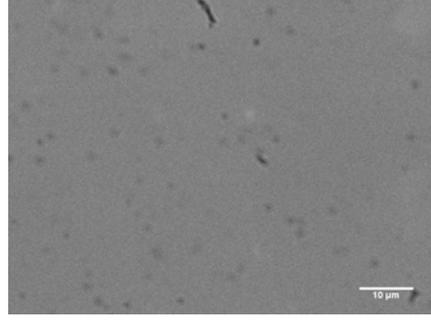
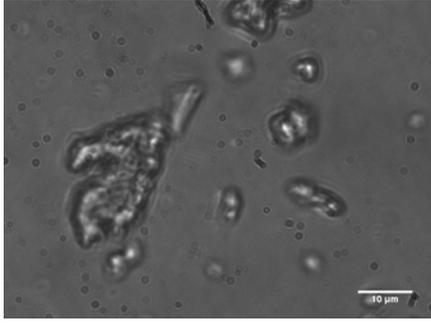
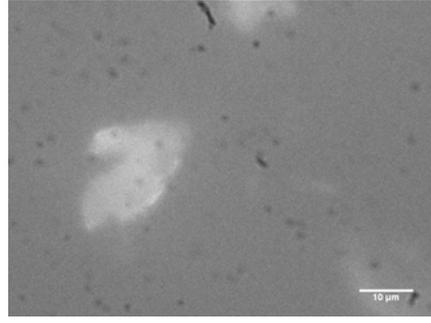
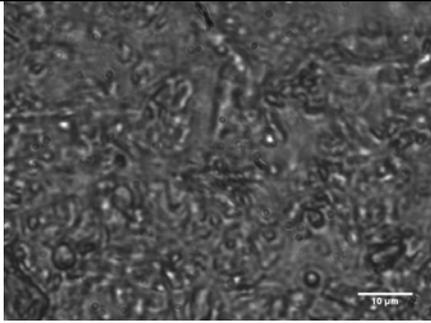
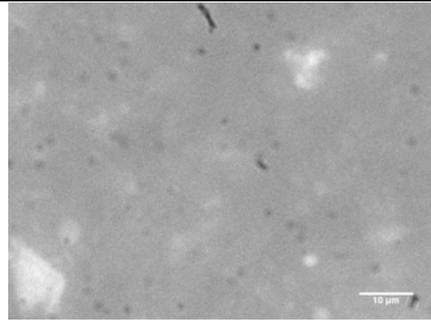
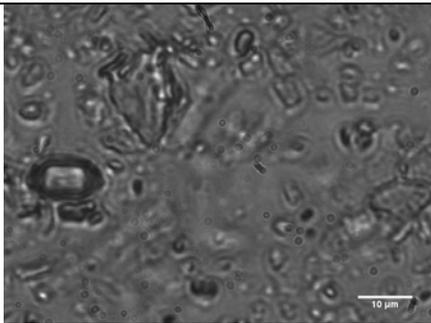
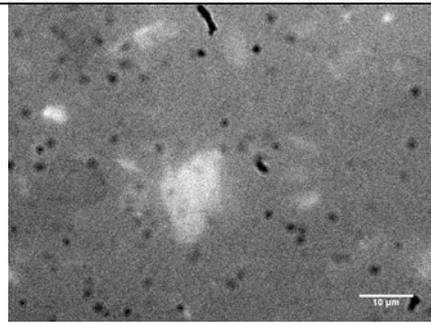
electrolitos como peroxodisulfato de sodio y sulfato de cobre (II). El agregado de peroxodisulfato se hizo para observar si en las condiciones experimentales en las que se realizaron los ensayos con radicales inorgánicos oxidantes (ver capítulo siguiente), las SH son capaces de asociarse y formar agregados. El agregado de iones  $\text{Cu}^{+2}$  se realizó porque se conoce que estos iones son capaces de favorecer la generación de agregados desordenados del tipo de las pseudomicelas [Baalousha y col., 2006]. Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Prof. Peter Ogilby en Aarhus, Dinamarca.

Si bien las SH fluorescen, los blancos en los que la solución de AHA se mezcló con un volumen igual de agua destilada, no presentaron emisión a 535 nm.

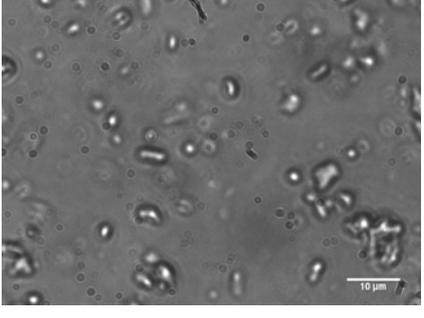
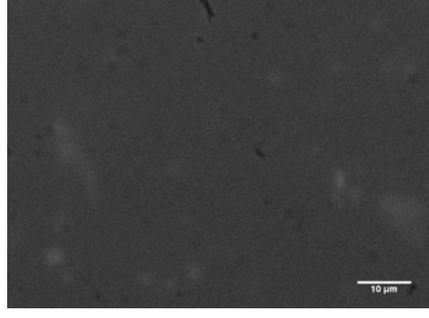
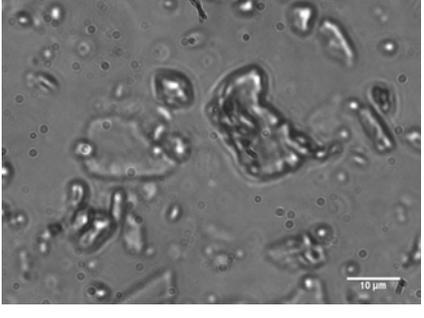
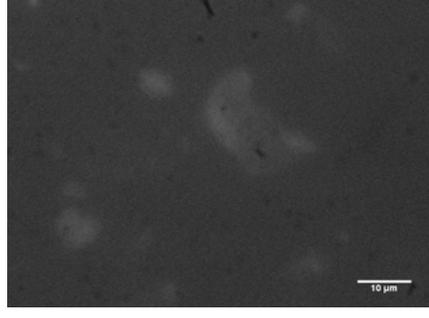
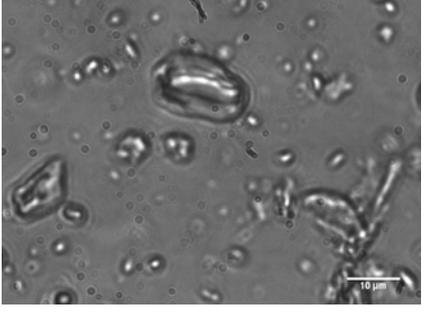
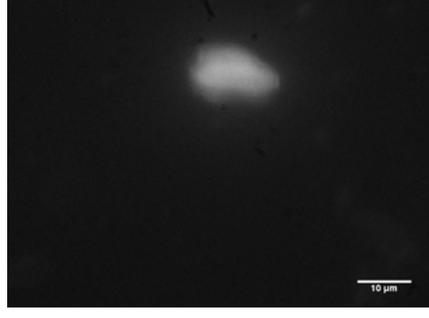
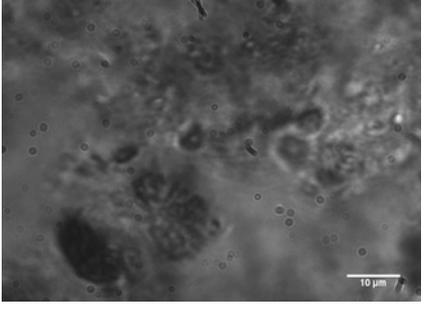
El ajuste de pH de las muestras se hizo con  $\text{HNO}_3$  o  $\text{NaOH}$ . Las imágenes que dicen “PS” contienen 0.01 M de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  y las que dicen Cu contienen 0.1 M  $\text{CuSO}_4$ . Los resultados se muestran en la Tabla 3.6.

Se observa que sin agregado de sales, a  $\text{pH} = 4$  el tamaño de las pseudomicelas es más pequeño que a otros pHs. No se encontraron pseudomicelas más grandes que las que se muestran en la foto en todo el preparado. En cambio a  $\text{pH} 6$  y  $10$  se encontraron pseudomicelas grandes y pequeñas (ver fotos). Se observa que el agregado de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  en concentraciones del orden de las empleadas en los experimentos de flash-fotólisis aumenta el tamaño de las pseudomicelas formadas a  $\text{pH} 4$ , cuando en ausencia de peroxodisulfato solo se observaron pseudomicelas pequeñas a ese pH. Además, en presencia de peroxodisulfato se ven pseudomicelas muy brillantes, las que contienen mayor concentración de la porfirina dentro de ellas. Esto puede explicarse por la asociación entre el  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  y el AHA, lo que incrementa la cantidad de cargas negativas dentro de la pseudomicela, capaces de interaccionar con la porfirina cargada positivamente. Por otro lado, en presencia de  $\text{Cu(II)}$  el tamaño de los agregados es más grande que los observados en presencia de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  o a  $\text{pH} \geq 6$ . [Baalousha y col., 2006; Andelković y col., 2004; Engebretson y von Wandruska, 1997]. En el ensayo en presencia de  $\text{Cu(II)}$  por emisión no pudo observarse nada. Se ha descrito para otros cationes divalentes (Zn, Pd) la formación de un complejo con el  $\text{TMPyP}$ , que disminuye o desactiva la fluorescencia de la porfirina [Anula y col., 2006]. Se publicaron también resultados similares de desactivación de la fluorescencia de porfirinas por iones  $\text{Cu(II)}$  [Weng y col., 2007].

**Tabla 3.6:** imágenes microscópicas de las pseudomicelas de AHA obtenidas en diferentes condiciones experimentales.

Muestra	Imagen de transmisión	Imagen de fluorescencia
AHA pH 4		
AHA pH 6 pequeñas		
AHA pH 6 grandes		
AHA pH 10 pequeñas		
AHA pH 10 grandes		

**Tabla 3.6, continuación:** imágenes microscópicas de las pseudomicelas de AHA obtenidas en diferentes condiciones experimentales.

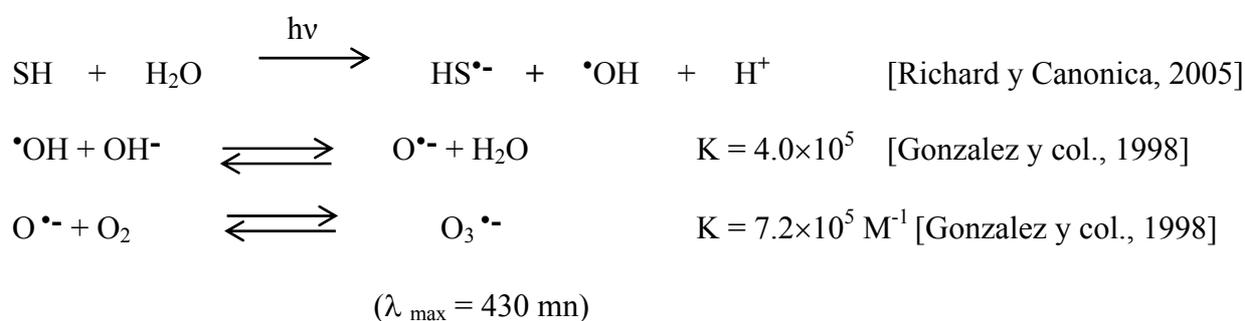
Muestra	Imagen de transmisión	Imagen de fluorescencia
AHA pH 4 PS pequeñas		
AHA pH 4 PS grandes		
AHA pH 4 PS brillantes		
AHA pH 4 Cu		

## ***Caracterización de los radicales libres generados por fotólisis de soluciones de sustancias húmicas comerciales y del extracto.***

Se fotolizaron soluciones de SH en diferentes condiciones para estudiar la generación de radicales libres y determinar su reactividad.

### Radical hidroxilo:

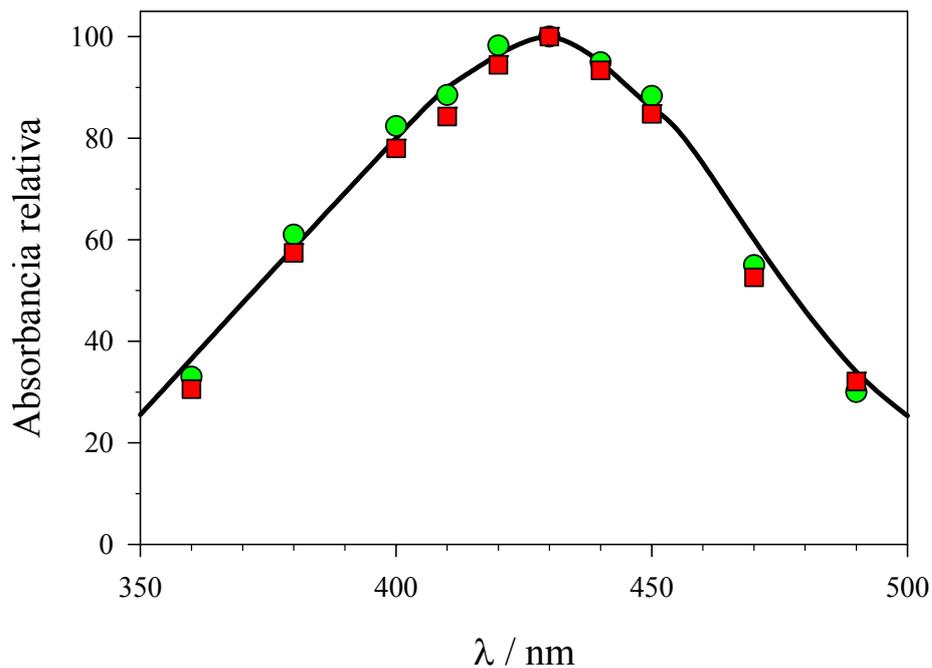
La generación de radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) se evidenció a partir de la formación del radical ozónido ( $\text{O}_3^{\bullet-}$ ), en soluciones saturadas en  $\text{O}_2$  de pH fuertemente alcalino. Esto es posible debido a que en esas condiciones experimentales tienen lugar las siguientes reacciones:



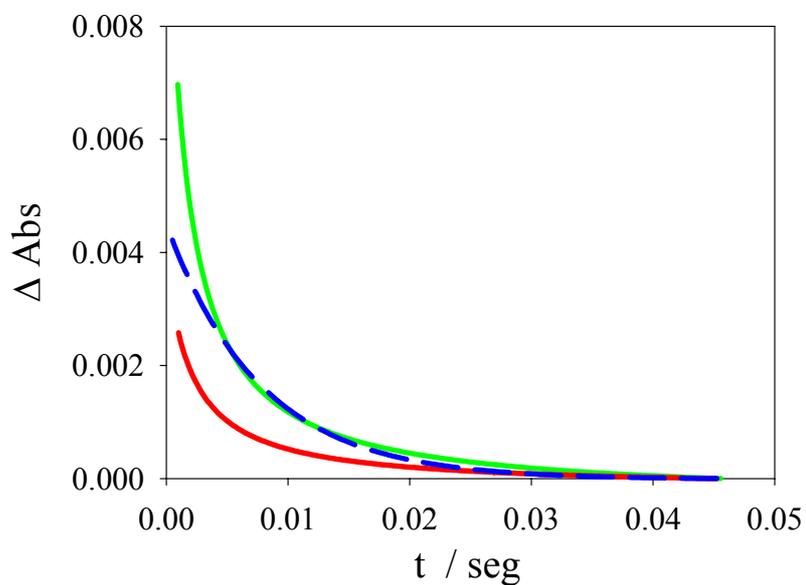
El radical  $\text{O}_3^{\bullet-}$  se caracterizó por su espectro, comparando el obtenido experimentalmente con el publicado en bibliografía [Sehested y col., 1982; Felix y col., 1967], tal como se muestra en la Figura 3.7.

También se realizó el análisis cinético del decaimiento del radical  $\text{O}_3^{\bullet-}$  a  $\lambda = 430 \text{ nm}$  en condiciones de saturación en  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ , aire, y en presencia de  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  de tolueno saturado de  $\text{O}_2$ , como se observa en la Figura 3.8. El agregado de tolueno compite con el oxígeno molecular por el radical hidroxilo, según la reacción.





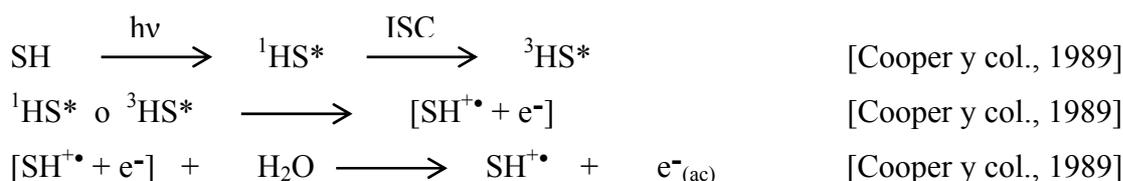
**Figura 3.7:** Espectro del radical  $O_3^{\bullet-}$  obtenido por fotólisis de soluciones acuosas de AHA (círculos verdes) o el extracto alcalino de vermicompost (cuadrados rojos), ajustadas a pH 13 y saturadas en  $O_2$ , comparados con el publicado en bibliografía (línea negra).



**Figura 3.8:** Decaimientos del radical  $O_3^{\bullet-}$  a  $\lambda_{anal} = 430$  nm, formado por fotólisis de AHA en soluciones acuosas de pH 11 saturadas en  $O_2$  (línea verde), en  $O_2$  con  $1 \times 10^{-3}$  M tolueno (línea roja), y en aire (línea azul).

### Electrón hidratado:

Se realizaron ensayos de flash-fotólisis para obtener el espectro del electrón hidratado  $e^-_{(ac)}$ . Se midieron los cambios de absorbancia a 700 nm de soluciones de AHA saturadas en Ar (para eliminar el oxígeno disuelto), con una celda de 25 cm de camino óptico. Sin embargo en estos experimentos no se vieron señales, debido a la alta reactividad del  $e^-_{(ac)}$  con las SH y el oxígeno que pudo haberse disuelto durante el ensayo. Por ello se evidenció su formación indirectamente, mediante su reacción con el ácido tricloroacético (ATCA) para liberar iones cloruro, proponiendo el mecanismo:



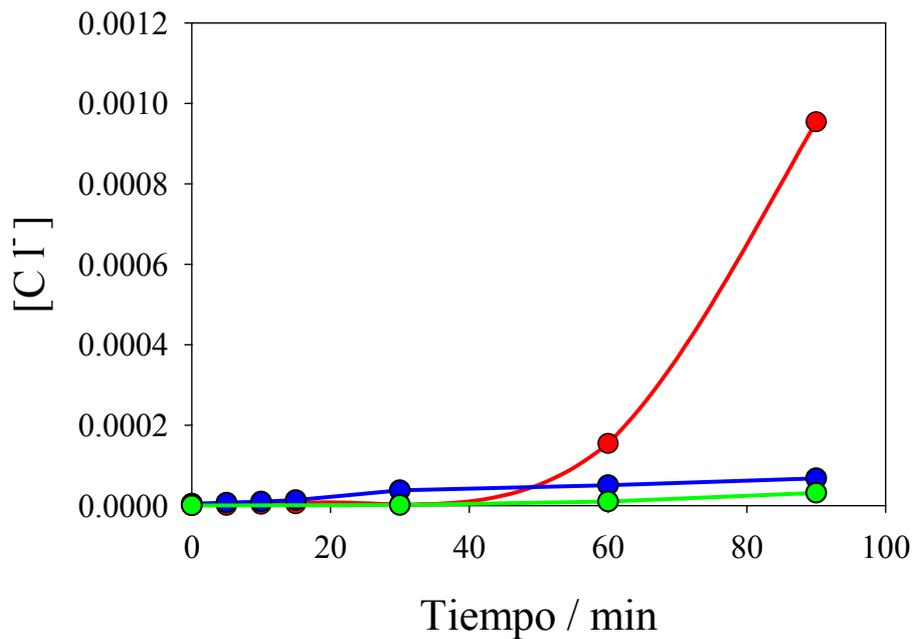
Para varias sustancias cloradas se propuso:



Es de esperar que en presencia de oxígeno esta reacción se vea inhibida por la reacción



Se realizaron ensayos de irradiación continua con luz de  $\lambda > 250$  nm de soluciones de ATCA, con o sin AHA y en diferentes concentraciones de  $\text{O}_2$ . Se observó que en ausencia de SH, el ATCA no se degrada. En presencia de AHA, el ATCA se mineraliza eficientemente, tanto en ausencia como en presencia de  $\text{O}_2$ . Sin embargo, sólo en ausencia de  $\text{O}_2$  se observa liberación del cloro orgánico como  $\text{Cl}^-$ , indicando la participación del  $e^-_{(ac)}$ .



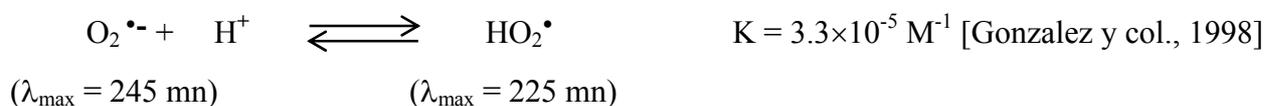
**Figura 3.9:** Evolución temporal de la concentración de cloruro durante la irradiación de soluciones acuosas de ATCA  $1 \times 10^{-3}$  M (en verde), o la misma solución con 20 ppm de AHA, saturada en aire (en azul) o en Ar (en rojo).

#### Radicales superóxido e hidroperóxido:

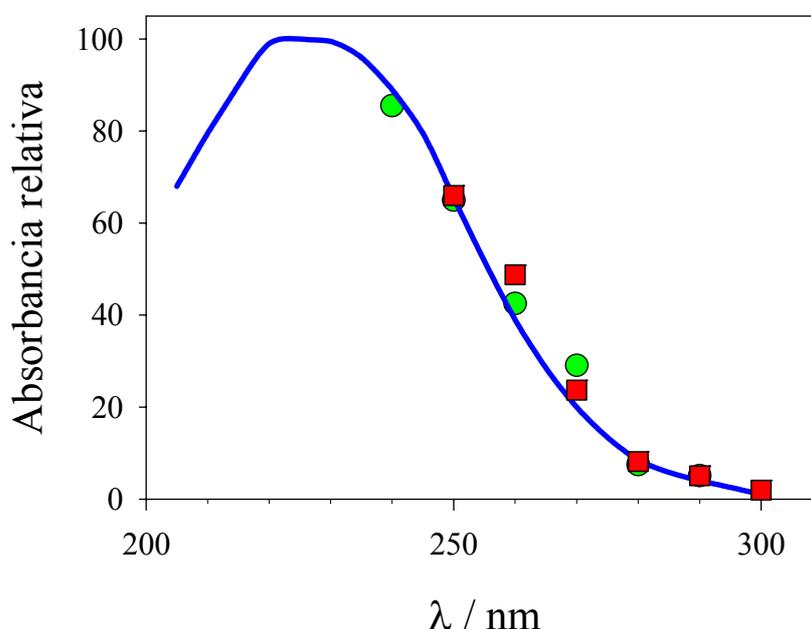
Se estudió la generación de los radicales superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroperóxido ( $HO_2^{\bullet}$ ), que se encuentran en equilibrio ácido-base. Para ello se realizaron experimentos de fotosensibilización de SH en diferentes condiciones de pH y concentración de oxígeno molecular disuelto. Las reacciones que generan estos radicales, aparte de las mostradas en el punto anterior, son:



En presencia de grupos amino presentes en las SH, se produce la reacción



Los radicales  $O_2^{\bullet-}$  /  $HO_2^{\bullet}$  se caracterizaron mediante el análisis de sus decaimientos en distintas concentraciones de  $O_2$  disuelto (solución saturada en aire y en oxígeno), a distintos valores de pH (3, 7 y 9). También se obtuvo el espectro del radical  $HO_2^{\bullet}$  a partir de la irradiación de soluciones de ácido húmico Aldrich o del extracto alcalino de vermicompost (ambas ajustadas a pH 3 y en concentraciones 1 ppm) saturadas en oxígeno, el cual se comparó con el de bibliografía [Bielski y Ritcher, 1977], como se muestra en la Figura 3.10. Con nuestro equipo y diseño experimental no pude medir por debajo de 240-250 nm, debido a que a esas longitudes de onda la lámpara de análisis posee baja potencia, el fotomultiplicador poca respuesta y la muestra de SH alta absorbancia.



**Figura 3.10:** Espectros del radical  $HO_2^{\bullet}$  obtenido del análisis bilineal de decaimientos por fotólisis de soluciones de ácido húmico Aldrich (círculos verdes) y del extracto alcalino de VC (cuadrados rojos) saturadas en  $O_2$ , a pH 3. La línea azul representa el espectro publicado para este radical.

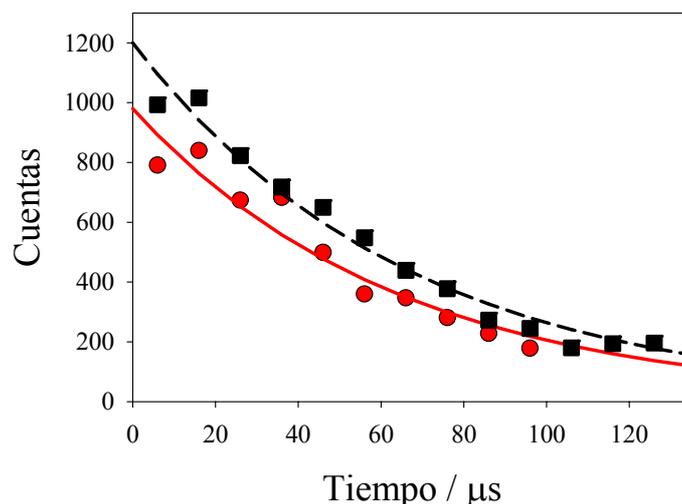
#### Oxígeno singlete:

La producción de oxígeno singlete ( $O_2(^1\Delta_g)$ ) sensibilizada por SH se detectó empleando como fotosensibilizadores ácidos húmicos de origen comercial (Aldrich, AHA) y extracto alcalino de vermicompost (Ext. OH) en agua deuterada. Debido a los bajos rendimientos cuánticos de producción de  $O_2(^1\Delta_g)$ ,  $\Phi_{\Delta}$ , debió utilizarse un equipo de muy alta sensibilidad cuya operación se basa en la detección por la técnica de single photon counting (SPC) de la de la emisión en el infrarrojo cercano (1270 nm) producida por el decaimiento del oxígeno del estado excitado  $^1\Delta_g$  al

estado fundamental  $^3\Sigma_g^-$ . Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Prof. Peter Ogilby en Aarhus, Dinamarca.

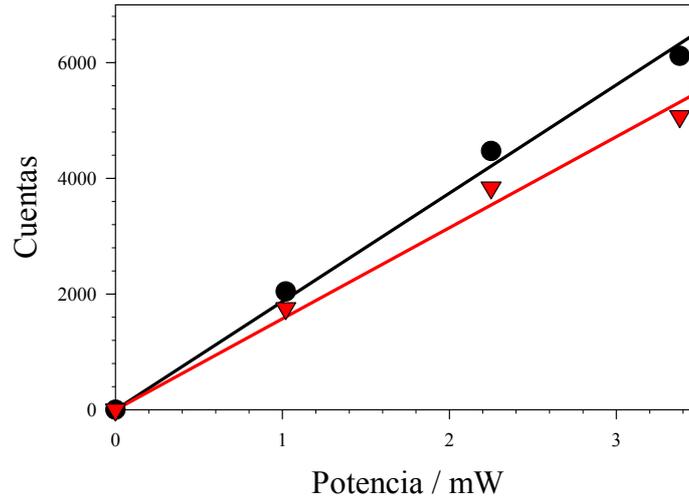
Se emplearon soluciones saturadas en aire del AHA y del Ext. OH, ambas de  $A^{400} = 0.61 \pm 0.01$ . Los decaimientos obtenidos en ambos casos se muestran en la Figura 3.11. Las señales de fosforescencia de las soluciones se ajustan a un decaimiento monoexponencial con valores de vida medias de  $O_2(^1\Delta_g)$  obtenidas en  $D_2O$  de  $62 \mu s$ , los que coinciden con los valores publicados en dicho solvente [Wilkinson y col; 1995].

Con el objeto de determinar el valor de  $\Phi_\Delta$  para el extracto se tomaron señales de fosforescencia a diferentes potencias del láser empleando el método comparativo [Ogilby y Foote; 1982]. Así, las amplitudes de las señales extrapoladas a tiempo cero ( $I_0$ ) para ambas muestras (AHA y Ext. OH) se graficaron en función de la potencia del láser obteniéndose las rectas que se muestran en la Figura 3.12.



**Figura 3.11:** Decaimiento de fosforescencia de  $O_2(^1\Delta_g)$  a partir de la fotosensibilización por AHA (en rojo) o el extracto alcalino (en negro).

El valor de  $I_0$  es proporcional a la potencia del láser, a la fracción de luz absorbida ( $1 - 10^{-A}$ ) y a  $\Phi_\Delta$  [Paul y col., 2005]. Los valores de  $\Phi_\Delta$  para las SH disminuye al aumentar la longitud de onda de excitación [Scully y col., 1997, Haag y Hoigné, 1986]. El rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete del AHA disminuye de  $2.0 \times 10^{-3}$  a  $1.1 \times 10^{-3}$  cuando la longitud de onda de la luz de irradiación aumenta de 365 a 434 nm. [Haag y col, 1984]. Por lo tanto, a partir del cociente de las pendientes de las líneas rectas mostradas en la Figura 3.12 para los dos sensibilizadores y del valor de  $\Phi_\Delta$  para AHA se estimó el  $\Phi_\Delta$  para EAVC, obteniéndose el valor de  $(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ .



**Figura 3.12:** Gráfico de  $I_0$  en función de la potencia del láser para el AHA (en rojo) y el extracto alcalino de vermicompost (en negro)

Las SH actúan no sólo en la producción de  $O_2(^1\Delta_g)$ , sino también en su decaimiento [Hessler y col., 1996]. Por lo que el valor aparente de  $\Phi_\Delta$  estará determinado por la presencia de cromóforos que generan  $O_2(^1\Delta_g)$  como sensibilizadores y de grupos reactivos que actúen de quenchers. En las condiciones experimentales empleadas, el tiempo de vida del  $O_2(^1\Delta_g)$  observado,  $\tau_\Delta$ , coincide con el valor reportado en  $D_2O$ , lo que indica que el quenching es despreciable. Haag y Hoigné demostraron que las fracciones de menor peso molecular poseen rendimientos cuánticos de producción de  $O_2(^1\Delta_g)$  mayores, basados en ensayos de fraccionamiento de SH de diferentes orígenes por cromatografía de exclusión molecular en gel [Haag y Hoigné., 1986]. Por lo tanto, el valor de  $\Phi_\Delta$  depende tanto de la longitud de onda de excitación como de las características y concentración de las SH.

## Capítulo IV.- Reactividad de sustancias húmicas con radicales oxidantes.

Para estudiar de que manera afecta a los tratamientos oxidativos de degradación de contaminantes *in situ* (ISCO) la presencia de materia orgánica en suelos y aguas naturales se investigó la reacción de las sustancias húmicas (SH) con distintos radicales oxidantes. Se trabajó con SH de origen comercial y extraídas en el laboratorio a partir de compost de lombriz, con los radicales aniones sulfato ( $\text{SO}_4^{\bullet-}$ ) y bicloruro ( $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ ), y el átomo de cloro ( $\text{Cl}^{\bullet}$ ). El primero es uno de los radicales más usados en las tecnologías ISCO [Huling y Pivetz, 2006]. Los dos radicales de cloro son generados durante los tratamientos oxidativos de ambientes naturales con elevado contenido de iones cloruro [Buxton y col., 1999; Buxton y col., 1998; Huie y Clifton, 1990; Jayson y col., 1973].

### a.- Radical anión sulfato.

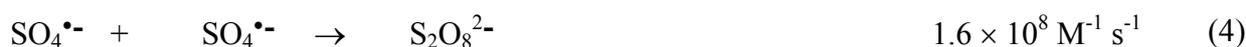
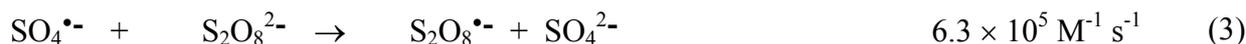
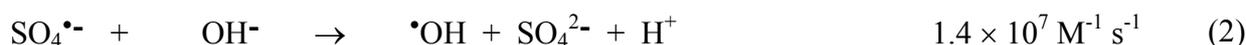
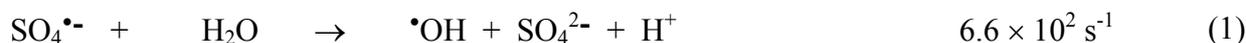
Se realizaron ensayos de flash-fotólisis convencional de soluciones acuosas de peroxodisulfato  $1 \times 10^{-2}$  M en el intervalo de temperaturas de 283.2 a 303.2 K. En estas condiciones se observó la formación de una especie que absorbe entre 300 y 550 nm, cuyo espectro y cinética de decaimiento coinciden con los publicados en bibliografía para el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  [McElroy y Waygood 1990; Choure y col, 1997] (Figura 4.1), y por lo tanto se pueden asignar a esta especie las trazas observadas. En las condiciones experimentales utilizadas, el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  decae con una cinética mixta de primer y segundo orden simultáneas, con constantes de velocidad  $k_{prim}$  (la constante de velocidad del radical con el agua, con los iones oxhidrilo y peroxodisulfato, reacciones 1 a 3) y  $k_{seg}$  (la constante de velocidad del proceso de recombinación, reacción 4), respectivamente. El factor de peso para cada proceso depende de la intensidad del flash y de la concentración de peroxodisulfato [McElroy y Waygood 1990]. Las trazas de absorbancia fueron ajustadas con la Ecuación 4.1:

$$A(t, \lambda) = \frac{k_{prim}}{b(\lambda) \times \exp(k_{prim} \times t) - c(\lambda)} + d(\lambda) \quad \text{Ec. 4.1}$$

Donde  $A(t, \lambda)$  es la absorbancia en función del tiempo y la longitud de onda,  $c(\lambda) = 2 k_{seg} / \varepsilon(\lambda) l$  (con  $\varepsilon(\lambda)$  = el coeficiente de absorción a esa longitud de onda y  $l$  = camino óptico),  $b(\lambda) = c(\lambda) + k_{prim} / A_0(\lambda)$  (con  $A_0(\lambda)$  la absorbancia inmediatamente después del flash),  $d(\lambda)$  es la

absorbancia a tiempos muy largos y corresponde a la formación de productos estables de reacción. Para los experimentos en ausencia de sustancias húmicas, este término es nulo. En los ensayos en presencia de las distintas SH toma valores muy pequeños.

Tabla 4.1: reacciones que intervienen en el decaimiento del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  (constantes de velocidad obtenidas de NIST, [Ross y col., 1998]), en solución acuosa en ausencia de SH.



El valor obtenido para  $k_{\text{seg}}$  a 293 K es de  $4.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , en concordancia con los valores publicados en bibliografía en similares condiciones ( $\text{pH} = 4.5$ ,  $I = 3 \times 10^3 \text{ M}$ ) [Ross y col., 1998]. El valor de la constante de primer orden  $k_{\text{prim}}$  a 293 K obtenido es  $1.7 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ , similar a otros obtenidos por nuestro grupo [Bosio y col., 2005]. Esta constante engloba, como ya se dijo, las reacciones del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  con el agua y con los iones  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  y  $\text{OH}^-$ . Valores similares para dicha constante global en condiciones experimentales muy similares han sido publicados por Buxton ( $1500 \text{ s}^{-1}$  [Buxton y col., 2000]).

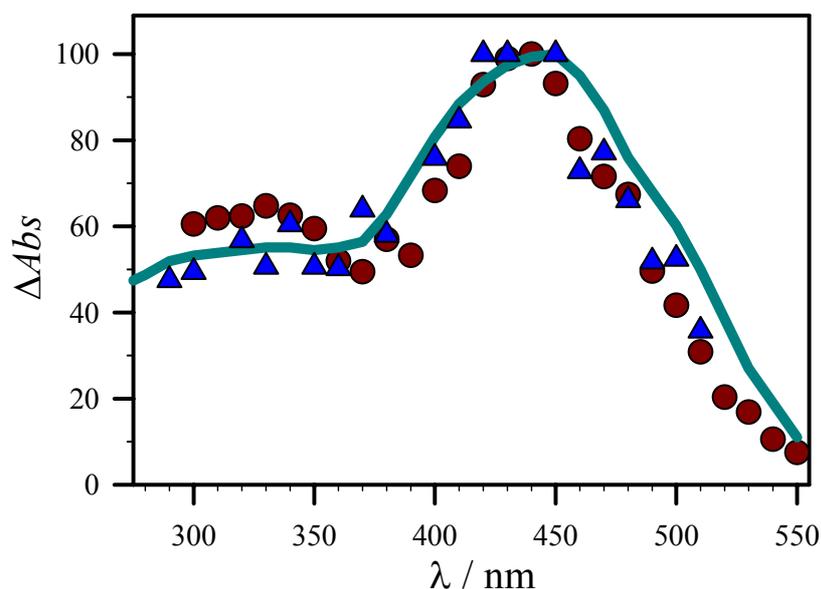
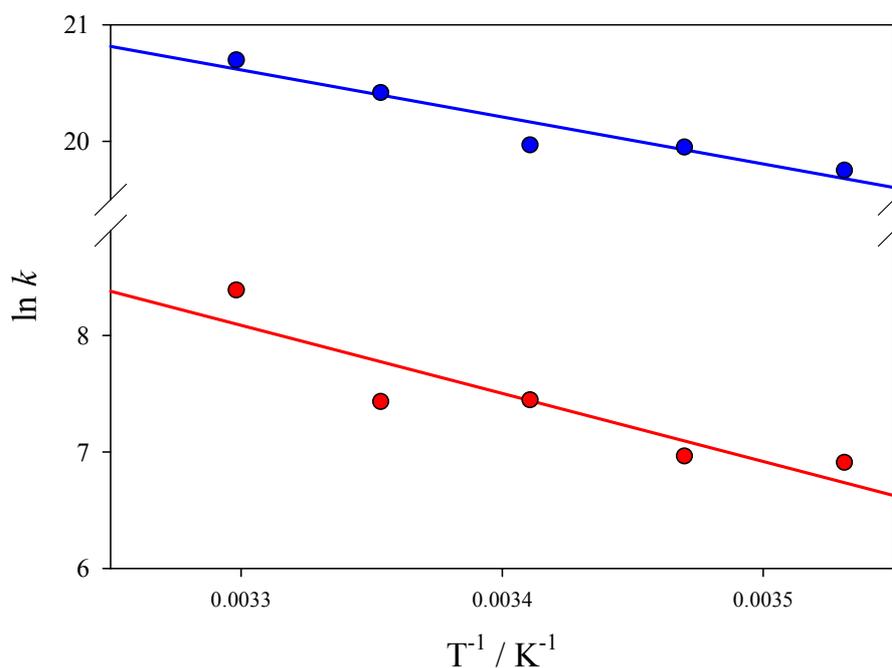


Figura 4.1: Espectro de absorción normalizado inmediatamente después del flash, correspondiente al valor de  $A(\lambda)$  a tiempo cero obtenido del ajuste de la eq. 1, para soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  0.01 M en ausencia de SH (●) y en presencia de  $400 \mu\text{gL}^{-1}$  de AHA (▲). La línea sólida representa el espectro de bibliografía para el radical sulfato [McElroy y Waygood 1990].

El análisis de las trazas obtenidas con soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $1 \times 10^{-2}$  M a diferentes temperaturas en el intervalo estudiado permite calcular las energías de activación para los procesos englobados en las dos constantes de velocidad. Los gráficos de Arrhenius para  $k_{\text{prim}}$  y  $k_{\text{seg}}$  se muestran en la Figura 4.2. A partir de las pendientes de estos gráficos, se obtuvieron los valores de energías de activación de  $(49 \pm 13)$  y  $(8.4 \pm 1.9)$   $\text{kJ mol}^{-1}$  para los decaimientos de primer y segundo orden, respectivamente. El moderado efecto de la temperatura en  $k_{\text{seg}}$  ya había sido informado por George y Chovelon [George y Chovelon, 2002]. Ervens [Ervens, 1997] obtuvo una energía de activación de  $(7 \pm 3)$   $\text{kJ mol}^{-1}$  que concuerda con el valor encontrado.

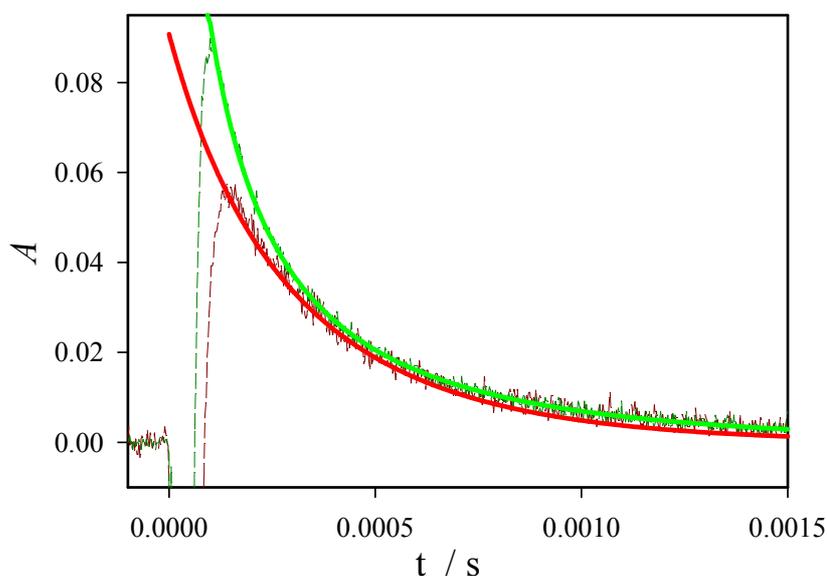


**Figura 4.2:** Gráficos de Arrhenius para  $k_{\text{prim}}$  (●) y  $k_{\text{seg}}$  (▲), obtenidas de los ajustes de los datos con la Ecuación 4.1 de las trazas de flash-fotólisis a 450 nm de soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  0.01 M.

Para el estudio de la reactividad del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  con las distintas SH, se fotolizaron soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $1 \times 10^{-2}$  M, en presencia de concentraciones crecientes de SH. Se ensayaron el ácido húmico Aldrich (AHA) comercial y el AHA purificado, los ácidos húmico y fúlvico de turba de Waskish de la IHSS (AH IHSS y AF IHSS) y el extracto de vermicompost (Ext. OH). Los experimentos de flash-fotólisis de soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  con  $400 \mu\text{gL}^{-1}$  de AHA se observó la formación de un radical cuyo espectro de absorción coincide con el publicado para el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  (Figura 4.1) [McElroy y Waygood 1990].

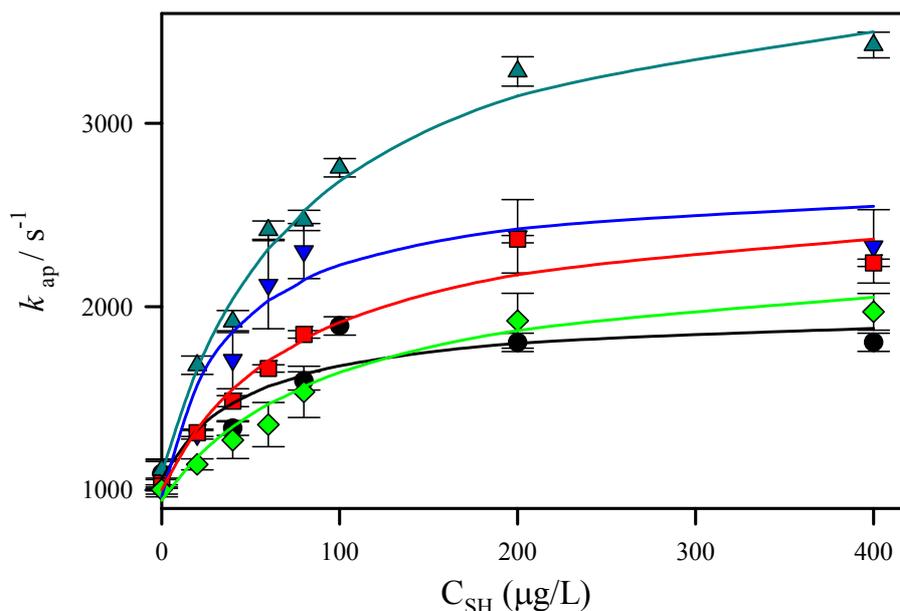
Para evitar la producción de otros radicales por la fotólisis de las SH, se colocó en la camisa externa de la celda de fotólisis una solución de mayor concentración de SH a modo de filtro, para que la luz que ingresa a la celda sea absorbida principalmente por el peroxidisulfato.

Las trazas obtenidas a 450 nm con soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $1 \times 10^{-2}$  M en presencia de SH de diferentes orígenes en el intervalo de 0 a  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  fueron ajustadas a una cinética de orden mixto con la Ecuación 4.1, con  $k_{\text{ap}}$  la constante de decaimiento del  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  en lugar de  $k_{\text{prim}}$ . El peso de la componente de segundo orden disminuye a medida que aumenta la concentración de sustancias húmicas, y para concentraciones del orden de los  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  los datos se pueden ajustar muy bien con una cinética de primer orden. Los decaimientos para el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  a 450 nm, obtenidos por flash-fotólisis convencional de soluciones acuosas 0.01 M de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  en presencia de  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  de AHA o en ausencia del mismo y a 293.2 K, se muestran en la Figura 4.3.



**Figura 4.3:** Decaimiento a 450 nm con soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  0.01 M en ausencia de AHA (rojo) o en presencia de  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  de AHA (verde), a 293.2 K. Las líneas sólidas corresponden a las simulaciones de los datos experimentales para las dos concentraciones de AHA.

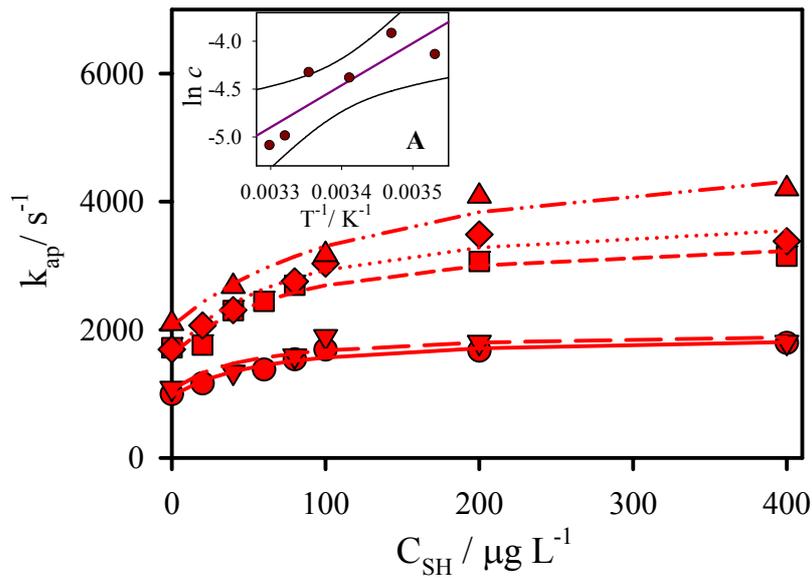
$k_{\text{ap}}$ , aumenta con la concentración de SH expresada en  $\mu\text{g L}^{-1}$ , alcanzando un valor constante para altas concentraciones de sustancias húmicas. (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6). Se han encontrado desviaciones a los comportamientos lineales tipo Stern-Volmer en experimentos con sustancias húmicas. Por ejemplo, Lang y col. observaron una curvatura descendente en el gráfico de Stern-Volmer de la titulación con  $\text{Cu}^{2+}$  de la fluorescencia de sustancias húmicas. Este comportamiento fue asignado a la presencia simultánea de quenching estático y dinámico de los estados singletes excitados [Lang y col., 1997]. Hessler y col. estudiaron el quenching de la fosforescencia en estado estacionario del oxígeno singlete a 1270 nm por SH de diferentes orígenes. El gráfico de Stern-Volmer del quenching muestra una fuerte desviación debida a la interacción entre el sensibilizador (Rosa de Bengala) y las SH [Hessler y col., 1996].



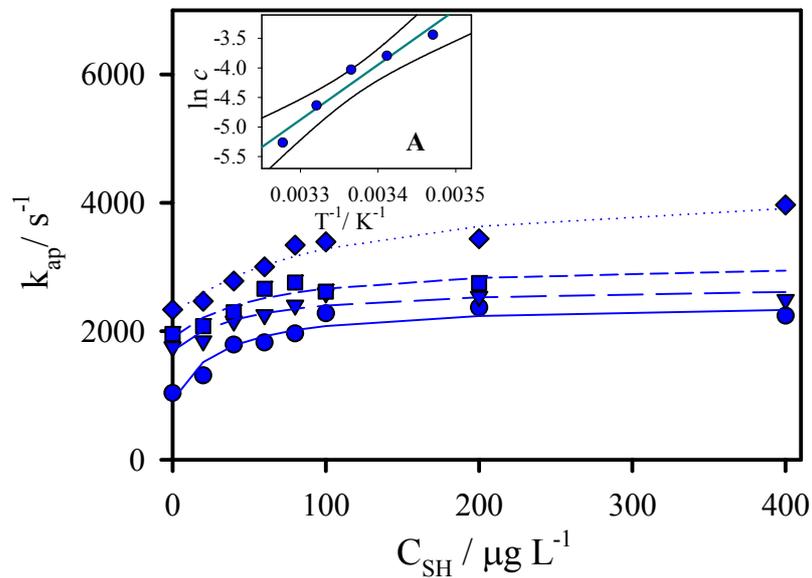
**Figura 4.4:** Gráfico de  $k_{ap}$  contra la concentración de sustancias húmicas, obtenido a partir de la fotólisis de soluciones acuosas conteniendo  $1 \times 10^{-2}$  M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  a 293.2 K, y diferentes muestras de SH: AHA (●), AHA purificado (▲), AH IHSS (▼), AF IHSS (■), y Ext. OH (◆). Las líneas muestran el ajuste de los datos según la Ecuación 4.2.

Se observa que la purificación del AHA no modifica en forma cualitativa la dependencia de  $k_{ap}$  con la concentración, sólo varían los valores de las constantes observadas del ajuste (ver Tabla 4.2). Las constantes de velocidad obtenidas con el AHA purificado son mayores que las que se obtienen con el ácido comercial. Esto puede deberse a la presencia de iones metálicos y material inorgánico presente en el AHA no purificado que contribuya a disminuir el tiempo de vida del radical sulfato.

Las Figuras 4.5 y 4.6 muestran la dependencia de  $k_{ap}$  con la  $C_{SH}$  en experimentos realizados con AHA y AF IHSS a diferentes temperaturas en el intervalo 283.2 a 303.2 K.

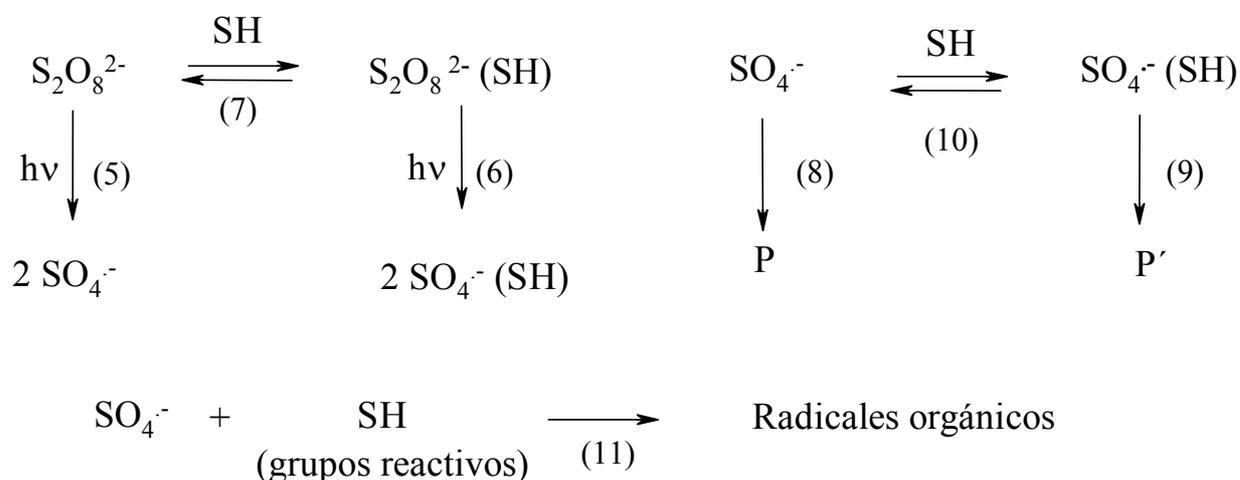


**Figura 4.5:** Gráfico de  $k_{ap}$  contra la concentración de AHA, obtenido a partir de la fotólisis de soluciones acuosas conteniendo  $1 \times 10^{-2}$  M  $Na_2S_2O_8$ , a diferentes temperaturas de trabajo: 283.2 K (●), 288.2 K (▲), 293.2 K (■), 298.2 K (◆), y 303.2 K (▼). Las líneas muestran el ajuste de los datos según la Ecuación 4.2. **Recuadro:** gráfico de Van't Hoff de  $\ln c$  contra  $T^{-1}$  para el AHA.



**Figura 4.6:** Gráfico de  $k_{ap}$  contra la concentración de AF IHSS, obtenido a partir de la fotólisis de soluciones acuosas conteniendo  $1 \times 10^{-2}$  M  $Na_2S_2O_8$ , a diferentes temperaturas de trabajo: 289.2 K (●), 293.2 K (▲), 297.2 K (■), y 301.2 K (◆). Las líneas muestran el ajuste de los datos según la Ecuación 4.2. **Recuadro:** gráfico de Van't Hoff de  $\ln c$  contra  $T^{-1}$  para AF IHSS.

Los resultados se pueden interpretar con un mecanismo como el que se muestra en el Esquema 4.1. El mecanismo transcurre por la asociación reversible del anión  $S_2O_8^{2-}$  a las SH. Se ha publicado para otros aniones como cromato, arseniato, arsenito, sulfato, silicato y fosfato, su capacidad de unirse a las SH [Sanjay y col., 1999; Sachs y col., 2004].



Esquema 4.1

La interacción del radical sulfato con las SH puede ser mediante abstracción de H o transferencia de carga con los grupos reactivos presentes (reacción 11), o por la partición con las SH (proceso reversible en el esquema, reacción 10). El radical sulfato asociado,  $SO_4^{\cdot -}(HS)$ , puede interpretarse como el radical sulfato en un ambiente diferente al del seno de la solución. Como se describió en el capítulo anterior, el AHA forma en solución acuosa pseudomicelas con diámetros de entre 1 y 10 micrones. El tamaño y las características de las mismas son afectados por la presencia de peroxodisulfato en la solución. Por otro lado, Myneni ha publicado la formación de dominios globulares en soluciones de ácidos húmicos y fúlvicos, de tamaños del orden de los 300 nm<sup>3</sup> [Myneni, 2002].

La dependencia experimental de la constante aparente  $k_{ap}$  con la concentración de las SH se puede ajustar bien con la Ecuación 4.2 para las diferentes SH empleadas:

$$k_{ap} = \frac{(a + b \times C_{SH})}{(1 + c \times C_{SH})} \qquad \text{Ec. 4.2}$$

Las reacciones 5 y 6 corresponden a la fotólisis del anión peroxodisulfato en solución o unido a las SH para generar respectivamente al radical sulfato libre o asociado. Estos radicales se encuentran en equilibrio, según la reacción reversible 10. La constante de velocidad  $k_8$  corresponde

al conjunto de reacciones de pseudo primer orden responsables del decaimiento del radical  $SO_4^{\bullet-}$  en ausencia de SH, y coincide con  $k_{prim}$ . El decaimiento de la concentración molar total de los radicales intermediarios de reacción,  $[I] = [SO_4^{\bullet-}] + [SO_4^{\bullet-} (HA)]$ , está dada por la Ecuación 4.3.

$$-\frac{d[I]}{dt} = k_4 [SO_4^{\bullet-}]^2 + k_8 [SO_4^{\bullet-}] + k_{11} [SO_4^{\bullet-}] [SH] + k_9 [SO_4^{\bullet-} (HS)] \quad \text{Ec. 4.3}$$

Si los radicales sulfato libres y ligados se encuentran en equilibrio rápido, se puede expresar la concentración total de intermediarios como  $[I] = [SO_4^{\bullet-}] (1 + K_{10} [SH])$ , y entonces el decaimiento del radical sulfato está dado por la Ecuación 4.4.

$$-\frac{d[SO_4^{\bullet-}]}{dt} = \frac{k_4 [SO_4^{\bullet-}]^2 + k_8 [SO_4^{\bullet-}] + (k_{11} + k_9 \times K_{10}) \times [SH] \times [SO_4^{\bullet-}]}{(1 + K_{10} [SH])} \quad \text{Ec. 4.4}$$

La Ecuación 4.4 predice una cinética de decaimiento de orden mixto para el radical  $SO_4^{\bullet-}$ , con una constante de velocidad de primer orden,  $k_{ap}$ , dependiente de la concentración de SH como se muestra en la Ecuación 4.5.

$$k_{ap} = \frac{(k_8 + (k_{11} + k_9 \times K_{10}) \times C_{SH})}{(1 + K_{10} \times C_{SH})} = \frac{(a + b \times C_{SH})}{(1 + c \times C_{SH})} \quad \text{Ec.4.5}$$

Si la principal especie que absorbe a 450 nm es el radical  $SO_4^{\bullet-}$  libre, la Ecuación 4.5 ajusta el valor de  $k_{ap}$ , de acuerdo a lo observado a partir del análisis de los datos experimentales con la Ecuación 4.2. Además, el espectro de absorción normalizado del radical sulfato obtenido en presencia de  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  de AHA y el obtenido en ausencia de SH son coincidentes, como se observa en la Figura 4.1.

La comparación de las ecuaciones 4.2 y 4.5 nos muestra que el parámetro  $a$  coincide con la constante  $k_8$ , el parámetro  $b$  con  $(k_{11} + k_9 \times K_{10}) / (10^6 \times \text{PM})$ , y que  $K_{10} = 10^6 \times c \times \text{PM}$ , donde PM es peso molecular nominal de la sustancia húmica.

Los valores de las constantes para las distintas SH se listan en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2:** Valores de los parámetros del ajuste de la Ecuación 4.2 a 293 K para las distintas SH.

Muestra	a / s <sup>-1</sup>	b / μg <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup>	c / μg <sup>-1</sup> L	c / mol(C) <sup>-1</sup> L
AHA	1100 ± 100	40 ± 10	0.013 ± 0.005	(4 ± 1) × 10 <sup>5</sup>
AHA <sub>purif</sub>	1090 ± 90	50 ± 10	0.012 ± 0.002	(3.3 ± 0.5) × 10 <sup>5</sup>
AH IHSS	1000 ± 200	70 ± 40	0.03 ± 0.01	(8 ± 2) × 10 <sup>5</sup>
AF IHSS	1000 ± 200	50 ± 20	0.02 ± 0.01	(4 ± 1) × 10 <sup>5</sup>
Ext. OH	1000 ± 100	24 ± 10	0.010 ± 0.005	(8 ± 2) × 10 <sup>5</sup>

El análisis de los comportamientos obtenidos para el AHA y el AF IHSS a diferentes temperaturas en el intervalo estudiado, nos permite obtener la dependencia con la temperatura de los parámetros b y c.

Del análisis de los gráficos de van't Hoff de  $\ln c$  vs.  $T^{-1}$  (recuadros de las Figuras 4.5 y 4.6) se obtienen los valores de la diferencia de entalpía para la reacción 10,  $\Delta H_{10}$  de  $-(37 \pm 11)$  kJ mol<sup>-1</sup> para el AHA y de  $-(76 \pm 10)$  kJ mol<sup>-1</sup> para el AF IHSS. No he encontrado en bibliografía datos termodinámicos para la asociación de aniones a sustancias húmicas, que me permita discutir los resultados de  $\Delta H_{10}$ . Tomando los valores publicados para el peso molecular nominal del AHA ( $4.7 \times 10^3$  g mol<sup>-1</sup> [O'loughlin y col., 2000],  $4.1 \times 10^3$  g mol<sup>-1</sup> [Perminova y col., 2003]) se obtiene un valor de  $K_{10}$  del orden de  $(6 \pm 2) \times 10^7$  a 298.2 K. A partir de estos valores, se calcula  $\Delta G_{10} = -RT \ln K_{10} = -44.7$  kJ mol<sup>-1</sup>, y por tanto  $T\Delta S_{10} = 7.7$  kJ mol<sup>-1</sup>. Por lo tanto el binding del anión esta controlado por la exotermicidad de la interacción con el AH, y el aumento entrópico podría deberse a la liberación de moléculas de agua de solvatación.

Para otras SH a 293 K se obtuvieron comportamientos similares para el ajuste de  $k_{ap}$  con la concentración, tal como se observa en la Figura 4.4. Los valores obtenidos de los ajustes se muestran en la Tabla 4.2. Para estas muestras no pudo calcularse el valor de  $K_{10}$  por no conocerse el peso molecular. El extracto alcalino de vermicompost puede contener además materia orgánica diferente a las sustancias húmicas.

Se realizaron ensayos para cuantificar la asociación del peroxodisulfato a las sustancias húmicas. Se prepararon soluciones de  $S_2O_8^{2-}$   $1 \times 10^{-2}$  M, AHA  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $S_2O_8^{2-}$   $1 \times 10^{-2}$  M con AHA  $400 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para separar el peroxodisulfato libre del asociado a las SH se ultracentrifugaron las soluciones durante 3hs a 60000 rpm y 10°C, con un equipo Beckman Coulter Optima MAX en el grupo del Dr. Balatti (INFIVE, UNLP). Para determinar la concentración de  $S_2O_8^{2-}$  en solución se agregó al sobrenadante una alícuota de solución patrón de sulfato ferroso amónico ( $[\text{Fe}^{+2}] = 1 \times 10^{-2}$  M) y el exceso de hierro (II) se tituló con solución recién valorada de  $\text{KMnO}_4$  [Vogel,

1947]. El peroxodisulfato asociado a las SH se calculó como la diferencia entre el total inicial y el libre en solución luego de la centrifugación.

Se titularon alícuotas de las soluciones de AHA, de  $S_2O_8^{2-}$  y de AHA +  $S_2O_8^{2-}$ , antes y después de la centrifugación, y se midieron los espectros UV-visible de las 6 muestras. Las concentraciones de  $S_2O_8^{2-}$  obtenidas para las soluciones sin centrifugar son: 0 M para la solución de AHA,  $(9.68 \pm 0.01) \times 10^{-3}$  M para la de  $S_2O_8^{2-}$  + AHA y  $(9.70 \pm 0.01) \times 10^{-3}$  M para la de  $S_2O_8^{2-}$ . Para la solución centrifugada de  $S_2O_8^{2-}$  + AHA la concentración es de  $(9.53 \pm 0.02) \times 10^{-3}$  M. En presencia de AHA, la concentración de peroxodisulfato asociado es 2% del valor de la concentración inicial, lo que implica que la asociación del  $S_2O_8^{2-}$  y el AHA (equilibrio 7), existe pero no es importante en el mecanismo de reacción planteado. A partir de estos resultados, se obtiene un valor de  $K_7 = 2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , el cual es mucho menor a  $K_{10}$ .

Para probar el mecanismo propuesto en el esquema 1 se realizaron simulaciones de los ensayos realizados a 293 K con diferentes concentraciones de AHA en el mismo intervalo que el experimental. Se considera que la absorción de la emisión de luz del flash por el  $S_2O_8^{2-}$  produce un delta de radicales  $SO_4^{\bullet-}$ . El valor de la concentración inicial del radical sulfato  $[SO_4^{\bullet-}]_0$  se estimó a partir de la extrapolación a tiempo cero del ajuste de la absorbancia medida en ausencia de SH, tomando el valor de  $\epsilon^{450}(SO_4^{\bullet-}) = 1650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [McElroy y Waygood, 1990]. Los experimentos en ausencia de AHA se reprodujeron bien considerando la concentración inicial del radical sulfato  $[SO_4^{\bullet-}]_0 = 5.5 \times 10^{-6} \text{ M}$  y,  $k_{\text{prim}} = 1.4 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ , y  $k_{\text{seg}} = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . En la Figura 4.3 se observa la buena concordancia entre los decaimientos experimentales y los simulados.

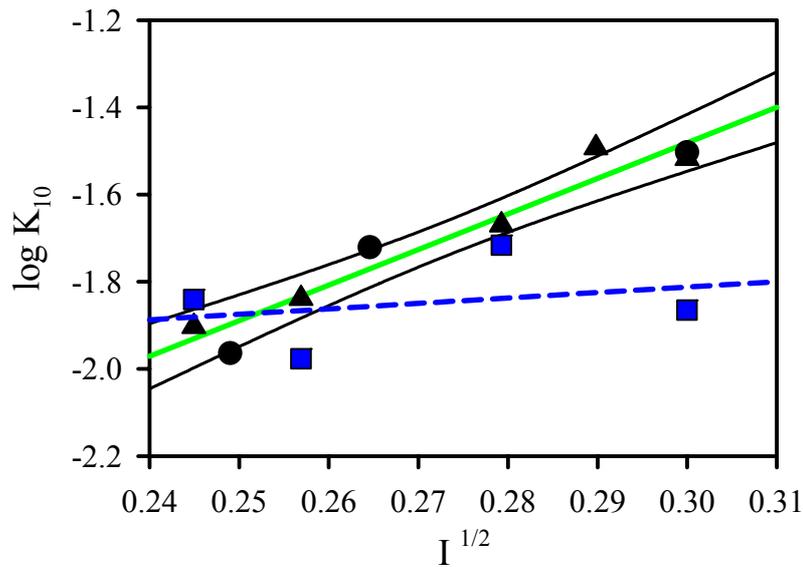
Para simular los ensayos en presencia de SH se usaron los mismos parámetros que para la simulación del radical sulfato en ausencia de SH. Los valores de las constantes de velocidad del radical sulfato con las SH utilizados en las simulaciones que mejor ajustaron los resultados experimentales fueron  $k_9 = 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $k_{11} = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y el peso molecular del AHA  $4.7 \times 10^3$  [O'loughlin y col., 2000]. Se consideró a las reacciones 10 y -10 como reversibles, sin suponer la condición de equilibrio. Para simular los perfiles de absorbancia a 450 nm se consideró la contribución de las dos especies de radical sulfato, libre y asociada.,  $SO_4^{\bullet-}$  y  $SO_4^{\bullet-}(\text{HA})$ . Asignándole al coeficiente de absorción a 450 nm del radical  $SO_4^{\bullet-}(\text{HA})$  valores en el intervalo desde 0 a  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , la contribución del mismo a la absorbancia es menor al 6% de la absorbancia total de la solución. Esto concuerda con nuestra suposición inicial de que la especie que absorbe principalmente a 450 nm es el radical sulfato libre. Se realizaron simulaciones con valores de  $k_{10}$  en el intervalo desde  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  hasta el límite difusional,  $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , pero manteniendo constante el valor de  $K_{10} = k_{10}/k_{-10} = 5.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Se observó que con valores de  $k_{10}$  menores a  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  no se podía simular los decaimientos experimentales, por lo que se tomó

a éste como el límite inferior en dicha constante. Con el valor determinado del contenido de carbono del AHA de 42%  $P/P$  y su peso molecular de literatura, se obtiene un valor de  $k_{10} > 6 \times 10^6 \text{ L mol(C)}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Para todas las concentraciones de AHA, la relación  $[\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{AHA})]/[\text{SO}_4^{\bullet-}] \times [\text{AHA}]$  calculada a partir de las simulaciones a tiempos entre los pocos microsegundos y el tiempo necesario para consumir la mitad del radical sulfato formado, ajusta el valor de la constante de equilibrio calculada con un error menor al 20%. Este resultado confirma la suposición de equilibrio entre las dos especies de radical sulfato obtenida de la resolución de los datos cinéticos, tal como se plantea en el esquema 1. Los decaimientos obtenidos con la simulación para diferentes concentraciones de AHA se ajustaron a una cinética de orden mixto con la Ecuación 4.1. Los valores de  $k_{ap}$  obtenidos se graficaron contra la concentración de AH, reproduciendo el comportamiento experimental como se puede ver en la Figura 4.8 Todos estos resultados están de acuerdo con el mecanismo propuesto.

No se encontraron en la literatura constantes de velocidad del radical sulfato con SH. Para reacciones del radical  $\text{HO}^{\bullet}$  con moléculas de gran tamaño y con grupos aromáticos, las constantes de velocidad publicadas varían en un intervalo de un orden de magnitud ( $10^7 - 10^8 \text{ L mol(C)}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [Westerhoff y col., 1999]. Este radical reacciona con los sitios reactivos de moléculas grandes con constantes de velocidad limitadas difusionalmente. Estas moléculas se pliegan sobre sí mismas bloqueando algunos sitios, por lo que las constantes de velocidad observadas son menores a las esperadas para el número de sitios reactivos presentes [Westerhoff y col., 1999]. El límite inferior para la constante de velocidad  $k_{10} > 6 \times 10^6 \text{ L mol(C)}^{-1}\text{s}^{-1}$  y las constantes publicadas para el radical  $\text{HO}^{\bullet}$  con sustratos similares, están de acuerdo con la reactividad de ambos radicales.

Para observar el efecto de la fuerza iónica (I) en la constante de equilibrio  $K_{10}$ , se realizaron ensayos de flash-fotólisis con soluciones de peroxodisulfato 0.01 M y diferentes concentraciones de AHA a 20°C, en presencia de concentraciones crecientes de distintos electrolitos. Para regular la fuerza iónica de las soluciones se les agregó sales de cationes mono y divalentes. El pH de la solución se ajustó a 4.7, donde los grupos ácidos del AHA están parcialmente deprotonados, y a 3.0, donde estos grupos están principalmente protonados [Andjelkovic y col., 2006].

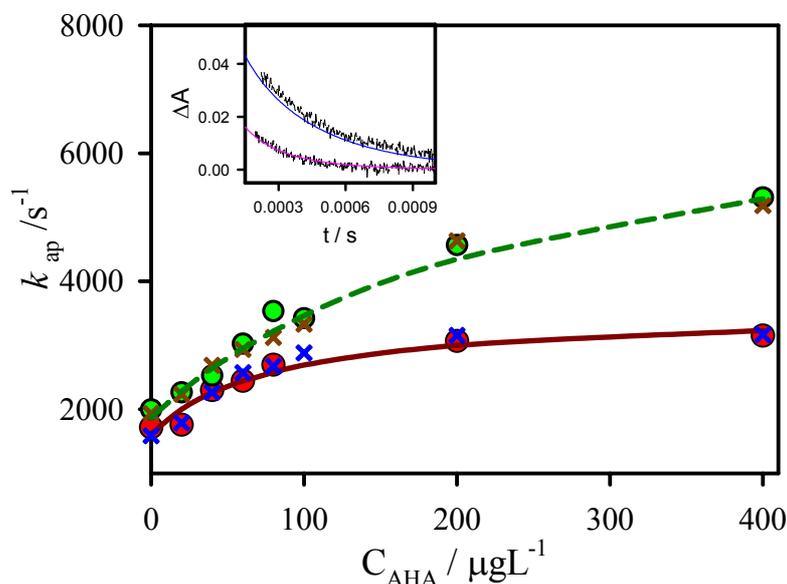


**Figura 4.7:** gráfico del  $\log K_{10}$  vs.  $I^{1/2}$  para experimentos con AHA a 293.2 K con el agregado de los electrolitos:  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  a  $\text{pH} = 4.6$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NaClO}_4$  a  $\text{pH} = 4.6$  ( $\bullet$ ), y  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  at  $\text{pH} = 3.0$  ( $\blacksquare$ ). También se graficaron los ajustes lineales de los datos a  $\text{pH} 3.0$  (en azul) y a  $\text{pH} 4.6$  (en verde), este último con su intervalo de confianza del 99%.

En la Figura 4.7 se muestra la dependencia del logaritmo de  $K_{10}$  con la raíz cuadrada de  $I$ , con los distintos electrolitos ensayados. Los resultados obtenidos con  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  y  $\text{NaClO}_4$  se ajustan a la misma recta, lo que indica que el efecto observado se debe a la fuerza iónica y no a la valencia del catión. A  $\text{pH} 4.6$  se observa un aumento del  $\log K_{10}$  con  $I^{1/2}$  debido a la interacción de dos especies cargadas negativamente, el radical sulfato y el AHA deprotonado, mientras que a  $\text{pH} 3$  no se observa un efecto de la fuerza iónica. Este comportamiento es esperable para la asociación de un anión con una especie sin carga, el AHA no disociado.

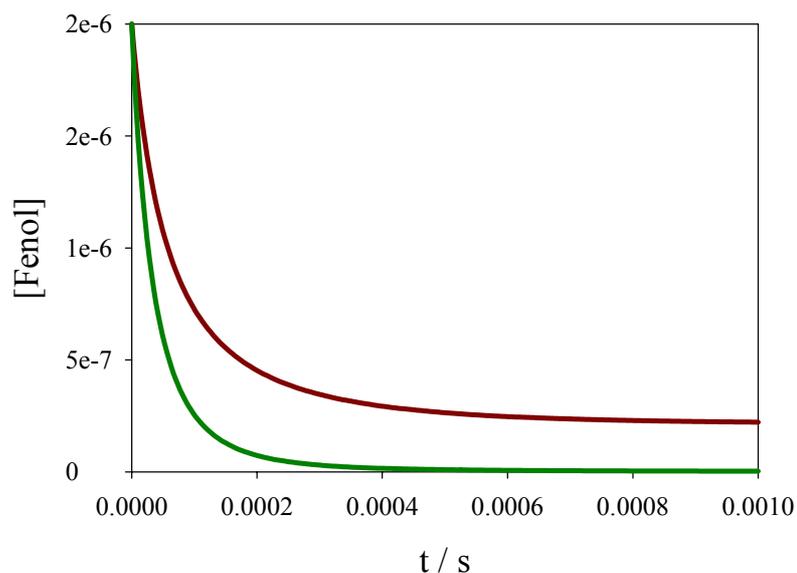
Para poder predecir el comportamiento del radical sulfato en los métodos de degradación oxidativa in situ (ISCO), se estudió por flash-fotólisis un sistema similar al anterior (soluciones acuosas de peroxodisulfato 0.01 M y diferentes concentraciones de AHA en el intervalo de 0 a 400  $\mu\text{gL}^{-1}$  siguiendo el decaimiento del radical sulfato a  $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) con el agregado de  $2 \times 10^{-6} \text{ M}$  de fenol como contaminante modelo. Las señales se ajustaron nuevamente a un decaimiento mixto con la Ecuación 4.1. Como se puede observar en el recuadro de la Figura 4.8, la presencia de fenol en la solución disminuye la concentración de radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  generada, ya que este actúa como filtro

interno y acelera el decaimiento de las trazas por reacción con el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ . Los valores de  $k_{\text{ap}}$  se graficaron en función de la concentración de AHA, como se ve en la Figura 4.8.



**Figura 4.8:** Gráfico de  $k_{\text{ap}}$  contra la concentración de AHA,  $C_{\text{AHA}}$ , obtenido con  $1 \times 10^{-2}$  M  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  a 293.2 K en presencia de  $2 \times 10^{-6}$  M de fenol (●) y en ausencia de fenol (●). Las cruces (en azul y marrón, respectivamente) corresponden al valor de  $k_{\text{ap}}$  obtenida del ajuste de las trazas simuladas con la Ecuación 4.1. Las líneas muestran el ajuste de los datos con la Ecuación 4.2. **Recuadro:** Decaimiento obtenido a 450 nm con soluciones 0.01 M de  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  y  $2 \times 10^{-6}$  M de fenol en presencia de  $400 \mu\text{gL}^{-1}$  de AHA (traza inferior, en rosa) o en ausencia de AHA (traza superior, en azul) a 293.2 K. Las líneas corresponden a la simulación de los datos experimentales.

Dichos experimentos fueron simulados con el mismo conjunto de parámetros iniciales que se usó para los experimentos en ausencia de fenol. Para la reacción de  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ (HA) con fenol, se utilizó la constante de velocidad bimolecular determinada en ensayos en ausencia de sustancias húmicas,  $2.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Mártire y Gonzalez, 2001]. Se observa también una buena concordancia entre los valores de  $k_{\text{ap}}$  obtenidos experimentalmente y los simulados (Figura 4.8), lo que indica que el fenol es capaz de reaccionar con velocidades similares con el radical sulfato libre y el unido a las SH, y con la misma eficiencia. En la Figura 4.9 se observan los perfiles de concentración de fenol obtenidos de las simulaciones en ausencia de AHA (en verde) y en presencia de  $400 \mu\text{gL}^{-1}$  de AHA (en marrón). Como puede observarse, la degradación del fenol es más eficiente en ausencia de SH que en su presencia, debido a la competencia entre las SH y el fenol por los radicales  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ .



**Figura 4.9:** Cinética de consumo de fenol por el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  en presencia de  $400 \mu\text{gL}^{-1}$  de AHA (traza superior, en marrón) o en ausencia de AHA (traza inferior, en verde) de la simulación de los datos experimentales.

### **Conclusiones:**

Se plantea como parte del mecanismo de reacción, una interacción reversible entre el radical anión sulfato ( $\text{SO}_4^{\bullet-}$ ) y las sustancias húmicas (SH). La desactivación de los radicales  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  mediante el mecanismo propuesto implica la competición entre las sustancias húmicas y los contaminantes por los radicales oxidantes. Los primeros pasos en el mecanismo resultan en la generación de radical asociado a las sustancias húmicas,  $\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH})$ , con un tiempo de vida  $\tau^{\circ}(\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH}))$  menor al del radical libre,  $\tau^{\circ}(\text{SO}_4^{\bullet-})$  como se observó en las simulaciones cinéticas por computadora.

Los experimentos con fenol como modelo de contaminante muestran que tanto el  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  como el  $\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH})$  reaccionan con el sustrato con constantes de velocidad similares. Los tiempos de vida en presencia de fenol de los radicales libres y asociados son  $\tau(\text{SO}_4^{\bullet-})$  y  $\tau(\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH}))$ , respectivamente. A partir de las simulaciones cinéticas, se observa que la fracción de radicales  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  que reaccionan con fenol es mayor a la correspondiente para el radical asociado  $\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH})$ . Lo que resulta en una reducción de la eficiencia del tratamiento oxidativo en presencia de sustancias húmicas, por lo menos para el caso del fenol como contaminante. Esto se confirma por los perfiles de consumo de fenol por el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  en ausencia y en presencia de SH.

### ***b.- Estudio de la reacción de $SO_4^{\bullet-}$ con ácido gálico como modelo de las sustancias húmicas.***

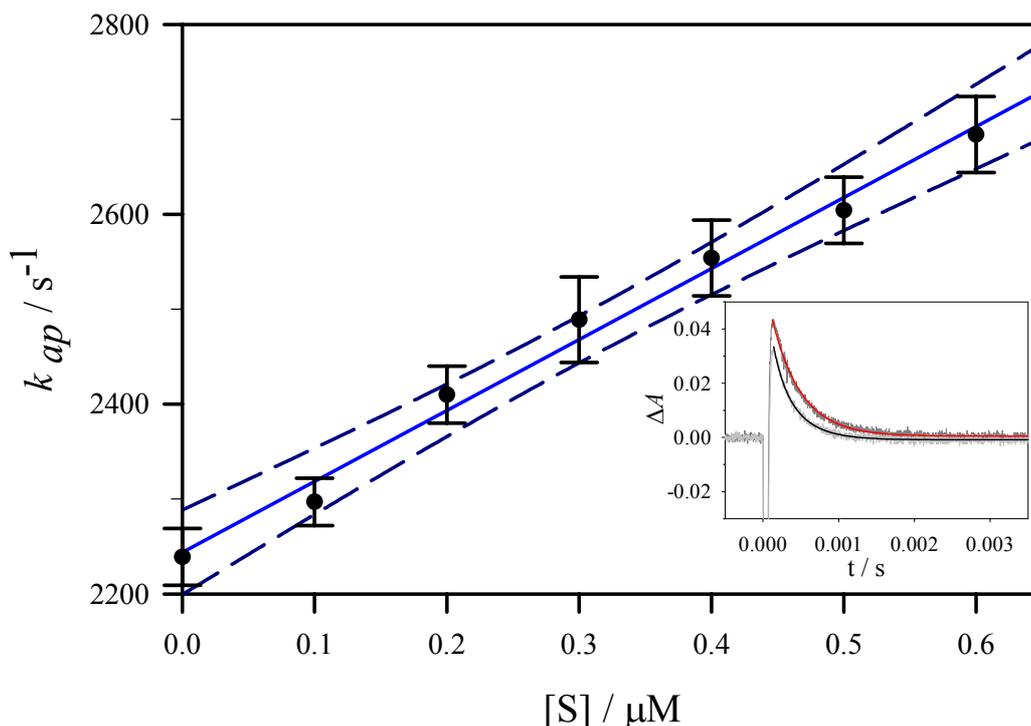
Como ya se mencionó, la naturaleza compleja de las SH dificulta la detección y caracterización de intermediarios o productos de reacción para corroborar el mecanismo propuesto. Por lo que se realizaron estudios similares con el ácido gálico, que ha demostrado ser un buen modelo del comportamiento de las SH [Tipping, 2002; Stevenson, 1994; Giannakopoulos y col., 2005]. Se estudiaron las reacciones del radical  $SO_4^{\bullet-}$  en soluciones de ácido gálico a pH 3.1 y 5.6, donde las principales especies presentes son el ácido gálico (AG) y su base conjugada el anión galato ( $G^-$ ), respectivamente. Se siguió el decaimiento de dicho radical en función de la concentración de ácido gálico agregado, por la técnica de flash-fotólisis convencional. La fotólisis de soluciones de  $S_2O_8^{2-}$ , en presencia de bajas concentraciones de especies de gálico muestra un espectro de absorción a  $\lambda$  mayores a 350 nm, que coincide con el del radical sulfato obtenido en ausencia de sustrato orgánico, el que ya se mostró anteriormente. Las señales obtenidas a 450 nm pueden ajustarse bien con la ecuación  $\Delta A = \Delta A_0 \exp(-k_{ap} \times t) + C$  (Recuadro de la Figura 4.10) y muestran un aumento de la velocidad de decaimiento con el incremento de la concentración de sustrato orgánico (S). El valor muy pequeño de la constante  $C$  (menor al 1% del máximo de absorbancia) se asocia a la absorción de especies de vida media larga, como por ejemplo los radicales orgánicos formados por la reacción 12. De la pendiente de los gráficos de  $k_{ap}$ , obtenida de promediar los resultados de cuatro experimentos independientes, contra la concentración de sustrato orgánico en experimentos a pH = 5.4 se obtiene la constante de velocidad bimolecular para la reacción con el anión galato  $k_{12}^{G^-}$ , que se lista en la Tabla 4.3. En la Figura 4.10 se muestran los resultados obtenidos a pH 3.1, donde la especie mayoritaria es el ácido gálico.



Debido a la pequeña fracción de galato presente a pH 3.1, el cual es más reactivo con el radical  $SO_4^{\bullet-}$  que el ácido gálico, la constante de velocidad para el ácido gálico,  $k_{12}^{AG}$ , se calculó con la Ecuación 4.6

$$k_{12}^{AG} = (p - k_{12}^{G^-}) \times 10^{(pH - pKa)} + p \quad \text{Ec. 4.6}$$

Donde  $p = (7.4 \pm 0.5) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  es la pendiente de la Figura 4.10,  $pKa = 4.4$  y  $k_{12}^{G^-} = (2.9 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .



**Figura 4.10:** gráfico de  $k_{ap}$  contra la concentración de ácido gálico obtenidas por irradiación de soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  0.01 M a 293 K y  $\text{pH} = 3.1$ . Las barras de error se obtienen de la desviación estándar de los resultados experimentales. La línea sólida azul muestra el ajuste lineal de los datos y las líneas de puntos azul oscuro representan el intervalo de confianza del 99%. **Recuadro:** perfiles de absorbancia a 450 nm con soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  0.01 M con 0 (en rojo) y  $6 \times 10^{-7}$  M (en negro) de ácido gálico, a 293 K y  $\text{pH} = 3.1$ .

**Tabla 4.3:** constantes de velocidad bimoleculares de la reacción del radical sulfato con especies del gálico. El error en  $k_{12}^{\text{G}^-}$  se obtiene de la desviación estándar del ajuste lineal entre  $k_{ap}$  y  $[\text{G}^-]$ ; el error en  $k_{12}^{\text{AG}}$  de la propagación de errores de la Ecuación 4.6 considerando los errores en  $p$ ,  $k_{12}^{\text{G}^-}$ ,  $\text{pH}$ , y  $\text{pKa}$  son:  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 0.01, y 0.1 respectivamente.

$k_{12}^{\text{G}^-} / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{12}^{\text{AG}} / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$(2.9 \pm 0.2) \times 10^9$	$(6.3 \pm 0.7) \times 10^8$

Se estudiaron también los intermediarios de reacción generados, para lo cual se obtuvieron los espectros de los radicales orgánicos por láser flash-fotólisis y de los productos por fotólisis convencional. En estos experimentos se utilizó una concentración de especies de gálico mayor que en los ensayos anteriores, para consumir totalmente el radical sulfato generado en tiempos cortos y poder observar solamente los decaimientos del radical orgánico. Los ensayos de láser flash-fotólisis se realizaron a  $\text{pH} 3.2$  y  $5.4$ , en soluciones de peroxodisulfato  $5 \times 10^{-2}$  M y

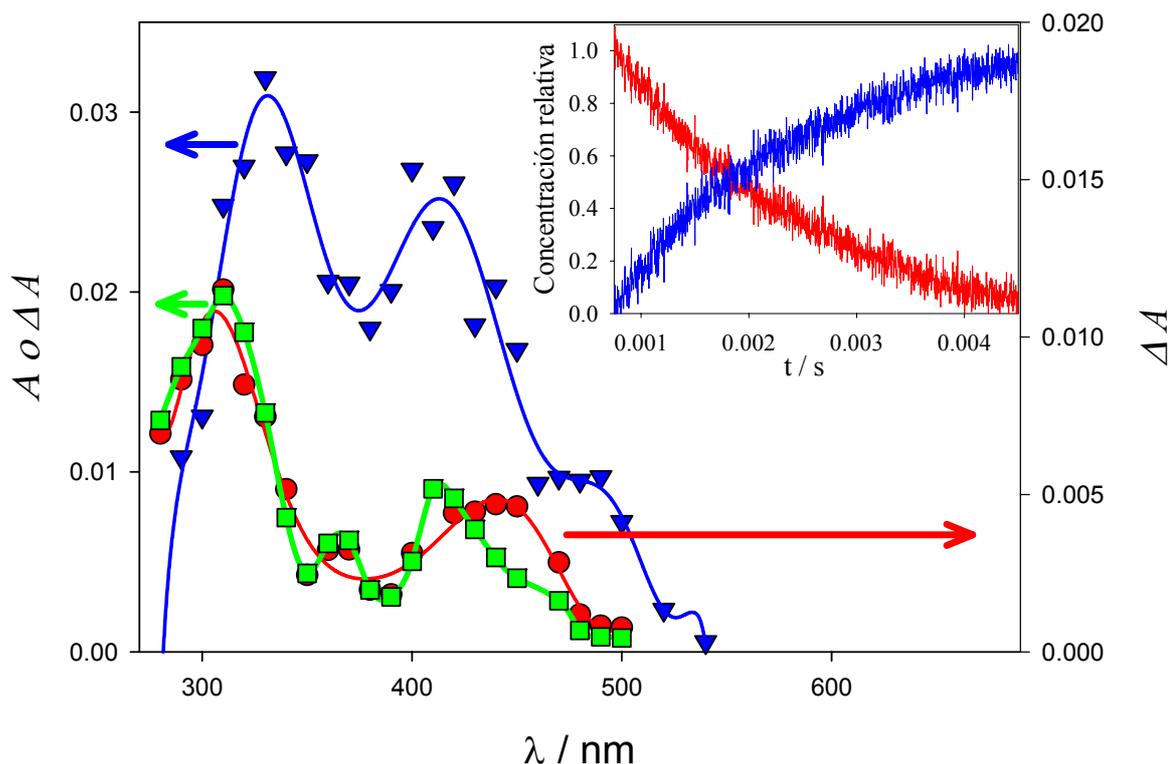
ácido gálico 10  $\mu\text{M}$ , mientras que los de fotólisis convencional se realizaron a los mismos valores de pH, con soluciones de  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$   $1 \times 10^{-2}$  M y gálico 5  $\mu\text{M}$ . Se observó en los experimentos de flash-fotólisis que la cinética de decaimiento de los radicales orgánicos se ajustaba a una ley de velocidad de segundo orden, y las constantes de recombinación observadas son independientes de la concentración de oxígeno disuelto, como se observa en la Tabla 4.4.

Los experimentos de láser flash-fotólisis en ausencia de ácido gálico muestran la formación de radicales  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ , los que decaen con una cinética de orden mixto. Del análisis de los decaimientos a 450 nm y tomando el coeficiente de absorción a esta longitud de onda del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  de  $1650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [McElroy y Waygood, 1990], puede calcularse la concentración inicial del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-} = 5.3 \times 10^{-6}$  M. A partir de los valores de las constantes de reacción del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  con las especies de gálico, el agua, los iones oxhidrilo y peroxodisulfato, y su constante de velocidad del proceso de recombinación (ver Tablas 4.1 y 4.3), se determina que en estas condiciones experimentales todo el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  se consume antes de los 20  $\mu\text{s}$  después del disparo del láser. Por lo que los decaimientos obtenidos en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de ácido gálico que se muestran en el recuadro de la Figura 4.12, a tiempos mayores o iguales a 50  $\mu\text{s}$  después del disparo del láser no muestran contribución del radical sulfato. En las Figuras 4.11 y 4.12 se muestran los espectros de absorción tomados a tiempos cortos, donde la contribución del radical sulfato no puede despreciarse, y a 50  $\mu\text{s}$  después del disparo a pH 3.1 y 5.4, respectivamente. Estos espectros se asignan por lo tanto a los radicales orgánicos generados por la reacción 12.

**Tabla 4.4:** Constantes de velocidad de recombinación de los radicales orgánicos obtenidos en soluciones con diferentes concentraciones de oxígeno disuelto, para el ácido gálico y el anión galato.

$2k / \varepsilon$ ( $\text{cm s}^{-1}$ )	Radical fenoxilo del AG ( $\lambda = 310 \text{ nm}$ )	Radical fenoxilo del G <sup>-</sup> ( $\lambda = 320 \text{ nm}$ )
Saturado en argón	$(2.0 \pm 1.0) \times 10^6$ <sup>(a)</sup>	$(1.5 \pm 1.0) \times 10^6$ <sup>(a)</sup>
Saturado en aire	$(3.2 \pm 1.2) \times 10^6$ <sup>(a)</sup> $(3.09 \pm 0.01) \times 10^6$ <sup>(b)</sup>	$(1.0 \pm 0.4) \times 10^6$ <sup>(a)</sup> $(2.45 \pm 0.02) \times 10^6$ <sup>(b)</sup>
Saturado en oxígeno	$(2.6 \pm 1.0) \times 10^6$ <sup>(a)</sup>	$(9.4 \pm 1.2) \times 10^5$ <sup>(a)</sup>

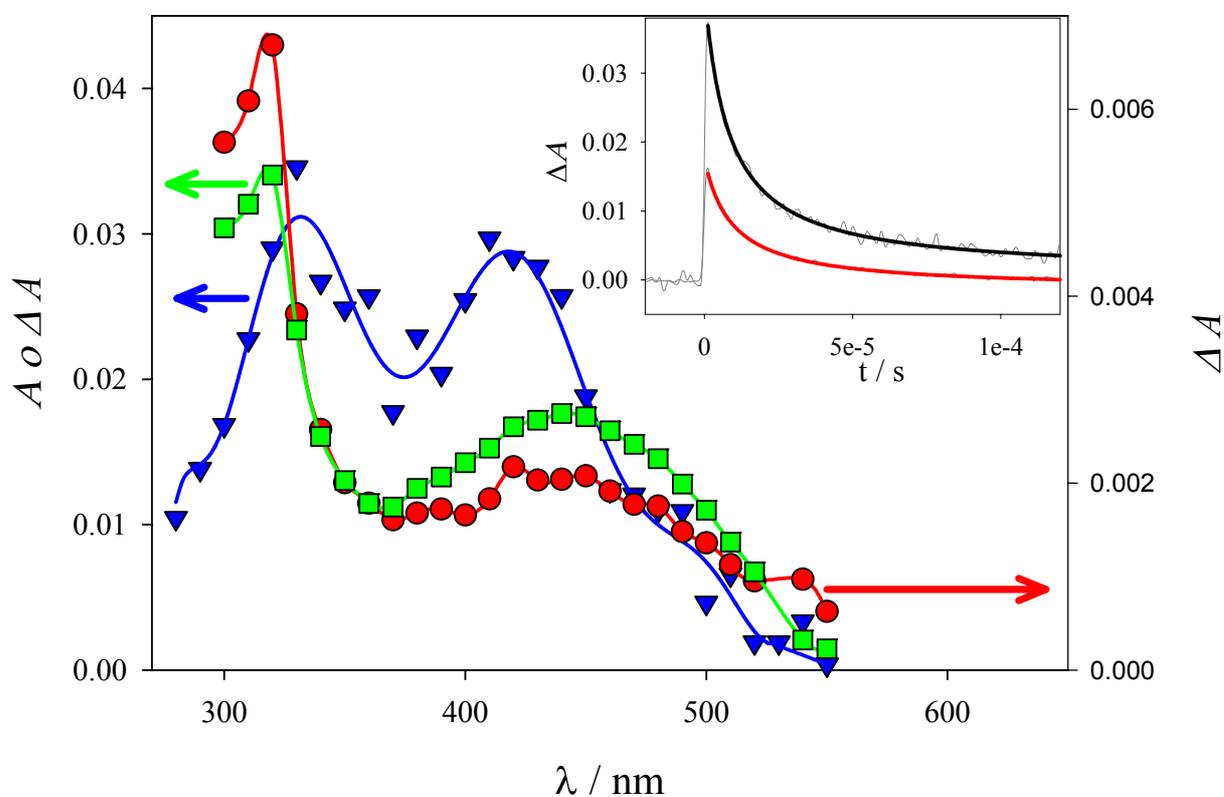
<sup>(a)</sup> Obtenido por fotólisis convencional; <sup>(b)</sup> obtenido en experimentos de láser flash-fotólisis.



**Figura 4.11:** Espectro de absorción del radical orgánico generado por láser flash-fotólisis de soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $5 \times 10^{-2}$  M y ácido gálico  $10 \mu\text{M}$  tomado  $5$  (■) y  $50 \mu\text{s}$  (●) después del disparo del láser, a  $\text{pH} = 3.2$ . Espectro de absorción de los productos (▼) generados por flash-fotólisis convencional de soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $1 \times 10^{-2}$  M y ácido gálico  $5 \mu\text{M}$  a  $\text{pH} = 3.2$ , obtenido del análisis bilineal de los decaimientos experimentales. **Recuadro:** Perfiles de decaimiento del radical (en rojo) y formación de producto (en azul) cuyos espectros se asignaron en la figura principal.

En las condiciones en que se realizaron los experimentos de flash-fotólisis convencional, el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  se consume antes de  $300 \mu\text{s}$  y sólo se detectan por los cambios de absorbancia los intermediarios orgánicos generados por la reacción 12 y sus productos de reacción. El análisis de las trazas de los experimentos de flash-fotólisis convencional es complejo, debido a que tanto el radical orgánico como alguno de los productos de la reacción absorben en el mismo intervalo de longitudes de onda. Para obtener los espectros individuales de las especies se realizó un análisis bilineal de la matriz de datos experimentales. El perfil de absorbancia experimental a cada longitud de onda pudo reproducirse como una combinación lineal de las absorbancias de cada especie. Tomando para el radical orgánico el espectro de absorción de los experimentos de láser flash-fotólisis, se obtiene el espectro de la segunda especie. El decaimiento del radical orgánico y la formación de los productos obtenidos del análisis de las trazas a  $\text{pH} = 3.1$  se muestran en el

recuadro de la Figura 4.11. Debido a que la formación del radical orgánico es muy rápida para ser detectada con el equipo de flash-fotólisis convencional, el espectro de la segunda especie se calcula como la diferencia entre la absorción de los productos y los reactivos. Calculando la concentración inicial del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  de experimentos en las mismas condiciones pero en ausencia de sustrato orgánico ( $3.9 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), y suponiendo la conversión total del  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  en radicales orgánicos, pueden obtenerse los espectros de los productos. Estos se muestran en las Figuras 4.11 y 4.12 para los experimentos a  $\text{pH} = 3.1$  y  $5.4$ , respectivamente.



**Figura 4.12:** Espectro de absorción del radical orgánico generado por láser flash-fotólisis de soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $5 \times 10^{-2} \text{ M}$  y ácido gálico  $10 \mu\text{M}$  tomado  $2$  (■) y  $50 \mu\text{s}$  (●) después del disparo del láser, a  $\text{pH} = 5.4$ . Espectro de absorción de los productos (▼) generados por flash-fotólisis convencional de soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  y ácido gálico  $5 \mu\text{M}$  a  $\text{pH} = 5.4$ , obtenido del análisis bilineal de los decaimientos experimentales. **Recuadro:** Decaimientos experimentales obtenidos por láser flash-fotólisis a longitudes de onda de análisis de  $320 \text{ nm}$  (en negro) y  $400 \text{ nm}$  (en rojo).

Los espectros de absorción de los radicales orgánicos formados por la reacción del ácido gálico y el ion galato con el  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  (Figuras 4.11 y 4.12) son similares a los publicados para radicales tipo fenoxilo [Draper y col., 1989] y por lo tanto se asignaron a dichos radicales. En la Tabla 4.4 se observa que dichos radicales se recombinan por una ley de segundo orden y que su velocidad de recombinación es independiente de la concentración de oxígeno disuelto, lo que corrobora la asignación realizada de los radicales orgánicos formados al tipo fenoxilo. Los valores de  $2k / \epsilon$  obtenidos por láser flash-fotólisis en ensayos con soluciones de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $5 \times 10^{-2}$  M a  $\text{pH} = 5.4$  son mayores a los obtenidos con soluciones  $10^{-3}$  M de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  con flash-fotólisis convencional, como se espera para el efecto de la fuerza iónica en la velocidad de reacción de dos especies cargadas negativamente. Los valores de  $2k / \epsilon$  obtenidos por ambos métodos a  $\text{pH} = 3.2$  son independientes de la fuerza iónica, como se predice para la reacción de dos especies sin carga.

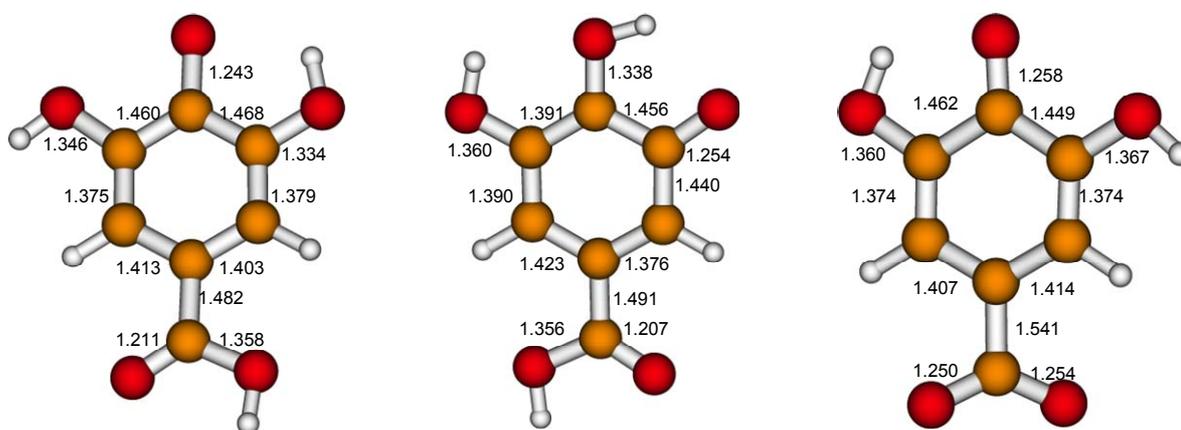


Figura 4.13: Geometrías optimizadas de los radicales fenoxilo generados por la reacción del ácido gálico o el anión galato con el radical anión  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ .

Dwibedy y col. [Dwibedy y col., 1999] estudiaron la reacción del ácido gálico con los radicales  $\text{HO}^{\bullet} / \text{O}^{\bullet-}$ ,  $\text{N}_3^{\bullet}$ , y  $\text{Br}_2^{\bullet-}$  a diferentes valores de  $\text{pH}$ . Observaron la formación del correspondiente radical fenoxilo con un pico a 310 nm un hombro en la región de los 400 nm a  $\text{pH}$  6.8, mientras que a  $\text{pH}$  mayor a 9.7 el pico se corre a 340 nm y el hombro se mantiene en la zona de 400 nm. El espectro de absorción publicado [Jovanovic y col., 1995] para el radical fenoxilo del metil galato presenta un máximo a 310 nm a  $\text{pH}$  3 con un hombro ancho en la zona de 340- 400 nm, mientras que el observado a  $\text{pH}$  7 presenta picos a 340 y 420 nm, y a  $\text{pH}$  10 el segundo pico se corre a 440 nm. Todo esto coincide con lo observado por nosotros a  $\text{pH}$  3 y 5 para el radical fenoxilo del ácido gálico y el ión galato, respectivamente, y valida la asignación de especies realizada.

Considerando que todo el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  generado en los ensayos de láser flash-fotólisis ( $5.3 \times 10^{-6}$  M) reacciona con el sustrato orgánico, se calcula el valor del coeficiente de absorción a

ambos valores de pH para el radical fenoxilo del ácido gálico a 310 nm y para el del ion galato a 320 nm de  $8.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Con estos valores del coeficiente de absorción se obtienen los valores de las constantes de velocidad de segundo orden  $2k = 2.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a pH 3.1. La constante de velocidad para el ion galato depende de la fuerza iónica, como ya se mencionó. Los valores de  $2k$  son  $4.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $I = 0.03 \text{ M}$  (en ensayos de flash-fotólisis convencional), y  $1.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $I = 0.15 \text{ M}$  (en ensayos de láser flash-fotólisis), a pH = 5.4. Estos valores de constantes de velocidad, cercanos a las controladas difusionalmente, coinciden con los publicados para radicales fenoxilo no sustituidos [Merga y col., 1994].

Para confirmar la formación de los radicales fenoxilo de las distintas especies del ácido gálico, y para investigar el mecanismo de formación de estas especies, se hicieron cálculos por la teoría del funcional de la densidad.

La formación de los radicales fenoxilo es el primer producto de la reacción 12, y puede llevarse a cabo por alguna de las siguientes vías de reacción:

- a) Transferencia electrónica desde el ácido gálico al radical anión sulfato formándose el radical catión del ácido gálico y el anión sulfato (Reacciones C e I de Tablas 4.5 y 4.6). El radical catión continúa reaccionando por una hidratación rápida y reversible para dar el radical hidroxiclohexadienilo (HCHD) [Draper y col., 1989]. La eliminación del agua de radicales HCHD de fenoles genera radicales fenoxilo, como fue publicado por Merga y por Adams [Merga y col., 1994; Adams y col., 1966].
- b) La vía de adición y eliminación que genera un aducto del radical sulfato, seguida de la eliminación del anión sulfato, y dando además radicales HCHD [Mártire y Gonzalez, 2001].
- c) La abstracción de hidrógeno del fenol por el radical anión sulfato (Reacciones A, B y H de Tablas 4.5 y 4.6) [Leopoldini y col., 2004].

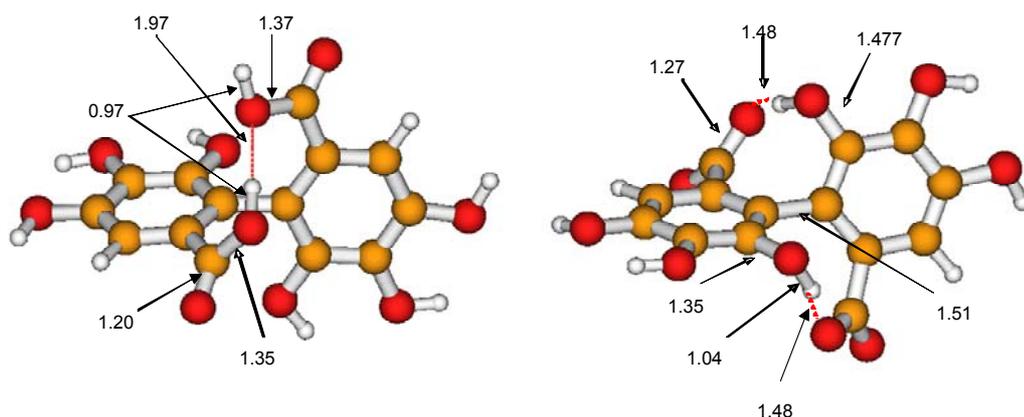
Los resultados se listan en las Tablas 4.5 y 4.6. Los cálculos realizados para las reacciones A y B de la Tabla 4.5 y para la H de la Tabla 4.6 muestran que los procesos de abstracción de hidrógeno de los grupos OH son exotérmicos. La transferencia de carga de un electrón desde el ácido gálico o el ión galato hacia el radical sulfato para generar los correspondientes radicales cationes (reacciones C e I) son endotérmicos, como también la eliminación del protón para formar el radical fenoxilo a partir del radical catión (reacciones D y J). Los intentos de calcular la adición directa del radical sulfato a los anillos aromáticos no pudieron realizarse. Al acercarse el radical a los grupos fenólicos del ácido gálico o del galato se favorece la reacción de transferencia de carga lo que indica que no es posible la ruta de adición/eliminación.

Por lo tanto, los resultados muestran que la reacción tiene lugar por vía de la abstracción de hidrógeno. Resultados similares se observaron para el caso de compuestos aromáticos con dos grupos OH en posición orto [Leopoldini y col., 2004].

Como los resultados experimentales muestran una recombinación de segundo orden de los radicales fenoxilo tanto a pH 3.1 como a 5.3 (Tabla 4.4), se calcularon las energías  $\Delta E^\circ$  para las diferentes reacciones de recombinación de acuerdo a los posibles productos predichos por Fang [Fang y col., 2000] para otros radicales fenoxilo con sustituyentes halogenados. Tanto las reacciones E y K que generan bifenilos, como las disproporcionaciones para dar quinonas (F, G, L y M) resultaron ser exotérmicas. Las estructuras optimizadas de los bifenilos se muestran en la Figura 4.14.

La recombinación de los fenoxilos por el átomo de oxígeno para dar los correspondientes peróxidos orgánicos no es significativa debido a la baja energía del enlace O-O [Fang y col, 2000], lo que predice una reacción reversible. Los cálculos teóricos de moléculas con enlaces O-O no pudieron realizarse, ya que estos tendían a la ruptura de dicho enlace durante la optimización de la geometría molecular.

Para confirmar los resultados experimentales y los cálculos teóricos realizados sobre los posibles productos de la reacción 12, se analizaron los productos por el test NBT/glicinato para quinonas y HPLC/MS. El test para quinonas dio resultados positivos para los productos de la reacción del radical sulfato con ácido gálico y con galato. El análisis por HPLC/MS se realizó para la reacción del galato únicamente (pH 5.4), y se obtuvieron dos picos. Uno de ellos presenta un tiempo de retención de 2.74 min corresponde por su peso molecular y su espectro de absorción al peroxodisulfato. El otro pico tiene un tiempo de retención de 3.46 min, y se asignó por su peso molecular a la quinona que se obtiene como producto de la reacción M de la Tabla 4.6. El espectro de absorción de esta quinona es similar al observado para otras quinonas [Gibaja Oviedo, 1998; Faig y col., 1958]. Esta reacción de recombinación de radicales fenoxilo a ese pH es la más favorable termodinámicamente según los cálculos realizados.

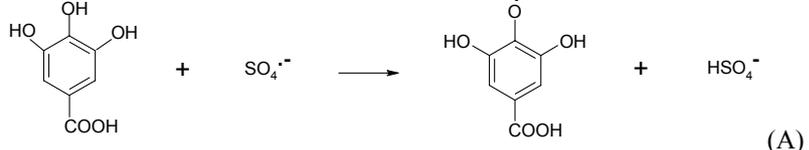
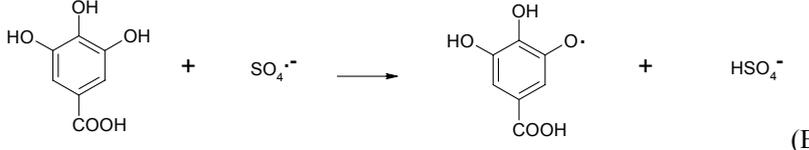
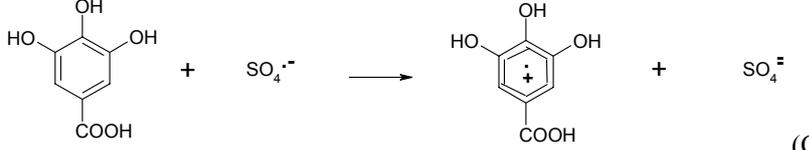
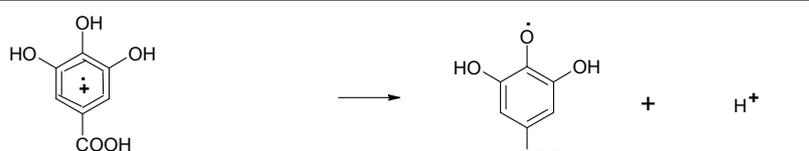
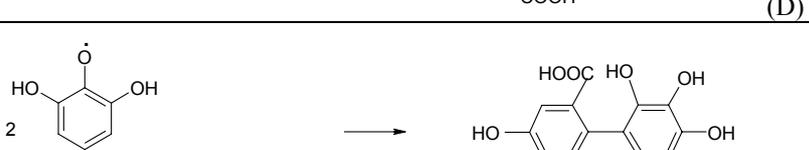
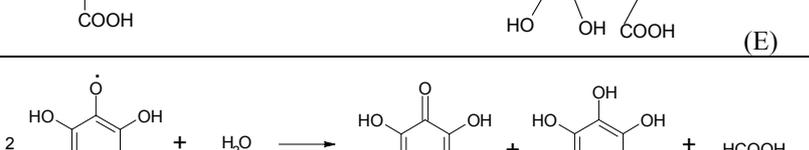
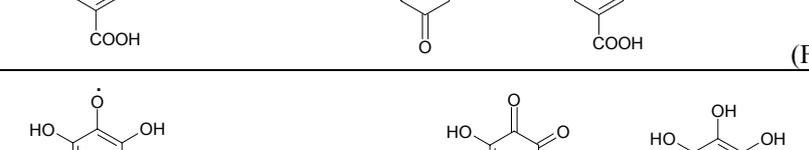


**Figura 4.14:** geometrías optimizadas B3LYP/6-311++G\*\* de los bifhenilos productos de las reacciones E y K, respectivamente. Las distancias están expresadas en Å.

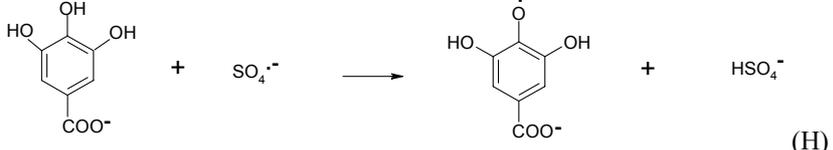
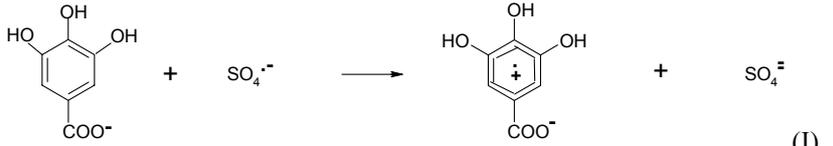
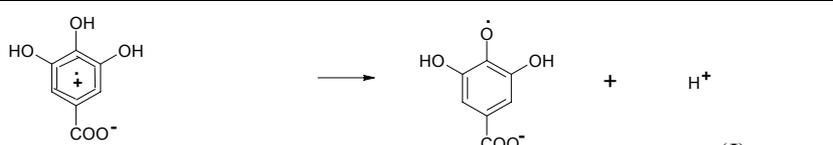
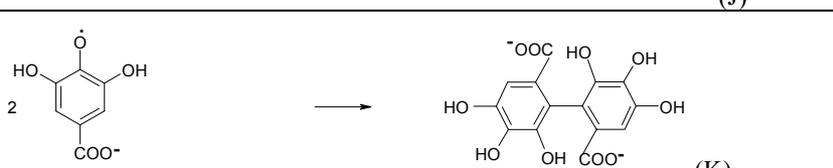
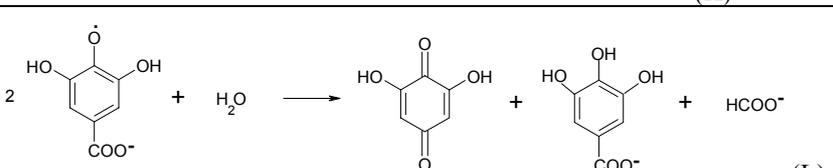
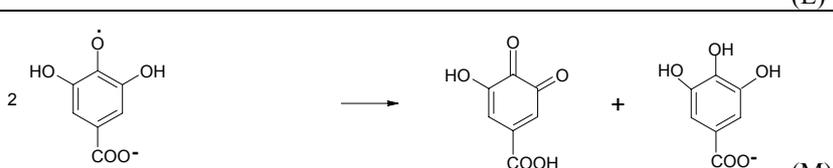
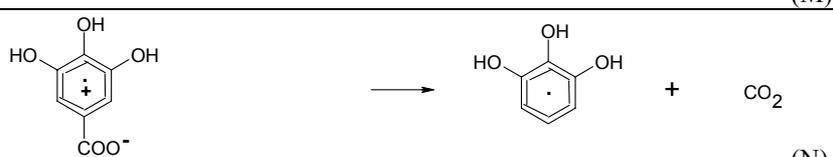
### **Conclusiones:**

Los resultados experimentales y los cálculos mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT) confirman el mecanismo propuesto. En este mecanismo se postula la formación de radicales fenoxilo como intermediarios de reacción de la oxidación del ácido gálico y el galato por el radical anión sulfato. Los cálculos teóricos apoyan la formación de quinonas y bifhenilos sustituidos por recombinación de los radicales orgánicos. Como se observa de los resultados experimentales, no se puede extrapolar la reactividad del radical sulfato con ácido gálico a la de éste radical con las sustancias húmicas. En los experimentos a pH 5.4 se detectó la quinona correspondiente a la reacción M como único producto de reacción y esta sustancia resultó ser el producto más favorable termodinámicamente según los cálculos teóricos.

**Tabla 4.5:** valores de energía  $\Delta E_0$ ,  $\Delta H_0$  y  $\Delta G_0$  (todos en kcal/mol<sup>-1</sup>) obtenidos de los cálculos teóricos en fase gaseosa y de  $\Delta E_0$  en solución, para las reacciones que involucran al ácido gálico o su radical fenoxilo (298.15 K).

Reacciones	$\Delta E_0(\text{g})$	$\Delta E_0(\text{sol})$	$\Delta H_0(\text{g})$	$\Delta G_0(\text{g})$
 <p>(A)</p>	-18.50	-27.21	-12.62	-18.72
 <p>(B)</p>	-17.87	-23.16	-17.94	-18.11
 <p>(C)</p>	223.76	137.88	223.39	223.83
 <p>(D)</p>	202.73	253.97	202.45	203.02
 <p>(E)</p>	-27.57	-24.28	-27.09	-13.19
 <p>(F)</p>	-2.94	-4.05	-3.40	-4.27
 <p>(G)</p>	-3.31	-4.73	-2.66	-3.31

**Tabla 4.6:** valores de energía  $\Delta E_o$ ,  $\Delta H_o$  y  $\Delta G_o$  (todos en kcal/mol<sup>-1</sup>) obtenidos de los cálculos teóricos en fase gaseosa y de  $\Delta E_o$  en solución, para las reacciones que involucran al anión galato o su radical fenoxilo (298.15 K).

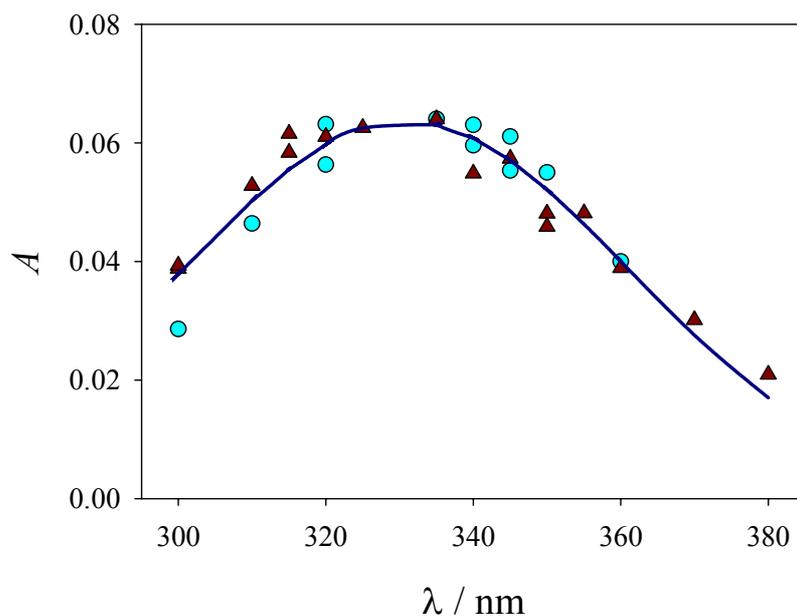
Reacciones	$\Delta E_o$ (g)	$\Delta E_o$ (sol)	$\Delta H_o$ (g)	$\Delta G_o$ (g)
 <p>(H)</p>	-29.10	-30.88	-29.33	-29.32
 <p>(I)</p>	115.70	141.60	115.43	115.65
 <p>(J)</p>	300.19	246.57	299.70	300.60
 <p>(K)</p>	26.01	-	25.63	41.87
 <p>(L)</p>	16.77	5.72	16.29	15.92
 <p>(M)</p>	0.98	-4.30	1.64	5.02
 <p>(N)</p>	0.17	82.43	0.71	-9.79

## **Radicales $Cl^{\bullet}$ y $Cl_2^{\bullet-}$**

Cuando se irradian soluciones de  $S_2O_8^{2-}$   $1 \times 10^{-3}$  M en presencia de NaCl en concentraciones mayores a  $1 \times 10^{-4}$  M, no se observa la señal a 450 nm característica del radical  $SO_4^{\bullet-}$ , por la alta eficiencia de la reacción entre este radical y los iones cloruro (Reacción 13). Esta reacción posee una constante de velocidad de  $4.7 \times 10^8$   $M^{-1}s^{-1}$  en soluciones con fuerza iónica  $I=0.1M$  [Ross y col., 1998]. Los átomos de cloro reaccionan reversiblemente con los iones cloruro para dar el ion radical  $Cl_2^{\bullet-}$ , reacciones 13 y 14 con constantes de velocidad  $8.5 \times 10^9$   $M^{-1} s^{-1}$  y  $6.0 \times 10^4$   $s^{-1}$  [Ross y col., 1998]. Ambas especies,  $Cl^{\bullet}$  y  $Cl_2^{\bullet-}$  absorben por debajo de 380 nm con coeficientes de absorción molar a 340 nm,  $\epsilon^{340} = 3800$   $M^{-1}cm^{-1}$  [Yu y col, 2004] y  $9600 \pm 500$   $M^{-1}cm^{-1}$  [Nagarajan y Fessenden, 1985], respectivamente.

Experimentos resueltos en el tiempo con soluciones de NaCl entre 0.1 M y  $5 \times 10^{-4}$  M, y  $S_2O_8^{2-}$   $5 \times 10^{-3}$  M muestran la formación de especies transientes con un máximo de absorción a 340 nm, cuyo espectro concuerda con el publicado para el radical  $Cl_2^{\bullet-}$  [Adams y col, 1995], como se muestra en la Figura 4.15. La constante de equilibrio para las reacciones reversibles 14 y 15  $K_{14,15}$  a 293 K se calculó a partir de los valores a 295 K ( $6.5 \times 10^4$   $M^{-1}$  [Bao y Barker, 1997]) y a 298 K ( $1.4 \times 10^5$   $M^{-1}$ , [Buxton y col., 1998]), obteniéndose un valor de  $3.9 \times 10^4$   $M^{-1}$ . Para el intervalo de concentraciones de ion cloruro utilizado en estos experimentos y con el valor de la constante de equilibrio ya calculado, la contribución de los átomos de cloro en la absorción de la solución puede despreciarse, ya que en las condiciones experimentales utilizadas se mantiene la relación  $\epsilon(Cl_2^{\bullet-}) \times [Cl_2^{\bullet-}] / \epsilon(Cl^{\bullet}) \times [Cl^{\bullet}] > 100$ .

El decaimiento de los transientes generados sigue una cinética compleja, que depende de la concentración de cloruros,  $[Cl^-]$ . Las trazas del radical  $Cl_2^{\bullet-}$  pueden ajustarse a una cinética mixta de primero y segundo orden, cuya ley de velocidad se esta dada por la Ecuación 4.1, como se muestra en la Figura 4.17. La contribución del comportamiento de segundo orden es más importante en soluciones de  $Cl^-$   $10^{-1}$  M, y a medida que disminuye la concentración de cloruros aumenta el peso del decaimiento de primer orden.



**Figura 4.15:** espectro de absorción tomado 385  $\mu$ s después del flash con soluciones acuosas de  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$   $5 \times 10^{-3}$  M y  $9.6 \times 10^{-4}$  M  $\text{Cl}^-$  con: 0 (▲) y  $6.4 \text{ mg L}^{-1}$  (●) AHA a 293 K.

La constante de velocidad de segundo orden  $k_{16}$  depende de la concentración de cloruros, como se espera para el efecto de la fuerza iónica en la reacción de dos especies cargadas negativamente como son los radicales  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  [Alegre y col., 2000]. De la ordenada al origen del gráfico lineal del  $\log k_{16}$  contra  $I^{1/2}/(1+I^{1/2})$ , de la Figura 4.16, se obtiene el valor de dicha constante de velocidad a fuerza iónica cero a 293 K,  $k_{16}^0 = 6.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , que es menor al publicado para esta reacción a 298 K [Huie y Clifton, 1990; Huie, 1995; Alegre y col., 2000].

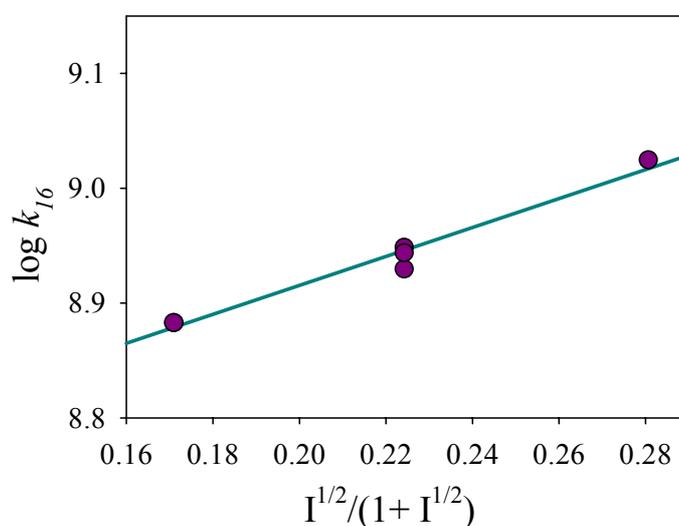
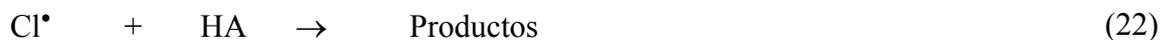


Figura 4.16:  $\log k_{16}$  contra  $I^{1/2}/(I^{1/2}+1)$  obtenido a partir de los datos a 293 K.

Las principales reacciones que tienen lugar en el decaimiento del radical  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  son: las reacciones reversibles 14 y 15, la recombinación de  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ , reacción 16, y el conjunto de reacciones de los radicales  $\text{Cl}^{\bullet}$  /  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  con el solvente y los iones oxhidrilo [Alegre y col., 2000], reacciones 17 a 21, que se listan en la Tabla 4.7.

De acuerdo a este mecanismo, las reacciones de  $\text{Cl}^{\bullet}$  y  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  con agua generan cloruros y radicales  $\text{HO}^{\bullet}$ . Los radicales  $\text{HO}^{\bullet}$  generados pueden afectar los equilibrios planteados por las ecuaciones 17 a 21, y la constante de velocidad de primer orden dependerá entonces de la velocidad de estas reacciones. Cuando todos los radicales  $\text{HO}^{\bullet}$  generados se consumen, en nuestro sistema por recombinación o por reacción con  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  o  $\text{SO}_4^{2-}$  [Alegre y col., 2000], ya no se establece el equilibrio. En este caso las cinéticas de los radicales  $\text{Cl}^{\bullet}$  y  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  con agua son de primer orden, como ya fue observado por Buxton [Buxton y col., 1998].

Tabla 4.7: principales reacciones que intervienen en el decaimiento del radical  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ .



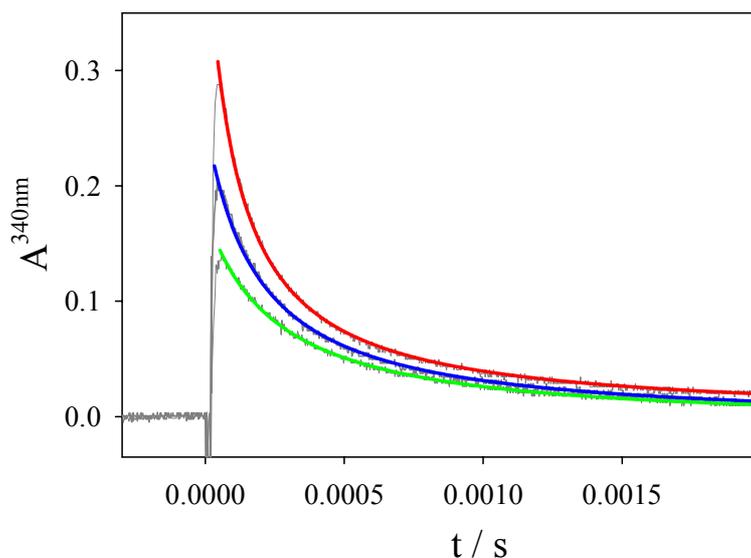
Para confirmar este mecanismo se realizaron simulaciones de los perfiles de absorbancia a 340 nm obtenidos. Se consideraron las reacciones 13 a 21, y las reacciones del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  con agua,  $\text{HO}^-$  y  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ , y la recombinación de los radicales  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ . La concentración inicial de  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  se estimó de ensayos en idénticas condiciones en ausencia de iones cloruro y con el  $\epsilon^{450}$  del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ , como ya se ha mencionado. Las concentraciones obtenidas con las simulaciones de los radicales  $\text{Cl}^{\bullet}$  y  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  se convirtieron a absorbancia con los correspondientes  $\epsilon^{340}$ , y se compararon

los perfiles de decaimiento simulados con los experimentales, observándose una buena concordancia entre ellos.

Cuando se realizaron experimentos de flash-fotólisis con soluciones acuosas de peroxodisulfato en presencia de iones cloruro en el intervalo  $9.6 \times 10^{-4}$  a  $6.9 \times 10^{-3}$  M y AHA en concentraciones menores a  $8 \times 10^{-3}$  g L<sup>-1</sup>, se observó la generación de especies transientes cuyo espectro de absorción presenta un máximo a 335 nm. El espectro observado en estas condiciones coincide con el obtenido para el radical Cl<sub>2</sub><sup>•-</sup> en experimentos realizados en las mismas condiciones en ausencia de AHA, como se observa en la Figura 4.15 y es asignado a dicho radical. Para una dada concentración de iones Cl<sup>-</sup>, se observa que la velocidad de decaimiento del radical Cl<sub>2</sub><sup>•-</sup> aumenta con la concentración de AHA (Figura 4.17), de acuerdo a las reacciones 22 y 23 entre de radicales Cl<sup>•</sup> y Cl<sub>2</sub><sup>•-</sup> con el AHA, respectivamente. Las señales de decaimiento experimentales se ajustaron con la Ecuación 4.1, con una constante de primer orden  $k_{prim}$  que depende linealmente con la concentración de AHA, como se observa en la Figura 4.18. La absorción remanente de la solución asociada al término  $d(\lambda)$  puede asignarse a especies de vida media más larga, formadas a partir del decaimiento del radical Cl<sub>2</sub><sup>•-</sup>. En las condiciones experimentales utilizadas, las principales reacciones que involucran al radical Cl<sub>2</sub><sup>•-</sup>, al que se asume en equilibrio con el radical Cl<sup>•</sup>, son aquellos listados en la Tabla 4.7. Para todas las soluciones se cumple la condición  $K_{14,15} \times [Cl^-] > 1$ , por lo que se puede expresar la dependencia observada de  $k_{prim}$  con [HA] mediante la Ecuación 4.7.

$$k_{prim} = f([Cl^-]) + \left[ k_{23} + \frac{k_{22}}{K_{14,15} \times [Cl^-]} \right] \times [HA] \quad \text{Ec. 4.7}$$

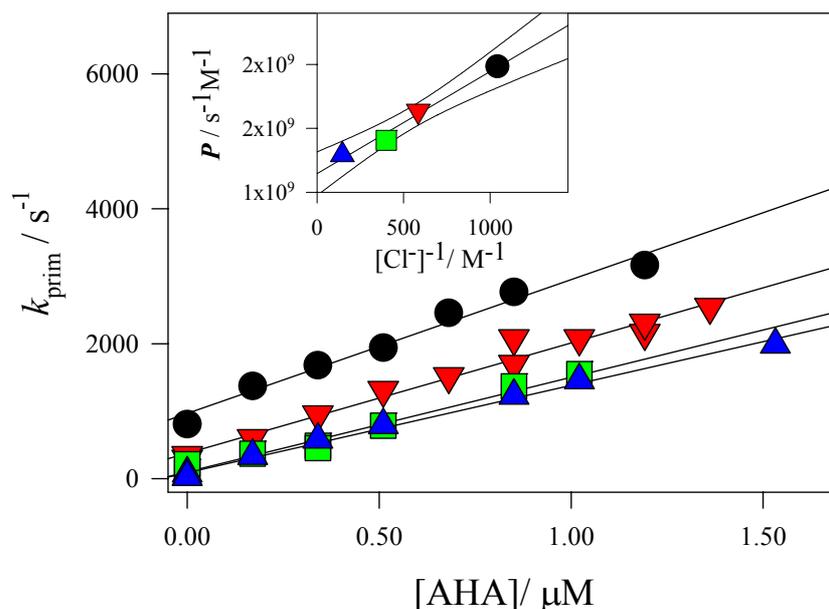
El término  $f([Cl^-])$  incluye al producto  $k_{18} \times [H_2O]$ , el que es menor a  $100 \text{ s}^{-1}$  [Yu y col., 2004], más un término dependiente de la concentración de cloruros que proviene de la reacción reversible 17. Si consideramos sólo la reacción 17 de ida,  $f([Cl^-])$  se puede aproximar a  $k_{18} + k_{17} / (K_{14,15} \times [Cl^-])$ . Esta suposición predice una disminución de  $f([Cl^-])$  con la concentración de cloruros.



**Figura 4.17:** decaimientos a 340 nm obtenidos con soluciones  $5 \times 10^{-3}$  M  $S_2O_8^{2-}$  y  $1.7 \times 10^{-3}$  M  $Cl^-$  en presencia de (de arriba hacia abajo): 0 (rojo); 1.6 (azul); y 2.4 (verde)  $mgL^{-1}$  AHA, a 293 K. Las líneas sólidas muestran el ajuste de los datos con la Ecuación 4.1.

Los gráficos de  $k_{prim}$  contra la concentración molar de AHA, calculada asumiendo su peso molecular de  $4.7 \times 10^3$   $g\ mol^{-1}$  se comportan linealmente (Figura 4.18). Las ordenadas al origen de estos gráficos,  $f([Cl^-])$  de la Ecuación 4.7, disminuyen al aumentar la concentración de  $Cl^-$ , como se predijo. El gráfico lineal de las pendientes de la Figura 4.18,  $P$ , contra la inversa de la concentración de cloruros,  $[Cl^-]^{-1}$  se muestra en el recuadro interno de la Figura 4.18. De este gráfico se obtienen los valores de  $k_{23} = (1.15 \pm 0.15) \times 10^9$   $M^{-1}s^{-1}$ , y  $k_{22}/K_{14,15} = (8.0 \pm 0.8) \times 10^5$   $s^{-1}$  de la ordenada al origen y la pendiente de este gráfico, respectivamente. Con el valor de  $K_{14,15} = 3.9 \times 10^4$   $M^{-1}$  se obtiene un valor de  $k_{22} = 3.1 \times 10^{10}$   $M^{-1} s^{-1}$ , en el límite difusional.

Se han publicado valores cercanos a los controlados difusionalmente para reacciones del átomo de cloro con sustratos aromáticos [Alegre y col., 2000; Mártire y col., 2001]. El valor de  $k_{22}$  igual a  $3 \times 10^8$  en  $L\ mol(C)^{-1}s^{-1}$  concuerda con valores publicados para el radical  $HO^\bullet$  con moléculas de gran tamaño [Westerhoff y col, 1999].



**Figura 4.18:** Dependencia de la constante de velocidad de primer orden del radical  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ ,  $k_{\text{prim}}$ , con  $[\text{HA}]$  para soluciones  $5 \times 10^{-3} \text{ M S}_2\text{O}_8^{2-}$  y diferentes concentraciones de cloruro:  $9.6 \times 10^{-4} \text{ M}$  ( $\bullet$ );  $1.7 \times 10^{-3} \text{ M}$  ( $\blacktriangledown$ );  $2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$  ( $\blacksquare$ );  $6.8 \times 10^{-3} \text{ M}$  ( $\blacktriangle$ ). **Recuadro:** Dependencia de la pendiente  $P$  del gráfico principal con la inversa de la concentración de cloruro,  $[\text{Cl}^-]^{-1}$ .

Las constantes de velocidad publicadas para el radical  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  con sustratos aromáticos son menores a  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Herrmann, 2003; Alegre y col., 2000; Mártire y col., 2001], excepto para hidrocarburos aromáticos con sustituyentes ricos en electrones. Sin embargo, se ha medido aquí una constante de velocidad mucho mayor para  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  con el AHA. Los radicales  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  reaccionan principalmente por oxidación, con un potencial de  $E(\text{Cl}_2^{\bullet-}/2\text{Cl}^-) = 2.09 \text{ V}$  contra el Electrodo Normal de Hidrógeno [Schwarz y Dodson, 1984]. Algunos compuestos orgánicos insaturados que contienen grupos carboxilato unidos al anillo aromático (por ejemplo 4-aminobenzoato, metoxifenol, metoxibenzoato, aminobenzoato, y fenoxilbenzoato) reaccionan con el radical  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  con constantes de velocidad del orden de  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Ross y col., 1998]. Los ácidos húmicos contienen grupos carboxílicos principalmente aromáticos, débilmente ácidos (pK entre 4 y 5), y entre un 2.5 y un 3 % de N del cual 3-19 % corresponde a N aromático, por ejemplo derivados de piridina, imina, o anilina [Suton y Sposito, 2005]. Al pH en que se realizaron los experimentos (aproximadamente 4), el ácido húmico presenta un contenido significativo de carboxilatos, lo que justifica el alto valor de  $k_{23}$  observado.

## **Conclusiones:**

La desactivación del radical anión sulfato por iones cloruro disminuyen el tiempo de vida del radical sulfato, haciendo menos eficiente el tratamiento de contaminantes. Los radicales  $Cl^{\bullet}/Cl_2^{\bullet-}$  son muy reactivos tanto con los contaminantes como con las sustancias húmicas presentes durante los tratamientos oxidativos, generando como productos compuestos clorados [Alegre *et al.* 2000, Malcolm & MacCarthy 1986], los que son generalmente más tóxicos que los propios contaminantes.

Se observa además que los radicales de cloro no muestran el mismo comportamiento que el radical sulfato con la concentración de sustancias húmicas. Para concentraciones de cloruros bajas, el equilibrio entre estos radicales (reacciones 14 y 15) está más desplazado hacia el radical  $Cl^{\bullet}$ , cuyo tiempo de vida es muy corto. Lo cual indica que su camino libre medio es muy corto como para posibilitar un proceso reversible entre dos entornos diferentes.

Para concentraciones de cloruros altas, el equilibrio se desplaza hacia  $Cl_2^{\bullet-}$ , cuya principal vía de decaimiento es la recombinación (reacción 16), no pudiendo competir otros procesos como la compartimentalización en dos entornos químicos distintos.

Por estas razones, la existencia de un proceso de equilibrio de los radicales  $Cl^{\bullet}/Cl_2^{\bullet-}$  asociados a las sustancias húmicas, análogo al de la reacción 10 para el radical anión sulfato no resulta favorable.

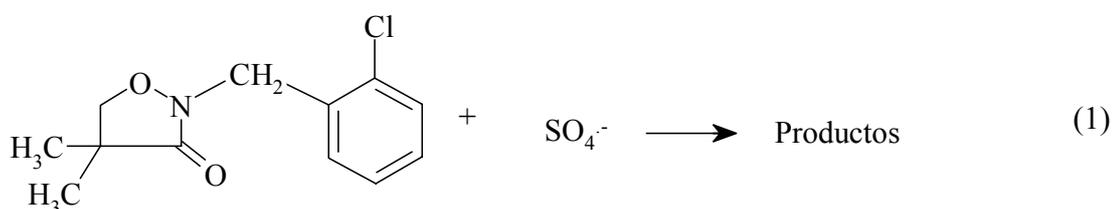
# Capítulo V. Degradación fotoinducida de contaminantes.

## a.- Clomazone.

Para modelar la fotodegradación natural del clomazone, se utilizaron como fotosensibilizadores extracto alcalino de vermicompost (Ext. OH) y ácido húmico Aldrich (AHA). También se estudió la degradación del herbicida por el radical sulfato como modelo de los métodos oxidativos para degradación de contaminantes *in situ*.

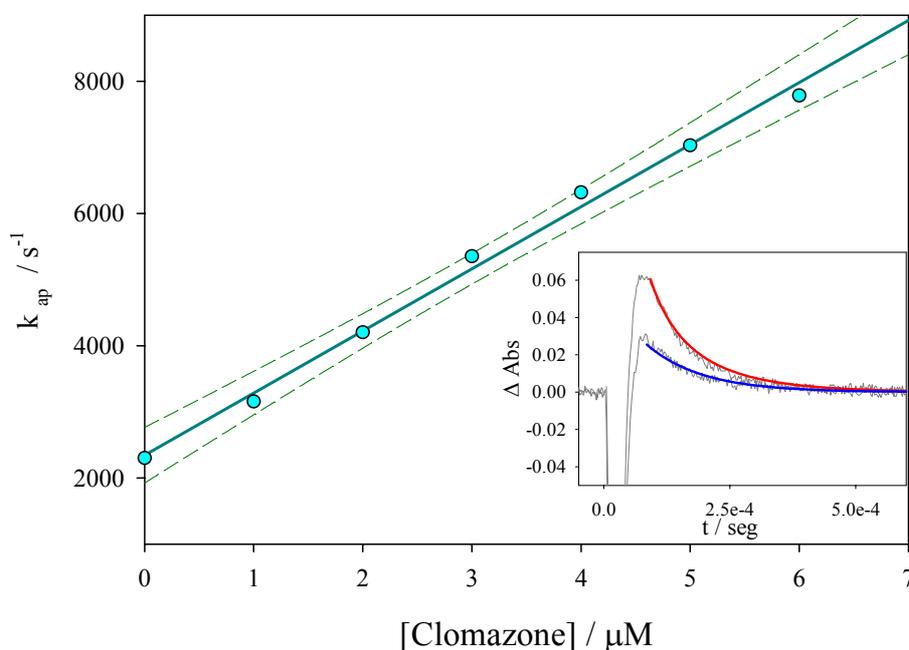
### Estudio del mecanismo de reacción con el radical anión sulfato.

Para estudiar la reacción del clomazone con el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ , reacción 1, se realizaron experimentos resueltos en el tiempo y de fotólisis estacionaria.



Para la determinación de la constante de velocidad del radical sulfato con clomazone se realizaron ensayos de flash-fotólisis convencional con soluciones de peroxodisulfato  $1 \times 10^{-2}$  M y bajas concentraciones de clomazone (en el intervalo 1 - 7  $\mu\text{M}$ ), a  $\text{pH} = 4.4$ . Los resultados experimentales pudieron ajustarse a un decaimiento de primer orden,  $\Delta A = \Delta A_0 \exp(-k_{\text{app}} \times t) + C$ . El término constante  $C$ , menor al 2 % del máximo de absorbancia en todos los ensayos, está asociado a la absorción de los radicales orgánicos generados por la reacción. Las trazas obtenidas a diferentes longitudes de onda muestran un espectro de absorción inmediatamente después del flash de luz que coincide con el publicado para el radical sulfato. La dependencia de las constantes de reacción aparentes con la concentración de clomazone se muestra en la Figura 5.1. De la pendiente del ajuste lineal se obtuvo el valor de la constante de reacción bimolecular  $k_1 = (9.4 \pm 0.4) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ .

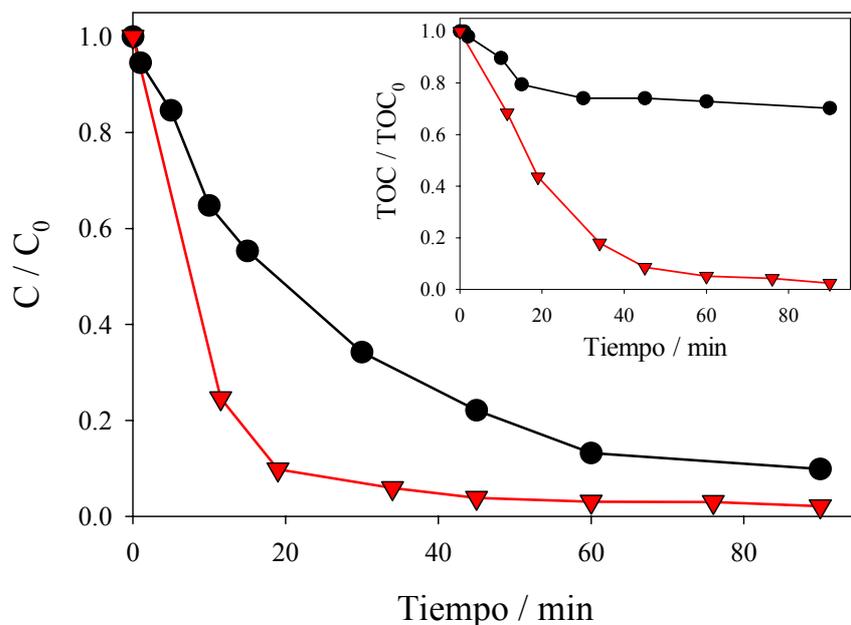
Este valor es del orden de los publicados para el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  con diferentes clorobencenos (2-clorotolueno =  $1.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , 1,2-diclorobenceno =  $6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  [Ross y col., 1998]). El anillo de isoxasolidona reacciona con el radical  $\bullet\text{OH}$  con una constante del orden de  $9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  [Ross y col., 1998], mayor a la obtenida para el mismo radical con los mismos clorobencenos. Como se mencionó en el capítulo anterior, si bien el radical  $\bullet\text{OH}$  es menos selectivo y reacciona con cualquier sustrato con constantes de velocidad mayores o iguales a las del radical sulfato [Rosso, 2002; Neta y col., 1988], la diferencia de reactividad entre ambos radicales típicamente no es mayor a un orden de magnitud. Por lo que no puede descartarse el ataque del radical sulfato al heterociclo.



**Figura 5.1:** Dependencia de la constante de velocidad de pseudo primer orden ( $k_{\text{ap}}$ ) con la concentración molar de clomazone. Recuadro: decaimientos del radical sulfato y sus ajustes en ensayos con  $[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ , en ausencia (rojo) y en presencia de  $6 \mu\text{M}$  de clomazone (azul), a  $22^\circ\text{C}$ .

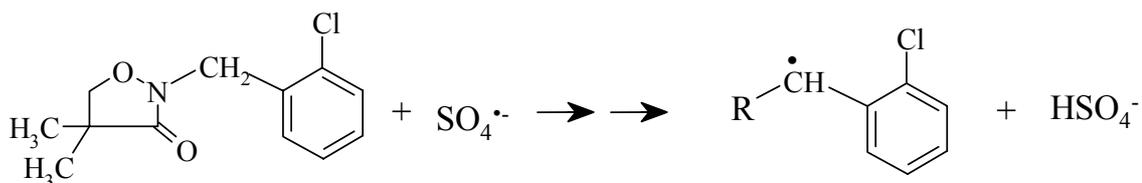
Se realizaron experimentos de fotólisis continua con luz de  $\lambda^{\text{exc}} > 200 \text{ nm}$ , con soluciones acuosas de clomazone  $7.6 \times 10^{-4} \text{ M}$  con o sin peroxodisulfato. Se siguió la degradación del herbicida por HPLC y la disminución del carbono orgánico total (TOC), en función del tiempo de irradiación. Los resultados muestran que luego de 20 minutos de irradiación con luz  $\lambda^{\text{exc}} > 200 \text{ nm}$  en presencia de  $0.1 \text{ M}$  de  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ , se degrada más del 90 % del clomazone inicial (Figura 5.2), y a los 90 minutos de tratamiento se degrada casi totalmente el herbicida. En ausencia de  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  la

velocidad de degradación es menor, ver Figura 5.2. Los valores de TOC muestran diferencia más marcadas entre los experimentos en presencia y en ausencia de  $S_2O_8^{2-}$ . En los ensayos en presencia de  $S_2O_8^{2-}$  el TOC disminuye a valores por debajo del 5 % del inicial luego de 60 minutos. Mientras que en ausencia de  $S_2O_8^{2-}$ , el TOC se reduce sólo un 25 % en tiempos de tratamiento de más de 80 minutos.



**Figura 5.2:** Evolución temporal de la concentración relativa de Clomazone en soluciones del herbicida irradiadas en ausencia (●) o presencia (▼) de  $Na_2S_2O_8$  0.1 M. **Recuadro:** Evolución temporal de la medida de TOC relativa a la inicial en las mismas soluciones.

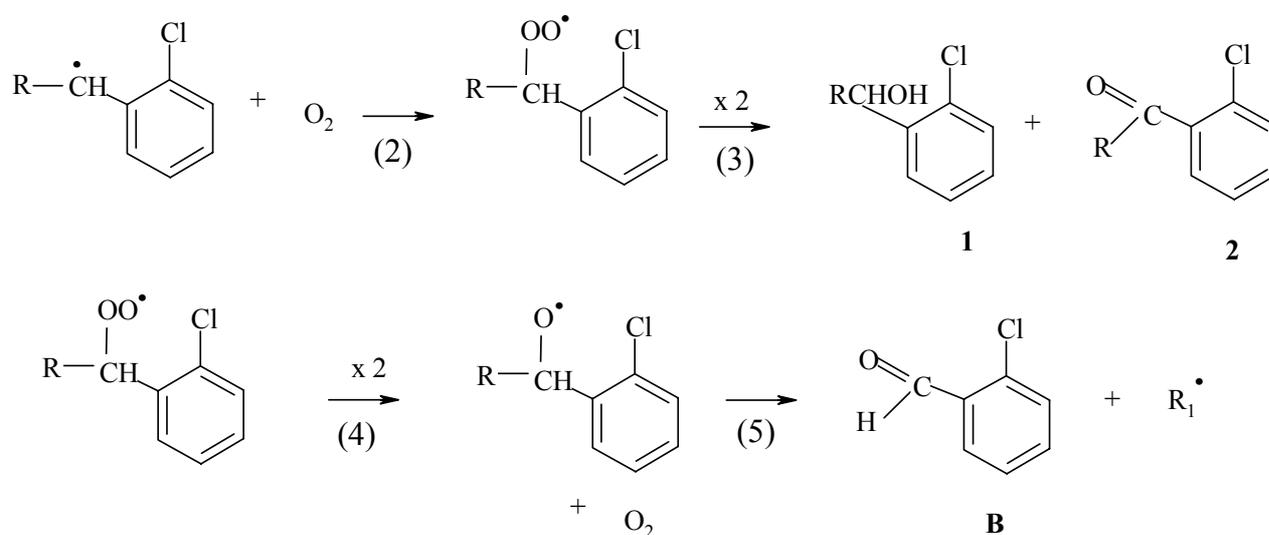
Los productos de oxidación detectados y caracterizados por sus espectros de masas se listan en la Tabla 5.1. Se observa que los productos **A - E** conservan el anillo aromático, con oxidación del carbono en posición  $\alpha$  o ruptura del heterociclo en diferentes posiciones. Los productos **A, B** y **C** se generan por oxidación del  $C\alpha$  al anillo aromático, los que sugieren la participación de radicales bencilo sustituidos como intermediarios de la reacción de la siguiente forma:



Donde R puede ser el anillo de isoxasolidona sustituido o alguno de sus productos de oxidación (como se mencionó anteriormente).

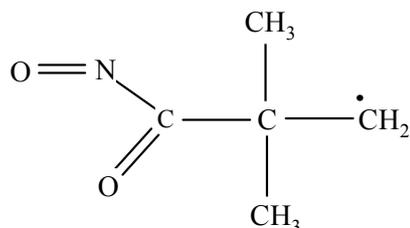
La formación de estos radicales puede deberse a diferentes procesos, como por ejemplo la abstracción de H del C $\alpha$  al anillo por el radical sulfato, u otros mecanismos que involucran al radical hidroxiciclohexadienilo (HCHD) o al radical catión [Merga y col., 1994; Rosso y col., 2003; Mártire y Gonzalez, 2001].

Las reacciones que intervienen en la formación de los productos **A** y **B** se muestran en el Esquema 1. Los radicales bencilo reaccionan eficientemente con el oxígeno molecular para dar radicales peroxilo (reacción 2) [Rosso y col., 2003], los que pueden desproporcionarse para generar compuestos carbonílicos y alcoholes (reacción 3). El producto **C** corresponde a la oxidación de los productos anteriores.



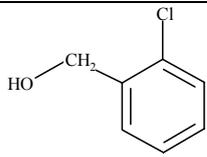
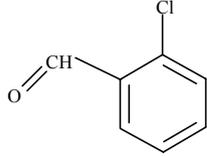
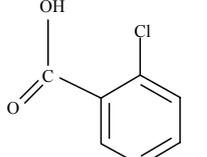
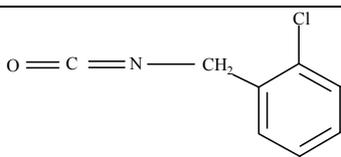
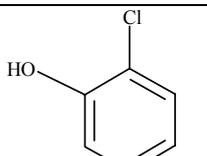
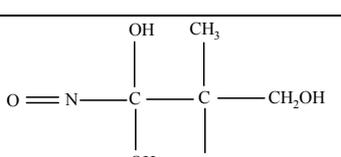
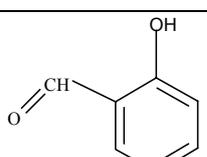
**Esquema 1:** Formación de los productos de reacción **A** y **B** a partir del radical bencilo sustituido. Los productos **A** y **B** corresponden respectivamente a los compuestos **1** y **2** con R = H.

Los radicales peroxilo también pueden recombinarse para generar radicales alcóxido y oxígeno molecular [Janik y col., 2000], reacción 4. Los radicales alcóxido reaccionan fragmentándose en un radical más pequeño y clorobenzaldehído, reacción 5. Para el radical bencilo del clomazone, R corresponde al anillo de 4,4-dimetil-3-isoxazolidona y R $_1^\bullet$  al radical:



Este radical reacciona por oxidación posterior para dar el producto **F**.

**Tabla 5.1:** Productos por CG-MS de la degradación del clomazone, generados por fotólisis de soluciones con 1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. T es el tiempo en el cual se detecta el máximo de concentración de dicho producto, TR es el tiempo de retención en la columna.

Producto	T (min)	TR (min)	Espectro de masas (m/z)
 <p style="text-align: right;"><b>A</b></p>	5-10	4.22	77.1, 79.1, 107.1, 51.0, 85.0, 142.1, 50.0, 75.1, 73.0, 53.0, 63.1, 105.1, 78.0, 74.0, 62.0, 113.1, 139.0, 125.1, 144.1, 89.1, 80.1, 110.9, 76.1
 <p style="text-align: right;"><b>B</b></p>	10-15	3.70	139.1, 140.0, 110.9, 75.0, 50.0, 51.0, 141.0, 76.9, 142.0, 76.0, 206.9, 112.9, 74.1, 52.0, 119.8, 116.8, 112.1, 60.8, 69.3, 114.0, 71.9, 77.6, 73.1, 63.1
 <p style="text-align: right;"><b>C</b></p>	30-45	5.66	139.2, 85.0, 75.0, 111.2, 50.1, 83.0, 155.1, 141.2, 113.1, 157.1, 51.1, 77.2, 74.3, 73.1, 137.2, 55.2, 87.0, 76.1, 58.9, 65.1, 71.3, 208.3, 140.1, 280.9, 60.2, 63.3, 102.2, 110.2, 81.2, 133.3, 79.1
 <p style="text-align: right;"><b>D</b></p>	10-45	2.89	83.0, 116.9, 166.8, 164.9, 121.1, 129.9, 86.0, 132.1, 60.0, 168.8, 119.0, 95.1
 <p style="text-align: right;"><b>E</b></p>	45-60	2.81	83.0, 83.9, 51.1, 106.2, 105.1, 118.0, 77.1, 52.0, 50.1, 78.2, 119.9, 55.0
 <p style="text-align: right;"><b>F</b></p>	5-10	7.91	149.2, 57.2, 150.2, 56.2, 104.2, 76.1, 55.2, 50.2, 82.2, 65.2
 <p style="text-align: right;"><b>G</b></p>	30-60	3.28	82.9, 85.0, 117.0, 83.9, 119.0, 60.1, 121.0, 86.9, 95.0, 70.1, 50.0, 96.1, 120.0

La reactividad de los anillos heterocíclicos con radical sulfato (ver más arriba) predice la formación del producto **D**, que resulta de la ruptura del ciclo en el enlace N-O y en el enlace entre el carbono del grupo carbonilo y el carbono cuaternario, como se muestra en el Esquema 2.



correspondiente radical catión por fotoionización [Russo-Caia y Steenken, 2002]. La pérdida de un protón del grupo metilo del radical catión genera la formación de radicales bencilo [Russo-Caia y Steenken, 2002]. La detección de los productos **A** y **B** nos permite proponer la posible participación de radicales bencilo como intermediarios de reacción (como se mostró en el Esquema 1). Esto indica que en nuestras condiciones experimentales, la energía de la luz empleada sería suficiente para fotoionizar al compuesto, o a sus productos de oxidación. Estos resultados están de acuerdo con la obtención de **A** y **B** como los productos principales detectados en la fotodegradación de este herbicida en agua destilada y en aguas de irrigación de campos de plantación de arroz [Zanella y col, 2008].

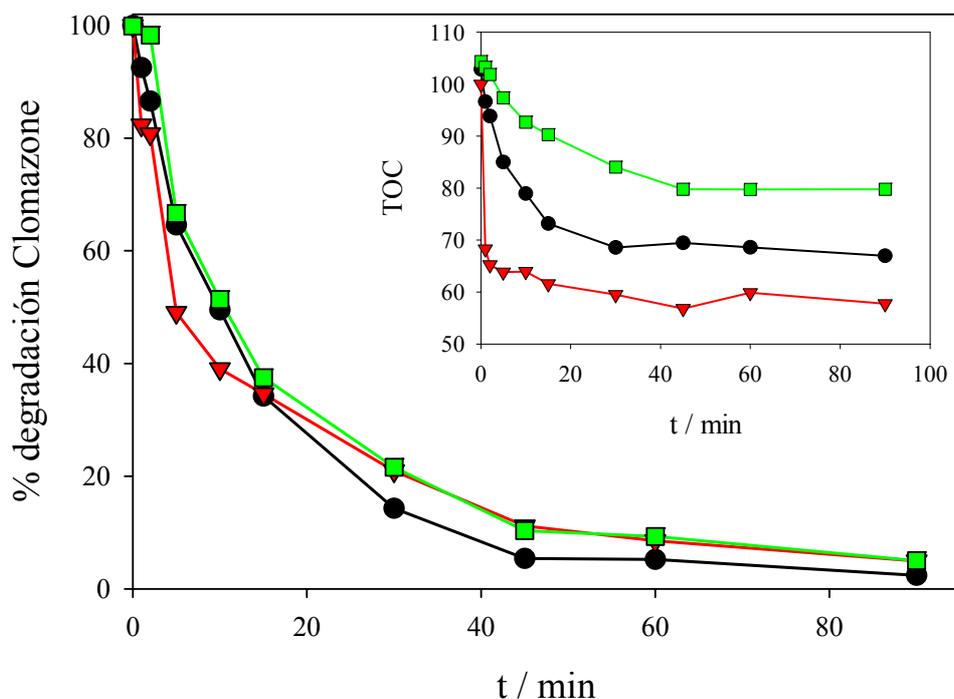
Se intentó obtener información de los intermediarios de la reacción del radical sulfato con el clomazone, registrando sus espectros por flash-fotólisis. En los ensayos realizados con flash-fotólisis convencional, los tiempos son muy largos y no pueden separarse los espectros de las especies generadas. Mientras que en los experimentos de láser flash-fotólisis no pueden obtenerse datos por debajo de 300 nm, región en la que es más importante la absorbancia de los radicales orgánicos, debido a la alta absorbancia de las soluciones de trabajo.

Nascimento y col. [Nascimento y col., 2007] estudiaron la remediación de aguas naturales (conteniendo clomazone y otros contaminantes) por procesos foto-Fenton con Fe(II), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y luz solar. Los autores mostraron que a bajas concentraciones del contaminante, más del 90% del contenido de carbono orgánico total se mineralizaba en alrededor de 2 a 3 horas, utilizando reactores solares de diferentes geometrías.

#### *Ensayos en presencia de peroxodisulfato y sustancias húmicas.*

Como se mostró en el capítulo anterior, las SH disminuyen la vida del radical SO<sub>4</sub><sup>•-</sup>, modificando la eficacia de los tratamientos oxidativos in situ. Para observar el efecto de las SH en la degradación del herbicida por el radical SO<sub>4</sub><sup>•-</sup> se realizaron ensayos de irradiación continua de soluciones acuosas del herbicida en presencia de: (1) 10<sup>-3</sup> M de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, (2) de 5 ppm de AHA, y (3) de 5 ppm de AHA y 10<sup>-3</sup> M de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Los resultados de degradación del contaminante y de mineralización del mismo se muestran en la Figura 5.3. Se observa que el contaminante se degrada eficientemente tanto por sensibilización por AHA como por oxidación por el radical SO<sub>4</sub><sup>•-</sup>, como se observa en la Figura 5.3. Sin embargo, no se observó una degradación mayor cuando se utilizó Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> y AHA juntos. Esto puede deberse a que la luz que llega a la muestra es absorbida por ambas especies. Con respecto a la mineralización de la muestra, se observa que ésta es más efectiva por oxidación con peroxodisulfato en ausencia de SH. En el tratamiento conjunto con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> y AHA la mineralización es menor, mientras que en las condiciones de trabajo la fotosensibilización con SH es intermedia entre estas dos. Sin embargo, se observa que con estas

condiciones, no se alcanza una mineralización eficiente de la muestra. Si bien la degradación del herbicida es igualmente eficiente en las tres condiciones empleadas, su grado de mineralización disminuye debido principalmente a que en presencia de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  y AHA, los radicales sulfato generados reaccionan tanto con el contaminante como con la materia orgánica presentes en la solución (ver Capítulo IV, esquema 4.1).



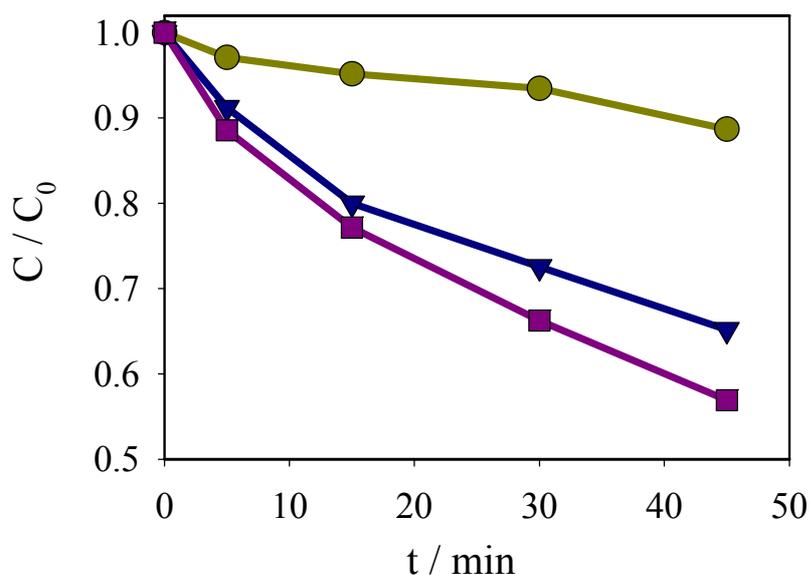
**Figura 5.3:** Evolución temporal de la concentración porcentual relativa de Clomazone en soluciones del herbicida irradiadas con 5 ppm de AHA (●),  $10^{-3}$  M de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (▼), y 5 ppm de AHA y  $10^{-3}$  M de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (■). **Recuadro:** Evolución temporal de la medida de TOC en las mismas soluciones.

#### *Estudio del mecanismo de fotosensibilización con sustancias húmicas.*

Para estudiar el efecto de las sustancias húmicas en la degradación de clomazone, se siguió la evolución temporal de la concentración de herbicida y el contenido de carbono orgánico durante la irradiación con luz de  $\lambda^{\text{exc}} > 300$  nm. Para los ensayos con soluciones saturadas en aire, se observa que los cambios en la concentración y el TOC son mucho más marcados en soluciones con agregado de 20 ppm de AHA que en su ausencia, como se muestra en las Figuras 5.4 y 5.5. Para estos ensayos, la absorbancia del clomazone es menor al 10% de la de las sustancias húmicas en todo el intervalo de irradiación de la lámpara. Como se observa en ambas figuras, la degradación del contaminante es poco eficiente en ausencia de sustancias húmicas, por lo que el

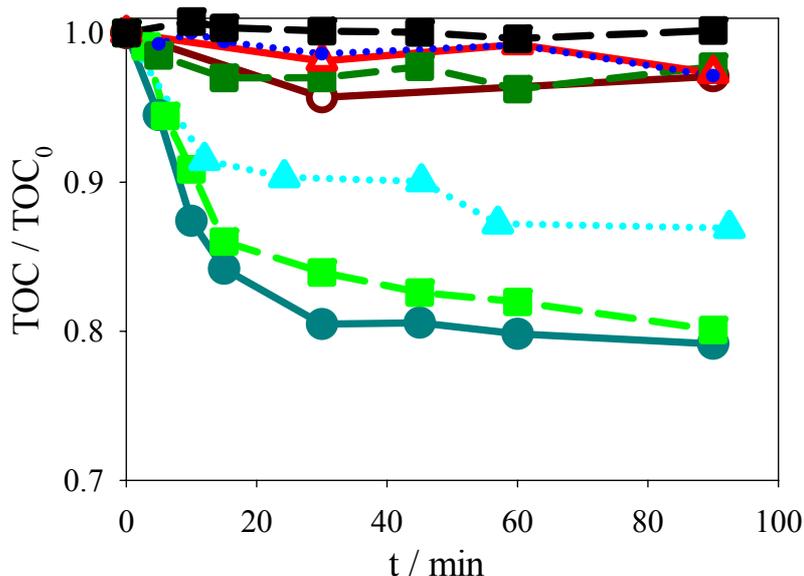
proceso es fotosensibilizado por estas sustancias.

Para determinar cuáles de las especies reactivas generadas por irradiación de sustancias húmicas participan en la degradación del clomazone, se realizaron experimentos utilizando AHA, Ext. OH o rosa de bengala (RB) como sensibilizadores en presencia de diferentes concentraciones de oxígeno disuelto, y/o desactivadores selectivos. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 5.5. Se observó que tanto la degradación del herbicida como la disminución del contenido de carbono orgánico total dependen de la concentración de oxígeno disuelto.



**Figura 5.4:** Concentración relativa de clomazone en función del tiempo de irradiación con luz de  $\lambda > 300$  nm, para clomazone solo (●), clomazone con AHA saturado en aire (▼) y clomazone con AHA saturado en O<sub>2</sub> (■).

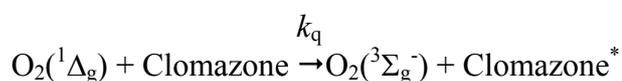
En ensayos con soluciones del herbicida burbujeadas con Ar (para desplazar el O<sub>2</sub> disuelto) no se observó disminución del TOC. El mismo efecto inhibitorio en la mineralización de la muestra se obtuvo empleando soluciones saturadas en aire con el agregado de NaN<sub>3</sub> (desactivador para oxígeno singulete, O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) [Rubio y col., 1992] y los radicales •OH [Ross y col., 1998]). Estos resultados demuestran que para  $\lambda^{\text{exc}} > 300$  nm el O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) es la principal especie reactiva en la fotodegradación del clomazone.



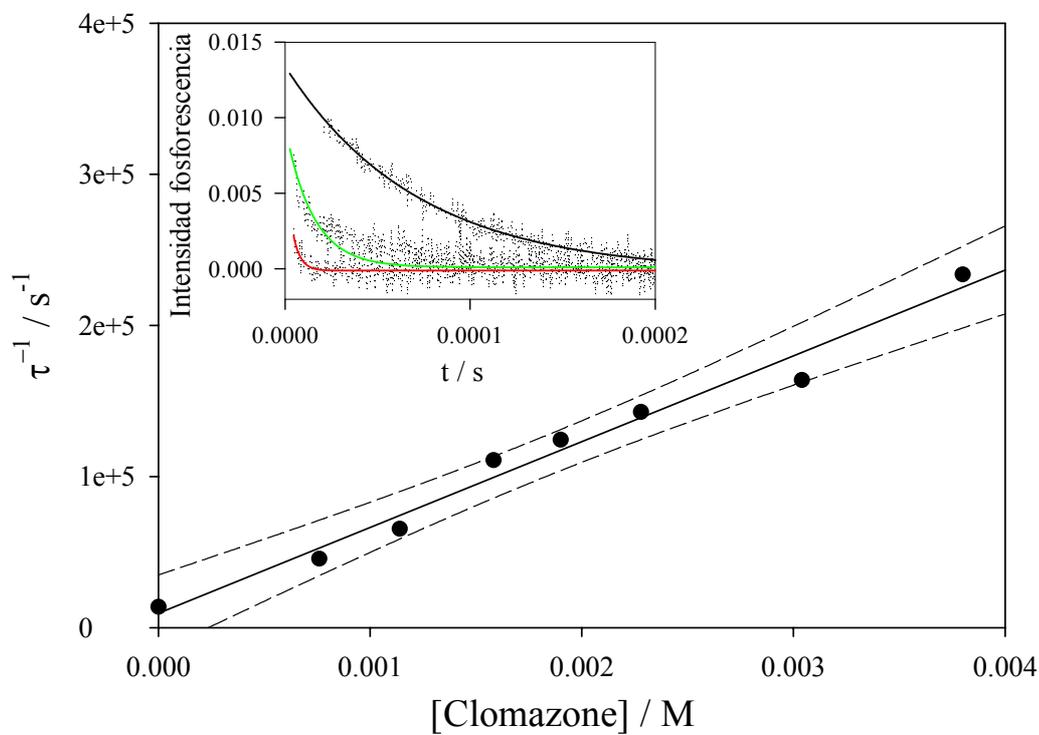
**Figura 5.5:** Evolución del contenido de carbono orgánico de soluciones de clomazone irradiadas con luz de  $\lambda > 300$  nm, en las siguientes condiciones: solo (—■—); con AHA (—●—); con AHA y  $\text{NaN}_3$  (—△—); con AHA, saturada en Ar (—■—); con Ext. OH (—■—); con Ext. OH, saturada en Ar y (—●—); con RB (—△—); con RB y  $\text{NaN}_3$  (—○—).

Para estos ensayos la absorbancia de la solución de AHA es del orden de 1.5 veces mayor que la de la solución del Ext. OH en todas las longitudes de onda de excitación. En estas condiciones el Ext. OH y el AHA muestran eficiencias comparables para la fotodegradación del clomazone, en concordancia con nuestra observación previa de que la producción de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  es más eficiente para el Ext. OH que para el AHA (ver Figura 3.12, Capítulo 3).

Para tener mayor información del proceso de fotodegradación, se estudió la cinética de desactivación del  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  por clomazone. La desactivación del  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  puede seguir dos vías: (i) por reacción química con el sustrato con una constante de velocidad  $k_r$ , y (ii) por interacción física con una constante de quenching  $k_q$ . En esta ecuación,  $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$  es el estado fundamental del oxígeno molecular. La constante de velocidad bimolecular del proceso global contiene contribución de los dos procesos de desactivación  $k_t = k_r + k_q$ .



El valor de  $k_t$  en  $D_2O$  se obtuvo del análisis de las trazas de fosforescencia resueltas en el tiempo (TRPD) del  $O_2(^1\Delta_g)$  a 1270 nm ( $\lambda^{exc} = 532$  nm) las que se muestran en el recuadro de la Figura 5.6.



**Figura 5.6:** Gráfica para determinación de  $k_t$ . **Recuadro:** trazas de TRPD con 0 (en negro), 2.3 (en verde) y 3.8 mM (en rojo) de Clomazone.

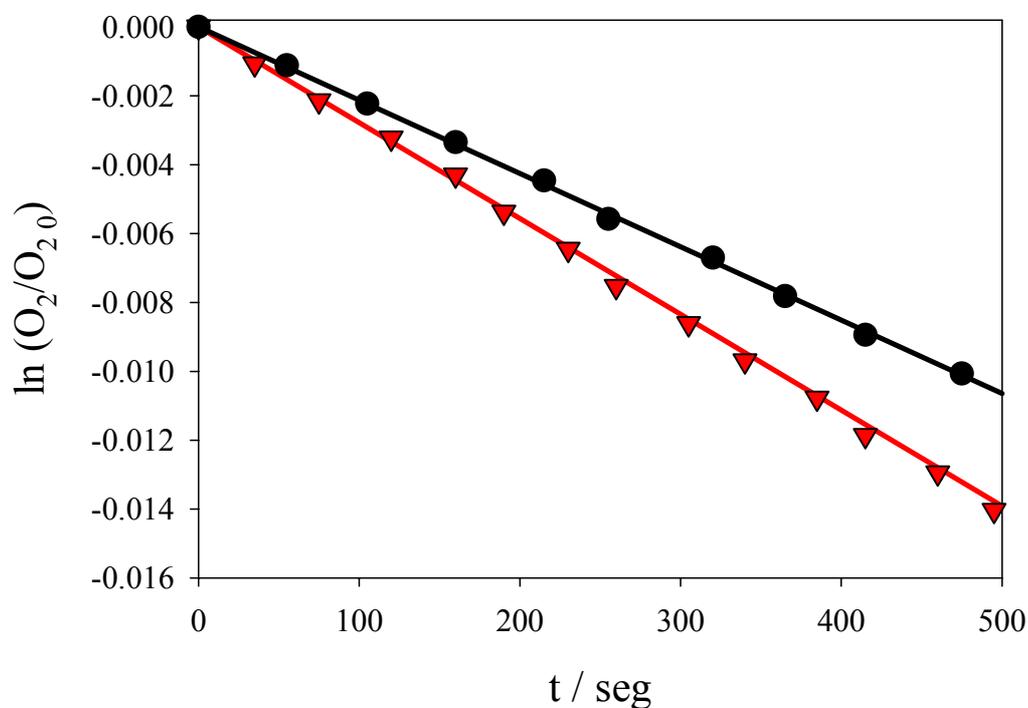
El tiempo de vida del  $O_2(^1\Delta_g)$  en las soluciones en  $D_2O$  con el sensibilizador,  $\tau_\Delta$ , disminuye al aumentar la concentración del sustrato adicionado, según la Ecuación 5.1 [Mártire y col., 1993].

$$1/\tau_\Delta = 1/\tau_\Delta^0 + k_t \times [\text{clomazone}] \quad \text{Ec. 5.1}$$

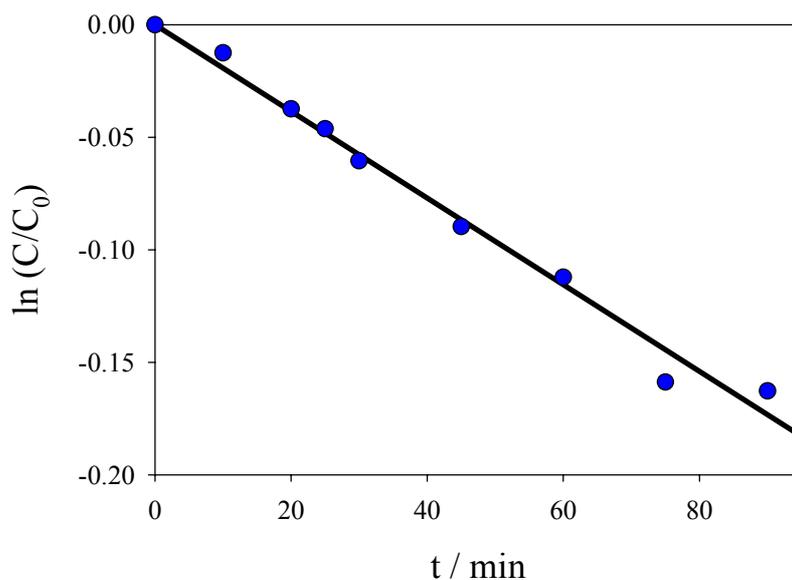
donde  $\tau_\Delta^0$  es el tiempo de vida del  $O_2(^1\Delta_g)$  en ausencia de clomazone. El gráfico de  $1/\tau_\Delta$  vs.  $[\text{clomazone}]$  se muestra en la Figura 5.6. El valor de  $\tau_\Delta^0$  en  $D_2O$  obtenido a partir de la ordenada al origen del gráfico, concuerda dentro del error experimental con los publicados en la literatura [Wilkinson y col., 1995]. A partir de la pendiente del ajuste lineal de los datos se obtiene un valor de  $k_t = (5.7 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Del seguimiento del consumo de clomazone por HPLC (Figura 5.8) y de oxígeno disuelto con un electrodo selectivo (Figura 5.7), en experimentos de irradiación continua de soluciones de clomazone y RB se obtuvieron el valor de  $k_r$  y la estequiometría de la reacción. Las pendientes de las rectas de pseudoprimer orden del consumo de oxígeno y del pesticida son respectivamente  $-(2.14 \pm 0.07) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  y  $-(2.24 \pm 0.03) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Estos valores son iguales dentro del error

experimental, y por lo tanto teniendo en cuenta que el consumo de oxígeno se debe únicamente a la reacción entre el oxígeno singlete y el clomazone, la estequiometría de ésta reacción es 1 a 1 [García, 1994]. Como las pendientes son proporcionales a  $k_r$ , puede obtenerse el valor de la constante experimental a partir del análisis comparativo de los resultados del consumo de oxígeno del sustrato y de una sustancia de referencia de  $k_r$  conocida, en idénticas condiciones experimentales [Foote y Ching, 1975]. Se utilizó como referencia el aminoácido histidina, con un valor de  $k_r = 9.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Miskoski y Garcia, 1993], y a partir del cociente de las pendientes se obtuvo el valor de  $k_r$  para clomazone de  $(5.4 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Figura 5.7). Como puede observarse de los valores de  $k_t$  y  $k_r$  obtenidos, estos son iguales dentro del error experimental, por lo que el clomazone desactiva al oxígeno singlete por la vía química principalmente.



**Figura 5.7:** cinética de consumo del oxígeno disuelto en el ensayo con clomazone (en negro) y con histidina (en rojo), para la determinación de  $k_r$ .



**Figura 5.8:** cinética de consumo del clomazone para la determinación de  $k_r$ .

Para la degradación de clomazone sensibilizada por AHA en soluciones saturadas en aire irradiadas con luz de  $\lambda^{\text{exc}} > 300$  nm, se determinaron como productos principales alcohol 2-clorobencílico y 2-clorobenzaldehído (**A** y **B** en la Tabla 5.1). En estas condiciones es probable que además de  $O_2(^1\Delta_g)$  otras especies como el radical  $\cdot OH$  sean relevantes en la degradación del herbicida (ver Capítulo VI).

El oxígeno singlete reacciona eficientemente con el anillo no aromático, debido a su carácter electrofílico. La interacción puede ser tanto por quenching físico como químico. Es sabido que varios heterociclos no aromáticos son oxidados por esta especie reactiva, produciéndose finalmente la ruptura del anillo [Iesce y col., 2007], en concordancia con los productos detectados.

## **Conclusiones:**

Como se observó con otros pesticidas o herbicidas [Burrows y col., 2002], la fotodegradación directa por luz solar es un proceso de menor importancia (como puede verse en las Figuras 5.4 y 5.5 para fotólisis con luz de  $\lambda > 300$  nm), sin embargo en suelos y aguas naturales donde están presentes las sustancias húmicas, la degradación fotosensibilizada de clomazone puede ser un mecanismo eficiente para su remoción.

El clomazone es eficientemente degradado en aguas naturales con concentraciones apreciables de sustancias húmicas, debido a la oxidación por oxígeno singulete ( $O_2 (^1\Delta_g)$ ). A pesar del corto tiempo de vida de 4  $\mu s$  del oxígeno singulete en agua, esta especie alcanza en aguas naturales irradiadas por luz solar concentraciones en estado estacionario mayores a  $10^{-14}$  M.

Los resultados también muestran que el clomazone es eficientemente degradado por procesos avanzados de oxidación (AOP), como por ejemplo UV/  $Na_2S_2O_8$  que involucra al radical  $SO_4^{\bullet-}$  como iniciador del proceso de oxidación (Figuras 5.2 y 5.3).

### ***b.- Ácido tricloroacético:***

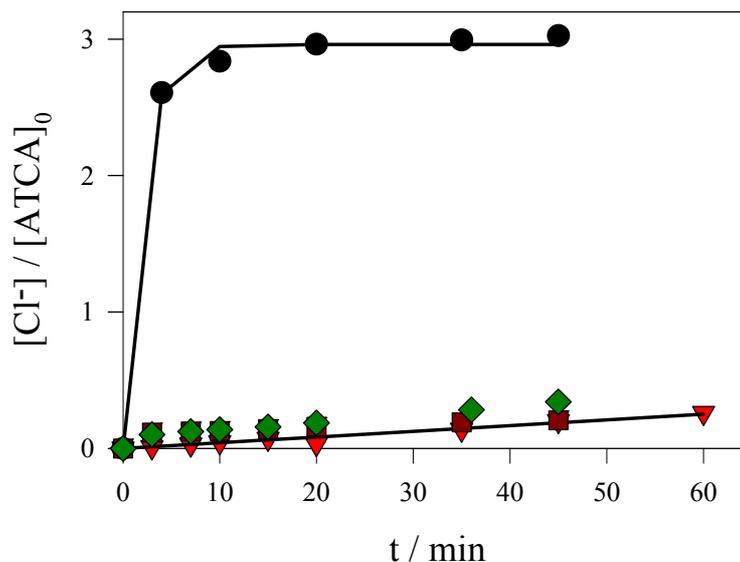
Se estudió la degradación del ácido tricloroacético (ATCA) por diferentes radicales inorgánicos de carácter reductor, así como también la capacidad del ácido húmico de degradarlo por fotosensibilización. Los radicales estudiados son el radical anión superóxido y su ácido conjugado ( $O_2^{\bullet-} / HO_2^{\bullet}$ ), el radical anión  $CO_2^{\bullet-}$  y el radical hidroximetilo ( $^{\bullet}CH_3OH$ ).

#### *Fotólisis del ATCA.*

El ATCA se degrada completamente a HCl,  $CO_2$  y en menor proporción a  $CHCl_3$ , por homólisis de los enlaces C-Cl y C-C inducida por luz UVC [Wu y col., 2001; Krutsko y Kulak, 2004; Lifongo y col., 2004]. Las reacciones térmicas que siguen a este proceso liberan el cloro orgánico como  $Cl^-$  [Wu y col., 2001; Krutsko y Kulak, 2004; Lifongo y col., 2004; Wang y Haag, 1999]. Los experimentos de irradiación continua de soluciones acuosas de ATCA  $2.7 \times 10^{-4}$  M saturadas en aire con luz de 185 nm y 254 nm liberan en 15 minutos  $8.2 \times 10^{-4}$  M de  $Cl^-$ , como puede verse en la Figura 5.9. En este ensayo se detectó la formación de formiato ( $HCO_2^-$ ) en concentraciones menores al 1% de la concentración inicial de ATCA.

La fotólisis de la solución de ATCA en las mismas condiciones, pero utilizando un filtro de cuarzo normal para eliminar la luz de 185 nm, genera una concentración relativa de  $Cl^-$ , ( $[Cl^-]/[TCAA_0]$ ) correspondiente a la degradación del 7 % de ATCA luego de 60 minutos (Figura 5.9). En este ensayo no se han detectado otros productos con las técnicas analíticas disponibles (límite de resolución  $< 0.5$  ppm). Estos resultados se explican por el bajo coeficiente de absorción del ATCA a  $\lambda > 250$  nm ( $\epsilon_{254\text{ nm}} \approx 5\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [Wang y Haag, 1999]).

La recuperación del cloro orgánico como  $Cl^-$  por fotólisis de soluciones acuosas de ATCA con lámparas de Hg de media presión dopadas (Heraeus Noblelight QC2000 y EQ2023, 2kW) que emiten en casi todo el intervalo espectral UVC ( $\lambda_{exc} > 210$  nm) ya había sido publicada [Wörner y col., 1998].



**Figura 5.9:** concentración relativa de cloruros,  $[Cl^-] / [ATCA]_0$ , vs. el tiempo de irradiación en experimentos con: (●) solución de ATCA  $2.7 \times 10^{-4}$  M y excitación con 185 y 254 nm; (▼) solución de ATCA  $9.7 \times 10^{-4}$  M y excitación a 254 nm (◆) y (■) excitación a 254 nm de soluciones saturadas en aire de ATCA  $8 \times 10^{-4}$  M y  $H_2O_2$   $9.8 \times 10^{-2}$  M, ajustadas a pH 3.3 y 9.8, respectivamente.

En experimentos blanco realizados utilizando una camisa de Pyrex alrededor de la lámpara para filtrar las líneas de 185 y 254 nm, no se detectó la formación de productos. Por lo tanto, la degradación de ATCA por reacciones térmicas inducidas por la emisión IR de la lámpara en las condiciones experimentales utilizadas es despreciable.

Para estudiar solamente las reacciones de degradación de ATCA inducida por sustancias húmicas (HS) o por los diferentes radicales inorgánicos, los experimentos de irradiación continua se realizaron con la luz  $> 240$  nm. Para ello se utilizó una camisa de cuarzo natural que filtra la emisión a 185 nm de la lámpara Heraeus Noblelight, o se hizo circular por dentro de la camisa de cuarzo una mezcla de ácido acético-agua en partes iguales cuando se utilizó la lámpara Philips HPK.

#### *Radical anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$ .*

La irradiación con luz UVC (254 nm) de soluciones saturadas en aire de ATCA  $8 \times 10^{-4}$  M y  $H_2O_2$   $4.8 \times 10^{-2}$  M en el intervalo de pH 3.0 - 9.8, genera bajas concentraciones de iones cloruro aún para tiempos de irradiación largos (Figura 5.9). Para relaciones de  $[H_2O_2] / [ATCA]$  mayores que 10, el agua oxigenada compite con el ATCA por los radicales  $HO^\bullet$ . Por lo tanto, en las condiciones experimentales utilizadas, la reacción de los radicales  $HO^\bullet$  con el ATCA (reacción 10)

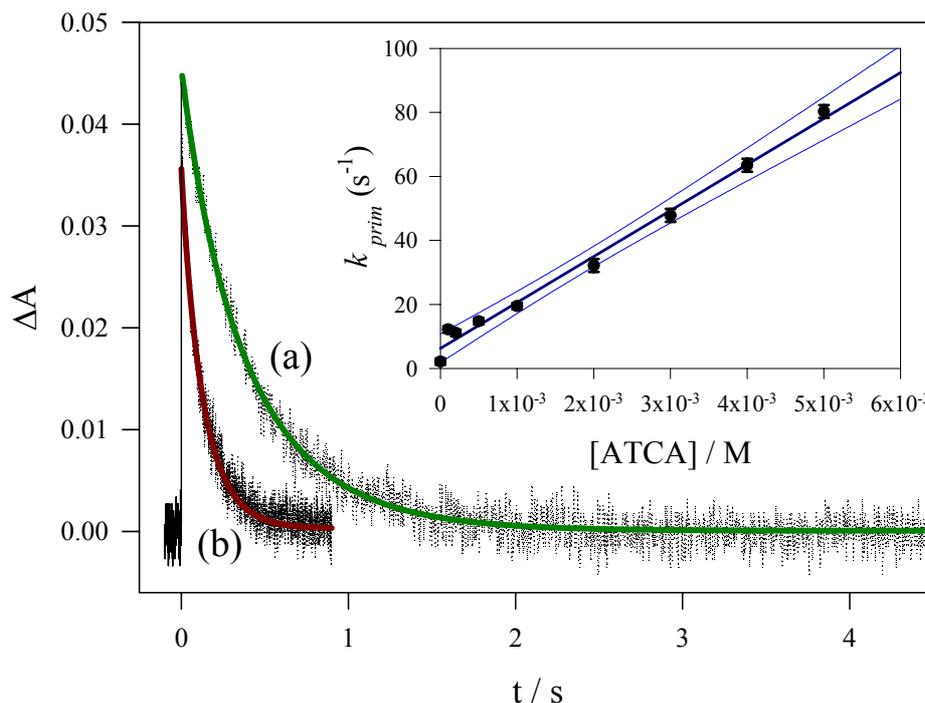
de Tabla 5.2) no es significativa respecto a las reacciones para generar los radicales  $\text{HO}_2^\bullet / \text{O}_2^{\bullet-}$  (reacciones 6 y 7 de la Tabla 5.2). La principal especie presente en soluciones alcalinas es el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que es un agente reductor moderado capaz de degradar al ATCA, según la reacción 8 de la Tabla 5.2. Sin embargo, los rendimientos de cloruro observados en la irradiación de soluciones alcalinas de ATCA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  son similares a los de soluciones ácidas, como se ve en la Figura 5.9. Esto indica que se espera una baja eficiencia de la reacción del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  con el ATCA.

**TABLA 5.2:** Reacciones que intervienen en la degradación de ATCA en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . <sup>(a)</sup> [Ross y col., 1998]. Las constantes de recombinación se expresan como multiplicadas por 2.

$\text{HO}^\bullet + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	$2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>(a)</sup>	(6)
$\text{HO}_2^\bullet \rightleftharpoons \text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+$	$\text{pKa} = 4.8$ <sup>(a)</sup>	(7)
$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{CCl}_3\text{CO}_2^- \rightarrow \text{Productos}$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(8)
$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{HO}_2^\bullet + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{HO}^-$	$9.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>(a)</sup>	(9)
$\text{HO}^\bullet + \text{CCl}_3\text{CO}_2^- \rightarrow \text{CCl}_3\text{CO}_2^\bullet + \text{HO}^-$	$9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>(a)</sup>	(10)

Para evaluar la constante de velocidad de la reacción 8, se realizaron experimentos de flash-fotólisis con soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.0116 M y concentraciones crecientes de ATCA a pH 9. En estos experimentos, el radical anión  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se detectó a 300 nm ( $\epsilon_{290 \text{ nm}} \approx 560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) con una velocidad de decaimiento que aumentaba con [ATCA] (Figura 5.10). El decaimiento pudo ajustarse a una cinética mixta de primer y segundo orden (con constantes de velocidad  $k_{ap}$  y  $k_{rec}$ , respectivamente, como se muestra en las trazas de la Figura 5.10).

El valor de  $k_{rec} = (4 \pm 1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  se obtuvo a pH 9, y es del orden del esperado para la reacción entre  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{HO}_2^\bullet$  a este pH [Bielski y Cabelli, 1995]. Si bien a este valor de pH la especie principal es el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , no se observa su recombinación por su baja reactividad [Bielski y Cabelli, 1995]. De la pendiente del gráfico de  $k_{ap}$  vs. [ATCA], ver recuadro de la Figura 5.10, se obtiene el valor de  $k_8 = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , lo que muestra la baja reactividad de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  con ATCA, en concordancia con los experimentos de fotólisis continua. Estos resultados fueron confirmados por los potenciales de reducción del ATCA determinados por voltamperometría de pulso diferencial [David Gara y col., 2007]. El valor determinado para la primera reducción de ATCA a dicloroacetato contra el electrodo normal de hidrógeno (ENH) es de -600 mV, el cual es mayor al del radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ( $E(\text{O}_2 / \text{O}_2^{\bullet-}) = -330 \text{ mV}$  [Wardman, 1989]). En cambio, los radicales  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  y  $^\bullet\text{CH}_3\text{OH}$  poseen el potencial necesario para la reducción del ATCA ( $E(\text{CO}_2 / \text{CO}_2^{\bullet-}) \approx -2000 \text{ mV}$  y  $E(^\bullet\text{CH}_2\text{OH} / \text{CH}_2\text{O}) \approx -740 \text{ a } -930 \text{ mV}$ , ambos contra el ENH [Wardman, 1989]).

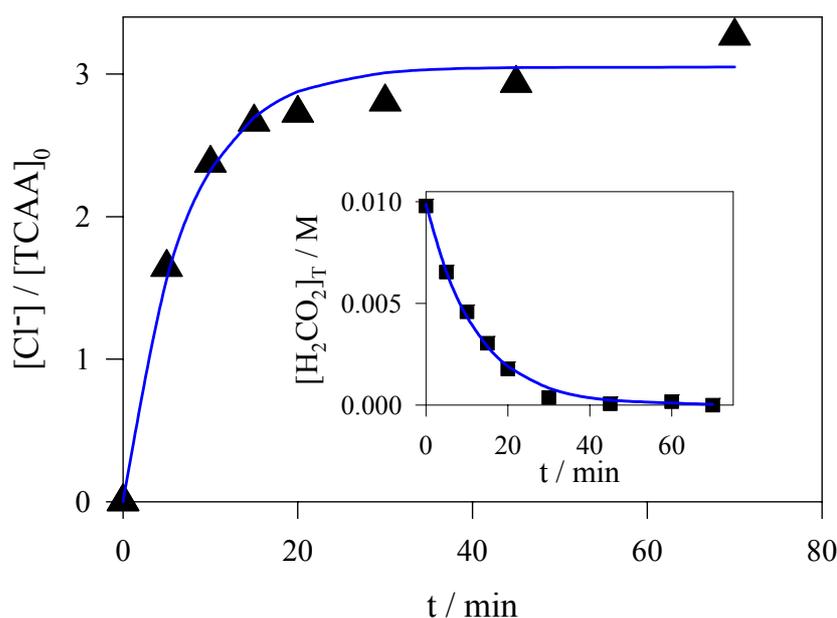


**Figura 5.10:** Trazas observadas a 280 nm en experimentos de flash-fotólisis en soluciones 0.0116 M de  $H_2O_2$  saturadas en oxígeno a  $pH\ 9.0 \pm 0.3$ , en presencia de (a) 0 M y (b)  $1 \times 10^{-3}$  M ATCA, respectivamente. Las líneas llenas corresponden a los ajustes. *Recuadro:* Gráfico de  $k_{prim}$  vs. [ATCA].

Excepto por la absorción del  $O_2^{\bullet-}$ , no se detectó ninguna otra contribución a  $\lambda^{det}$  entre 270 y 550 nm lo que indica que los radicales formados a partir de la reacción 8, o no absorben a estas longitudes de onda o tienen tiempos de vida menores que 0.05 s.

#### *Radical anión dióxido de carbono, $CO_2^{\bullet-}$ .*

La excitación UV-C (254 nm) de soluciones saturadas en aire con  $8 \times 10^{-4}$  M de ATCA,  $5 \times 10^{-2}$  M de  $H_2O_2$  y  $1.3 \times 10^{-2}$  M de ácido fórmico a pH 3.3 condujo a casi un 100 % de recuperación del cloro orgánico como cloruro después de 20 minutos de fotólisis (Figura 5.11).



**Figura 5.11:**  $[Cl^-]/[ATCA]_0$ , vs. tiempo de irradiación para fotólisis UVC (254 nm) de soluciones saturadas en aire de ATCA  $8 \times 10^{-4}$  M,  $H_2O_2$   $5 \times 10^{-2}$  M y formiato  $1.3 \times 10^{-2}$  M a pH 3.3. **Recuadro:** Concentración total de formiato,  $[H_2CO_2]_T$ , vs. el tiempo de irradiación para los mismos experimentos. Las líneas azules de la figura principal y el recuadro representan los ajustes con las ecuaciones 5.2 y 5.3, respectivamente.

En los experimentos de pH 3.3 hay presentes tanto ácido fórmico ( $pK_a = 3.75$ ) como formiato con una relación de concentraciones 2.8:1. La velocidad de consumo del ácido fórmico total,  $[H_2CO_2]_T = [H_2CO_2] + [HCO_2^-]$ , y los perfiles de concentración de iones cloruro pudieron ajustarse a un decaimiento de primer orden y crecimiento exponencial, respectivamente (líneas azules de la Figura 5.11), según las siguientes ecuaciones:

$$[H_2CO_2]_{T,t} = [H_2CO_2]_{T,0} \times e^{-k_{H_2CO_2} \times t} \quad \text{Ec. 5.2}$$

Donde  $[H_2CO_2]_{T,t}$  y  $[H_2CO_2]_{T,0}$  son las concentraciones de formiato total a tiempo  $t$  y a tiempo 0, respectivamente, y  $k_{H_2CO_2}$  es la constante de velocidad global de consumo de formiato.

$$\frac{[Cl^-]_t}{[ATCA]_0} = \frac{[Cl^-]_{final}}{[ATCA]_0} \times (1 - e^{k_{Cl^-} \times t}) \quad \text{Ec. 5.3}$$

Para la cual  $[Cl^-]_t$  y  $[Cl^-]_{final}$  son respectivamente las concentraciones de cloruro a tiempo  $t$  y a tiempos de irradiación largos donde no se observan más cambios en su concentración.

$[ATCA]_0$  es la concentración inicial de ATCA y  $k_{Cl^-}$  es la constante de velocidad aparente de producción de  $Cl^-$ .

Los valores de  $k_{Cl^-} = 2.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  y  $k_{H_2CO_2} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  obtenidos del ajuste de las curvas indican que la velocidad de formación de  $Cl^-$  es 1.5 veces mayor que la velocidad de consumo de ácido fórmico total. Como ya se discutió, se supone que el radical anión  $CO_2^{\bullet-}$  es la principal especie que consume ATCA en nuestras condiciones experimentales. Por lo tanto, la pérdida de tres átomos de cloro como iones cloruro involucra el consumo de dos radicales aniones  $CO_2^{\bullet-}$ .

Los experimentos de fotólisis estacionaria realizados bajo burbujeo con aire no condujeron a la recuperación estequiométrica del cloro orgánico como cloruro. Estas observaciones sugieren que el oxígeno molecular disuelto compite por ATCA con los radicales  $CO_2^{\bullet-}$ , reacciones 11 y 12 de la Tabla 5.3. La recuperación cuantitativa de ATCA observada con un valor inicial de oxígeno disuelto ( $[O_2]_{dis}$ ) de  $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$  en un reactor cerrado, sugiere que el oxígeno molecular se consume eficientemente por la reacción 12 hasta que la relación desfavorable  $k_{11} \times [ATCA] \leq k_{12} \times [O_2]_{dis}$  se revierte.

**TABLA 5.3:** Reacciones que intervienen en la degradación de ATCA en presencia de  $H_2CO_2$ . <sup>(a)</sup> [Ross y col., 1998]. Las constantes de recombinación se expresan como multiplicadas por 2.

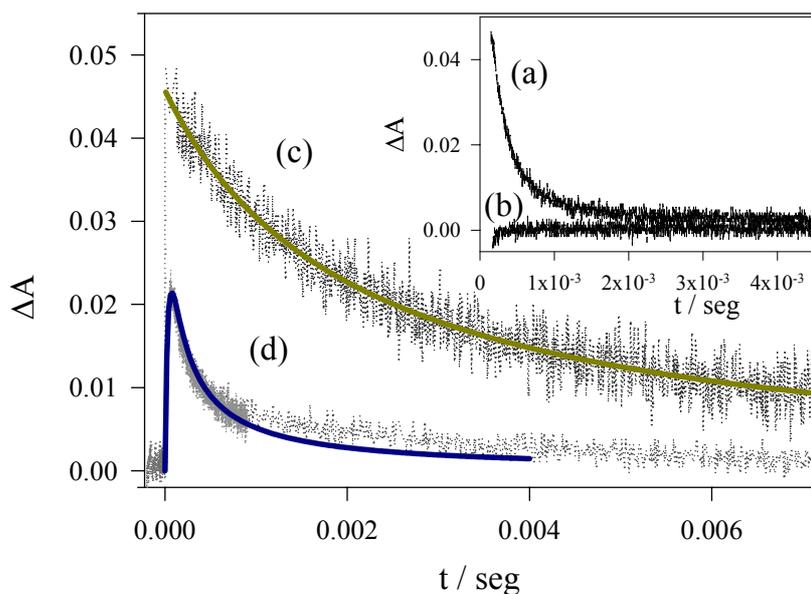
$CO_2^{\bullet-} + CCl_3CO_2^- \rightarrow \bullet CCl_2CO_2^- + Cl^- + CO_2$	$(2 \pm 1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(11)
$CO_2^{\bullet-} + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-} + CO_2$	$(3 \pm 1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ <sup>(a)</sup>	(12)
$CO_2^{\bullet-} + CO_2^{\bullet-} \rightarrow C_2O_4^{2-}$	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(13)
$\bullet CCl_2CO_2^- + CO_2^{\bullet-} \rightarrow \bullet\bullet CClCO_2^- + Cl^- + CO_2$	$(8 \pm 2) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(14)
$\bullet\bullet CClCO_2^- + H_2O \rightarrow Cl(HO)CH-CO_2^-$		(15)
$Cl(HO)CH-CO_2^- \rightarrow H(O)C-CO_2^- + H^+ + Cl^-$		(16)
$\bullet CCl_2CO_2^- + \bullet CCl_2CO_2^- \rightarrow (-O_2C-CCl_2-CCl_2-CO_2^-)$	$(4 \pm 1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(17)

Se realizaron experimentos de flash-fotólisis para obtener información sobre el mecanismo de reacción de  $CO_2^{\bullet-}$  con ATCA, reacción 11 en la Tabla 5.3. Para evitar la interferencia del  $O_2^{\bullet-}$ , el  $CO_2^{\bullet-}$  se generó por reacción del  $HCO_2^-$  con el radical sulfato ( $SO_4^{\bullet-}$ ) formado por fotólisis de peroxodisulfato.

Los experimentos de flash-fotólisis con soluciones acuosas de ATCA  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , en ausencia o presencia de formiato  $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ , no mostraron la formación de especies transientes. En experimentos con soluciones de peroxodisulfato  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , se observó la formación de  $SO_4^{\bullet-}$  (ver

curva **(a)** del recuadro de la Figura 5.12). Experimentos similares con  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$   $1 \times 10^{-3}$  M y ATCA  $1 \times 10^{-3}$  M también muestran la formación del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ , cuyo decaimiento es independiente de [ATCA]. A partir de los resultados experimentales se estimó el límite superior para esta constante de velocidad como  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , el cual está de acuerdo con el valor publicado ( $k < 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [Ross y col., 1998]). Cuando se realizan experimentos con  $5 \times 10^{-3}$  M peroxodisulfato y  $1 \times 10^{-2}$  M formiato no se observa la señal correspondiente al radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ , pero sí a un transiente que absorbe a  $\lambda^{\text{det}} < 350 \text{ nm}$ , como se puede ver en las trazas **(b)** y **(c)**, en la Figura 5.12. Este radical fue asignado a  $\text{CO}_2^{\bullet-}$ , generado por reacción de  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  con formiato y ácido fórmico, como se corroboró posteriormente debido a la similitud de su espectro con el publicado para el  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  [Hug, 1981]. El decaimiento observado para el radical  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  es de segundo orden, con  $2 \times k / \epsilon_{260 \text{ nm}} = 1.16 \times 10^5 \text{ cm s}^{-1}$ . Tomando para este radical el valor de literatura de  $\epsilon_{260 \text{ nm}} \approx 2190 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [Hug, 1981], el valor obtenido para  $2 \times k = 2.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a fuerza iónica 0.01 M está de acuerdo con el publicado para la reacción 13 de la Tabla 5.3.

Por otro lado, experimentos con soluciones saturadas en Ar con  $5 \times 10^{-3}$  M de peroxodisulfato en presencia de  $1 \times 10^{-2}$  M formiato y  $1 \times 10^{-3}$  M de ATCA, mostraron la formación de transientes en el intervalo de longitudes de onda de 270 a 330 nm, con un máximo a 290 nm, ver trazas **(d)** de la Figura 5.12, donde se superponen dos señales con distintas ventanas de tiempo. Un análisis bilineal de estos resultados experimentales reveló la presencia de dos especies. La especie de menor tiempo de vida se asignó al radical  $\text{CO}_2^{\bullet-}$ , por su espectro de absorción (Figura 5.13, círculos verdes) [Hug, 1981]. La especie de mayor tiempo de vida (Figura 5.13, triángulos verdes) se asignó al radical anión  $^{\bullet}\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$ . Bae y Choy postularon al radical  $^{\bullet}\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  como un intermediario en la reducción secuencial de ATCA a dicloroacetato por  $\text{TiO}_2/\text{Pt}$  [Bae y Choi, 2003]. La formación de  $^{\bullet}\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  por la reacción 11 está apoyada por la coincidencia con el espectro publicado [Roman y col., 1997] y por la fuerte dependencia de su decaimiento con la concentración de ATCA [Hart y Anbar, 1970]. Además, no se detecta absorción del  $^{\bullet}\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  en experimentos realizados en las mismas soluciones saturadas en aire, como se espera de la competencia entre la reacción 11 y la 12 para dar principalmente  $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{HO}_2^{\bullet}$  en lugar del radical  $\text{CO}_2^{\bullet-}$ . Como se mencionó anteriormente, la reacción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  con ATCA no genera radicales detectables a longitudes de onda  $> 270 \text{ nm}$ . Como se observa del decaimiento de las señales experimentales (trazas **(d)** en la Figura 5.12), la recombinación del  $^{\bullet}\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  es la principal reacción que consume este radical, reacción 17 de la Tabla 5.3.

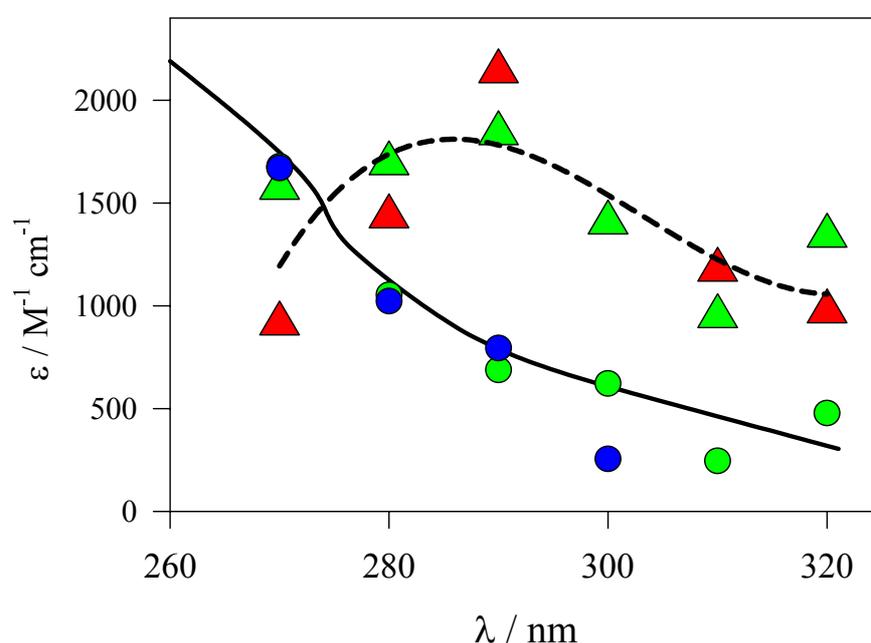


**Figura 5.12:** Transientes correspondientes a soluciones  $5 \times 10^{-3}$  M de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  de pH 5.0 en las siguientes condiciones: **a:**  $\lambda^{\text{det}} = 450$  nm, **b** y **c:** en presencia de 0.01 M  $[\text{H}_2\text{CO}_2]_{\text{T}}$ ,  $\lambda^{\text{det}} = 450$  nm y 260 nm, respectivamente; y **d:** con el agregado de 0.01 M  $[\text{H}_2\text{CO}_2]_{\text{T}}$  y  $1 \times 10^{-3}$  M ATCA,  $\lambda^{\text{det}} = 300$  nm. Las líneas llenas corresponden a las simulaciones cinéticas.

Para confirmar los mecanismos propuestos y obtener datos cinéticos precisos de los experimentos resueltos en el tiempo, se realizaron simulaciones computacionales de los comportamientos cinéticos de las especies involucradas, utilizando un programa basado en el método de Runge-Kutta de resolución de ecuaciones diferenciales. En estas simulaciones se consideraron las reacciones 11 a 17 listadas en la Tabla 5.3, y las reacciones de pseudo primer orden del radical sulfato (con  $\text{HCO}_2\text{H}$  y  $\text{HCO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$  y  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ) y su recombinación bimolecular [Ross y col., 1998]. Como se describió en capítulos anteriores, la concentración inicial de radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  se estimó a partir de datos experimentales realizados en las mismas condiciones pero en ausencia de sustratos (traza **a** en la Figura 5.12), y tomando el valor de  $\epsilon_{450 \text{ nm}}(\text{SO}_4^{\bullet-}) = 1650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [McElroy y Waygood, 1990]. En ausencia de ATCA, el programa de simulación genera perfiles de absorción de  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  que ajustan muy bien los resultados experimentales (traza **c** de la Figura 5.12). Se obtuvieron buenos ajustes de los datos experimentales en presencia de ATCA  $1 \times 10^{-3}$  M con valores de  $\epsilon_{295 \text{ nm}}(\text{CCl}_2\text{CO}_2^{\bullet-}) = (2000 \pm 500) \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $k_{11} = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $2 \times k_{17} = 4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . También se confirmó la contribución despreciable de las reacciones del  $\text{CCl}_2\text{CO}_2^{\bullet-}$  con el solvente y el anión peroxodisulfato.

El valor obtenido para  $2 \times k_{17}$  de  $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  es del orden de los publicados para constantes de velocidad de recombinación de radicales halogenados centrados en el carbono

[Roman y col., 1997; Ross y col., 1998]. La recombinación del  $\cdot\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  es la principal reacción de terminación en los experimentos de flash-fotólisis, y se supone que genera ácido tetraclorobutanodioico como producto de reacción. Se realizaron análisis por HPLC de soluciones de ATCA  $1 \times 10^{-2}$  M,  $\text{HCO}_2\text{H}$   $1 \times 10^{-2}$  M y  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$   $5 \times 10^{-3}$  M, fotolizadas con cinco disparos del equipo de flash-fotólisis convencional. En estos ensayos se detectó la presencia de dos picos, uno más grande que coincide con el ATCA, y el otro pequeño a tiempos de retención más largos que el anterior y que por lo tanto puede atribuirse a una molécula más polar que el ATCA. Sin embargo, no se espera observar el pico correspondiente al ácido tetraclorobutanodioico debido a su inestabilidad térmica [March, 2001].



**Figura 5.13:** Espectro de absorción de  $\text{CO}_2\cdot^-$  (círculos) y  $\cdot\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  (triángulos) obtenidos del análisis bilineal de soluciones saturadas en Ar en las siguientes condiciones: (●) pH 5.0,  $5 \times 10^{-3}$  M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , y 0.01 M  $[\text{H}_2\text{CO}_2]_{\text{T}}$ ; (●) y (▲) pH 5.0,  $5 \times 10^{-3}$  M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 0.01 M de  $[\text{H}_2\text{CO}_2]_{\text{T}}$ , y  $2 \times 10^{-3}$  M de ATCA; y (▲) pH 3.1,  $1 \times 10^{-3}$  M de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 0.01 M de MeOH y  $1 \times 10^{-3}$  M de ATCA. Las líneas corresponden a los espectros publicados para ambos radicales.

En los experimentos de irradiación continua no se detectaron productos alifáticos cloro-sustituídos. Esto puede explicarse porque en estos experimentos se genera continuamente  $\text{CO}_2\cdot^-$ , el que se requiere para la posterior reducción del  $\cdot\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  para dar finalmente  $\text{CO}_2$ , HCl, y pequeñas cantidades de  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ . Se postula la formación de un clorocarbeno ( $\cdot\text{CClCO}_2^-$ ) como intermediario de reacción, el cual se hidroliza al correspondiente derivado clorhidrina ( $\text{Cl}(\text{HO})\text{CH}-\text{CO}_2^-$ ), el que posteriormente se descompone en HCl y glioxilato ( $\text{H}(\text{O})\text{C}-\text{CO}_2^-$ ) [Hine, 1950; Ross y col., 1998], reacciones 14 a 16 en la Tabla 5.3. De hecho, las simulaciones de los decaimientos

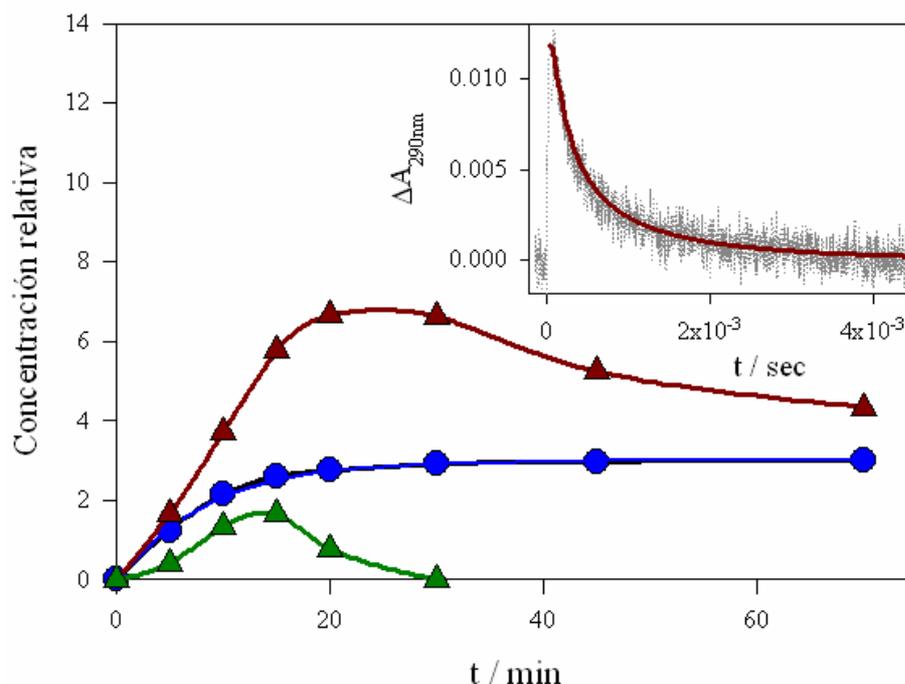
de los transientes observados experimentalmente fue posible únicamente incluyendo la reacción 14 en el mecanismo con una constante de velocidad  $k_{14} = (8 \pm 2) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

El espectro de absorción y el coeficiente de absorción molar obtenidos para el radical  $\bullet\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  son similares a los publicados para radicales dihalo acetato sustituidos [Roman y col., 1997]. El espectro obtenido por dos métodos independientes para generar dicho radical, se encuentra corrido al azul 5 nm con respecto al publicado [Roman y col., 1997], como se observa en la Figura 5.13 (triángulos: datos experimentales, línea punteada: espectro publicado).

#### *Radical hidroximetilo, $\bullet\text{CH}_3\text{OH}$ .*

Soluciones saturadas en aire con  $8.6 \times 10^{-4} \text{ M}$  ATCA,  $5 \times 10^{-2} \text{ M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $9.1 \times 10^{-4} \text{ M}$   $\text{CH}_3\text{OH}$  a pH 3.5 mostraron una recuperación total del cloro orgánico del ATCA como ion cloruro después de 20 minutos de irradiación a 254 nm (Figura 5.14). Se detectó la formación de concentraciones milimolar de formiato y micromolar de oxalato, que acompañaron a la pérdida de cloruro (Figura 5.14). La formación de concentraciones más altas de formiato con respecto al ion cloruro indica que más de una molécula de  $\text{MeOH}$  se oxida por cada molécula de ATCA mineralizada. Por otro lado, cuando el ion cloruro alcanza su valor máximo, el ion oxalato también alcanza su máxima concentración y posteriormente es consumido por el sistema de reacción, sugiriendo que el oxalato es un intermediario en la mineralización del ATCA a  $\text{CO}_2$  y  $\text{HCl}$ .

Para obtener mayor información cinética y sobre el mecanismo de la reacción entre el radical  $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$  y ATCA, reacción 18 de la Tabla 5.4, se realizaron experimentos de flash-fotólisis. No se observaron señales en los experimentos de flash-fotólisis convencional con soluciones acuosas de ATCA  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  y  $\text{CH}_3\text{OH}$   $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  a las que se les eliminó el  $\text{O}_2$  disuelto burbujando con Ar. Tampoco se observaron señales a longitudes de onda de detección  $> 270 \text{ nm}$  en ensayos realizados con soluciones burbujeadas con Ar de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  y  $\text{CH}_3\text{OH}$   $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ , lo que indica que los radicales  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  generados se consumen por su reacción con el  $\text{CH}_3\text{OH}$  para generar el correspondiente radical  $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$  [Ross y col., 1998]. Experimentos con soluciones similares que contenían además ATCA  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  mostraron la formación de un transiente que absorbe a longitudes de onda  $< 330 \text{ nm}$ . El análisis bilineal de las trazas experimentales muestra la presencia de una única especie, con un espectro muy similar al del radical anion  $\bullet\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$ , como puede verse en la Figura 5.13. El transiente observado se asignó por lo tanto a este radical como producto de la reacción entre el radical reductor hidroximetilo y el ATCA, reacción 18 [Hart y Anbar, 1970].



**Figura 5.14:**  $[Cl^-]/[ATCA]_0$  (●),  $[HCO_2^-]/[ATCA]_0$  (▲), y  $500 \times [C_2O_4^{2-}]/[ATCA]_0$  (▲) en función del tiempo de irradiación para fotólisis a 254 nm de soluciones saturadas en aire de pH 3.5 con  $8.6 \times 10^{-4}$  M ATCA,  $5 \times 10^{-2}$  M  $H_2O_2$  y  $9.1 \times 10^{-4}$  M  $CH_3OH$ . **Recuadro:** Perfiles de absorción a 290 nm obtenidos en experimentos de flash-fotólisis con soluciones saturadas en Ar de  $1 \times 10^{-3}$  M  $Na_2S_2O_8$  a pH 3.1 con 0.01 M  $CH_3OH$  y  $1 \times 10^{-3}$  M ATCA. Las líneas llenas de la figura principal y el recuadro corresponden a las simulaciones computacionales de los datos experimentales.

**TABLA 5.4:** Reacciones que intervienen en la degradación de ATCA en presencia de MeOH. <sup>(a)</sup> [Ross y col., 1998]. Las constantes de recombinación se expresan como multiplicadas por 2.

$\bullet CH_2OH + CCl_3CO_2^- + H_2O \rightarrow CCl_2CO_2^- + Cl^- + CH_2(OH)_2 + H^+$	$(2 \pm 1) \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$	(18)
$\bullet CCl_2CO_2^- + \bullet CH_2OH \rightarrow \bullet\bullet CClCO_2^- + Cl^- + H_2CO + H^+$	$3 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$	(19)
$\bullet CCl_2CO_2^- + CH_3OH \rightarrow HCCl_2CO_2^- + \bullet CH_2OH$	$< 2 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$	(20)
$\bullet CH_2OH + O_2 \rightarrow \bullet\bullet OCH_2OH$	$4.9 \times 10^9 M^{-1}s^{-1(a)}$	(21)
$\bullet CH_2OH + \bullet CH_2OH \rightarrow (CH_2OH)_2$	$1.6 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$	(22)
$\bullet CH_2OH + S_2O_8^{2-} \rightarrow SO_4^{\bullet-} + CH_2O + SO_4^{2-} + H^+$	$1.5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1(a)}$	(23)

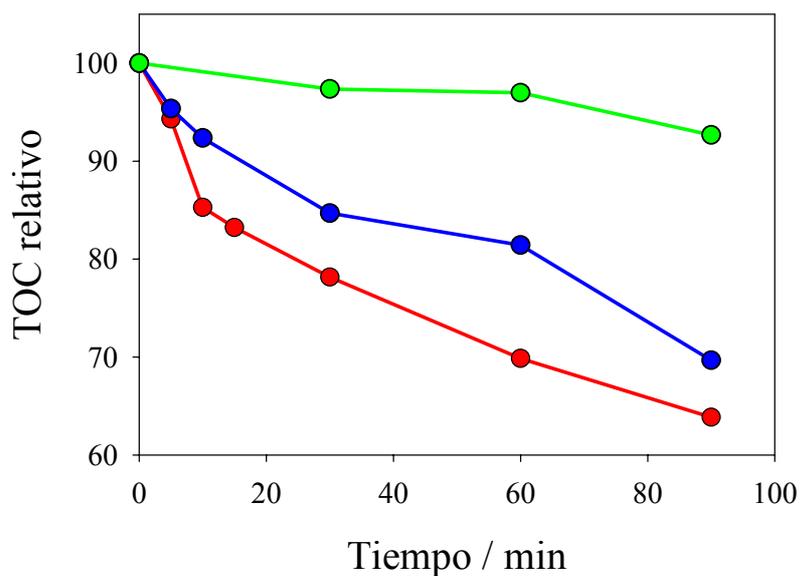
Los perfiles de absorbancia observados muestran un crecimiento exponencial seguido de un decaimiento mixto de primer y segundo orden, como se observa en el recuadro de la Figura 5.14 para  $\lambda^{det} = 290$  nm. Se realizaron simulaciones de los perfiles cinéticos, por resolución de ecuaciones algebraicas por el método de Runge-Kutta, formulado con un conjunto de reacciones

que incluyen las reacciones 15 a 23 de las Tablas 5.3 y 5.4, y las reacciones de primer y segundo orden del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ . Para el cálculo de la concentración inicial de radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  se consideró nuevamente al flash de luz como una función delta que generó  $[\text{SO}_4^{\bullet-}]_0 = 4.6 \times 10^{-6} \text{ M}$  en estos ensayos. En la Figura 5.14 se muestra la concordancia entre los resultados experimentales y los simulados, con valores de  $k_{18} = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $2 \times k_{17} = 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . El valor de  $k_{17}$  es similar al obtenido en los ensayos en los que la especie reactiva es el radical  $\text{CO}_2^{\bullet-}$ . El valor determinado para la constante de velocidad de la reacción entre  $\text{CCl}_2\text{CO}_2^{\bullet-}$  y  $\text{CH}_2\text{OH}^{\bullet}$  es  $k_{19} = 3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Este mecanismo propuesto indica que se necesitan dos radicales  $\text{CH}_2\text{OH}^{\bullet}$  para liberar los tres sustituyentes cloro del ATCA, lo que se confirma por los resultados de irradiación continua. El clorocarbeno formado en la reacción 19 se hidroliza posteriormente como se postuló en la reacciones 15 y 16.

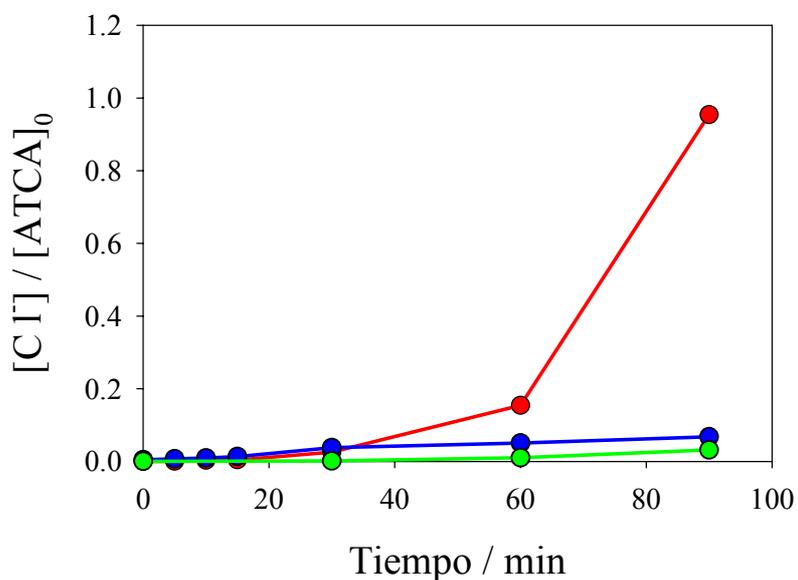
La abstracción de H del  $\text{CH}_3\text{OH}$  por el radical  $\text{CCl}_2\text{CO}_2^{\bullet-}$ , reacción 20 en la Tabla 5.4, genera radicales  $\text{CH}_2\text{OH}^{\bullet}$  que puedan reaccionar con el ATCA induciendo un mecanismo en cadena. El programa de simulación predice un valor de  $k_{20} < 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , en concordancia con los valores publicados para la abstracción de H de  $\text{CH}_3\text{OH}$  por radicales alifáticos halogenados [Ross y col., 1998], por lo que se descarta la importancia de un mecanismo en cadena.

#### *Fotosensibilización con sustancias húmicas.*

Para estudiar la fotosensibilización por sustancias húmicas en la degradación de ATCA, se siguió la evolución de la concentración de cloruro y del contenido de carbono orgánico total (TOC) en el tiempo de irradiación para  $\lambda^{\text{exc}} > 250 \text{ nm}$ . Para los ensayos con soluciones de ATCA  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  y 20 ppm de AHA saturadas en Ar, se observa que la variación del TOC y la liberación de  $\text{Cl}^-$  son mucho más marcados, como se muestra en las figuras 5.15 y 5.16. En soluciones de ATCA y AHA saturadas en aire, la mineralización del ácido es un poco menor que en Ar, pero no hay una significativa liberación de  $\text{Cl}^-$ . Luego de 90 minutos de irradiación en presencia de sustancias húmicas el valor de TOC disminuye al 70% del valor inicial (Figura 5.15). La degradación del contaminante es poco significativa en ausencia de AHA, por lo que el proceso es sensibilizado por SH.



**Figura 5.15:** evolución temporal del TOC relativo durante la irradiación de soluciones acuosas de ATCA  $1 \times 10^{-3}$  M (en verde), o la misma solución con 20 ppm de AHA, saturada en aire (en azul) o en Ar (en rojo).



**Figura 5.16:** evolución temporal de la concentración de cloruro relativa ( $[Cl^-]/[ATCA]_0$ ) durante la irradiación de soluciones acuosas de ATCA  $1 \times 10^{-3}$  M (en verde), o la misma solución con 20 ppm de AHA, saturada en aire (en azul) o en Ar (en rojo).

## Conclusiones:

El ácido tricloroacético (ATCA) se degrada eficientemente mediante radicales reductores. Los radicales  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  y  $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$  son más eficientes que el radical anión superóxido en la degradación reductiva del contaminante, pero menos que el electrón hidratado ( $k(e_{\text{aq}}^- + \text{ATCA}) = 8.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [Ross y col., 1998]). Se propone para estos radicales ( $\text{CO}_2^{\bullet-}$  y  $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ ) un mecanismo de reacción común que genera al radical  $\bullet\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  y  $\text{Cl}^-$ , similar al propuesto para la dehalogenación reductiva por el electrón hidratado [Hart y Anbar, 1970]. El radical  $\bullet\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  se degrada posteriormente por reacciones térmicas hasta la completa mineralización del ATCA a  $\text{CO}_2$  y  $\text{Cl}^-$ . Se observó que el oxígeno molecular compite con en ATCA por los radicales  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  y  $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ . Sin embargo, en ensayos de irradiación continua en reactores cerrados, se consume el oxígeno disuelto inicialmente por reacción con estos radicales hasta que se ve favorecida la reacción de los radicales con el ATCA.

La tendencia observada en las constantes de velocidad de reacción,  $k(\text{O}_2^{\bullet-} + \text{TCAA}) < k(\bullet\text{CH}_2\text{OH} + \text{TCAA})$ ,  $k(\text{CO}_2^{\bullet-} + \text{TCAA}) < k(e_{\text{aq}}^- + \text{TCAA})$ , es similar a la de los potenciales de oxidación del radical respectivo. Estas observaciones están de acuerdo con el mecanismo de reacción que plantea inicialmente la reducción del ATCA. El potencial de reducción medido mediante la técnica de voltametría diferencial de pulso (DPV) para el ATCA,  $E(\text{CCl}_3\text{CO}_2^- / [\bullet\text{CCl}_2\text{CO}_2^-])$ , es del orden de los -600 mV contra el electrodo normal de hidrógeno (ENH). Este valor es mayor al publicado para el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , de -330 mV contra el ENH [Wardman, 1989]. Esto puede deberse ya sea por que el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  reacciona por un mecanismo de reacción diferente con el ATCA que los otros radicales, o porque las condiciones experimentales para los experimentos cinéticos y electroquímicos son muy diferentes.

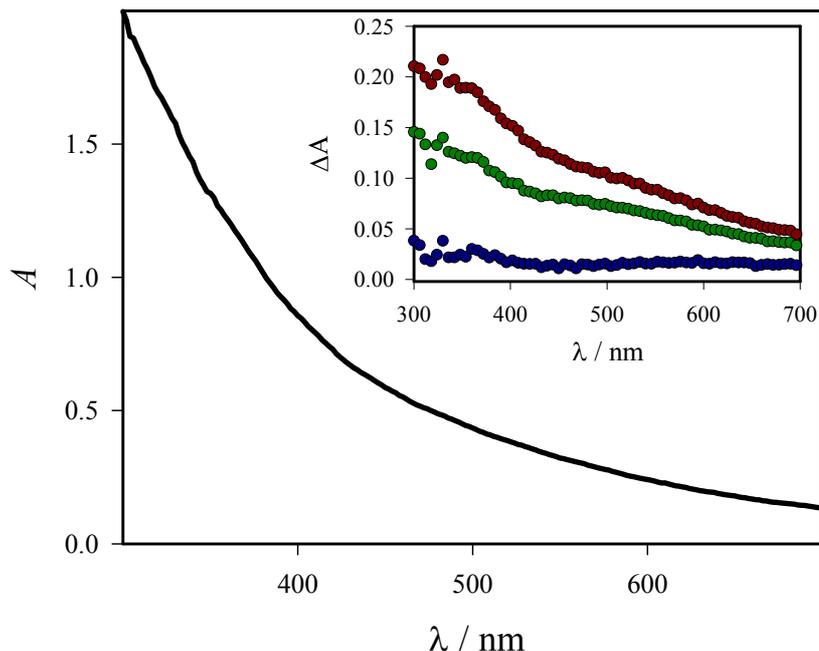
Los procesos empleados para degradar al ATCA ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}/\text{H}_2\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}/\text{CH}_3\text{OH}$ , o los que emplean  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  en vez de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como oxidante) mostraron ser muy eficientes, a la vez que son económicos y no generan residuos tóxicos luego de su empleo. Evidentemente, la fotosensibilización por sustancias húmicas (SH) produce  $e_{\text{aq}}^-$  que reacciona con el ATCA en forma eficiente. Sin embargo en medios naturales, en los que no puede obviarse la presencia de  $\text{O}_2$  disuelto, la fotosensibilización por SH es de esperar que resulte de baja eficiencia, y además no lleve a la liberación del cloro orgánico como cloruro, sino que genere otros productos clorados.

# Capítulo VI.- Fotodegradación de sustancias húmicas.

Se investigó el rol de las especies reactivas de oxígeno (ROS, de su sigla en inglés) en la degradación de las sustancias húmicas (SH) y la producción de compuestos biodisponibles a partir de ellas. Para ello se estudió el efecto de la fotólisis con  $\lambda^{\text{exc}} > 320$  nm, de diferentes SH: ácido húmico Aldrich (AHA) y extracto de suelo (Ext. S). Se utilizaron distintas técnicas espectroscópicas, y se ensayaron diferentes desactivadores para inhibir las ROS generadas por fotosensibilización de las SH. Para determinar la capacidad de aumentar la biodisponibilidad de las SH, se siguió el desarrollo de dos cultivos bacterianos (una cepa de *Pseudomonas sp.* aislada del suelo y una cepa de referencia de *Escherichia coli*) en distintos medios de cultivo suplementados con los sustratos fotolizados o sin fotolizar.

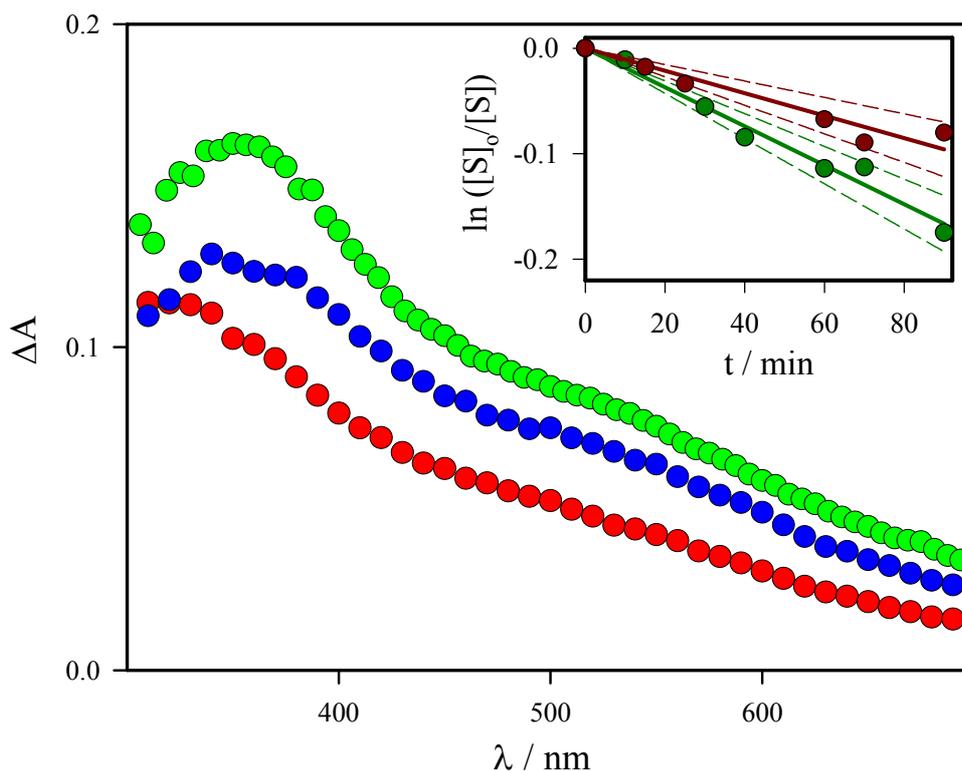
## ***a.- Experimentos fotoquímicos.***

Se midieron los espectros UV-visible de soluciones de AHA en diferentes condiciones para investigar el efecto de las ROS en la fotodegradación de SH. Los espectros de absorción de las SH son muy sensibles a los cambios generados por fotólisis [Scully y col., 2003]. En la Figura 6.1 se muestra el espectro de absorción de una solución de AHA 0.1 g L<sup>-1</sup> en aire, sin irradiar. En el recuadro se observan los cambios producidos en la absorción luego de irradiar la muestra durante 90 min, en soluciones con diferente concentración de oxígeno disuelto. Como puede observarse, los cambios en el espectro son mayores a mayor concentración de oxígeno, como se espera del efecto de las ROS en la fotodegradación del AHA. Sin embargo, en soluciones saturadas en Ar, se observan pequeños cambios, debidos a estados excitados de las SH y otras vías reactivas como por ejemplo mediante el radical OH• [Goldstone y col., 2002] o tal vez por procesos foto Fenton ya que las SH contienen hierro [Lovley y Blunt-Harris, 1999].



**Figura 6.1:** Espectro de absorción de una solución de AHA no irradiada. **Recuadro:** cambios espectrales  $\Delta A$  calculados como la absorbancia de la solución de AHA irradiada menos la no irradiada, vs.  $\lambda$  para soluciones saturadas en: oxígeno (●); aire (●); y Ar (●).

Para determinar cuales de las ROS generadas son las responsables de los cambios en los espectros de absorción, las soluciones de AHA se fotolizaron en presencia de los agentes desactivadores listados en la Tabla 6.1 y los resultados se muestran en la Figura 6.2. Se observa que ninguno de los desactivadores utilizados suprimió completamente los cambios espectrales, lo que indica que son varias las especies responsables de estos cambios. Los cambios son más inhibidos por la presencia de  $\text{NaN}_3$  e isopropanol que por la enzima superóxido dismutasa (SOD), por lo que principalmente se deben a  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  y  $\text{HO}^\bullet$ , y en menor medida al  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Para evaluar el efecto del agua oxigenada en la degradación de las SH, se mezclaron soluciones de AHA  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1 \text{ } \mu\text{M}$ , concentración mucho mayor a la que se formaría durante la fotólisis de SH, observándose en este caso cambios muy pequeños, lo que indica que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  tampoco es una ROS importante para mediar la fotodegradación de las SH. Para corroborar estos resultados, se determinaron las concentraciones en estado estacionario de  $\text{HO}^\bullet$  y  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ , durante la irradiación de AHA. Para su determinación se irradiaron soluciones de AHA en presencia de fenol o alcohol furfúrico como sondas para  $\text{HO}^\bullet$  y  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  [Kohn y Nelson, 2007], respectivamente, y se siguió su consumo por HPLC.



**Figura 6.2:**  $\Delta A$  vs  $\lambda$  para soluciones de AHA saturadas en aire con: (●)  $\text{NaN}_3$  10 mM, (●) isopropanol 10 mM, (●)  $1 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$  de SOD 15 UI/L. **Recuadro izquierdo:** cinética de consumo de las diferentes sondas (S): fenol (●) y alcohol furfurílico (●).

**Tabla 6.1:** Desactivadores y sondas para las diferentes ROS en los experimentos de la Figura 6.2, y las concentraciones en estado estacionario de las mismas  $[\text{ROS}]_{\text{ee}}$ .

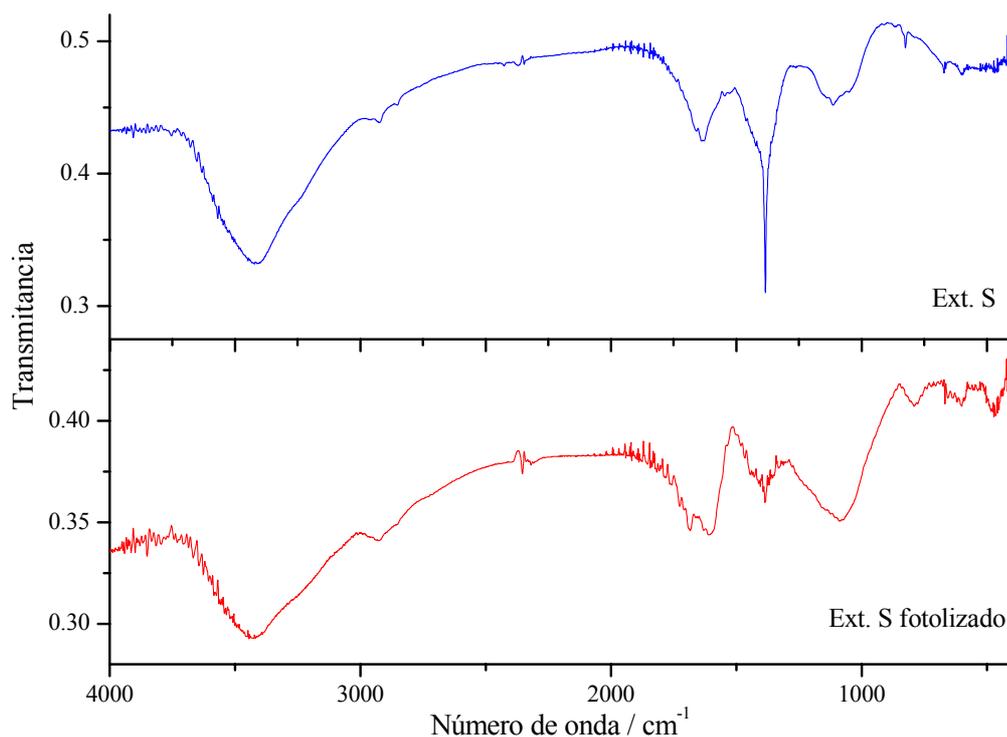
ROS	Desactivadores	Sonda	$[\text{ROS}]_{\text{ee}} / \text{M}$
$\text{O}_2(^1\Delta_g)$	$\text{NaN}_3$ 10 mM	Alc. furfurílico	$8.9 \times 10^{-12}$
$\text{HO}^\bullet$	Isopropanol 10 mM	Fenol	$1.3 \times 10^{-13}$
$\text{O}_2^{\bullet-}$	$1 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ de SOD15 UI $\text{L}^{-1}$	-	-

El fenol y el ion fenóxido, además de reaccionar con los radicales  $\text{HO}^\bullet$ , son capaces de reaccionar con el  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  con constantes de velocidad de  $1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $2.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente [Scurlock y col., 1990]. Para determinar el efecto del  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  se siguió la variación del pH durante la fotólisis para obtener información de la especiación del fenol. Durante la fotólisis, el pH disminuye de 9.3 a 7.8, siempre por debajo del  $\text{pK}_a$  del fenol = 10.0 [Barlin y Perrin, 1966]. Se calcularon los límites superiores de velocidad para la desactivación de fenol y fenolato por  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ , como el producto de la constante de velocidad bimolecular por su respectiva concentración inicial, siendo  $2.9 \times 10^3$  y  $1.5 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$  para los ensayos a pH 9.3 y 7.8,

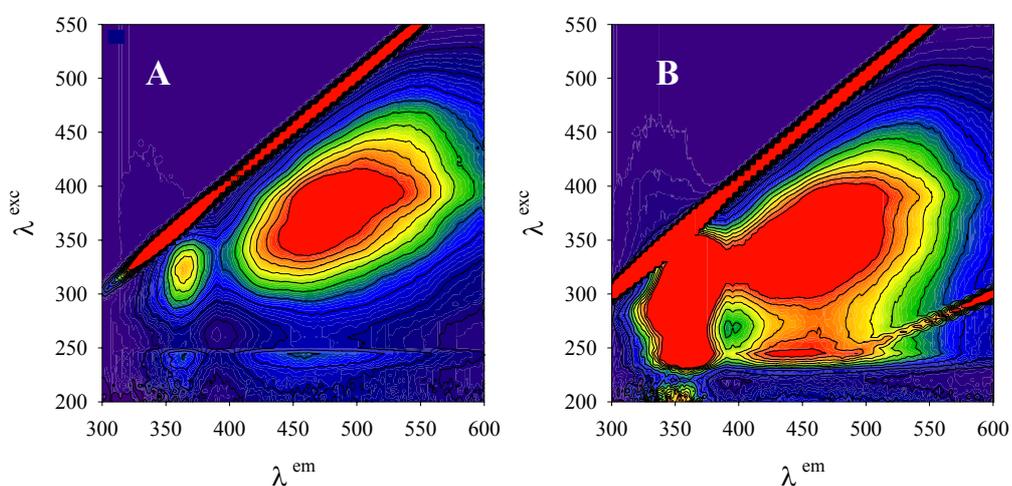
respectivamente. En estas condiciones experimentales la vía de desactivación principal del  $O_2(^1\Delta_g)$  es con el solvente (constante de velocidad de pseudo primer orden =  $2.5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ , correspondiente a los 4.2  $\mu\text{s}$  de tiempo de vida [Schmidt y Afshari, 1992]) y por lo tanto puede utilizarse al fenol como sonda para  $HO^\bullet$ , sin interferencia del  $O_2(^1\Delta_g)$ .

Los gráficos de decaimiento de primer orden para ambas sondas se muestran en el recuadro de la Figura 6.2. De las pendientes de éstos se obtuvieron las concentraciones de estado estacionario para ambas especies multiplicadas por la constante de quenching bimolecular correspondiente,  $kq$ . A partir de los valores publicados para  $kq$  para el alcohol furfurílico con  $O_2(^1\Delta_g)$  y el fenol con  $HO^\bullet$  ( $1.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Haag y Hoigné, 1986] y  $1.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Kochany y Bolton, 1991], respectivamente), se obtuvieron los valores de  $[^1O_2]_{ee} = 8.9 \times 10^{-12} \text{ M}$  y  $[HO^\bullet]_{ee} = 1.3 \times 10^{-13} \text{ M}$  (Tabla 6.1). La baja concentración de fenóxido en estos ensayos, el cual también reacciona con  $HO^\bullet$  con una constante de velocidad de  $9.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Matthews y Sangster, 1965] no afecta la  $[HO^\bullet]_{ee}$  dentro del error experimental. Estos valores de concentración en estado estacionario para ambas especies justifica la inhibición de los cambios espectrales por  $NaN_3$  e isopropanol. Las condiciones de irradiación y  $[HO^\bullet]_{ee}$  son similares a las empleadas en muchos métodos de oxidación avanzada (AOP, Advanced Oxidation Processes) de degradación de contaminantes, pero mucho mayores a las obtenidas en aguas naturales con irradiación por luz solar [Sulzberger y col., 1997], permitiéndonos observar en tiempos cortos de irradiación cambios apreciables en los espectros de absorción.

Se realizaron además medidas de fluorescencia y FTIR del AHA y del Ext. S, ambos fotolizados y sin fotolizar. Los espectros FTIR muestran una disminución de las bandas de 1380-1400  $\text{cm}^{-1}$  (deformación de O-H, stretching de C-O de fenoles, stretching anti simétrico de  $COO^-$  y deformación de C-H alifático) y de 1440-1460  $\text{cm}^{-1}$  (deformación de C-H alifático en ácidos grasos y lípidos de cadena larga producidos en el proceso de compostaje), y un incremento en la de 1030-1080  $\text{cm}^{-1}$  asignado al stretching C-O-C de carbohidratos [Lguirati y col., 2005] durante la irradiación, como se observa en la Figura 6.3. Las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEEF) del AHA y el Ext. S muestran un incremento con la irradiación en la zona de  $\lambda^{exc} < 250 \text{ nm}$  y  $\lambda^{em} < 350 \text{ nm}$ , asignada a los productos secundarios solubles del metabolismo microbiano y a moléculas aromáticas pequeñas [Coble, 1996].



**Figura 6.3:** espectros FTIR del Ext. S fotolizado (en rojo) y sin fotolizar (en azul).



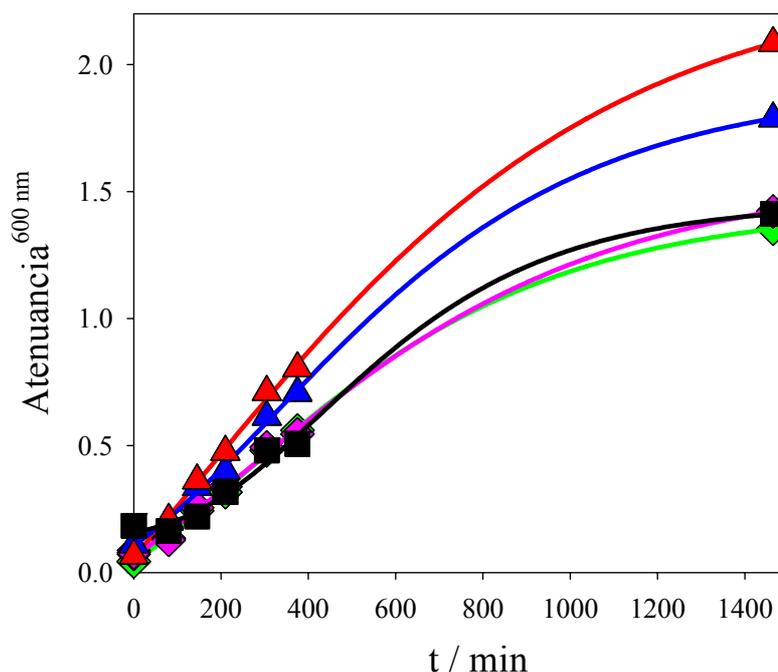
**Figura 6.4:** MEEF de A) Ext. S y B) Ext. S fotolizado. Ambas matrices fueron obtenidas en solución acuosa a pH 7,  $A^{550} = 0.050$ , como se describió en el capítulo de Materiales y métodos. Las líneas corresponden al Raman de primer y segundo orden.

## **b.- Experimentos microbiológicos**

Para determinar el efecto de la irradiación de SH en su degradación y posterior biodisponibilidad, se siguió el desarrollo de bacterias creciendo en medios de cultivo suplementados con los AHA o Ext. S, ambos fotolizados o sin fotolizar. El extracto posee un alto contenido de SH, como se observa en las MEEF. Se realizaron experimentos con una cepa de referencia de *E. coli*, para obtener información del sistema para luego diseñar los ensayos con la cepa B de *Pseudomonas sp.* que fue aislada del mismo suelo del que se obtuvo el extracto. Curtis y col. [Curtis y col., 1992] observaron con bacterias coliformes que su crecimiento en tanques de estabilización de residuos era afectado por la generación de ROS por fotosensibilización por SH. El desarrollo bacteriano se siguió por medidas de atenuancia a 600 nm a distintos tiempos, las que correlacionan linealmente con el número de bacterias por mL de medio de cultivo que son capaces de crecer en placa de Petri con medio R2. En todos los experimentos microbiológicos, las determinaciones se realizaron por duplicado, y las medidas de atenuancia mostraron una dispersión  $\leq 6\%$ . En las tablas 6.2 y 6.3 se listan los parámetros de Gompertz obtenidos del ajuste de los datos con la Ecuación 2.9, y los errores.

Se realizaron ensayos con diferentes medios de cultivo. En los experimentos realizados con el medio mineral (MML) no se observó desarrollo con ninguna de las dos cepas bacteriana utilizadas, incluso con el agregado de los sustratos fotolizados o sin fotolizar.

Cuando se empleó el medio R2 se observa desarrollo de *E. coli*, que es incrementado por la adición del Ext. S al medio como se puede ver en la Figura 6.5 y en la Tabla 6.2, la que lista los parámetros de Gompertz), mientras que el agregado de Ext. S previamente irradiado produce un mayor desarrollo del cultivo bacteriano. Al agregar AHA (fotolizado o sin fotolizar) al medio de cultivo no se observaron cambios apreciables en el desarrollo en la cepa de *E. coli*, como se ve en la Figura 6.5.

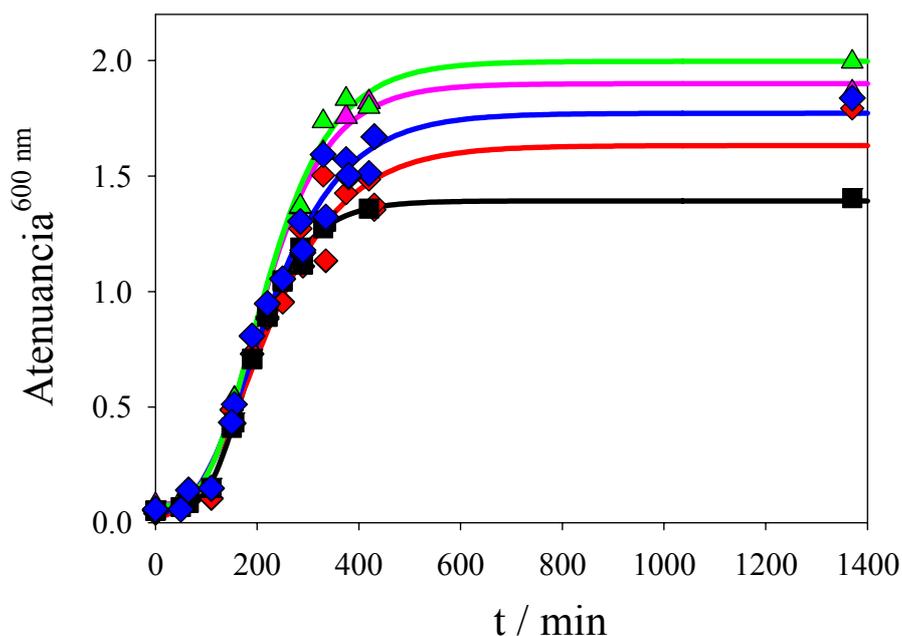


**Figura 6.5:** Cinética de desarrollo de *E. coli* (atenuancia a 600 nm vs. tiempo) en medio R2 (■) o R2 suplementado con: Ext. S (▲), Ext. S fotolizado (▲), AHA (◆), AHA fotolizado (◆). Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos con la ecuación de Gompertz (Ec. 2.9).

**Tabla 6.2:** Parámetros de desarrollo de *E. coli* en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	<i>Escherichia coli</i>			
	$t_{latencia}$ (min)	$\mu$ ( $min^{-1}$ )	Máxima concentración de biomasa	
			Atenuancia final	UFC /mL final
R2	$115 \pm 75$	$0.004 \pm 0.001$	$1.41 \pm 0.02$	$(7.6 \pm 0.1) \times 10^9$
R2 + Ext. S	0	$0.006 \pm 0.001$	$1.79 \pm 0.05$	$(9.7 \pm 0.2) \times 10^9$
R2 + Ext. S fotolizado	0	$0.008 \pm 0.002$	$2.08 \pm 0.07$	$(1.13 \pm 0.03) \times 10^{10}$
R2 + AHA	0	$0.008 \pm 0.002$	$1.35 \pm 0.05$	$(7.3 \pm 0.3) \times 10^9$
R2 + AHA fotolizado	0	$0.006 \pm 0.001$	$1.42 \pm 0.03$	$(7.7 \pm 0.2) \times 10^9$

Los experimentos realizados con la cepa B muestran que, a diferencia de *E. coli*, ambos sustratos son capaces de favorecer el desarrollo bacteriano. Como se observa en la Tabla 6.3 y la Figura 6.6, la fotólisis de los sustratos mejora los rendimientos de los cultivos microbianos.



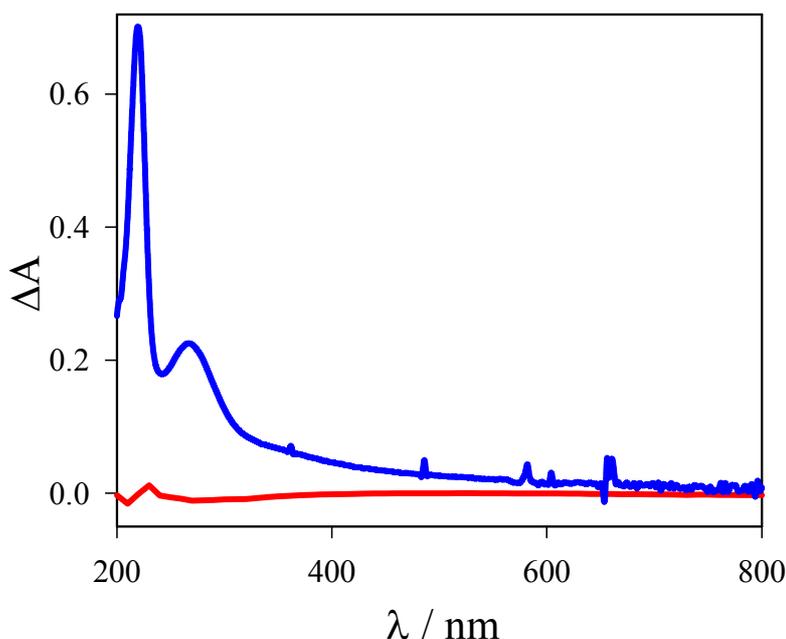
**Figura 6.6:** Cinética de desarrollo de la cepa B de *P. sp.* en medio R2 (■) o R2 suplementado con: Ext. S (▲), Ext. S fotolizado (▲), AHA (◆), AHA fotolizado (◆). Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos con la ecuación de Gompertz (Ec. 2.9).

**Tabla 6.3:** Parámetros de desarrollo de *P. sp.* en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	$t_{latencia}$ (min)	$\mu$ ( $min^{-1}$ )	Máxima concentración de biomasa	
			Atenuancia final	UFC /mL final
R2	$45 \pm 15$	$0.0202 \pm 0.0002$	$1.40 \pm 0.05$	$(7.5 \pm 0.3) \times 10^9$
R2 + His	$36 \pm 15$	$0.014 \pm 0.001$	$1.49 \pm 0.02$	$(8.1 \pm 0.1) \times 10^9$
R2 + His fotolizada	$53 \pm 20$	$0.012 \pm 0.001$	$2.09 \pm 0.02$	$(1.13 \pm 0.01) \times 10^{10}$
R2 + Ext. S	$53 \pm 10$	$0.019 \pm 0.001$	$1.86 \pm 0.06$	$(1.01 \pm 0.03) \times 10^{10}$
R2 + Ext. S fotolizado	$33 \pm 10$	$0.018 \pm 0.001$	$1.99 \pm 0.07$	$(1.08 \pm 0.04) \times 10^{10}$
R2 + Ext. S + His	0	$0.015 \pm 0.003$	$2.28 \pm 0.03$	$(1.23 \pm 0.02) \times 10^{10}$
R2 + (Ext. S + His) fotolizados	$25 \pm 10$	$0.021 \pm 0.003$	$2.65 \pm 0.05$	$(1.43 \pm 0.03) \times 10^{10}$
R2 + AHA	$71 \pm 20$	$0.023 \pm 0.004$	$1.79 \pm 0.05$	$(9.7 \pm 0.3) \times 10^9$
R2 + AHA fotolizado	$59 \pm 10$	$0.025 \pm 0.003$	$1.84 \pm 0.06$	$(9.9 \pm 0.3) \times 10^9$
R2 + AHA + His	$25 \pm 10$	$0.018 \pm 0.004$	$1.97 \pm 0.03$	$(1.07 \pm 0.02) \times 10^{10}$
R2 + (AHA + His) fotolizados	$21 \pm 10$	$0.014 \pm 0.002$	$1.99 \pm 0.04$	$(1.08 \pm 0.02) \times 10^{10}$

Para determinar el efecto de las diferentes ROS en la producción de sustratos más biodisponibles, se fotolizaron el AHA y el Ext S en presencia de desactivadores para el  $O_2(^1\Delta_g)$  y

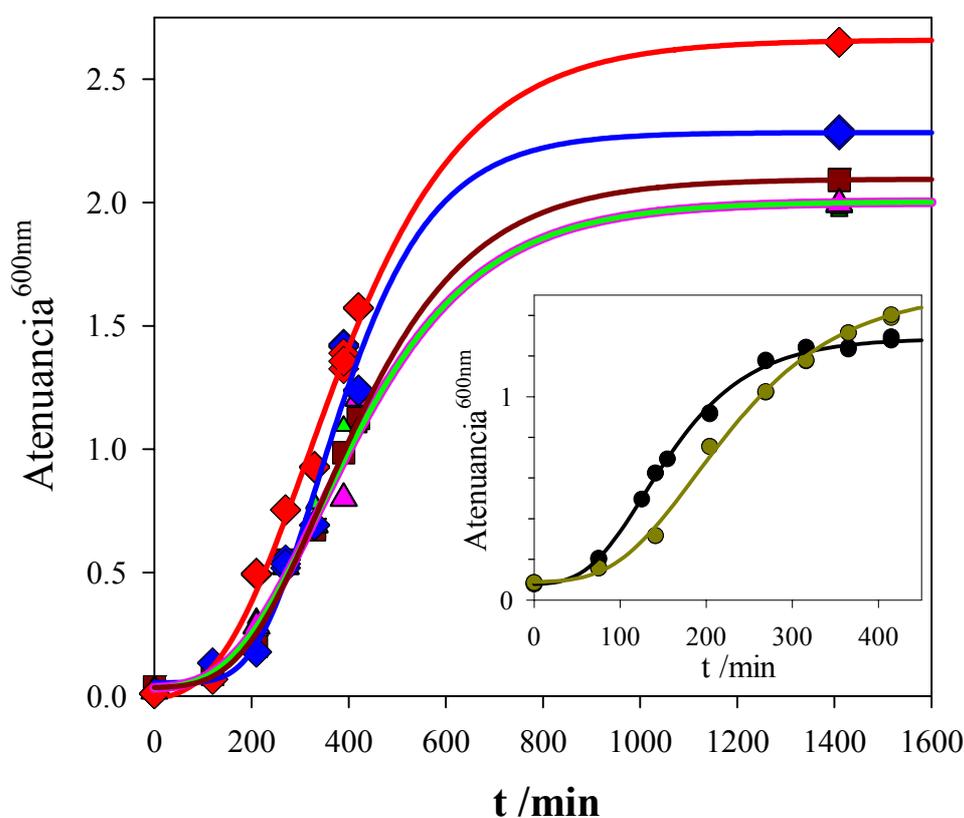
el radical  $\text{HO}^\bullet$ , para luego adicionarlos al medio de cultivo y seguir la cinética de desarrollo de la cepa B. Debido a la toxicidad de la  $\text{NaN}_3$  y el alcohol furfurílico, debieron utilizarse otros desactivadores para estas ROS. Kohn y Nelson [Kohn y Nelson, 2007] y Curtis y col. [Curtis y col., 1992] emplearon al aminoácido histidina (His) en concentraciones  $\geq 10$  mM para desactivar al  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ . En esas concentraciones, la His es capaz de desactivar también al radical  $\text{OH}^\bullet$ , ( $k_q = 4.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [Goldstone y col., 2002]). En la Figura 6.7 se muestran los cambios en el espectro de absorción de soluciones de AHA o Ext. S fotolizadas en presencia de 20 mM de His. Se observa que el AHA no muestra cambios espectrales apreciables, mientras que el Ext. S presenta cambios significativos en su espectro por la fotólisis, principalmente en la zona de 200 a 300 nm. Esto indica que el Ext. S posee otros compuestos además de las SH o SH de naturaleza química diferente al AHA, y que estos son capaces de degradarse por vías en los que no intervienen ni el  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ , ni el  $\text{HO}^\bullet$ .



**Figura 6.7:**  $\Delta A$  vs  $\lambda$  para soluciones de AHA (línea roja) o Ext. S (línea azul) fotolizadas en presencia de His 20 mM, respecto a las no fotolizadas.

En los experimentos microbiológicos con la cepa B, se observa que el agregado de 20 mM de His al medio R2 no afecta mayormente su desarrollo (recuadro de la Figura 6.8 y Tabla 6.3). Se realizaron ensayos con la cepa B de *P. sp.* Con el agregado de Ext. S o AHA fotolizados en presencia de 20 mM His, cuyos resultados se muestran en la Figura 6.8 y Tabla 6.3. Como se discutió previamente, en estas condiciones las concentraciones en estado estacionario de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  y  $\text{HO}^\bullet$  son despreciables. Para el AHA, no se observaron cambios en los espectros de absorción UV-

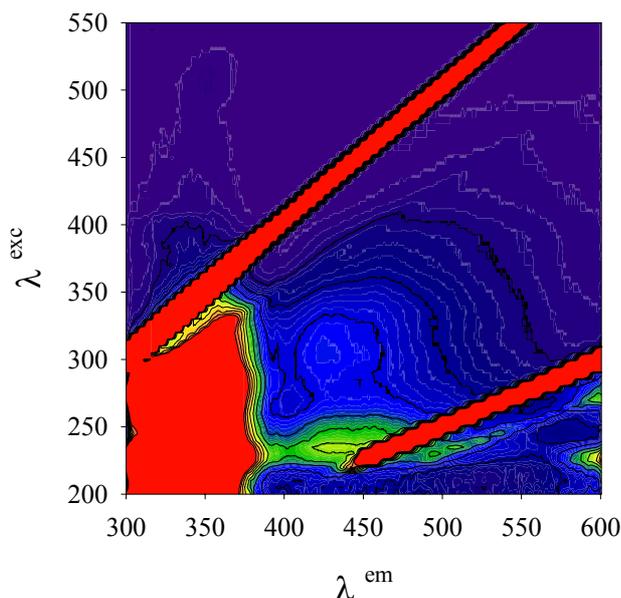
visible (Figura 6.7, línea roja), como tampoco en los espectros FTIR o de fluorescencia. Cuando se fotoliza el AHA en presencia de His y se agrega al medio R2, no se observa mayor desarrollo de la cepa B como puede verse en la Figura 6.8 y la Tabla 6.3. Esto indica que la His disminuye la disponibilidad del sustrato para las bacterias. Mientras que el Ext. S fotolizado en presencia de His presenta cambios en sus espectros de absorción, de fluorescencia y FTIR. La MEEF muestra un aumento en la zona de  $\lambda^{exc} < 250 \text{ nm}$  y  $\lambda^{em} < 350 \text{ nm}$ , asignada a productos de bajo peso molecular, como se ve en la Figura 6.9. Cuando se emplea el Ext. S fotolizado en presencia de His, a diferencia del comportamiento del AHA, no se inhibe su biodisponibilidad para la cepa B sino que, por el contrario, aumenta, como se observa al comparar los rombos azul y rojo de la Figura 6.8..



**Figura 6.8:** Cinética de desarrollo de la cepa B de *P. sp.* en medio R2 + His fotolizada (■) R2 + His + Ext. S (◆), R2 + His y Ext. S fotolizados (◇), R2 + His + AHA (▲), R2 + His y AHA fotolizados (▲). Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos con la ecuación de Gompertz (Ec. 2.9). **Recuadro:** Cinética de desarrollo de la cepa B de *P. sp.* en medio R2 (●) y en R2 + His (●)

Cabe destacar que la esterilización del Ext. S fotolizado en presencia de His se realizó por filtración (tamaño de poro  $0.22 \mu\text{m}$ ). La esterilización por autoclave produjo caramelización de la solución por modificación no enzimática de proteínas. Esto se debe a que la fotólisis del extracto

genera moléculas más pequeñas (ácidos grasos pequeños, aldehídos, aminoácidos y sacáridos [Dahlén y col., 1996; Tarr y col., 2001; Schmitt-Koplin y col., 1998]). La caramelización no se observó en el Ext. S en ausencia de His (fotolizado o no), ni en el AHA en ningún caso. Esto indica que la fotodegradación del Ext. S tiene lugar incluso durante la irradiación en presencia de His, un desactivador eficiente de  $O_2(^1\Delta_g)$  y  $HO^\bullet$ , lo que confirma los resultados microbiológicos y espectroscópicos.



**Figura 6.9:** MEEF de la solución Ext. S fotolizado en presencia de 20 mM de His, ajustada a  $A^{550} = 0.050$  y pH 7.0 Las líneas corresponden al Raman de primer y segundo orden.

### **Conclusiones:**

Los experimentos fotoquímicos con AHA a  $\lambda^{exc} > 320$  nm mostraron su fotodegradación por  $O_2(^1\Delta_g)$ ,  $O_2^{\bullet-}$ , y  $HO^\bullet$ , y un efecto inhibitorio por la presencia de desactivadores específicos para estas ROS durante la irradiación. Este sustrato es un buen suplemento para el desarrollo de la cepa B de *Pseudomonas* sp. en medio R2, y su fotodegradación aumenta el crecimiento microbiano. Sin embargo, el crecimiento de la cepa de referencia de *E. coli* no fue afectado por la adición del AHA, irradiado o no irradiado, al medio de cultivo.

Por otro lado, la irradiación del Ext. S con luz de  $\lambda^{exc} > 320$  nm produce su fotodegradación, incluso en presencia de His, un desactivador de  $O_2(^1\Delta_g)$  y  $HO^\bullet$ . Esto pudo observarse por los cambios en el espectro de absorción UV-visible, en las MEEF, en el espectro IR y por la caramelización de la solución durante la esterilización por autoclave. El Ext. S es un buen

suplemento para el desarrollo de *E. coli* y la cepa B de *Pseudomonas sp.* en medio R2, y su fotodegradación incluso en presencia de His aumenta el crecimiento bacteriano.

Las diferencias en los resultados observados con los distintos sustratos pueden explicarse por las distintas capacidades metabólicas que presentan ambas bacterias. *E. coli* se adapta fácilmente a medios ricos en nutrientes (copiotrófico), donde pueden desarrollarse a su máxima velocidad de crecimiento [Kovárová-Kovar y Egli, 1998]. Cuando estas bacterias se inoculan en medios mínimos, necesitan adaptarse a las condiciones de deficiencia de nutrientes (oligotrófico). Para la cepa de *E. coli* ATCC 4352 el medio R2 es oligotrófico y el suplemento del Ext. S, fotolizado o no, constituye una fuente de carbono y energía disponible para el desarrollo de estas bacterias heterotróficas. Sin embargo, la velocidad máxima de desarrollo y la concentración máxima de biomasa para esta bacteria son menores a las obtenidas con la cepa B de *Pseudomonas sp.* El género *Pseudomonas*, aislado frecuentemente de ambientes naturales como suelos y sedimentos, se caracteriza por su mayor versatilidad catabólica y su capacidad para crecer en medios oligotróficos [Meyer y col., 2004]. Esto se evidenció cuando la cepa B se inoculó en medio R2 con diferentes suplementos. Las bacterias crecieron a velocidades máximas similares, pero alcanzaron valores diferentes de concentración de biomasa máxima cuando se agregó al medio Ext. S fotolizado (en presencia o ausencia de His).

Estos experimentos nos permiten demostrar que la fotodegradación de los compuestos solubles del suelo genera sustratos disponibles para bacterias aisladas del mismo suelo. Se concluye además que las vías de degradación por  $O_2(^1\Delta_g)$  y el radical  $HO^\bullet$  no son las únicas que intervienen en la fotodegradación y el aumento en la biodisponibilidad del extracto.

## Conclusiones Generales

Los resultados de flash-fotólisis indican que esta es una técnica apropiada para investigar la formación de radicales libres y la fotosensibilización por sustancias húmicas, como método alternativo para el tratamiento de contaminantes. Se observó un alto contenido de sustancias húmicas en las dos fuentes naturales utilizadas (el vermicompost y el suelo superficial). Las mismas mostraron características fisicoquímicas similares a las SH comerciales, en particular sus propiedades espectroscópicas.

El mecanismo propuesto para la reacción del radical sulfato con las SH implica la competencia de los contaminantes y las SH por los radicales oxidantes durante los tratamientos ISCO. En las condiciones experimentales utilizadas, la cantidad de radical asociado  $\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH})$  es despreciable respecto de la del radical sulfato libre,  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ . La concentración de materia orgánica en las aguas naturales es mucho mayor a la empleada en este trabajo, por lo que el efecto espera sea más importante en sistemas naturales. En concentraciones mayores a  $7.4 \text{ g L}^{-1}$  [Guetzloff y Rice, 1994] se espera que las sustancias húmicas formen micelas y los radicales se adsorban a estas por la afinidad mostrada en este trabajo.

Los experimentos en presencia de peroxodisulfato, ácido húmico y fenol muestran que el fenol reacciona con velocidades similares con el  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  y el  $\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH})$ . La fracción de radicales sulfato libres que reaccionan con fenol,  $(\tau (\text{SO}_4^{\bullet-})^{-1} - \tau^0 (\text{SO}_4^{\bullet-})^{-1}) / \tau^0 (\text{SO}_4^{\bullet-})^{-1}$ , es mayor que la fracción que lo hace con el radical asociado  $(\tau (\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH}))^{-1} - \tau^0 (\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH}))^{-1}) / \tau^0 (\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH}))^{-1}$ . Lo que reduce, al menos con fenol como modelo de contaminante, la eficiencia del tratamiento oxidativo en presencia de SH.

Los resultados experimentales y los cálculos mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT) confirman el mecanismo propuesto para la reacción del ácido gálico y el ion galato con el radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ . Se postula la formación de radicales fenoxilo como intermediarios de reacción. Los cálculos teóricos apoyan la formación de quinonas y bifenilos sustituidos por recombinación de los radicales orgánicos. No puede extrapolarse la química de

los fenoxilos del ácido gálico a la de los fenoxilos generados por oxidación de las sustancias húmicas. Además, dada la diferencia cinética encontrada entre las reacciones del radical sulfato con ácido gálico y SH, el ácido gálico no es un buen modelo de las SH.

La reacción entre el radical sulfato y los iones cloruro disminuye el tiempo de vida de dicho radical y además genera radicales  $\text{Cl}^\bullet$  y  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ , agentes clorantes muy reactivos frente a los contaminantes y las sustancias húmicas. Esto disminuye la eficacia del tratamiento y produce especies halogenadas no deseadas. [Alegre y col., 2000; Malcolm y MacCarthy, 1986]. Se observa además que los radicales de cloro no muestran el mismo comportamiento que el radical sulfato con la concentración de sustancias húmicas. El radical  $\text{Cl}^\bullet$ , el que es muy reactivo, posee un camino libre medio muy corto como para posibilitar un proceso reversible entre dos entornos diferentes. Mientras que el  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  decae principalmente por recombinación y no se observan otros procesos como la compartimentalización en dos entornos distintos.

La fotodegradación directa del clomazone por luz solar es un proceso de menor importancia, como se observó para otros pesticidas o herbicidas [Burrows y col., 2002], lo que aumenta su permanencia en el medio ambiente. En suelos y aguas naturales con sustancias húmicas, la degradación fotosensibilizada de clomazone puede ser un mecanismo eficiente para su remoción. Este es eficientemente degradado por procesos avanzados de oxidación (AOP) como la irradiación directa con luz UV o por tratamientos químicos in situ (ISCO) con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , que involucra la reacción del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  con el contaminante, y en aguas naturales por oxidación con oxígeno singulete,  $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ .

El ácido tricloroacético (ATCA) se degrada eficientemente mediante radicales reductores. Los radicales  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  y  $^\bullet\text{CH}_2\text{OH}$  son más eficientes que el radical anión superóxido en la degradación reductiva del contaminante, pero menos que el electrón hidratado ( $k(e_{\text{aq}}^- + \text{ATCA}) = 8.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [Ross y col.,

1998]). Se propone para estos radicales ( $\text{CO}_2^{\bullet-}$  y  $^{\bullet}\text{CH}_2\text{OH}$ ) un mecanismo de reacción común que genera al radical  $^{\bullet}\text{CCl}_2\text{CO}_2^-$  y  $\text{Cl}^-$ , similar al propuesto para la dehalogenación reductiva por el electrón hidratado [Hart y Anbar, 1970]. Este radical se degrada posteriormente por reacciones térmicas hasta la completa mineralización del ATCA a  $\text{CO}_2$  y  $\text{Cl}^-$ .

Se observó que el oxígeno molecular compite con en ATCA por los radicales  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  y  $^{\bullet}\text{CH}_2\text{OH}$ . Sin embargo, en ensayos de irradiación continua en reactores cerrados, se consume rápidamente el oxígeno disuelto inicialmente por reacción con estos radicales hasta que se favorezca la reacción de los radicales con el ATCA. La tendencia observada en las constantes de velocidad de reacción observada es similar a la de los potenciales de oxidación del radical respectivo. Estas observaciones están de acuerdo con el mecanismo de reacción planteado.

El potencial de reducción para el ATCA es mayor al reportado para el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , por lo que es de esperarse que el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  reaccione por un mecanismo de reacción diferente con el ATCA que los otros radicales. Los procesos empleados para degradar al ácido tricloroacético mostraron ser muy eficientes, a la vez que son económicos y no generan residuos tóxicos luego de su empleo. Mientras que la fotosensibilización por sustancias húmicas resulto de baja eficiencia, y además no lleva a la liberación del cloro orgánico como cloruro, sino que genera otros productos clorados.

Se observó la fotodegradación con  $\lambda^{\text{exc}} > 320$  nm del AHA por  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , y  $\text{HO}^{\bullet}$ , y su inhibición por desactivadores específicos para estas ROS. Este sustrato es un buen suplemento para el desarrollo de la cepa B de *Pseudomonas* sp. en medio R2, y su fotodegradación aumenta el crecimiento microbiano. Sin embargo, el crecimiento de la cepa de referencia de *E. coli* no fue afectado por la adición del AHA, irradiado o no irradiado, al medio de cultivo.

Por otro lado, la irradiación del Ext. S con luz de  $\lambda^{\text{exc}} > 320$  nm produce su fotodegradación, incluso en presencia de His, un desactivador de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  y  $\text{HO}^{\bullet}$ . Esto pudo observarse por los cambios en el espectro de absorción UV-visible, en las MEEF, en el espectro IR y por la caramelización de la solución

durante la esterilización por autoclave. El Ext. S es un buen suplemento para el desarrollo de *E. coli* y la cepa B de *Pseudomonas sp.* en medio R2, y su fotodegradación incluso en presencia de His aumenta el crecimiento bacteriano.

Las diferencias en los resultados observados con los distintos sustratos pueden explicarse por las distintas capacidades metabólicas que presentan ambas bacterias. El género *Pseudomonas*, aislado frecuentemente de ambientes naturales como suelos y sedimentos, se caracteriza por su mayor versatilidad catabólica y su capacidad para crecer en medios oligotróficos [Meyer y col., 2004]. Estos experimentos nos permiten demostrar que la fotodegradación de los compuestos solubles del suelo genera sustratos disponibles para bacterias aisladas del mismo suelo. Se concluye además que las vías de degradación por  $O_2(^1\Delta_g)$  y el radical  $HO^\bullet$  no son las únicas que intervienen en la fotodegradación y el aumento en la biodisponibilidad del extracto.

## Referencias

Adams D. J., S. Barlow, G. V. Buxton, T. Malone y G. A. Salmon. **1995**. Evaluation of the stability constant of  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  in neutral aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **91**: 3303 - 3305.

Adams G. E., B. D. Mitchel y E. J. Land. **1966**. Pulse radiolysis investigations of unimolecular elimination reactions in free radicals produced by OH addition to hydroxybenzenes. *Nature*, **211**: 293 - 294.

Aguer J. P., C. Richard y F. Andreux. **1999**. Effect of light on humic substances: production of reactive species. *Analisis*, **27**: 387 - 390.

Aguer J. P., C. Richard, L. Cox, M. C. Hermosin y J. Cornejo. **2000**. Sorption and photolysis studies in soil and sediment of an herbicide: the napropamide. *Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, **35**: 725 - 738.

Ahmad S. R. y D. M. Reynolds. **1999**. Monitoring of water quality using fluorescence technique: prospect of on-line process control. *Water Research*, **33**: 2069 - 2074

Aho J. y O. Lehto. **1984**. Effect of ionic strength on elution of aquatic humus in gel filtration chromatography. *Archives of Hydrobiology*, **101**: 21 - 38.

Ainsworth C. C., J. M. Zachara y S. C. Smith. **1989**. Carbazole Sorption by Surface and Subsurface Materials: Influence of Sorbent and Solvent Properties. *Soil Science Society of America Journal*, **53**: 1391 - 1401.

Albanell E., J. Plaixats y T. Cabrero. **1988**. Chemical changes during vermicomposting (*Eisenia fetida*) of sheep manure mixed with cotton industrial wastes. *Biology and Fertility of Soils*, **6**: 266 - 269.

Alegre M. L., M. Geronés, J. A. Rosso, S. G. Bertolotti, A. M. Braun, D. O. Mártire y M. C. Gonzalez. **2000**. Kinetic study of the reaction of chlorine atoms and  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  radicals anions in aqueous solutions. I. Reaction with benzene. *Journal of Physical Chemistry A*, **104**: 3117 - 3125.

Amarante D. **2000**. Applying in situ chemical oxidation several oxidizers provide an effective first step in groundwater and soil remediation. *Pollution Engineering*, **32**: 40 - 42.

Amir S., M. Hafidi, J. R. Bailly y J. C. Revel. **2003**. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex® gel fractions. *Agronomie*, **23**: 269 - 275.

Andersen L. K., Z. Gao, P. R. Ogilby, L. Poulsen, e I. Zebger. **2002**. A singlet oxygen image with 2.5 micrometer resolution. *Journal of Physical Chemistry A*, **106**: 8488 - 8490.

Andjelkovic T., J. Perovic, M. Purenovic y D. Andjelkovic. **2004**. Destabilization and aggregation of aqueous humic acids solution by metal ions. *Facta Universitatis Series: Physics, Chemistry and Technology*, **3**: 79 - 85.

Andjelkovic T., J. Perovic, M. Purenovic, S. Blagojevic, R. Nikolic, D. Andjelkovic y A. Bojic. **2006**. Spectroscopic and potentiometric studies on derivatized natural humic acid. *Analytical Sciences*, **22**: 1553 - 1558.

Anesio A. M., C. M. T. Denward, L. J. Tranvik y W. Grane'li. **1999**. Decreased bacterial growth on vascular plant detritus due to photochemical modification. *Aquatic Microbial Ecology*, **17**: 159 - 165.

Anesio A. M., J. Theil-Nielsen y W. Grane'li. **2000**. Bacterial growth on photochemically transformed leachates from aquatic and terrestrial primary producers. *Microbial Ecology*, **40**: 200 - 208.

Anipsitakis G. P. y D. D Dionysiou. **2003**. Degradation of organic contaminants in water with sulfate radicals generated by the conjunction of peroxymonosulfate with cobalt. *Environmental Science and Technology*, **37**: 4790 - 4797.

Arnold D. J. y G. G. Briggs. **1990**. Fate of Pesticides in Soil: Predictive and Practical Aspects. Capítulo 5: 101 - 122. En: Environmental Fate of Pesticides. Editado por D. H. Hutson y T. R. Roberts. John Wiley, Chichester, UK.

Artinger R., G. Buckau, S. Geyer, P. Fritz, M. Wolf y J. I. Kim. **2000**. Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon. *Applied Geochemistry*, **15**: 97 - 116.

Atkinson R, K. R. Darnall, A. C. Lloyd, A. M. Winer y J. N. Pitts. **1979**. Kinetics and mechanisms of the reaction of the hydroxyl radical with organic compounds in the gas phase. *Advances in Photochemistry*, **11**: 375 - 488.

Baalousha M., M. Motelica-Heino y P. Le Coustumer. **2006**. Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **272** 48 - 55.

Backlund P. **1992**. Degradation of aquatic humic material by ultraviolet light. *Chemosphere*, **12**: 1869 - 1878.

Bae E. y W. Choi. **2003**. Highly Enhanced photoreductive degradation of perchlorinated compounds on dye-sensitized metal/TiO<sub>2</sub> under visible light. *Environmental Science and Technology*, **37**: 147 - 152.

Bano N., M. A. Moran y R. E. Hodson. **1998**. Photochemical formation of labile organic matter from two components of dissolved organic carbon in a freshwater wetland. *Aquatic Microbial Ecology*, **16**: 95 - 102.

Bao Z. C y J. R. Barker. **1997**. Laser flash photolysis measurements of several reactions involving aqueous Cl, Cl<sup>-</sup>, and Cl<sub>2</sub><sup>-</sup>. *Fourth International Conference on Chemical Kinetics*. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA. Disponible en: [http://www.cstl.nist.gov/div838/kinet\\_conf/agenda/f\\_session/f40/f40.html](http://www.cstl.nist.gov/div838/kinet_conf/agenda/f_session/f40/f40.html).

Barlin G. B. y D. D. Perrin. **1966**. Prediction of the strengths of organic acids. *Quarterly Reviews of the Chemical Society*, **20**: 75 - 101.

Barone V. , M. Cossi, y J. Tomasi. **1997**. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *Journal of Chemical Physics*, **107**: 3210 - 3221.

Barriuso E., S. Houot y C. Serra-Wittling. **1997**. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pesticide Science*, **49**: 65 - 75.

Beccalli E. M., D. Pocar y C. Zoni. **2003**. Recent developments in the chemistry of isoxazol-5-ones. Capítulo 4: 31 - 63. En: Targets in heterocyclic systems - Chemistry and properties. Vol. 7. Editado por O. A. Attanasi y D. Spinelli. Italian Society of Chemistry, Roma, Italia.

Becke A. D. **1993**. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics*, **98**: 5648 - 5652.

Benner R. y B. Biddanda. **1998**. Photochemical transformations of surface and deep marine dissolved organic matter: effects on bacterial growth. *Limnology and Oceanography*, **43**: 1373 - 1378.

Bertilsson S. y L. J. Tranvik. **1998**. Photochemically produced carboxylic acids as substrates for freshwater bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, **43**: 885 - 895.

Betts K. **1998**. Growing concern about disinfection byproducts. *Environmental Science and Technology*, **32**: 546 A - 548 A.

Bielski B. H. J. y D. E. Cabelli. **1995**. Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. Capítulo 3: 66 - 104. En: Active Oxygen in Chemistry. Editado por C. S. Foote, J. S. Valentine, A. Greenberg y J. F. Liebman. Chapman and Hall, Londres, UK.

Bielski B. H. J. y H. W. Ritcher. **1977**. A study of the superoxide radical chemistry by stopped-flow radiolysis and radiation induced oxygen consumption. *Journal of the American Chemical Society*, **99**: 3019 - 3023.

Bosio G., S. Criado, W. Massad, F. J. Rodríguez Nieto, M. C. Gonzalez, N. A. García y D. O. Mártire. **2005**. Kinetics of the interaction of sulfate and hydrogen phosphate radicals with small peptides of glycine, alanine, tyrosine and tryptophan. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **4**: 840 - 846.

Braslavsky S. E. **2007**. Glossary of terms used in Photochemistry 3rd Edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, **79**: 293 - 465.

Braun A. M., M. T. Maurette y E. Oliveros. **1991**. Photochemical Technology. 580 páginas. Wiley, Chichester, UK.

Buffle J. A. E. **1977**. Humic substances in water and their interaction with mineral ions. *Techniques et Sciences Municipales*, **72**: 3 - 10.

Burrows H. D., L. M. Canle, J. A. Santaballa y S. Steenken. **2002**. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **67**: 71 - 108.

Buxton G. V., G. A. Salmon y J. Wang. **1999**. The equilibrium  $\text{NO}_3 \cdot + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{NO}_3^- + \text{Cl} \cdot$ : A laser flash photolysis and pulse radiolysis study of the reactivity of  $\text{NO}_3 \cdot$  with chloride ion in aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **1**: 3589 - 3593.

Buxton G. V., M. Bydder y G. A. Salmon. **1998**. Reactivity of chlorine atoms in aqueous solution. Part 1. The equilibrium  $\text{Cl} \cdot + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{Cl}_2 \cdot^-$ . *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **94**: 653 - 657.

Buxton G. V., M. Bydder, G. A. Salmon y J. E. Williams. **2000**. The reactivity of chlorine atoms in aqueous solution Part III. The reactions of Cl<sup>-</sup> with solutes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2**: 237 - 245.

Chen J., B. Gu, E. J. Leboeuf, H. Pan y S. Dai. **2002**. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* **48**, 59 - 68.

Chen W., P. Westerhoff, J. A. Leenheer, y K. Booksh. **2003**. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, **37**: 5701 - 5710.

Chen Y., N. Senesi, y M. Schnitzer. **1977**. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society of America Journal*, **41**:352 - 358.

Cheng H. H. y R. G. Lehman, **1985**. Characterization of herbicide degradation under field conditions. *Weed science*, **33**: 7 - 10.

Chester G., G. V. Simsiman, J. Levy, B. J. Alhajjar, R. N. Fathulla y J. M. Harkin. **1989**. Environmental fate of alachlor and metachlor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **110**: 1 - 74.

Chin Y.-P., G. Aiken y E. O'Loughlin. **1994**. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*, **28**: 1853 - 1858.

Chiou C. T., R. L. Malcolm, T. I. Briton y P. E. Kile. **1986**. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environmental Science and Technology*, **20**: 502 - 508.

Choure S. C., M. M. M. Bamatraf, B. S. M. Rao, R. Das, H. Mohan y J. P. Mittal. **1997**. Hydroxylation of chlorotoluenes and cresols: A pulse radiolysis, laser flash photolysis, and product analysis study. *Journal of Physical Chemistry A*, **101**: 9837 - 9845.

Christl I., H. Knicker, I. Kögel-Knabner, y R. Kretzschmar. **2000**. Chemical heterogeneity of humic substances: characterization of size fractions obtained by hollow-fibre ultrafiltration. *European Journal of Soil Science*, **51**: 617 - 625.

Clark T., J. Chandrasekhar, G. W. Spitznagel y P. V. R. Schleyer. **1983**. Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III. The 3-21+G basis set for first-row elements, Li-F. *Journal of Computational Chemistry*, **4**: 294 - 301.

Coates J. D., D. J. Ellis, E. L. Blunt-Harris, C. V. Gaw, E. E. Roden y D. R. Lovley. **1998**. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 1504 - 1509.

Coble P. G., C. A. Schultz y K. Mopper. **1993**. Fluorescence contouring analysis of DOC intercalibration. Experiment samples: a comparison of techniques. *Marine Chemistry*, **41**: 173 - 178.

Coble P. G., S. A. Green, N. V. Blough y R. B. Gagosian. **1990**. Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature*, **348**: 432 - 435.

Coble, P. G. **1996**. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation - emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, **51**: 325 - 346.

Cooper W. J. y R. G. Zika. **1983**. Photochemical Formation of Hydrogen Peroxide in Surface and Ground Waters Exposed to Sunlight. *Science*, **220**: 711 - 712.

Cooper W. J., R. G. Zika, R. G. Petasne y A. M. Fischer. **1989**. Sunlight-induced photochemistry of humic substances in natural waters: mayor reactive species. Capítulo 22: 333-362. En: Aquatic humic substances. Influence on fate and treatment of pollutants. Editado por I. H. Suffet y P. MacCarthy. American Chemical society, Washington, USA.

Cornejo J. y F. Moreno, **1998**. Dinámica de agroquímicos y otros contaminantes en el suelo. Capítulo 13: 275 - 294. En: Agricultura sostenible. Editado por R. M. Jiménez Díaz. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España.

Cossi M., V. Barone, R. Commi y J. Tomasi. **1996**. Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model. *Chemical Physics Letters*, **255**: 327 - 355.

Cox L., R. Celis, M. C. Hermosin y J. Cornejo. **1994**. Leaching patterns of pesticides as related to sorption and porosity properties of the soil. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, **3**: 1325 - 1330.

Cox L., M.C. Hermosin y J. Cornejo. **1999**. Leaching of simazine in organic amended soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **30**: 1697 - 1706.

Curtis T. P., D. D. Mara y S. A. Silva. **1992**. Influence of pH, oxygen, and humic substances on ability of sunlight to damage fecal coliforms in waste stabilization pond water, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 1335 - 1343.

Dahlén, J., S. Bertilsson and C. Pettersson. **1996**. Effects of UV-A irradiation on dissolved organic matter in humic surface waters. *Environment International*, **22**: 501 - 506.

Da Silva J. P., A. M. Da Silva, I. V. Khmelinskii, J. M. G. Martinho y L. F. Vieira Ferreira. **2001**. Photophysics and photochemistry of azole fungicides: triadimefon and triadimenol. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **142**: 31 - 37.

David Gara P. M., E. Bucharsky, M. Wörner, A. M. Braun, D. O. Mártire y M. C. Gonzalez. **2007**. Trichloroacetic acid dehalogenation by reductive radicals. *Inorgánica Chemica Acta*, **360**: 1209-1216.

Davis J. A. y R. Gloor. **1981**. Adsorption of dissolved organics in lake water by aluminum oxide. Effect of molecular weight. *Environmental Science and Technology*, **15**: 1223 - 1229.

Del Panno M. T., I. S. Morelli, B. Engelen y L. Berthe-Corti. **2005**. Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**: 305 - 316.

Determann S., R. Reuter, P. Wagner y R. Willkomm. **1994**. Fluorescent matter in the eastern Atlantic Ocean. Part 1: Method of measurement and near-surface distribution *Deep Sea Reserach, Part I*, **41**: 659 - 675.

Draper P. B., M. A. Fox, E. Pelizetti y N. Serpone. **1989**. Pulse radiolysis of 2,4,5-trichlorophenol: formation, kinetics, and properties of hydroxytrichlorocyclohexadienyl, trichlorophenoxy, and dihydroxytrichlorocyclohexadienyl radicals *Journal of Physical Chemistry*, **93**: 1938 - 1943.

Draper W. M. y D.G. Crosby. **1983**. The photochemical generation of hydrogen peroxide in natural waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **12**: 121 - 126.

Draper W. M. y D.G. Crosby. **1984**. Solar photooxidation of pesticides in dilute hydrogen peroxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **32** : 231 - 237.

Drozd J. **1978**. Studies of chemical and physiochemical properties of humus compounds of some taxonomic soil units. 65 páginas. Rosprawy Naukowe, Zeszyt 13, AR Wroclaw, Polonia.

Du H, R. A. Fuh, J. Li, A. Corkan y J. S. Lindsey. **1998**. PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry. *Photochemistry and Photobiology*, **68**: 141 - 142.

Dunker A. M. **1984**. The decoupled direct method for calculating sensitivity coefficients in chemical kinetics. *Journal of Chemical Physics*, **81**: 2385 - 2393.

Dwibedy P., G. R. Dey, D. B. Naik, K. Kishore y P.N. Moorthy. **1999**. Pulse radiolysis studies on redox reactions of gallic acid: one electron oxidation of gallic acid by gallic acid-OH adduct. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **1**: 1915 - 1918.

Elliot A. J. **1989**. A pulse radiolysis study of the temperature dependence of reactions involving H<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup> and e<sub>aq</sub><sup>-</sup> in aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry*, **34**: 753 - 738.

Elliot A. J. y D. R. McCracken. **1989**. Effect of temperature on O<sup>-</sup> reactions and equilibria: A pulse radiolysis study. *Radiation Physics and Chemistry*, **33**: 69 - 74.

Eloranta P. **1999**. Light penetration and thermal stratification in lakes. Pág. 72 - 94. En: *Limnology of Humic Waters*. Editado por J. Keskitalo y P. Eloranta. Backhuys Publishers, Leiden, Holanda.

Elving P.J. y C.-S. Tang. **1950**. Polarographic Behavior of Organic Compounds. III. The Chloroacetic Acids. *Journal of the American Chemical Society*, **72**: 3244 - 3246.

Engbretson R. R., T. Amos y R. von Wandruszka. **1996**. Quantitative approach to humic acid associations. *Environmental Science and Technology*, **30**: 990 - 997.

Engbretson R. R. y R. Von Wandruszka. **1997**. The effect of molecular size on humic acid associations. *Organic geochemistry*, **26**: 759 - 767.

Engbretson R. R. y R. Von Wandruszka. **1994**. Microorganization in dissolved humic acids. *Environmental Science and Technology*, **28**: 1934 - 1941.

Ephraim J. H., C. Pettersson, M. Nordén y B. Allard. **1995**. Potentiometric titrations of humic substances: Do ionic strength effects depend on the molecular weight? *Environmental Science and Technology*, **29**: 622 - 628.

Ervens B. **1997**. Kinetische Untersuchungen zur atmosphärischen Chemie von  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  and  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  Radikalanionen in wässriger Lösung. 86 páginas. Disertación de diploma de la University of Essen, Essen, Alemania.

Faig W., J. C. Salfeld y E. Baume. **1958**. UV-Spektren und Konstitution von *p*-Benzochinonen. *Annalen der Chemie*, **618**: 117 - 139.

Fang X., H. P. Schuchmann y C. von Sonntag. **2000**. The reaction of the OH radical with pentafluoro-, pentachloro-, pentabromo- and 2,4,6-triiodophenol in water: electron transfer vs. addition to the ring. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*: 1391 - 1398.

Felix W. D., B. L. Gall, y L. M. Dorfman. **1967**. Pulse radiolysis studies. IX. Reactions of the ozonide ion in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry*. **71**: 384 - 392

Foote C. S. y Y. T. Ching. **1975**. Chemistry of Singlet Oxygen. XXI. Kinetics of Bilirubin Photooxygenation. *Journal of the American Chemical Society*, **97**, 6209 - 6214.

Fischer A. M., D. S. Kliger, J. S. Winterle y T. Mill. **1985**. Direct observation of phototransients in natural waters. *Chemosphere*, **14**: 1299 - 1306.

Fisher A. M., J. S. Winterle y T. Mill. **1987**. Primary photochemical processes in photoysis mediated by humic substances. Capítulo 11: 141 - 156. En: Photochemistry of environmental aquatic systems. Editado por R. G. Zika y W. J. Cooper. American Chemical Society, Washington, USA.

Frimmel F. H. **1994**. Photochemical aspects related to humic substances. *Environment International*. **20**: 373 - 385.

Frisch M. J. , J. A. Pople y J. S. Binkley. **1984**. Self-consistent molecular orbital methods, 25 supplementary functions for Gaussian basis sets. *Journal of Chemical Physics*, **80**: 3265 - 3269.

Fuhrman, J. A., T. D. Sleeter, C. A. Carlson y L. M. Proctor. **1989**. Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Marine Ecology Progress Series*, **57**: 207 - 217.

Ganuja Monje, A. **2001**. Caracterización biogeoquímica de la materia orgánica del suelo en ecosistemas representativos del País Vasco. Tesis doctoral del Centro de Ciencias Medioambientales de la Universidad Autónoma de Madrid, España.

García N. A. **1994**. Singlet molecular oxygen-mediated photodegradation of aquatic phenolic pollutants. A kinetic and mechanistic overview, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **22**: 185 - 196.

Gates D. D. y R. L. Siegrist. **1995**. In-situ chemical oxidation of trichloroethylene using hydrogen peroxide. *Journal of Environmental Engineering*, **121**: 639 - 644.

Gaussian 03, Revision C.02, Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, Jr., J.A.; Vreven, T.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C.; Pople, J.A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.

Gauthier T. D., W. R. Seitz y C. L. Grant. **1987**. Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene Koc values. *Environmental Science and Technology*, **21**: 243 - 248.

Gauthier T. D., E. C. Shane, W. F. Guerin, W. R. Seitz y C. L. Grant. **1986**. Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology*, **20**: 1162 - 1166.

Gear CW. **1971**. Numerical initial value problems in ordinary differential equations. 253 páginas. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, USA.

George C. y J.-M. Chovelon. **2002**. A laser flash photolysis study of the decay of  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  and  $\text{Cl}_2^{\cdot-}$  radical anions in the presence of  $\text{Cl}^-$  in aqueous solutions. *Chemosphere*, **47**: 385 - 393.

Ghosh K. y M. Schnitzer. **1980**. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Science*. **129**: 266 - 276.

Giannakopoulos E. , K. C. Christoforidis, A. Tsipis, M. Jerzykiewicz e Y. Deligiannakis. **2005**. Influence of Pb(II) on the radical properties of humic substances and model compounds. *Journal of Physical Chemistry A* , **109**: 2223 - 2232.

Gibaja Oviedo S. **1998**. Pigmentos naturales quinónicos. Editado por O. Salaverry García. 277 páginas. Fondo Editorial UNMSM, Lima, Perú.

Glaze W. H., H. S. Weinberg y J. E. Cavanagh. **1993**. Evaluating the formation of brominated DBPs during ozonation. *Journal of the American Water Works Association*, **85**: 96 - 103.

Goldstone J. V., J. Pullin, S. Bertilsson y B. M. Voelker. **2002**. Reactions of hydroxyl radical with humic substances: bleaching, mineralization and production of bioavailable carbon substrates. *Environmental Science and Technology*, **36**: 364 - 372.

Gonzalez M. C. y D. O. Mártire. **1999**. The reactions of sulphate radicals with substituted benzenes studied by time-resolved spectroscopy. A structure-reactivity correlation analysis. *Asian Journal of spectroscopy* **3**; 125 - 128.

Gonzalez M. C. y A. M. Braun. **1995**. VUV photolysis of aqueous solutions of nitrate and nitrite. *Research on Chemical Intermediates*, **21**: 837 - 859.

Gonzalez M. C., D. O. Mártire y A. M. Braun. **1998**. Aqueous phase kinetic studies involving highly reactive species of environmental interest. *Recent Research Development in Photochemistry and Photobiology*, **2**: 25 - 45.

Gonzalez M. C. y D. O. Mártire. **1997**. Kinetics and mechanisms of reaction of  $O^{\cdot-}$  and  $O_3^{\cdot-}$  in alkaline aqueous media. I. Hydrogen peroxide solutions. *International Journal of Chemical Kinetics*, **29**: 589 - 597.

Guo L., W. Jury, R. Wagenet y M. Flury. **2000**. Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to batch reactors. *Journal of Contaminant Hydrology*, **43**:45 - 62.

Haag W. R. y J. Hoigne. **1985**. Photo-sensitized oxidation in natural water via OH radicals. *Chemosphere* **14**: 1659 - 1671.

Haag W. R. y J. Hoigné. **1986**. Singlet oxygen in surface waters. 3. Photochemical formation and steady-state concentrations in various types of waters. *Environmental Science and Technology*, **20**: 341 - 348.

Haag W. R. y T. Mill. **1990**. Survey of sunlight-produced transient reactants in surface waters. Pág. 82 - 88. En: Effects of solar ultraviolet radiation on biogeochemical dynamics in aquatic environments. Editado por N. V. Blough y R. G. Zepp. Woods Hole Oceanographic Institution Technical Report, WHOI-90-09, Woods Hole, USA.

Haag W. R., J. Hoigne, E. Gassman y A. M. Braun. **1984**. Quantum yields of its production by some natural humic materials as a function of wavelength. *Chemosphere*, **13**: 641 - 650.

Hansch C. y H. Gao. **1997**. Comparative QSAR: Radical Reactions of Benzene Derivatives in Chemistry and Biology. *Chemical Reviews*, **97**: 2995 - 3059.

Hautala K., J. Peuravuori y K. Pihlaja. **2000**. Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analyses. *Water Research*, **34**: 246 - 258.

Hart E. J. y M. Anbar. **1970**. The Hydrated Electron. 267 páginas. J. Wiley and Sons, Nueva York, USA.

Hayes M. H. B. **1998**. Humic Substances. Structures, Properties and Uses. Editado por G. Davies y E. A. Ghabbour. 272 páginas. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Hem L. J. y H. Efraimsson. **2001**. Assimilable organic carbon in molecular weight fractions of natural organic matter. *Water Research*, **35**: 1106 - 1110.

Hermosin M. C., J. Cornejo, J. L. White y F. D. Hess. **1982**. Bioavailability of s-triazines adsorbed on montmorillonite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**: 728 - 733

Hernbest K., P. Douglas, M. S. Garley y A. Mills. **1994**. Persulphate quenching of the excited state of ruthenium(II) tris-bipyridyl dication: thermal reactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **80**: 299 - 305.

Herrmann H. **2003**. Kinetics of aqueous phase reactions relevant for atmospheric chemistry. *Chemical Reviews*, **103**: 4691 - 4716.

Hessler D. P., F. H. Frimmel, E. Oliveros y A. M. Braun. **1996**. Quenching of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) by humic substances. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **36**: 55 - 60.

Hills G. J. y D. J. G. Ives. **1969**. The calomel electrode and other mercury-mercurous SALT electrodes. Capítulo 3: 127 - 164. En: Reference electrodes. Theory and practice. Editado por D. J. G. Ives y G. J. Janz.. Academic Press, Nueva York, USA.

Hindmarsh A. C. **1980**. Note on the startup of ODE solvers. *ACM SIGNUM Newsletter*, **11**: 12 - 13.

Hine J. **1950**. Carbon Dichloride as an Intermediate in the Basic Hydrolysis of Chloroform. A Mechanism for Substitution Reactions at a Saturated Carbon Atom. *Journal of the American Chemical Society*, **72**: 2438 - 2445.

Hole S. J., N. C. McClure y S. B. Powles. **2001**. Rapid degradation of carbetamide upon repeated application to Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**: 739 - 745.

House D.A. **1962**. Kinetics and mechanism of oxidations by peroxydisulfate. *Chemical Reviews*, **62**: 185 - 203.

Huovinen P. S., H. Penttilä y M. R. Soimasuo. **2000**. Penetration of UV radiation into Finnish lakes with different characteristics. *International Journal of Circumpolar Health*, **59**: 15 - 21.

Hug G. L. **1981**. Optical Spectra of Nonmetallic Inorganic Transient Species in Aqueous Solution. *National Standard Reference Data System*, **69**. National Bureau of Standards, USA, Washington.

Huie R. E. **1995**. Free radical chemistry of the atmospheric aqueous phase. Pág. 374 - 419. En: Advanced Series in Physical Chemistry, Vol. 3. Editado por J. R. Barker. World Scientific, Hackensack, USA.

Huie R. E. y C. L. Clifton. **1990**. Temperature dependence of the rate constants for reactions of the sulfate radical,  $\text{SO}_4^-$ , with anions. *Journal of Physical Chemistry*, **94**: 8561 - 8567.

Huling S. G. y B. Pivetz. **2006**. In-Situ Chemical Oxidation - Engineering Issue. US EPA/600/R-06/072. Disponible en: <http://www.epa.gov/ada/download/issue/600R06072.pdf>.

Hunter, W.H.; Morse, M. **1926**. The oxidation of trichlorophenol. *Journal of the American Chemical Society*, **48**: 1615 - 1624.

Iesce M. R., F. Cermola y M. Rubino. **2007**. Photooxygenation of non-aromatic heterocycles. *Current Organic Chemistry* **11**: 1053 - 1075.

Ismaili M. M., C. Belin, M. Lamotte y H. Texier. **1998**. Distribution et caractérisation par fluorescence de la matière organique dissoute dans les eaux de la Manche centrale. *Oceanologica Acta*. **21**: 645 - 654.

Janik I., P. Ulanski, J. M. Rosiak y C. von Sonntag. **2000**. Hydroxyl-radical-induced reactions of the poly(vinyl methyl ether) model 2,4-dimethoxypentane in the absence and presence of dioxygen: a pulse radiolysis and product study. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 2*: 2034 - 2040.

Jayson G. G., B. J. Parsons y A. J. Swallow. **1973**. Some simple, highly reactive, inorganic chlorine derivatives in aqueous solution. Their formation using pulses of radiation and their role in the mechanism of the Fricke dosimeter. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions. 1*, **69**: 1597 - 1607.

Jones K. D. y C. L. Tiller. **1999**. Effect of solution chemistry on the extent of binding of phenanthrene by a soil humic acid: a comparison of dissolved and clay bound humic. *Environmental Science and Technology*, **33**: 580 - 587.

Jones R. I. y L. Arvola. **1984**. Light penetration and some related characteristics in small forest lakes in Southern Finland. *Verh International Verein Limnology*, **22**: 811 - 816.

Jørgensen, N. O. G., L. Tranvik, H. Edling, W. Grane'li y M. Lindell. **1998**. Effects of sunlight on occurrence and bacterial turnover of specific carbon and nitrogen compounds in lake water. *FEMS Microbiology Ecology*, **25**, 217 - 227.

Jota M. A. T. y J. P. Hassett. **1991**. Effects of environmental variables on binding of a PCB congener by dissolved humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **10**: 483 - 491.

Jovanovic S. V., Y. Hara, S. Steenken y M. G. Simic. **1995**. Antioxidant potential of gallic catechins A pulse radiolysis and laser photolysis study. *Journal of the American Chemical Society*, **117**: 9881 - 9888.

Karanfil T., M. A. Schlautman, J. E. Kilduff, W. J. Weber Jr.. **1996**. Adsorption of organic macromolecules by granular activated carbon. 2. Influence of dissolved oxygen. *Environmental Science and Technology*, **30**: 2195 - 2201.

Kochany J. y J. R. Bolton. **1991**. Mechanism of photodegradation of aqueous organic pollutants. 1. EPR spin-trapping technique for the determination of OH radical rate constants in the

photooxidation of chlorophenols following the photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Physical Chemistry* **95**: 5116 - 5120.

Kohn T. y K L Nelson. **2007**. Sunlight-Mediated Inactivation of MS2 Coliphage via Exogenous Singlet Oxygen Produced by Sensitizers in Natural Waters. *Environmental Science and Technology*, **41**: 192 - 197.

Kollist-Siigur K, T. Nielsen, C. Grøn, P. E. Hansen, C. Helweg, K. E. N. Jonassen, O. Jørgensen y U. Kirso. **2001**. Sorption of polycyclic aromatic compounds to humic and fulvic acid HPLC column materials. *Journal of Environmental Quality*, **30**: 526 - 537.

Kononova M. M. **1966**. Soil organic matter. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility. 544 páginas. Pergamonn Press, Oxford, UK.

Kortelainen P. **1999**. Acidity and buffer capacity. Pág. 95-115. En: Limnology of Humic Waters. Editado por J. Keskitalo y P. Eloranta. Backhuys Publishers, Leiden, Holanda.

Kovač N., J. Faganeli, O. Bajt, B. Šket, A. Š. Vuk, B. Orel y P. Mozetič. **2006**. Degradation and Preservation of Organic Matter in Marine Macroaggregates. *Acta Chimica Slovenica*, **53**: 81 - 87.

Kovárová-Kovar K. y T. Egli. **1998**. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single substrate- controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**: 646 - 666.

Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R. ; Pople, J. A. **1980**. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wavefunctions. *Journal of Chemical Physics*, **72**, 650 - 654.

Kronberg L. **1999**. Content of humic substances in freshwater. Pág. 9 - 10. En: Limnology of Humic Waters. Editado por J. Keskitalo y P. Eloranta. Backhuys Publishers, Leiden, Holanda.

Kronberg L. y R. F. Christman. **1989**. Chemistry of mutagenic byproducts of water chlorination. *Science of the Total Environment*, **81/82**: 219 - 230.

Kruithof J. C., P. C. Kamp y M. Belosevic. **2002**. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment: the ultimate solution for pesticide control and disinfection. *Water Supply*, **2**: 113 - 122.

Krutsko E. N. y A. I. Kulak. **2004**. Photochemical decomposition of trichloroacetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of Chemical Sciences*, **3**: 30 - 33.

Kuhn H. J., S. E. Bralslavsky y R. Schmidt. **2004**. Chemical Actinometry (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, **76**: 2105 - 2146.

Kukkonen J. **1991**. Effects of pH and natural humic substances on the accumulation of organic pollutants in two freshwater invertebrates. Pág. 413 - 422. En: *Lecture Notes in Earth Sciences*. Editado por B. Allard, H. Borén y A. Grimvall. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.

Kulovaara M. **1995**. Dissolved Organic Matter and Xenobiotics in Humic Surface Waters - Formation of Associations and Degradation Induced by Light. Tesis doctoral de la Abo Akademi University, Finlandia.

Landgraf M. D., M. Ribeiro Alves, S. D. da Silva y M. O. de Oliveira Rezende. **1999**. Caracterização de ácidos húmicos de vermicomposto de esterco bovino compostado durante 3 e 6 meses. *Química Nova*, **22**: 483 - 486.

Lang K., D. M. Wagnerova, S. Klementova y P. Kubat. **1997**. Humic substances – excited states, quenching by metal ions, and photosensitized degradation of chlorophenols. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **62**: 1159 - 1168.

Latch D. E. y K. McNeill. **2006**. Microheterogeneity of Singlet Oxygen Distributions in Irradiated Humic Acid Solutions, *Science*, **311**: 1743 - 1747

Lee C., W. Yang y R. G. Parr. **1988**. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, **37**: 785 - 789.

Lenhart J. J., S. E. Cabaniss, P. MacCarthy y B. D. Honeyman. **2000**. Uranium(VI) complexation with citric, humic and fulvic acids. *Radiochimica Acta*, **88**: 345 - 353.

Leopoldini M., T. Marino, N. Russo y M. Toscano. **2004**. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *Journal of Physical Chemistry A*, **108**: 4916 - 4922.

Lguirati A., G. Ait Baddi, A. El Mousadik, V. Gilard, J.-C. Revel y M. Hafidi. **2005**. Analysis of humic acids from aerated and non-aerated urban landfill composts. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **56**: 8 - 16.

Liang C., C. J. Bruell, M. C. Marley y K. L. Sperry. **2004**. ISCO persulfate oxidation for in situ remediation of TCE. II. Activated by chelated ferrous ion. *Chemosphere*, **55**: 1225 - 1233.

Lifongo L. L., D. J. Bowden y P. Brimblecombe. **2004**. Photodegradation of haloacetic acids in water. *Chemosphere*, **55**: 467 - 476.

Lindell M. J., W. Grane'li y L. J. Tranvik. **1995**. Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, **40**: 195 - 199.

Lindell M. J. y H. Rai. **1994**. Photochemical oxygen consumption in humic waters. *Archiv für Hydrobiologie* **43**: 145 - 155

Lovley D. R. y E. L. Blunt-Harris. **1999**. Role of humic-bound iron as an electron transfer agent in dissimilatory Fe(III) reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 4252 - 4254.

Lovley D., J. Coates, E. Blunt-Harris, E. Phillips y J. Woodward. **1996**. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, **382**: 445 - 448.

Lüers F. y T. E. M. ten Hulscher. **1996**. Temperature effect on the partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between natural organic carbon and water. *Chemosphere*, **33**: 643 - 657.

Ma H., H. E. Allen y Y. Yin. **2001**. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Water Research*, **35**: 985 - 996.

MacCarthy P. **2001**. The principles of humic substances: An introduction to the first principle. Pág. 19- 30. En: Humic substances. Structures, models and functions. Editado por E. A. Ghabbour y G. Davies. The Royal Society of Chemistry, Gateshead, UK.

MacKinnon L. K. y N. R. Thomson. **2002**. Laboratory-scale in situ chemical oxidation of a perchloroethylene pool using permanganate. *Journal of Contaminant Hydrology*, **56**: 49 - 74.

Malcolm R. L. y P. MacCarthy. **1986**. Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research. *Environmental Science and Technology*, **20**: 904 - 911.

Mangrich A. S., M. A. Lobo, C. B. Tanck, F. Wypych, E. B. S. Toledo y E. Guimarães. **2000**. Criterious preparation and characterization of earthworm-composts in view of animal Waste Recycling. Part I. Correlation between chemical, thermal and FTIR spectroscopic analyses of four

humic acids from earthworm-composted animal manure. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **11**: 164 - 169.

March J. **2001**. Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure. 1495 páginas. Wiley-Interscience, Nueva York, USA.

Mártire D. O., C. Evans, S. G. Bertolotti, S. E. Braslavsky y N. A. García. **1993**. Singlet molecular oxygen  $O_2(a^1\Delta_g)$  production and quenching by hydroxybiphenyls. *Chemosphere*. **26**: 1691 - 1701.

Mártire D. O., J. A. Rosso, S. Bertolotti, G. Carrillo Le Roux, A. M. Braun y M. C. Gonzalez. **2001**. Kinetic study of the reactions of chlorine atoms and  $Cl_2^{\cdot-}$  radical anions in aqueous solutions. II. Toluene, benzoic acid and chlorobenzene. *Journal of Physical Chemistry*, **105**: 5385 - 5392.

Mártire D. O. y M. C. Gonzalez. **2001**. Aqueous phase kinetic studies involving intermediates of environmental interest: Phosphate radicals and their reactions with substituted benzenes. *Progress in Reaction Kinetics and Mechanisms*, **26**: 201 - 218.

Matthews R. W. y D. F. Sangster. **1965**. Measurement by benzoate radiolytic decarboxylation of relative rate constants for hydroxyl radical reactions. *Journal of Physical Chemistry*, **69**: 1938 - 1946.

Matsuda H., Y. Ose, T. Sato, H. Nagase, H. Kito y K. Sumida. **1992**. Mutagenicity from ozonation of humic substances. *Science of the Total Environment*, **117/118**: 521 - 529.

McCulloch A. **2001**. Trichloroacetic acid in the environment. Eurochlor Science dossier. Disponible en: <http://www.eurochlor.org/upload/documents/document62.pdf>.

McElroy W. J. y S. J. Waygood. **1990**. Kinetics of the reactions of  $SO_4^{\cdot-}$  radicals with  $SO_4^{\cdot-}$ ,  $S_2O_8^{2-}$  and  $Fe^{+2}$ . *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **86**: 2557 - 2564.

McElroy W. J. **1990**. A laser photolysis study of the reaction of  $SO_4^{\cdot-}$  with  $Cl^-$  and the subsequent decay of  $Cl_2^{\cdot-}$  in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry*, **94**: 2435 - 2441.

Merga G., C. T. Aravindakumar, B. S. M. Rao, H. Mohan y J. P. Mittal. **1994**. Pulse radiolysis study of the reactions of  $SO_4^{\cdot-}$  with some substituted benzenes in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **90**: 597 - 604.

Mervosh T. L., G. K. Sims y E. W. Stollert. **1995**. Clomazone fate in soil as affected by microbial activity, temperature, and soil moisture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 537 - 543.

Meyer A. F., D. A. Lipson, A. P. Martin, C. W. Schadt y S. K. Schmidt. **2004**. Molecular and metabolic characterization of cold-tolerant alpine soil *Pseudomonas sensu stricto*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 483 - 489.

Miano T., G. Sposito y J. P. Martin. **1990**. Fluorescence spectroscopy of model humic acid-type polymers. *Geoderma*, **47**: 349 - 359.

Miertos S. y J. Tomasi. **1982**. Approximate evaluations of the electrostatic free energy and internal energy changes in solution processes. *Chemical Physics*, **65**: 239 - 245.

Miettinen I. T., T. Vartiainen y P. J. Martikainen. **1996**. Contamination of drinking water. *Nature*, **381**: 654 - 655.

Mill T., D. G. Hendry y H. Richardson. **1980**. Free-Radical Oxidants in Natural Waters. *Science*, **207**: 886 - 887

Miller W. L. y M. A. Moran. **1997**. Interaction of photochemical and microbial processes in the degradation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment. *Limnology and Oceanography*, **42**: 1317 - 1324.

Miskoski S. y N. A. Garcia. **1993**. Influence of the peptide bond on the singlet molecular oxygen-mediated ( $O_2[{}^1\Delta g]$ ) photooxidation of histidine and methionine dipeptides. A kinetic study. *Photochemistry and Photobiology*, **57**: 447 - 452.

Mobed J. J., S. L. Hemmingsen, J. L. Autry y L. B. McGown. **1996**. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction. *Environmental Science and Technology*, **30**: 3061 - 3065

Mohan H., M. Mudaliar, C. T. Aravindakumar, B. S. Madhav Rao y J. P. Mittal. **1991**. Studies on structure–reactivity in the reaction of OH radicals with substituted halobenzenes in aqueous solutions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*: 1387 - 1392.

Mounier S., N. Patel, L. Quilici, J. Y. Benaim y C. Benamou. **1999** (a). Fluorescence 3D de la matière organique dissoute du fleuve Amazone. *Water Research*, **33**: 1523 - 1533

Mounier, S., R. Braucher, J. Y. Benaim. **1999** (b). Differentiation of organic matter's properties of the Rio Negro basin by crossflow ultra-filtration and UV-spectrofluorescence. *Water Research*, **33**: 2363 - 2373.

Müller S. R., H.-R. Zweifel, D. J. Kinnison, J. A. Jacobsen, M. A. Meier, M. M. Ulrich y R. P. Schwarzenbach. **1996**. Occurrence, sources, and fate of trichloroacetic acid in Swiss waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**: 1470 - 1478.

Münster U., K. Salonen y T. TOLONEN. **1999**. Decomposition. Pág. 225-264. En: Limnology of Humic Waters. Editado por J. Keskitalo y P. Eloranta. Backhuys Publishers, Leiden, Holanda.

Murphy E. M., J. M. Zachara, S. C. Smith, J. L. Phillips y T. W. Wietsma. **1994**. Interaction of hydrophobic organic compounds with mineralbound humic substances. *Environmental Science and Technology*, **28**: 1291 - 1299.

Myneni S. C. B. **2002**. Soft x-ray spectroscopy and spectromicroscopy studies of organic molecules in the environment. En: Applications of synchrotron radiation in low-temperature geochemistry and environmental science. Editado por P. Fenter, M. Rivers, N. Sturchio, S. V. Sutton. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **49**: 485 - 579.

Myneni S. C. B., J. T. Brown, G. A. Martinez y W. Meyer-Ilse. **1999**. Imaging of humic substance macromolecular structures in water and soils. *Science*, **286**: 1335 - 1337.

Nagarajan V. y R. W. Fessenden. **1985**. Flash photolysis of transient radicals. 1.  $X_2^{\cdot -}$  with  $X=Cl, Br, I,$  and  $SCN$ . *Journal of Physical Chemistry*, **89**: 2330 - 2335.

Nakashima N., T. Tokunaga, H. Owaki, H. Murakami y T. Sagara. **2000**. Catalytic reduction of organohalides at hemin and hemin -imidazole polymer films on pyrolytic graphite electrodes, *Colloids and Surfaces, A*, **169**: 163 - 170.

Nakayasu K., M. Fukushima, K. Sasaki, S. Tanaka y H. Nakamura. **1999**. Comparative studies of the reduction behavior of chromium (VI) by humic substances and their precursors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**: 1085 - 1090.

Nascimento C. A. O., A. C. S. C. Teixeira, R. Guardani, F.H. Quina, O. Chiavone-Filho, y A. M. Braun. **2007**. Industrial Wastewater Treatment by Photochemical Processes Based on Solar Energy. *Journal of Solar Energy Engineering*, **129**: 45 - 52.

Nassar A.-E. F., J. M. Bobbitt, J. D. Stuart y J. F. Rusling. **1995**. Catalytic Reduction of Organohalide Pollutants by Myoglobin in a Biomembrane-like Surfactant Film. *Journal of the American Chemical Society*, **117**: 10986 - 10993.

Neta P., R. E. Huie y A. B. Ross. **1988**. Rate Constants for Reactions of Inorganic Radicals in Aqueous Solution. NDRL-NIST solution kinetics database:- ver. 3.0. Notre Dame Radiation Laboratory, Notre Dame y National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg. Disponible en: <http://www.rcdc.nd.edu/compilations/Ino/Ino.htm>.

O'loughlin E. J., S. J. Traina y Y.-P. Chin. **2000**. Association of organotin compounds with aquatic and terrestrial humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**: 2015 - 2021.

Obernosterer I. y R. Benner. **2004**. Competition between biological and photochemical processes in the mineralization of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, **49**: 117 - 124.

Ogilby P. R. y C. S. Foote. **1982**. Chemistry of Singlet Oxygen. 36. Singlet molecular oxygen ( $^1\Delta_g$ ) luminescence in solution following pulsed laser excitation. Solvent deuterium isotope effects on the lifetime of singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, **104**: 2069 - 2070

OSHA Chemical sampling information. Disponible en: <http://www.osha-slc.gov/dts/sltc/methods/>.

Owen D. M., G. L. Amy, Z. K. Chowdhury, R. Paode, G. McCoy y K. Viscosil. **1995**. NOM characterization and treatability. *Journal of the American Water Works Association*, **87**: 46 - 63.

Palazzi V., R. Mignone, F. E. Morán Vieyra, H. Boggetti, I. S. de Pinto, C. D. Borsarelli, T. Verdejo y F. Gómez-Vila. **2007**. Caracterización de ácidos húmicos de diferente origen y su capacidad de interacción con cationes alcalinos. Póster presentado en el Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica, Tandil, Argentina.

Paul A., S. T. Hackbarth, E. Zwirnmann, B. Röder y C. E. W Steinberg,. **2005**. Photosensitized generation of singlet oxygen and its quenching by humic substances. Pág. 99 - 116. En: Humic substances: Molecular Details and Applications in Land and Water Conservation. Editado por E. A. Ghabbour y G. Davies. Taylor and Francis, Inc., Nueva York, USA.

Paz M. A., R. Flückiger, A. Boak, H. M. Kagan y P. M. Gallop. **1991**. Specific detection of quinoproteins by redox-cycling staining. *Journal of Biological Chemistry*, **266**: 689 - 692.

Perminova I. V., F. H. Frimmel, A. V. Kudryavtsev, N. A. Kulikova, G. Abbt-Braun, S. Hesse y V. S. Petrosyant. **2003**. Molecular weight characteristics of humic substances from different environments as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation. *Environmental Science and Technology*, **37**: 2477 - 2485.

Piccolo A. **1994**. Interactions between organic pollutants and humic substances in the environment. Pág. 961 - 979. En: Humic substances in the global environment and implications on human health. Editado por N. Senesi y T. M. Miano. Elsevier, Amsterdam, Holanda.

Pignatello J. J. y B. Xing, **1996**. Mechanisms of Slow Sorption of Organic Chemicals to Natural Particles. *Environmental Science and Technology*, **30**: 1 - 11.

Pusino A., I. Braschi, S. Petretto y C. Gessa. **1999**. Photodegradation of herbicide triasulfuron. *Pesticide Science*, **55**: 479 - 481.

Reasoner D. J. y E. E. Geldreich. **1985**. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**: 1 - 7.

Renken G. E. **1994**. Ozonation at Wiggins water purification works, Durban, South Africa. *Ozone - Science and Engineering*, **16**: 247 - 260.

Reynolds, D. M. y S. R. Ahmad. **1997**. Rapid and direct determination of wastewater BOD values using a fluorescence technique *Water Research*. **31**: 2012 - 2018.

Richard C. y S. Canonica. **2005**. Aquatic phototransformation of organic contaminants induced by coloured dissolved natural organic matter. Capítulo 9: 299 - 323. En: The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2, Part M. Editado por O. Hutzinger. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.

Rifi M. R. **1973**. Electrochemical Reduction of Organic Halides. Capítulo 6: 279-314. En: Organic Electrochemistry. Editado por M. M. Baizer. Marcel Dekker Inc., Nueva York, USA.

Roder M., L. Wojnarovits y G. Foldiak. **1990**. Pulse radiolysis of aqueous solutions of aromatic hydrocarbons in the presence of oxygen. *Radiation Physics and Chemistry*, **36**: 175 - 176.

Roman F., O. Makogon, D. M. Guldi y K. D. Asmus. **1997**. Radical-mediated degradation mechanisms of tribromo- and other trihalogenated acetic acids in oxygen-free solutions as studied

by radiation chemistry methods. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*: 1535 - 1545.

Romero E., G. Dios, M. D. Mingorance, M. B. Matallo, A. Peña y F. Sánchez-Rasero. **1998**. Photodegradation of mecoprop and dichlorprop on dry, moist and amended soil surfaces exposed to sunlight. *Chemosphere*, **37**: 577 – 589.

Ross A. B., W. G. Mallard, W. P. Helman, G. V. Buxton, R. E. Huie y P. Neta. **1998**. NDRL-NIST solution kinetics database: ver. 3.0, Disponible en: <http://www.rcdc.nd.edu>.

Rosso J. A., P. Caregnato, V. C. Mora, M. C. Gonzalez y D. O. Mártire. **2003**. Reactions of phosphate radicals with monosubstituted benzenes. A mechanistic investigation. *Helvetica Chimica Acta*, **86**: 2509 - 2524.

Rosso, Janina. **2002**. Caracterización y reactividad de los radicales fosfato y polifosfato en solución acuosa. Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Rotthaus O., O. Jarjayes, F. Thomas, C. Philouze, E. Saint-Aman y J.-L. Pierre. **2007**. Up to four phenoxyl radicals coordinated to two metal ions in copper and zinc complexes? *Dalton Transactions*: 889 - 895.

Russo-Caia C. y S. Steenken. **2002**. Photo- and radiation-chemical production of radical cations of methylbenzenes and benzyl alcohols and their reactivity in aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **4**: 1478 - 1485.

Rubio M. A., D. O. Mártire, S. E. Braslavsky y E. A. Lissi, **1992**. Influence of the ionic strength on  $O_2(a^1\Delta_g)$  quenching by azide. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **66**: 153 - 157.

Sachs S, K. Schmeide, V. Brendler, A. Křepelová, J. Mibus, G. Geipel, T. Reich, K. H. Heise y G. Bernhard. **2004**. Investigation of the complexation and the migration of actinides and non-radioactive substances with humic acid under geogenic conditions. Complexation of humic acid with actinides in the oxidation state IV (Th, U; Np). Pág. 19 - 94. En: Investigations on the complexation behaviour of humic acids and their influence on the migration of radioactive and non-radioactive substances under conditions close to nature. Editado por C. M. Marquardt. Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe, Alemania.

Saiz-Jimenez C. **1994**. Analytical Pyrolysis of Humic Substances: Pitfalls, Limitations, and Possible Solutions. *Environmental Science and Technology*, **28**: 1773 - 1780.

Samanta S., R. K. Kole y A. Chowdhury. **1999**. Photodegradation of metsulfuron methyl in aqueous solution. *Chemosphere*, **39**: 873 - 879.

Samios S., T. Lekkas, A. Nikolaou y S. Golfinopoulos. **2007**. Structural investigations of aquatic humic substances from different watersheds. *Desalination*, **210**: 125 - 137

San Román E., P. F. Aramendía, H. J. Schumacher. **1982**. Cinética de la recombinación de radicales fluorosulfato estudiada mediante fotólisis flash. *Anales de la Asociación Química Argentina*, **70**: 887 - 900.

San Román E. A. y M. C. Gonzalez. **1989**. Analysis of spectrally resolved kinetic data and time-resolved spectra by bilinear Regression. *Journal of Physical Chemistry*, **93**: 3532 - 3536.

Sanjay H. G., A. K. Fataftah, D. S. Walia y K. Srivastava. **1999**. Humsaorb CS: A humic acid-based adsorbent to remove organic and inorganic contaminants. Pág. 241 - 254. En: Understanding humic substances. Advanced methods, properties and applications. Editado por E. A. Ghabbour y G. Davies. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Saito T., L. K. Koopal, W. H. van Riemsdijk, S. Nagasaki y S. Tanaka. **2004**. Adsorption of humic acid on goethite: isotherms, charge adjustments, and potential profiles. *Langmuir* **20**: 689 - 700

Scaiano J. **1989**. Handbook of Organic Photochemistry. Vol. 1. 451 páginas. CRC Press, Boca Ratón, USA.

Schlautman M. A. y J. J. Morgan. **1993**. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology*, **27**: 961 - 969.

Schmidt R. y E. Afshari. **1992**. Deactivation of  $O_2 (^1\Delta_g)$  by solvent molecules. Comparative experiments with  $^{16}O_2$  and  $^{18}O_2$ . *Berichte der Bunsen-Gesellschaft fuer Physikalische Chemie*, **96**: 788 - 794.

Schmitt-Koplin P., N. Hertkorn, H. R. Schulten y A. Ketrup. **1998**. Structural changes in a dissolved soil humic acid during photochemical degradation processes under  $O_2$  and  $N_2$  atmosphere. *Environmental Science and Technology*, **32**: 2531 - 2541.

Schnabel C. **2001**. Photo-elektrochemische charakterisierung und entwicklung von siliciumcarbid-photokathoden zur reduktiven halogenierung von halogenorganika in der wässrigen phase. Tesis doctoral de la Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik de la Universität Karlsruhe, Alemania.

Schnitzer M. y S. U. Khan. **1972**. Humic substances in the environments. 203 páginas. Marcel Dekker, Nueva York, USA.

Schwarz H. A. y R. W. Dodson. **1984**. Equilibrium between hydroxyl radicals and thallium(II) and the oxidation potential of hydroxyl(aq). *Journal of Physical Chemistry*, **88**: 3643 - 3647.

Sehested K., J. Holcman, E. BJergbakke y E. J. Hart. **1982**. Ultraviolet spectrum and decay of the ozonide ion radical,  $O_3^-$ , in strong alkaline solution. *Journal of Physical Chemistry*, **86**: 2066 - 2069

Scott D. T., D. M. McKnight, E. L. Blunt-Harris, S. E. Kolesar y D. R. Lovley. **1998**. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. *Environmental Science and Technology*, **32**: 2984 - 2989.

Scully N. M., W. J. Cooper y L. J. Tranvik. **2003**. Photochemical effects on microbial activity in natural waters: the interaction of reactive oxygen species and dissolved organic matter. *FEMS Microbiology Ecology*, **46**: 353 - 357.

Scully N. M. y D. R. S. Lean. **1994**. The attenuation of ultraviolet radiation in temperate lakes. *Archiv für Hydrobiologie. Beiheft*, **43**: 135 - 144.

Scully N. M., W. F. Vincent, D. S. Lean y W. J. Cooper. **1997**. Implications of ozone depletion for surface water photochemistry: Sensitivity of clear lakes. *Aquatic Sciences*, **59**: 260 - 274.

Scurlock R., M. Rougee y R. V. Bensasson. **1990**. Redox properties of phenols, their relationships to singlet oxygen quenching and to their inhibitory effects on benzo(a)pyrene-induced neoplasia. *Free Radical Research Communications*, **8**: 251 - 258.

Seitz W. R. **1981**. Luminescence spectrometry (flourimetry and phosphorimetry). Pág. 159 - 248. En: Treatise on Analytical Chemistry. Part I. Theory and Practice, vol. 7, Section H. Optical Methods of Analysis. Editado por P. J. Elving. John Wiley and Sons, Nueva York, USA.

Senesi N. **1990**. Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. *Advanced Soil Science*, **14**: 77 - 130.

Senesi N. **1993**. Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter. Molecular and mechanistic aspects. Pág. 47 - 74. En: Migration and Fate of Pollutants in Soils and Subsoils. Editado por D. Petruzzelli y F. G. Elfferich. NATO-ASI Series, Vol. G32. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.

Senesi N. e Y. Chen. **1989**. Interaction of toxic organic chemicals with humic substances. Pág. 37 - 90. En: Toxic organic chemicals in porous media. Editado por Z. Gerstl, Y. Chen, B. Mingelgrin y B. Yaron. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.

Senesi N. y E. Loffredo. **1999**. The chemistry of soil organic matter. Pág. 239 - 370. En: Soil Physical Chemistry. Editado por D. L. Sparks. CRC Press, Boca Raton, USA.

Senesi N., T. M. Miano, M. R. Provenzano y G. Brunetti. **1991**. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, **152**: 259 - 271.

Senesi N, C. Saiz-Jimenez y T. M. Miano. **1992**. Spectroscopic characterization of metal-humic acid-like complexes of earthworm-composted organic wastes. *Science of the Total Environment*, **117/118**: 111 - 120.

Song Z., E. Chouparova, K.W. Jones, H. Feng, and N.S. Marinkovic. **2001**. FTIR Investigation of Sediments from NY/NJ Harbor, San Diego Bay, and the Venetian Lagoon. NSLS Activity Report, Z-112- Z-116. Disponible en: [http://www.pubs.bnl.gov/nsls01/pdf/section%202/geological%20and%20environmental%20section/sec2\\_scihi\\_geo\\_song.pdf](http://www.pubs.bnl.gov/nsls01/pdf/section%202/geological%20and%20environmental%20section/sec2_scihi_geo_song.pdf).

Stevenson F. J. **1994**. Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. 512 páginas. John Wiley and Sons: Nueva York, USA.

Struyk Z. y G. Sposito. **2001**. Redox properties of standard humic acids. *Geoderma*, **102**: 329 - 346.

Sukul P. y M. Spiteller. **2001**. Influence of biotic and abiotic factors on dissipating metalaxyl in soil. *Chemosphere*, **45**: 941 - 947.

Sulzberger B., S. Canonica, T. Egli, W. Giger, J. Klausen y U. von Gunten. **1997**. Oxidative Transformations of contaminants in natural and in technical systems. *Chimia*, **51**: 900 - 907.

Suton R. y G. Sposito. **2005**. Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environmental Science and Technology*, **39**: 9009 - 9015.

Swift R. S. **1996**. Organic matter characterization. Capítulo 35: 1018 - 1020. En *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods* (Soil Science Society of America Book Series, Número 5). Editado por D. L. Sparks. Soil Science Society of America, Madison, USA.

Tanaka F., M. Fukushima, A. Kikuchi, H. Yabuta, H. Ichikawa y K. Tatsumi. **2005**. Influence of chemical characteristics of humic substances on the partition coefficient of a chlorinated dioxin. *Chemosphere*, **58**: 1319 - 1326.

Tarr A., W. Wang, T. S. Bianchi y E. Engellhaupt. **2001**. Mechanisms of ammonia and amino acid photoproduction from aquatic humic and colloidal matter. *Water Research*. **35**, 3688 - 3696.

ten Hulscher T. E. M. y G. Cornelissen. **1996**. Effect of temperature on sorption equilibrium and sorption kinetics of organic micropollutants - a review. *Chemosphere* **32**: 609 - 626.

These A. **2005**. Strukturelle Charakterisierung von Fulvinsäure-Molekülen mittels LC-MS/MS: Hinweise zu Quellen, Bildung und Reaktivität. Tesis Doctoral de la Technical University de Berlin, Alemania.

Thomas A.H., C. Lorente, A.L. Capparelli, M.R. Pokhrel, A.M. Braun y E. Oliveros. **2002**. Fluorescence of pterin, 6formilpterin, 6-carboxipterin and folic acid in aqueous solution: pH effects. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **6**: 421 - 426.

Thomas J. D. **1997**. The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, **38**: 1 - 36.

Thorn K., J. Arterburn y M. Mikita. **1992**. Nitrogen-15 and carbon-13 NMR investigation of hydroxylamine-derivatized humic substances. *Environmental Science and Technology*, **26**, 107 - 116.

Thurman E.M., **1985**. Organic geochemistry of natural waters. Editado por M. Nijhoff. 516 páginas. Dr W.Junk Publishers, Dordrecht, Holanda.

Tinoco Pastor M. P. **2000**. Caracterización molecular de la materia orgánica del suelo en situaciones representativas de diferentes procesos de degradación de los ecosistemas forestales del

centro de España. Tesis doctoral del Centro de Ciencias Medioambientales de la Universidad Autónoma de Madrid, España.

Tipping E. **2002**. Cation Binding by Humic Substances. 444 páginas. Editado por: P. G. C. Campbell, R. M. Harrison y S. J. de Mora. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.,

Tsutsuki K. y S. Kuwatsuka. **1984**. Molecular size Distribution of humic acids as affected by the ionic strength and the degree of humification. *Soil Science and Plant Nutrition*, **30**: 151 - 162.

Turro N. J. **1991**. Modern Molecular Photochemistry. 628 páginas. University Science Books, Mill Valley, USA.

Villanueva A., L. Caggiari, G. Jori y C. Milanesi. **1994**. Morphological aspects of an experimental tumour photosensitized with a meso-substituted cationic porphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **23**: 49 - 56.

Villata L. S., J. A. Rosso; M. C. Gonzalez y D. O. Martire. **1997**. Kinetics of the reactions of  $\text{OH}^{\bullet}$  and  $\text{O}^{\bullet -}$  with  $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluorotoluene and 4-fluorotoluene. *Journal of Chemical Research, Synopses*: 172 - 173.

Vogel A. **1947**. A textbook of quantitative inorganic analysis (theory and practice). 358 páginas. Longmans. Green and Co. London, UK.

Waite T. D. y F. M. M. Morel. **1984**. Photoreductive dissolution of colloidal iron oxide: Effect of citrate. *Journal of Colloid and Interface Science*, **102**: 121 - 137.

Walker A., E. G. Cotterill y S. J. Welch. **1989**. Adsorption and degradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl in soils from different depths. *Weed Research* **29**: 281 - 287

Wang F. y W. Haag. **1999**. Comparison of Commercial UV Lamps for Radical Oxidation. and Direct Photolysis in Water. Report number UCRL-JC-135610, Lawrence Livermore National Laboratory. Disponible en <http://www.llnl.gov/tid/lof/documents/pdf/236501.pdf>.

Wardman P. **1989**. Reduction Potentials of One-electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **18**: 1637 - 1755.

Warwick P., A. Hall, V. Pashley y N. Bryan. **2001**. Investigation of the permeability of humic molecules using zeta potential measurements. *Chemosphere*, **45**: 303 - 307.

Weng Y.-Q., Y.-L. Teng, F. Yue, Y.-R. Zhong y B.-H. Ye. **2007**. A new selective fluorescent chemosensor for Cu(II) ion based on zinc porphyrin-dipyridylamino. *Inorganic Chemistry Communications*, **10**: 443 - 446.

Wershaw R. L. **1986**. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *Journal of Contaminant Hydrology*, **1**: 29 - 45.

Westerhoff P., G. Aiken, G. Amy y J. Debroux. **1999** Relationships between the structure of natural organic matter and its reactivity towards molecular ozone and hydroxyl radicals. *Water Research*, **33**: 2265 - 2276.

Westerhoff P., W. Chen y M. Esparza. **2001**. Fluorescence analysis of a standard fulvic acid and tertiary treated wastewater. *Journal of Environmental Quality*, **30**: 2037 - 2046.

Wilkinson F., W. P. Helman y A. B. Ross. **1995**. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **24**: 663 - 1021.

Wolff C. J. M., M. T. H. Halmans y H. B. van der Heijde. **1981**. The formation of singlet oxygen in surface waters. *Chemosphere*, **10**: 59 - 62.

Wörner M., C. Schnabel, T. M. Hashem, F. Zegenhagen, J. Gieser, y A. M. Braun. **1998**. Dehalogenation of halogenated organic compounds in aqueous solution by different photochemical methods. *Journal of Information Recording*, **24**: 455 - 460.

Wu C., D. Wei, J. Fan y L. Wang. **2001**. Photosonochemical degradation of trichloroacetic acid in aqueous solution. *Chemosphere*, **44**: 1293 - 1297.

Yu X.-X., Z. C. Bao y J. R. Barker. **2004**. Free radical reactions involving  $\text{Cl}^\cdot$ ,  $\text{Cl}_2^{\cdot-}$ , and  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  in the 248 nm photolysis of aqueous solutions containing  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  and  $\text{Cl}^-$ . *Journal of Physical Chemistry A*, **108**: 295 - 308.

Zafiriou O. C., J. Jousset-Dubien, R. Zepp y R. Zika. **1984**. Photochemistry of natural waters. *Environmental Science and Technology*, **18**: 358A - 371A.

Zanella R., E. G. Primel, F. F. Gonçalves, M. H. S. Kurz y C. M. Mistura. **2003**. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the

determination of herbicide residues in surface and agriculture waters. *Journal of Separation Science*, **26**, 935 - 938.

Zanella R., E. G. Primel, M. B. Adaime, F. F. Gonçalves, M. L. Martins, E. Marchezan y S. L. O. Machado. **2008**. Study of the degradation of the herbicide clomazone in distilled and in irrigated rice field waters using HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Aceptado.

Zebger I., L. Poulsen, Z. Gao, L. K. Andersen y P. R. Ogilby. **2003**. Singlet Oxygen Images of Heterogeneous Samples: Examining the Effect of Singlet Oxygen Diffusion across the Interfacial Boundary in Phase-Separated Liquids and Polymers. *Langmuir*, **19**: 8927 - 8933.

Zebger I., J. W. Snyder, L. K. Andersen, L. Poulsen, Z. Gao, J. D. C. Lambert, U. Kristiansen y P. R. Ogilby. **2004**. Direct Optical Detection of Singlet Oxygen from a Single Cell. *Photochemistry and Photobiology*, **79**: 319 - 322.

Zepp R. G. **1982**. Experimental approaches to environmental photochemistry. Pág. 19 - 41. En: Handbook of Environmental Chemistry: Reactions and Processes, Vol. 2, Part B. Editado por O. Hutzinger. Springer-Verlag, Nueva York, USA.

Zepp R. G., G. L. Baughman y P. F. Schlotzhauer. **1981**. Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water: I. Sunlight induced reactions of aquatic pollutants photosensitized by humic substances. *Chemosphere*, **10**: 109 - 117.

Zepp R. G., A. M. Braun, J. Hoigne y J. A. Leenheer. **1987**. Photoproduction of hydrated electrons from natural organic solutes in aquatic environments. *Environmental Science and Technology*, **21**: 485 - 490.

Zepp R. G., P. F. Schlotzhauer y R. M. Sink. **1985**. Photosensitized transformations involving electronic energy transfer in natural waters: role of humic substances. *Environmental Science and Technology*, **19**: 74 - 81.

Zheng W. y S. Y. Wang. **2001**. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 5165 - 5170.

Zwietering M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts y K. Van 'T Riet. **1990**. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1875-1881.