



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

Especiación del Cu(II)
en Sistemas Acuáticos

Efecto de la Presencia
de Complejantes Naturales

Atilio Andrés Porta

Tesis Doctoral

La Plata, 1991

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas ha sido realizado en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Doctor José Alberto Catoggio.

"El centro del asunto no está en hacer con la pregunta '¿qué es preguntar?' un juego intelectual, sino vivir la pregunta, vivir la indagación, vivir la curiosidad, testimoniarla....

Me parece importante observar cómo hay una relación indudable entre asombro y pregunta, riesgo y existencia. Radicalmente, la existencia humana implica asombro, pregunta y riesgo. Y, por todo esto, implica acción, transformación. Para mi, negar el riesgo es la mejor manera que se tiene para negar la propia existencia humana."

Paulo Freire ("Hacia una pedagogía de la pregunta")

Mi reconocimiento:

A la Facultad de Ciencias Exactas por permitirme el uso de sus instalaciones.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, por las becas que me otorgó para la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento:

Al Doctor José Catoggio, quien me impulsó a lo largo de todos estos años a definir frente al trabajo científico una actitud crítica, profunda y comprometida.

A la Doctora Silvia Alonso, al Doctor Eros Bacci, al Doctor Enrique Baran y al Doctor Roberto Romagnoli, por sus críticas y sugerencias en distintos momentos de la elaboración del trabajo de tesis.

Al Doctor Eloy Mandrile, por su apoyo y sus valiosos consejos en los momentos claves de mi carrera.

A los compañeros del CIMA, Carlos, Patricia, María José, Roxana, Amelia, Claudio, Gustavo, Pablo, Cecilia y Don Benjamín Jerez, quienes de un modo u otro se prestaron a colaborar desinteresadamente en la realización de este trabajo.

En especial a Nina, por su amistad y generosidad, y por estar siempre dispuesta a confrontar ideas y compartir experiencias, su colaboración fue esencial en la etapa final de mi trabajo de tesis.

A los Doctores P.J. Aymonino, R.S. Callegaro, V. Rascio y D. Yantorno, por autorizarme a realizar determinaciones con equipos pertenecientes a los centros por ellos dirigidos.

Al Sr. Peterini y al Sr. Aguilera, por su colaboración en la realización de los dibujos y la construcción del equipo utilizado en el fraccionamiento por espumas, respectivamente.

A Roberto García, por su gran ayuda en todas las determinaciones espectroscópicas.

A Rodolfo Iasi, por su importante colaboración en la determinación de la composición centesimal del AF Saladero.

A Héctor Viturro, gracias a su paciencia y a su docencia pude familiarizarme rápidamente con el manejo de el procesador de texto y los graficadores utilizados en este trabajo.

Al Dr. R.L. Malcolm por enviarme gentilmente el ácido fúlvico estándar de la sociedad internacional de ácidos húmicos.

Al Dr. E.M. Perdue, por hacerme llegar el programa de cálculo para la capacidad complejante de ácidos fúlvicos por el desarrollado.

Al Dr. C. Blaise, que nos permitió el acceso al bioensayo estandarizado de rotíferos con Cu(II).

Finalmente quiero agradecer a mi familia toda, quienes en algún momento se vieron involucrados en alguna parte de esta tarea, y particularmente a Belén y Pedro, ellos son "corresponsables" de esta tarea, fueron continuamente mi fuente de estímulo, serenidad e inspiración.

INDICE

1. - INTRODUCCION GENERAL :

- 1.1. METALES: INTERVALO ENTRE EL GRADO DE ESENCIALIDAD Y TOXICIDAD (pág. 1).
- 1.2. LOS METALES PESADOS Y EL ECOSISTEMA ACUATICO (pág. 4).
 - 1.2.1. Características de los metales pesados más relevantes como tóxicos eventuales y su distribución en los compartimientos abióticos. (pág. 4).
 - 1.2.2. Concepto de especiación química (pág. 9).
 - 1.2.3. Generalidades sobre especiación de metales pesados (pág. 10)
 - 1.2.4. Métodos para la determinación de parámetros de complejación de un cuerpo de agua (pág. 13).
 - 1.2.5. Especiación, Toxicidad y biodisponibilidad (pág. 16).
- 1.3. DIFICULTADES METODOLOGICAS EN LOS ESTUDIOS DE ESPECIACION (pág. 18).
 - 1.3.1. Generalidades sobre los estudios de especiación (pág. 18).
 - 1.3.2. Características principales de los métodos más frecuentemente utilizados para la determinación de parámetros de especiación y de complejación (pág. 21).
- 1.4. OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION (pág. 28).

2. FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS

- 2.1. FUNDAMENTACION DEL METODO. APLICACIONES (pág. 31).
 - 2.1.1. Teoría del fraccionamiento por espumas. Nomenclatura. Parámetros más importantes. Ventajas más destacadas de la técnica (pág. 31).
 - 2.1.2. Fundamentos del método (pág. 34).
 - 2.1.3. Medida de la eficiencia del fraccionamiento por espumas (pág. 38).
 - 2.1.4. Factores que afectan la eficiencia del fraccionamiento por espumas (pág. 39).
 - 2.1.4.1. Reflujo, selectividad y enriquecimiento (pág. 39).
 - 2.1.4.2. Factores fundamentales y factores derivados (pág. 40).
- 2.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES.
 - 2.2.1. Características principales del equipo utilizado (pág. 46).
 - 2.2.1.1. Características del contenedor (pág. 46).

- 2.2.1.2. Características del sistema de columnas (pág. 50).
- 2.2.1.3. Características del dispersor (pág. 53).
- 2.2.2. Variables ensayadas (pág. 54).
 - 2.2.2.1. Elección del gas y velocidad de burbujeo (pág. 54).
 - 2.2.2.2. Tiempo de reflujo (pág. 54).
 - 2.2.2.3. Temperatura, pH y fuerza iónica (pág. 54).
 - 2.2.2.4. Elección de los tensoactivos y concentración de los mismos (pág. 55).
 - 2.2.2.5. Concentración de cobre (II) utilizada; razones (pág. 57).
- 2.2.3. Problemas que suscita la recolección y medición del Cu(II) en la espuma licuada (pág. 60).
 - 2.2.3.1. Técnicas de coalescencia de la espuma (pág. 60).
 - 2.2.3.2. Determinación de la concentración de Cu (II) en la espuma licuada, técnicas absorciométricas: método de la ditizona (pág. 61).
 - 2.2.3.3. Linealidad del método en presencia de tensoactivos (pág. 65).
 - 2.2.3.4. Eliminación de posibles interferencias de Pb y Zn (pág. 67).
- 2.2.4. Metodología final adoptada (pág. 69).
- 2.3. APLICACION DEL FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS AL ESTUDIO DE LA ESPECIACION DE Cu(II) EN SOLUCION, CON LIGANDOS INORGANICOS.
 - 2.3.1. Recuperación de Cu(II) con CTABr, NaDBS y Tergitol NPX frente a un aumento en la concentración de NaCl. (pág. 71).
 - 2.3.1.1. Conclusiones (pág. 74).
 - 2.3.2. Recuperación de Cu(II) con CTABr, NaDBS y Tergitol NPX frente a una solución de agua dulce normalizada (pág. 76).
 - 2.3.2.1. Conclusiones (pág. 80).
- 2.4. APLICACION DEL FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS AL ESTUDIO DE LA ESPECIACION DE Cu(II) EN SOLUCION, CON LIGANDOS ORGANICOS.
 - 2.4.1. Recuperación de Cu(II) con CTABr, NaDBS y Tergitol frente a EDTA en medio neutro (pág. 82).
 - 2.4.1.1. Conclusiones (pág. 91).
 - 2.4.2. Aplicación del fraccionamiento por espumas al estudio de la especiación de Cu(II) frente a ligandos naturales (AF) en medio neutro (pág. 92).
 - 2.4.2.1. Resultados obtenidos con AF "K & K" (pág. 92).
 - 2.4.2.2. Resultados obtenidos con AF "Saladero" (pág. 97).
 - 2.4.2.3. Conclusiones (pág. 98).

2.4.3. Recuperación de Cu(II) con CTABr, NaDBS y Tergitol frente a agua dulce natural filtrada, y agua dulce natural acidificada a pH < 2 y filtrada (pág. 99).

2.4.3.1. Conclusiones (pág. 105).

3. - SUSTANCIAS HUMICAS (ácidos fúlvicos -AF- y ácidos húmicos -AH-).

3.1. DEFINICION Y CARACTERISTICAS GENERALES (pág. 106).

3.2. PROPIEDADES MAS IMPORTANTES (pág. 110).

3.2.1. Estructura y composición (pág. 111).

3.2.2. Composición centesimal, características ácido-base y grupos funcionales más importantes (pág. 114).

3.2.3. Características espectroscópicas (pág. 119).

3.2.3.1. Espectro Infrarrojo (pág. 119).

3.2.3.2. Espectro UV-Visible (pág. 121).

3.2.3.3. Espectro Fluorescente (pág. 122).

3.2.4. Capacidad complejante y constante de asociación AF-MP (pág.124).

3.3. AISLAMIENTO DE SUSTANCIAS HUMICAS A PARTIR DE AGUAS NATURALES (pág. 127).

3.4. AF "SALADERO": AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION (pág. 130).

3.4.1. Características físicoquímicas del agua de Río Santiago en las proximidades del arroyo Saladero (pág. 130).

3.4.2. Aislamiento del AF "Saladero" (pág. 133).

3.4.3. Composición centesimal del AF "Saladero" (pág. 134).

3.4.4. Características ácido-base del AF "Saladero" (pág. 135).

3.4.5. Características espectroscópicas del AF "Saladero" (pág. 137).

3.4.5.1. Espectro Infrarrojo (pág. 137).

3.4.5.2. Espectro UV-Visible (pág. 140).

3.4.5.3. Espectro Fluorescente (pág. 143).

3.4.6. Capacidad complejante y constante de asociación AF-Cu(II) (pág.147).

3.5. COMPLEJACION Y TOXICIDAD. Efecto de la complejación de Cu(II) con AF Saladero sobre sus propiedades toxicológicas (pág. 155).

3.5.1. Conclusiones (pág. 164).

4. - CONCLUSIONES GENERALES (pág. 165).

5. - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS (pág. 169).

1. INTRODUCCION GENERAL

1.1. METALES: INTERVALO ENTRE EL GRADO DE ESENCIALIDAD Y TOXICIDAD.

Los seres vivos habitan en un entorno esencialmente inorgánico, por lo que resulta lógico que, a lo largo de su proceso evolutivo hayan debido adaptarse a dicho entorno, desarrollando mecanismos adecuados para utilizar en beneficio propio las distintas variantes que éste les ofrece (Baran 1985).

La presencia de metales como constituyentes estructurales y funcionales de los organismos podría explicarse, si se tiene en cuenta la actual evidencia del rol preponderante de los mismos como catalizadores de muchas de las reacciones orgánicas que habrían tenido lugar en los orígenes de la vida (Ferris 1984, Baran 1985).

Por ejemplo, durante ensayos destinados a simular las condiciones que habrían prevalecido en la Tierra cuando apareció la vida, fué posible obtener oligopéptidos calentando aminoácidos sobre una superficie mineral (caolinita o bentonita), y se observó que al agregar Cu(II), Ni(II) o Zn(II) el rendimiento de la síntesis mejoraba notablemente (Ferris 1984). Dentro del mismo tipo de experiencias, se pudo comprobar que también para la síntesis de fosfatos cíclicos (posibles precursores de polinucleótidos) el rendimiento aumentaba por agregado de Mg(II), Zn(II), Mn (II) o Pb (II). Incluso se pudieron obtener polinucleótidos de hasta 40 unidades por copiado de una cadena patrón y utilizando Zn (II) o Pb (II) como catalizadores, donde el Zn no sólo favorece las uniones 3',5' (característica del ADN y del ARN) sino que también mantiene la fidelidad de la copia en un 99,5 %, es decir, se equivoca menos que el 0,5 % de las veces (Ferris 1984).

Una conquista significativa fue, sin duda, la posibilidad de generar mecanismos específicos para la captura, y la regulación de la concentración interna, de los denominados "elementos esenciales". Estos elementos, se caracterizan por ser necesarios para el desenvolvimiento normal de las funciones vitales, y actualmente agrupan a unos 28 elementos entre los que se cuentan

Fe, Mn, Co, Cu, Zn y Mo como representantes de la familia de los "metales pesados" (MP) (Baran 1985).

Dichos mecanismos incluyen: la incorporación selectiva de ciertos MP (a través de secuencias específicas, con distinto grado de afinidad para cada uno), el mantenimiento de su concentración en el organismo dentro de límites muy estrechos (a través de su complejación por proteínas ricas en grupos -SH, como las metalotioneínas con un 20-30% de cisteína sobre el total de aminoácidos), y el transporte de los mismos para su utilización o almacenamiento, mediante la intervención de moléculas específicas, por ejemplo, en los hombres, ferritina para hierro y céruloplasmina para cobre (Baran 1985, Viarengo 1989).

La mayor parte de los MP llamados esenciales forma parte de la estructura de biomoléculas, por ejemplo Fe y Cu de pigmentos respiratorios (Hemoglobina y Hemocianina respectivamente), o de enzimas que protegen a las células de los subproductos tóxicos de la reducción del O₂ (peróxidos y superóxidos), como la catalasa y la superóxido dismutasa. Otros ejemplos, son la presencia de Zn como componente de enzimas que participan en la producción de energía celular (es el caso de los espermatozoides) y del par Mo/Fe en las proteínas de la fijación de nitrógeno. En todos los casos citados, la presencia de los MP resulta imprescindible para el normal funcionamiento del organismo involucrado (Baran 1985, Ferris 1984).

Existen sin embargo metales tóxicos "per se", para la mayoría de las especies de la biota, independientemente de la concentración en que se encuentren, por ejemplo plomo, cadmio y mercurio. Estos actúan generalmente sustituyendo un metal esencial, de características similares, en su sitio activo, modificando muchas veces el funcionamiento habitual de la biomolécula involucrada. Es el caso de la sustitución de calcio por plomo o cadmio en la hidroxapatita de los huesos, inmovilizando el ion tóxico sin mayores consecuencias para la estructura ósea en el primer caso (Pb), y generando fragilidad y

deformaciones en la misma para el segundo metal considerado (Cd) (Baran 1985). De todas maneras, en el caso particular del Pb, si bien la fijación del mismo en el esqueleto es su destino final más importante en términos cuantitativos, con una baja velocidad de recambio (vida media 20 años); la fracción menor puede acumularse en riñón, pulmones, o sistema nervioso central con efectos tóxicos característicos como encefalopatías, disfunciones renales, anemias, etc. (Goyer 1986)

Por otro lado, un MP esencial puede convertirse en tóxico si su concentración resulta excesiva (por ejemplo cobre, cromo y cinc). A nivel celular, la presencia de un MP tóxico, una vez superadas las defensas primarias (metalotioneinas, enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa, péptidos con grupos -SH como el glutatión, etc.), genera una serie de reacciones que pueden conducir a un estado de disfunción generalizado, y como consecuencia final a la muerte celular, e incluso del organismo (Goyer 1986, Viarengo 1989).

La toxicidad de los metales se debería tanto a su acción oxidante (por ejemplo cobre, hierro y mercurio), que llevaría a la pérdida de la permeabilidad selectiva de las membranas celulares, básicamente a través de la generación de una cascada de radicales libres y por lo tanto de los mecanismos de peroxidación lipídica; como mediante su asociación directa con distintas macromoléculas involucradas en ciclos vitales (proteínas y ácidos nucleicos fundamentalmente) modificándolas, con la pérdida de sus propiedades específicas (Viarengo 1989).

Por último, cabe mencionar que a través de los mecanismos de adaptación, de alguna manera los distintos metales han debido seguir una secuencia del tipo: elemento tóxico -> impureza tolerable -> elemento útil -> elemento esencial. Es decir, se trata de un proceso dinámico, con las velocidades propias de los procesos evolutivos; incluso, se podría plantear que algunos MP puedan llegar a constituirse en esenciales, probablemente el vanadio, el níquel, el estaño y el cadmio sean ejemplos de este caso, para algunas especies particulares (Baran 1985, Goyer 1986).

1.2. LOS METALES PESADOS Y EL ECOSISTEMA ACUÁTICO.

Los metales se distribuyen entre los distintos compartimientos que constituyen un ecosistema acuático. Por ello, para comprender su comportamiento dentro del ambiente acuático, es necesario describir, al menos esquemáticamente, las principales características de dichos compartimientos y las relaciones que existen entre los mismos. En una descripción simplificada, pueden distinguirse cinco compartimientos abióticos y tres compartimientos bióticos como se muestra en la figura 1 (Salomons et al. 1988).

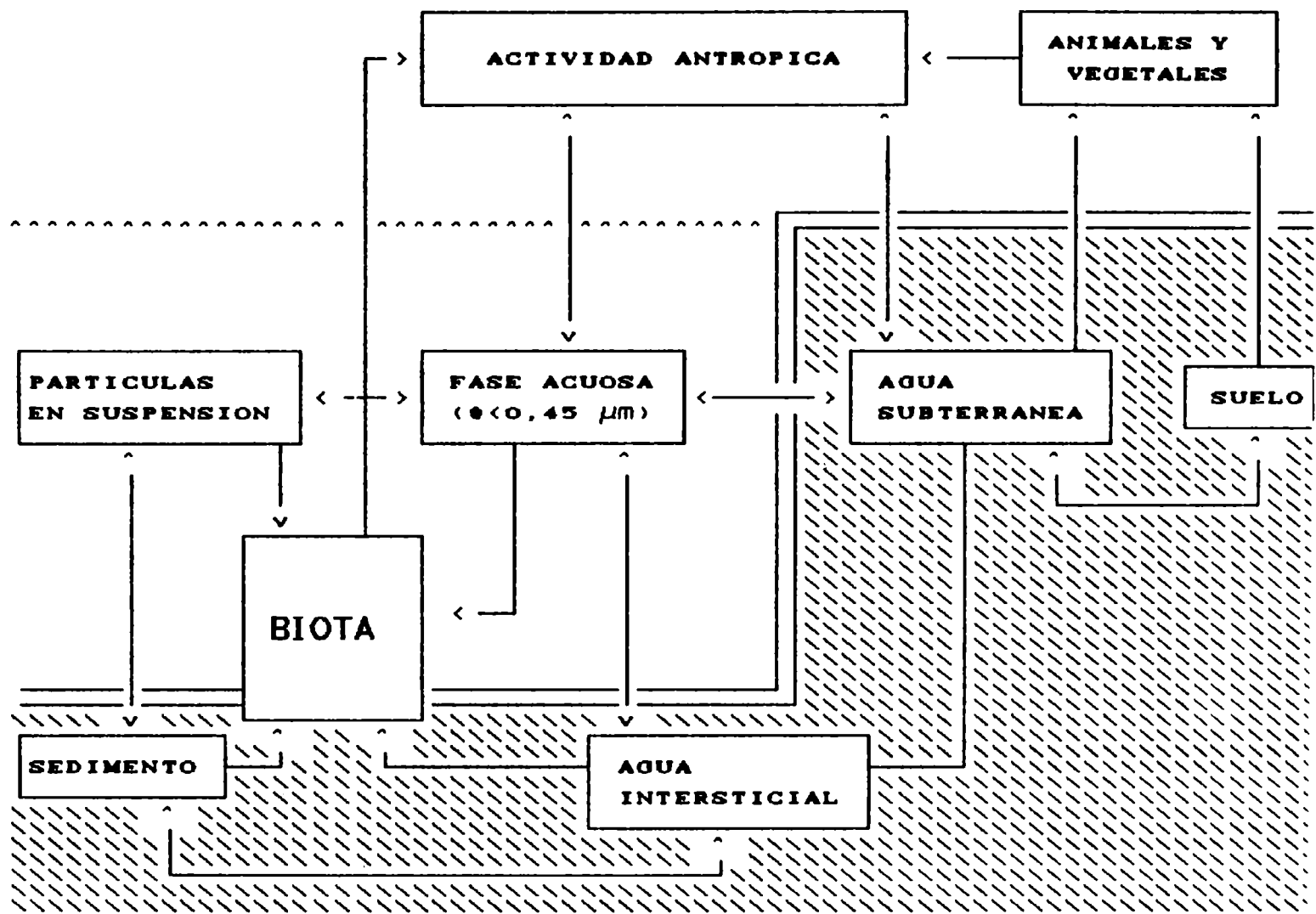
1.2.1. CARACTERÍSTICAS E INTERRELACIONES ENTRE LOS COMPARTIMIENTOS ABIÓTICOS MAS RELEVANTES:

SEDIMENTO:

La composición de los sedimentos, la proporción y la naturaleza de la materia orgánica en los mismos, incide sobre la composición del agua intersticial directamente, por el aporte de MP, nutrientes y materia orgánica que adquiere mayor importancia en condiciones de ambiente reductor. Por otro lado, parte de la porción superior del sedimento puede resuspenderse, debido a perturbaciones o agitación zonal producida por corrientes profundas, por los movimientos propios de la fauna bentónica presente, o por dragado (ver figura 2) (Salomons et al. 1988).

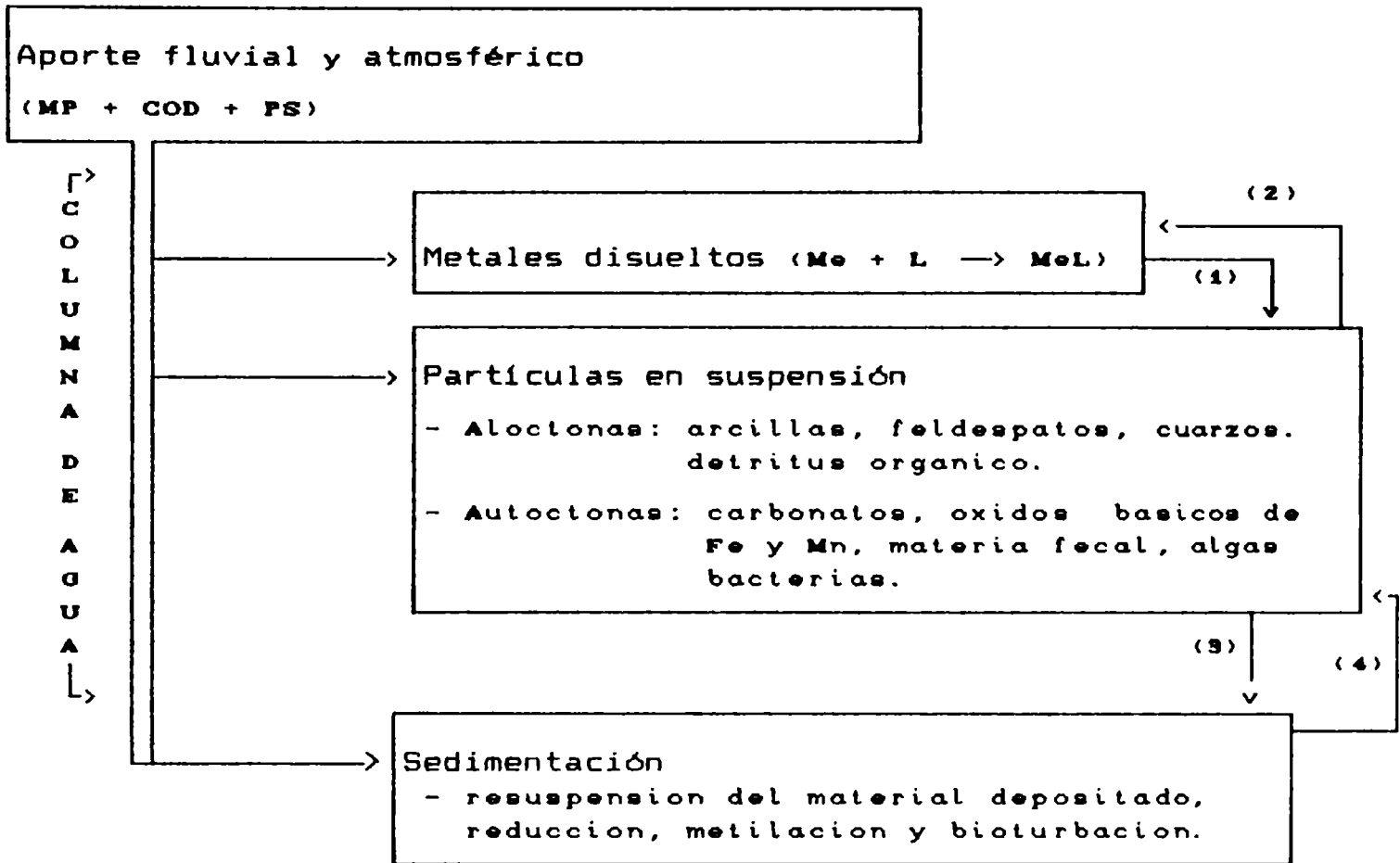
También ocurren en el sedimento reacciones mediadas biológicamente, como por ejemplo la metilación de ciertos metales como mercurio, arsénico, antimonio o estaño, por bacterias que viven en el sedimento (Kremling 1988).

De la biota, fundamentalmente los organismos bentónicos (peces iliófagos y otros habitantes del sedimento como anélidos, larvas y bacterias), los moluscos bivalvos filtradores y los animales nectónicos, serán los directamente influenciados por la composición del sedimento, ya que por ingestión de sus partículas incorporarán los MP (entre otras sustancias) allí presentes (Salomons et al. 1988, Odum 1972).



BIOTA incluye los organismos bentónicos, el perifiton, los animales nadadores y los integrantes del plancton.

FIGURA 1. INTERACCION ENTRE LOS DISTINTOS COMPARTIMIENTOS DE UN ECOSISTEMA ACUATICO. (Salomons, 1988)



Referencias:

- (1) Fenomenos de floculacion, precipitacion, adsorcion, captura por los distintos organismos.
- (2) Redisolucion.
- (3) Sedimentacion.
- (4) Aporte desde el sedimento (por liberacion de los MP adsorbidos o precipitados, o por resuspension del material decantado)

FIGURA 2, DISTRIBUCION DE LOS MP ENTRE LOS DISTINTOS COMPARTIMIENTOS DE UN SISTEMA ACUATICO (Kremling 1988)

PARTICULAS EN SUSPENSION (PS):

Pueden ser agrupadas en dos categorías fundamentales (Fig.2):

1. Alóctonas: llegan por arrastre o lavado de los suelos, se trata de materia orgánica de alto peso molecular (generalmente en estado coloidal) o partículas minerales (arcilla, feldespato, etc.). Es muy frecuente encontrar estas últimas recubiertas por coloides orgánicos o inorgánicos (generalmente óxidos básicos de Fe, Al y Mn).

2. Autóctonas: Se generan "in situ" a partir de "pellets fecales", microflóculos, la coalescencia de la materia orgánica y microorganismos (originalmente en suspensión) o la floculación de óxidos básicos de Fe y Mn debido a cambios en el pH; otra posibilidad está dada por la precipitación de carbonatos, sales básicas e hidróxidos de MP, (Salomons et al.1988).

Las PS, generalmente están recubiertas por una fina película de materia orgánica. Esta cobertura, se genera a partir de las excreciones de algas o bacterias, de productos de descomposición de plantas o animales y por la absorción de coloides como los ácidos húmicos. Estas películas se caracterizan por su abundancia en ácidos débiles, grupos fenólicos y carboxílicos, por los que se unen a los óxidos en la superficie de las partículas minerales. Por estas características y por su gran superficie de interacción, esta película define en gran medida las propiedades de las PS (Allan 1986).

Las PS, se relacionan de manera biunívoca con el agua superficial (por ejemplo cambios en el pH pueden generar diferencias en la solubilidad) y con el sedimento, a través de la dinámica sedimentación-resuspensión. De hecho, se adopta como límite entre PS y fase acuosa la separación que se obtiene de filtrar la dispersión por membranas de 0,45 μm de poro. Con esta medida de poro también se consigue retener el material biótico grueso (plancton) (Allan 1986, Salomons et al. 1988).

Los organismos más expuestos a la presencia de MP en este compartimiento son los "filtradores" y los integrantes del plancton.

Si se los compara con otros sectores del ciclo hidrogeológico, los ríos y estuarios se caracterizan por una elevada concentración de partículas en suspensión, que puede llegar a niveles de gramos/litro; tales niveles influirán de manera decisiva sobre la concentración de MP. Se encuentra incluso una correlación significativa entre el aumento de la concentración de las PS (en temporadas de lluvias intensas) y el descenso en la concentración de los MP en solución, debido probablemente al efecto dilutorio (dado el aumento de masa líquida), por un lado, y la presencia de una importante proporción de partículas de sedimentación rápida que arrastran en su caída a los MP, por el otro (Kremling 1988, Salomons et al. 1988).

AGUAS SUPERFICIALES, INTERSTICIALES Y SUBTERRANEAS:

Esta clasificación se justifica desde un punto de vista situacional solamente, ya que las tres se encuentran estrechamente interrelacionadas (formando parte de una misma fase), y los cambios en la composición en alguna de ellas incide marcadamente en las demás.

En particular, las aguas de ríos y lagos se caracterizan por su elevado contenido en materia orgánica disuelta, normalmente en tenores entre 5-20 mg / litro de carbono orgánico disuelto (COD), dependiendo de las características del terreno atravesado o circundante (en el caso de los lagos) y la intensidad del "lavado" del suelo por las lluvias (Salomons et al. 1984, Kremling 1988).

La discusión sobre este punto será retomada más adelante en el capítulo referido a los ligandos naturales.

Equilibrio PS - Fase acuosa

La distribución de los MP entre la fase acuosa y las PS depende de las características particulares de cada uno de ellos. Incluso, se puede definir un coeficiente de partición (K_d) que caracteriza dicha distribución, donde K_d cuantifica la facilidad con que cada MP es transferido desde las PS a la fase acuosa, siendo $K_d = [MP]_v/[MP]_{ps}$ (expresando [MP] en $\mu\text{g/Kg}$). Su valor de K_d depende fuertemente del pH, la fuerza iónica, las condiciones redox imperantes, la presencia de agentes complejantes en la fase solución y sobre la superficie de las PS (Kremling 1988).

El efecto del pH sobre el equilibrio fase acuosa-fase particulada es muy marcado. Por ejemplo para Zn y Cd, se observa que a pH = 6,5 se encuentran asociados a PS un 20% y un 55% respectivamente, y si el pH se eleva hasta 8,5 los porcentajes correspondientes son 85 % y 95 % (Salomons et al. 1988).

En el caso de los agentes complejantes, podemos distinguir en primer término a los de origen natural (ácidos húmicos y fúlvicos o ligandos extracelulares de origen algal, bacteriano ó fúngico) de mayor presencia en los últimos tiempos, dado el grado de erosión de los suelos causados por la mano del hombre en el primer caso, y debido a la marcada eutroficación de distintos cuerpos de aguas, también consecuencia de la actividad antrópica, con el consecuente aumento de la masa fitoplanctónica en el segundo; el segundo grupo, está constituido por los ligandos artificiales introducidos en el medio ambiente por el hombre, por ejemplo NTA utilizado en reemplazo de los polifosfatos en detergentes (como agente secuestrante de Ca y Mg) para evitar la eutroficación. En general, el aumento de la concentración de agentes complejantes genera un aumento de la concentración de los MP disueltos ya que provocan la remoción parcial de los MP originalmente asociados a PS o sedimento (Kremling 1988).

1.2.2. CONCEPTO DE ESPECIACION QUIMICA.

Dentro de cada compartimiento, los MP se encontrarán asociados con distintos tipos de ligandos, orgánicos e inorgánicos, constituyendo de esta manera un conjunto de formas fisicoquímicas o especies definidas para cada MP. Este comportamiento, sumamente característico de los MP en sistemas naturales, que conduce a la coexistencia de diferentes formas, iónicas o no, en proporciones variables según las circunstancias, es conocido como *Especiación Química*.

La especiación de cada MP dependerá de sus propiedades específicas (relación carga/radio, tipo de esfera de coordinación, comportamiento redox, etc.) y de las características fisicoquímicas del compartimiento en que se encuentre como pH,

temperatura, salinidad, potencial redox y concentración de ligandos orgánicos. (Engels et al. 1981, Salomons y Förstner 1984, Mizuike 1987).

1.2.3. GENERALIDADES SOBRE LA ESPECIACIÓN DE MP.

Las distintas formas fisicoquímicas en que los MP pueden coexistir en aguas naturales incluyen: iones hidratados con diferente estado de oxidación, complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos, especies no iónicas disueltas y coloides. Los iones metálicos frecuentemente también se encuentran adsorbidos, absorbidos o incluidos en materia en suspensión de tipo orgánico o inorgánico (Salomons y Förstner 1984, Mizuike 1987, Turner y Whitfield 1987).

Por este motivo, el transporte, comportamiento, y destino en el ambiente acuático de cada MP, como así también sus efectos biológicos (biodisponibilidad, toxicidad, etc.) quedan determinados por estas distintas especies; y la información referida a la especiación de cada MP en los distintos cuerpos de agua, su significado y efectos o consecuencias, requiere de la coparticipación de disciplinas científicas diversas como la geoquímica, la biología, la toxicología, la química analítica y las ciencias ambientales (Engel et al. 1981, Salomons y Förstner 1984, Mizuike 1987).

Los niveles de concentración en que normalmente se encuentran los MP en los sistemas acuáticos naturales son bajos (μM o menor) recibiendo por ello la denominación de "metales traza", por lo que se requiere de métodos analíticos de gran sensibilidad para su determinación. En fase acuosa, éstos pueden formar complejos con ligandos inorgánicos (fundamentalmente Cl^- , OH^- , CO_3^{2-}) y con ligandos orgánicos (por ejemplo ácidos húmicos -AH- y fúlvicos -AF-). Por otro lado, el potencial de óxido-reducción del sistema favorecerá la prevalencia de distintos estados redox; esta proporción puede verse modificada a su vez, por la formación de complejos de diferente estabilidad. Por lo tanto la especiación de cada MP en fase acuosa quedará definida por el tipo y cantidad de

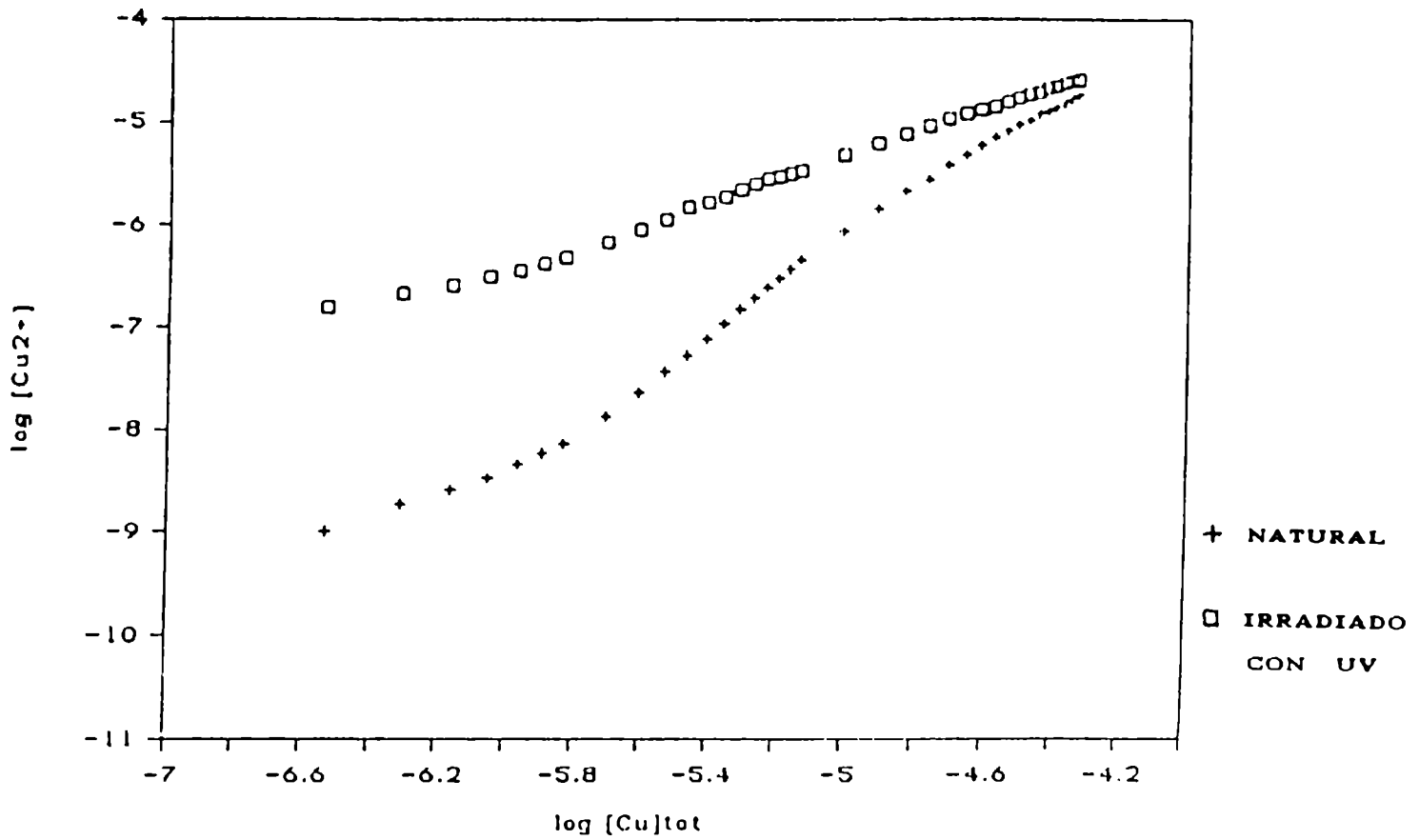
complejos que forme, es decir, dependerá de las características del metal y de las propiedades fisicoquímicas del sistema (Engel et al. 1981, Salomons y Förstner 1984, Mizuike 1987).

En cuanto a la asociación con ligandos orgánicos naturales, el Cu(II) se destaca por formar complejos muy estables, y en esta característica se diferencia de otros MP como Cd(II) y Ag(I). Por ejemplo en un agua dulce, con COD = 20 ppm y pH = 7,5, se encuentra que la relación $MP_{libre} / MP_{complejado}$ es 0,008 % para Cu, 10 % para Cd y 25 % para Ag (Engel et al. 1981). Incluso, al irradiar una muestra de agua dulce filtrada (0,45 μ m) con luz ultravioleta (utilizada para liberar los MP asociados con la materia orgánica por destrucción de la misma), la cantidad de cobre asociada disminuye notablemente, generalmente entre un 45 y un 70 % (Blutstein y Shaw 1981, Nelson y Mantoura 1984, Leckie et al. 1990); esta disminución de la capacidad complejante de un cuerpo de agua por fotooxidación de la materia orgánica puede observarse en la figura 3A.

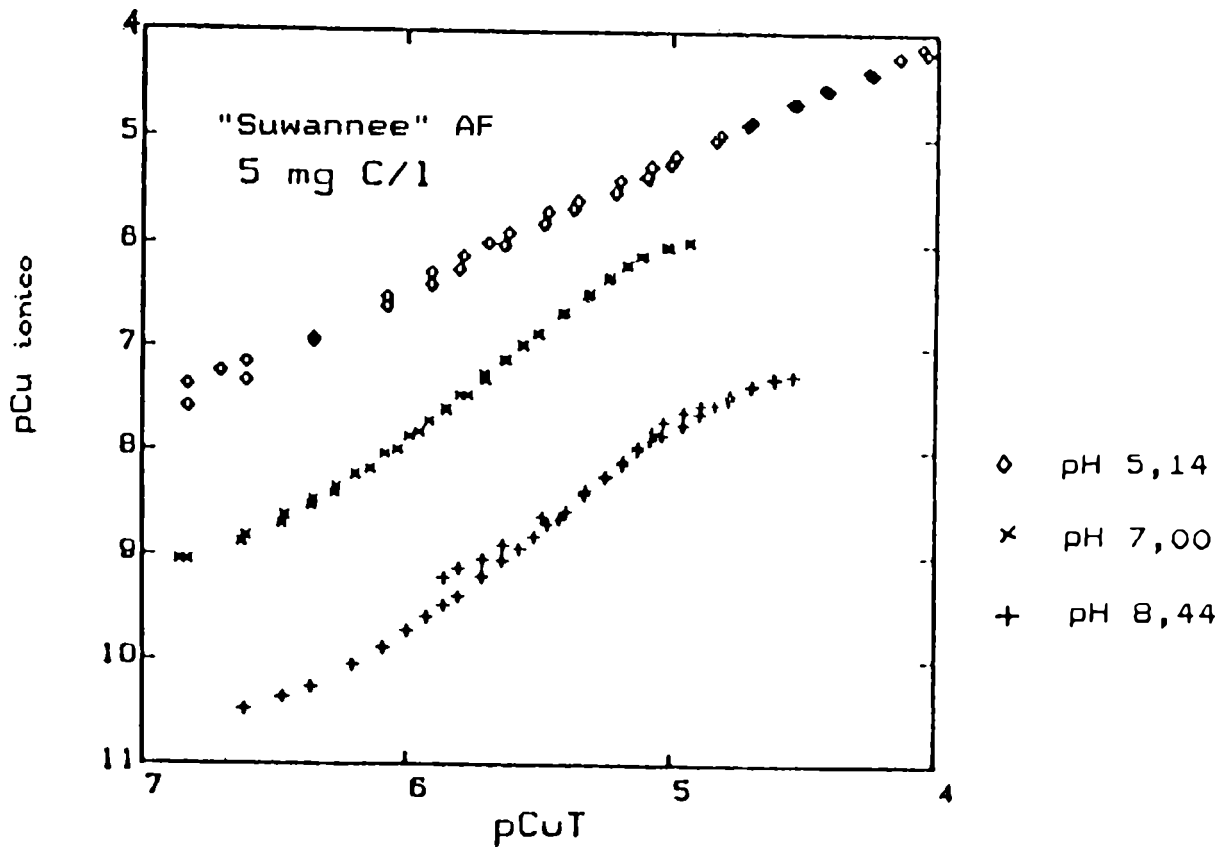
El aumento del pH, a su vez, produce un aumento proporcional de MP asociado, probablemente debido a la naturaleza ácida de los ligandos orgánicos naturales (tanto más disociados cuanto mayor es el pH), incremento importante en cobre y menor en cadmio y plata. Por ejemplo al alcalizar, de pH = 6,0 a pH = 7,5, el valor del cociente $\Delta([MP]_{total} - [MP]_{libre}) / \Delta pH$ fue 15,85 para Cu, 2,51 para Cd y 0,69 para Ag (Engel et al. 1981).

Por todas estas razones, es de esperar que en aguas filtradas con un considerable contenido en materia orgánica, las especies formadas entre Cu(II) y ligandos orgánicos naturales sean las predominantes; mientras que en agua de mar, donde la concentración relativa de ligandos inorgánicos es elevada y el contenido de materia orgánica menor, las formas fisicoquímicas predominantes sean las inorgánicas (Engel et al. 1981, Salomons y Förstner 1984, Mizuike 1987).

Figura 3. TITULACION POTENCIOMETRICA DE AF CON CU(II)



3A. MODIFICACION DE LA CAPACIDAD COMPLEJANTE LUEGO DE IRRADIAR CON LUZ ULTRAVIOLETA (Leckie et al. 1990).



3B. VARIACION DE LA CAPACIDAD COMPLEJANTE CON EL pH (Cabaniss y Shuman 1988).

1.2.4. METODOS PARA LA DETERMINACION DE PARAMETROS DE COMPLEJACION DE UN CUERPO DE AGUA.

Conocida la capacidad de los ligandos naturales para complejar MP, surge la necesidad de cuantificar esta relación. Para realizar dicha cuantificación, es fundamental conocer la naturaleza y la concentración de los distintos ligandos presentes. Los ligandos de origen inorgánico de importancia en la especiación de MP son pocos y de fácil cuantificación. Por el contrario, actualmente se sabe de la existencia de muchos ligandos de tipo orgánico de conocida capacidad complejante presentes en el medio acuático, por ejemplo: aminoácidos, proteínas, polisacáridos, porfinas, ácidos hidroxámicos, AF y AH. Dada la dificultad inherente a la identificación y cuantificación de todos los ligandos orgánicos, se ha desarrollado el término "Capacidad Complejante" (Campbell et al. 1977, Park y Allen 1984).

La capacidad complejante (CC), entonces, es una medida de la habilidad de un cuerpo de agua (filtrada por una membrana de 0,45 μm de porosidad promedio) para complejar los metales traza presentes. Esto significa que, para un metal dado, es posible medir una cierta propiedad que expresa una suerte de resultante, en el sentido físico de este término, de los comportamientos individuales de cada clase de ligando, es decir, que es posible agrupar los distintos ligandos presentes y englobar sus comportamientos en una cierta "propiedad" promedio (Campbell et al. 1977, Park y Allen 1984).

De la misma forma, el valor para la constante de estabilidad (K), expresión cuantitativa de la asociación metal-ligando, tendrá un valor promedio para el conjunto de los ligandos involucrados y dependerá a su vez del valor que se le asignen a algunos parámetros como pH y fuerza iónica, por lo que no se trata de una constante de estabilidad termodinámica, propiamente dicha, sino de una constante condicional (Park y Allen 1984, Lester et al. 1986).

Existe una gran variedad de procedimientos experimentales, que con distinto grado de complejidad y manipulación de los datos obtenidos, son utilizados para determinar la CC de aguas naturales

y el valor de la constante de estabilidad condicional de los complejos formados. Estos pueden agruparse en métodos químicos: titulaciones complejométricas, titulaciones potenciométricas (utilizando electrodos selectivos para iones -ESI- o voltametría de redisolución anódica -VRA-), determinaciones de solubilidad, o de adsorción sobre alúmina o MnO_2 , entre otros, (Campbell et al. 1977, Park y Allen 1984, Lester et al. 1986) y métodos biológicos (Laegreid et al. 1983, Newell y Sanders 1986).

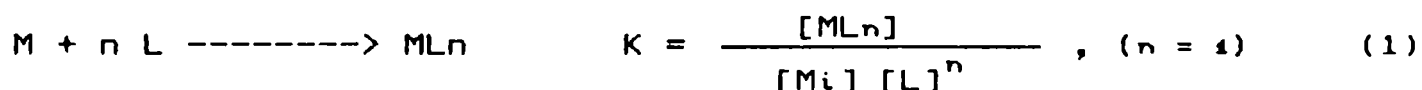
Dado que la Capacidad Complejante se define operacionalmente como la máxima concentración de ion metálico que puede complejar una alícuota dada del sistema acuático en estudio, se adopta como punto final de la titulación el cambio en la pendiente de la curva que se obtiene de graficar pM_i versus pC_M (valor negativo del logaritmo decimal de la concentración de MP libre y valor negativo del logaritmo de la concentración total de MP agregado respectivamente), obteniéndose normalmente curvas de tipo sigmoidales como las presentadas en la figura 3A y 3B (Campbell et al. 1977, Park y Allen 1984, Lester et al. 1986, Cabaniss y Shuman 1988, Leckie et al. 1990).

La CC suele expresarse en unidades de concentración: sea del número de moles de MP asociados por litro de fase acuosa (normalmente μM), o de la concentración total de ligandos (C_L) expresada como mg/L, dado que si se asume una relación MP:L :: 1:1, la máxima concentración de MP asociado se corresponderá a C_L en el punto de equivalencia, y tanto CC como C_L serán términos equivalentes (Campbell et al. 1977, Park y Allen 1984, Lester et al. 1986).

Por otro lado, cuando se estudia la CC de un ligando definido, generalmente AF o AH, las unidades de CC quedan definidas en función de los miliequivalentes asociados a una masa definida del ligando, típicamente meq. MP / gramos AF (Buffle et al. 1980, Weber et al. 1983, Marinsky y Ephraim 1986, Cabaniss y Shuman 1988, Perdue 1989). En todos los casos, los valores que adopte la CC dependen de los ligandos presentes, y de las condiciones experimentales previamente definidas como pH, fuerza

iónica, temperatura, y el método de titulación escogido (Buffle 1980, Park 1984, Cabaniss 1988, Perdue 1989).

Los valores de CC y K se derivan de los gráficos obtenidos a partir de los datos experimentales, del tipo pM_i vs. pC_M , y del modelo de asociación MP - L que se plantee (Park y Allen 1984, Lester et al. 1986, Cabaniss y Shuman 1988, Perdue 1989). Por ejemplo, si suponemos como cierta una estequiometría 1:1 M:L, entonces la constante de estabilidad puede ser evaluada de la siguiente manera:



Donde la concentración del MP complejoado ($[ML]$) es la diferencia entre la concentración total de metal (C_M) y la concentración del metal libre ($[M_i]$), $\Rightarrow [ML] = C_M - [M_i]$; y la concentración de ligando no unido $[L]$ en cada punto de la titulación es la diferencia entre la capacidad complejante (CC) y $[ML]$, $\Rightarrow [L] = CC - C_M + [M_i]$ (ya que $CC = C_L$); por lo que la constante de estabilidad puede ser expresada como:

$$K = \frac{C_M - [M_i]}{[M_i] \{ CC - C_M + [M_i] \}} \quad (2)$$

Y de esta manera puede ser evaluada la constante K, midiendo la concentración del MP no asociado, conociendo la cantidad de MP agregado y el valor de la capacidad complejante. La expresión (2) puede ser reordenada para dar:

$$\frac{[M_i]}{C_M - [M_i]} = \frac{1}{CC} [M_i] + \frac{1}{(K) (CC)} \quad (3)$$

Graficando $[Mi] / [ML]$ vs. $[Mi]$, el valor de la pendiente será la recíproca de la capacidad complejante y el valor correspondiente a la intersección con el eje de la ordenada será la recíproca del producto $K \times CC$ (Park y Allen 1984, Salomons y Förstner 1984, Lester et al. 1986).

Existen otros modelos más complejos para la estimación de estos parámetros, donde se incorporan a los protones en el equilibrio planteado, se admiten relaciones $MP:L :: 1:n$ ($n > 1$), y se intenta caracterizar los distintos sitios de unión para MP que presentan los ligandos naturales; situaciones que son más cercanas a la complejidad real de los sistemas naturales. De todas maneras, los modelos más simples, del tipo del aquí presentado, no pierden vigencia y son de gran utilidad para caracterizar globalmente las aguas en estudio (Park y Allen 1984, Lester et al. 1986).

Por otro lado, para el estudio de la CC y K de AF existen modelos que incluyen las variantes propuestas anteriormente e incluso realizan cálculos de regresión para conocer la precisión de los datos obtenidos (Buffle et al. 1980, Cabaniss y Shuman 1988, Perdue 1989).

Este último punto, será retomado más adelante en el capítulo referido a los ligandos naturales.

1.2.5. ESPECIACION, TOXICIDAD Y BIODISPONIBILIDAD.

La vida acuática es particularmente sensible a los niveles de metales pesados; de hecho, concentraciones del orden de los nanogramos por litro pueden afectar su desarrollo normal, dependiendo el efecto tóxico final de la sensibilidad de la especie considerada y de la facilidad con que los MP puedan ser incorporados, es decir de su biodisponibilidad (Engel et al. 1981, Viarengo 1989).

La biodisponibilidad de un MP es definida como la fracción de la concentración total de MP que puede ser incorporado por un organismo determinado, y dependerá de las características particulares de los diferentes organismos (mecanismos de incorporación -específicos o no-, liberación de agentes

complejantes, homeóstasis interna, etc.) y de las formas físicoquímicas que esté formando cada MP, es decir de su especiación (Salomons y Förstner 1984, Allan 1986, McCarthy 1989, Viarengo 1989).

A lo largo de las tres últimas décadas se han realizado diversas experiencias destinadas a estudiar la incidencia del agregado de distintos complejantes sobre el efecto tóxico agudo de los MP, a partir de los que se pueden extraer dos conclusiones principales:

1.- Que la toxicidad de un determinado MP sobre una especie dada se correlaciona directamente con la concentración de la forma libre del MP (o de complejos lábiles generalmente inorgánicos ($[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5\text{Cl}]^+$, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}]^+$, $[\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, etc) y no con la concentración total del mismo (Engel et al. 1981, Salomons y Förstner 1984, Viarengo 1989). Esto no quita que se formen complejos estables con ligandos inorgánicos que modifiquen la toxicidad del MP iónico; es el caso de la disminución de toxicidad de Cd(II) para crustáceos y bivalvos al aumentar la salinidad (NaCl) (Engel et al. 1981), y de la menor toxicidad de Cu(II) para peces (salmónidos) al aumentar la dureza o la alcalinidad del medio ($\text{CO}_3^{=}$) (Demayo y Taylor 1981).

Si bien es correcto pensar que aniones como el carbonato para Cu(II) o Pb(II) y cloruros para Cd(II) actúen como reguladores de la concentración de estos MP, y por lo tanto incidan sobre su comportamiento químico y biológico, así como existe correlación directa entre complejación de Cu con EDTA y disminución de efecto tóxico; hay que tener mucho cuidado en la descripción que se haga de las especies formadas, ya que decir que se forme CuCO_3 y permanezca en fase disuelta (como resulta muy común encontrar en trabajos publicados sobre el tema en cuestión) no se corresponde muy bien con los principios elementales de la solubilidad de los compuestos (Stumm y Brauner 1975, Byrne y Miller 1985).

En realidad se supone que lo que se forma son complejos de ligandos mixtos, o bien que puede ocurrir una asociación de ligandos aniónicos con micropartículas formadas, de manera de

conferirles carga y por lo tanto estabilidad en la fase acuosa. Esta presunción es compartida por algunos autores citados en el párrafo anterior, y además encuentra su contraparte experimental en resultados obtenidos en el CIMA, no publicados, en experiencias con agua de mar y separación de complejos presentes por electroforesis (ensayo en que se demostró que el Cu(II) se encontraba en forma aniónica), y en resultados presentados en este trabajo de tesis (y publicados anteriormente, Catoggio y Porta 1989) al separar los complejos presentes en soluciones de Cu (II) y concentraciones crecientes de NaCl mediante el fraccionamiento por espumas.

2.- Que la asociación de los MP con ligandos orgánicos puede o no disminuir su toxicidad. Por un lado está comprobado que existe una disminución real de la toxicidad de MP, al agregar ligandos orgánicos de composición definida como EDTA y NTA, o macromoléculas, como AH o productos extracelulares; en los que la característica común es la de formar asociaciones estables. Son ejemplos típicos, Cu-AH, Pb-AH, Cd-NTA, Cd-EDTA y Cu-EDTA (Demayo y Taylor 1981, Petersen 1982, Salomons y Förstner 1984, Sunda y Gessner 1989). Sin embargo, existen ciertos complejos de MP con ligandos orgánicos, típicamente grupos alquilo, que generan un efecto tóxico mayor que el correspondiente al metal libre, por ejemplo, metilmercurio ($[\text{Hg}(\text{CH}_3)]^+$), metilplomo ($[\text{Pb}(\text{CH}_3)]^{2+}$) y trialquilplomo ($[\text{Pb}(\text{Alq.})_3]^{2+}$) (Allan 1986, Pelletier 1988).

1.3. DIFICULTADES METODOLOGICAS EN LOS ESTUDIOS DE ESPECIACION.

1.3.1. GENERALIDADES ACERCA DE LOS ESTUDIOS DE ESPECIACION.

Hasta el momento, se han seguido dos grandes estrategias en los estudios de especiación:

1.- Por un lado, mediante el cálculo teórico de las especies que pueden coexistir en equilibrio; en función del pH, potencial redox, fuerza iónica, composición salina, concentración de MP, otros constituyentes que puedan interaccionar (por ejemplo agentes complejantes de MP) y las respectivas constantes de equilibrio de los complejos formados.

La aplicabilidad de dicha metodología encuentra serias restricciones, no sólo por la falta de valores confiables de muchas de las constantes de equilibrio involucradas, sino debido al conocimiento incompleto que se tiene de la globalidad del sistema. Este comprende incluso equilibrios heterogéneos y muchas veces situaciones de no equilibrio. En general este tipo de enfoque se complementa con estudios de interacción entre MP y PS, MP y ligandos naturales o sintéticos, en soluciones artificiales de agua (Stumm y Brauner 1975, Mizuike 1987, Turner y Whitfield 1987).

2.- La otra estrategia, consiste en la determinación experimental cuali y cuantitativa de las distintas especies que existen en un medio natural determinado. Las técnicas de mayor sensibilidad como la espectrometría de absorción atómica (EAA) y el análisis por activación con neutrones por su fundamento, permiten la determinación de la concentración total de cada elemento carecen de sin distinguir entre las distintas especies. La utilización de electrodos específicos para iones (ESI), se caracteriza por su especificidad y selectividad, permitiendo la determinación de las actividades de los iones libres y los complejos lábiles de MP, pero su sensibilidad no es suficiente en la mayoría de los casos. Por otro lado, si bien las técnicas voltamétricas y las espectrométricas son altamente sensibles y pueden ser específicas para cada elemento, su selectividad no es completamente satisfactoria para las diferentes especies en que éstos se encuentran en los sistemas naturales (Park y Allen 1984, Mizuike 1987).

En general, es difícil determinar directamente una especie dada de MP en aguas naturales, por lo que resulta casi imprescindible la utilización previa de técnicas adecuadas para la concentración y separación de las especies involucradas. Muchas veces junto con la separación y la concentración, son usadas otras técnicas que generan una modificación intencional en las especies originales, por ejemplo: la solubilización de las formas adsorbidas por acidificación, la transformación de formas

orgánicas a inorgánicas por fotólisis con luz UV, o procesos de óxido-reducción (Salomons y Förstner 1984, Mizuike 1987).

En función de las especies individualizadas mediante la combinación de estos distintos procedimientos, se ha propuesto una serie de esquemas alternativos para la especiación de MP en aguas naturales. En estos esquemas sin embargo, muchas de las especies encontradas son las que quedan definidas por la secuencia metodológica utilizada para su aislamiento y detección, pudiendo no ser las existentes en el medio natural (Salomons 1984, Mizuike 1987).

Los primeros modelos de especiación de MP en aguas naturales, se desarrollaron para el medio marino, donde el contenido de materia orgánica es minoritario y son los ligandos inorgánicos ($\text{CO}_3^-/\text{HCO}_3^-$, OH^- , Cl^-) los que definen las especies predominantes para los distintos MP. Los primeros modelos para MP en aguas dulces, desarrollados en la década del '70, en analogía equivocada con los anteriores, no consideraron la materia orgánica y su capacidad por asociarse con MP, pero fueron rápidamente corregidos mediante la incorporación de ligandos orgánicos sencillos como EDTA, NTA, citrato, salicilato y algunos aminoácidos (Stumm y Brauner 1975, Engel et al. 1981, Park y Allen 1984, Salomons y Förstner 1984). Incluso mediante la determinación de la CC y la K de diversos cursos de agua para los MP más significativos desde el punto de vista ecotoxicológico, se tuvo conciencia de la importancia que tiene la materia orgánica en la especiación de los MP (Campbell et al. 1977, Park y Allen 1984, Leckie et al. 1990).

Solamente a partir del aislamiento de ligandos naturales (típicamente AH y AF, responsables principales de la CC de las aguas naturales), su adecuada caracterización y la determinación de sus propiedades complejantes para los MP; fué posible plantear modelos semicuantitativos para la predicción de la especiación de los MP en aguas dulces (Buffle et al. 1980, Malcolm y Mac Carthy 1986, Marinsky y Ephraim 1986, Cabaniss y Shuman 1988, Gamble y Langford 1988, Mac Carthy y Suffet 1989, Perdue 1989).

Por último, cabe destacar que la situación es un poco distinta en los medios marinos o en lagos eutroficados, donde el aporte principal de ligandos orgánicos proviene de sustancias segregadas por el fitoplancton, lo que hace que su capacidad complejante varíe de acuerdo a las especies vegetales predominantes y su grado de desarrollo de acuerdo a las distintas épocas del año (Laegreid et al. 1983, Salomons y Förstner 1984, Sunda y Gessner 1990).

1.3.2. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LOS METODOS MAS FRECUENTEMENTE UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION DE PARAMETROS DE ESPECIACION Y DE COMPLEJACION.

A) Electrodo selectivo para iones (ESI):

Su amplia utilización se debe principalmente a su especificidad en la determinación de la actividad de iones metálicos. Por otro lado la metodología a aplicar es simple y accesible, e incluso, a partir de las medidas realizadas en condiciones precisas de pH, fuerza iónica, temperatura y concentración de ligando, es posible estimar la constante de asociación y el peso molecular del ligando utilizado, aún trabajando con macroligandos como AF (Buffle et al. 1980, Lester et al. 1986).

Presenta como grandes limitaciones una baja sensibilidad (que normalmente no permite su utilización para la determinación de CC en aguas naturales), que otros iones pueden interferir en la medida del metal estudiado, y que la respuesta del electrodo en matrices con alto contenido de materia orgánica muchas veces no es la esperada o es errática (Buffle et al. 1980, Hulanicki 1980, Lester et al. 1986).

Incluso tanto el O_2 , como concentraciones elevadas de cloruros y cambios en la intensidad lumínica modifican la respuesta del electrodo para un misma concentración de $Cu(II)$ (Buffle et al. 1980, Hulanicki 1980, Simpson 1980).

B) Métodos voltamétricos:

Actualmente se utiliza una gran variedad de técnicas voltamétricas de las que la más difundida es la voltametría de redisolución anódica o voltametría de "stripping" (VRA). En general, estas técnicas se caracterizan por su gran sensibilidad y especificidad para medir concentraciones de iones metálicos en solución; como en el caso anterior, detectan los iones libres. En general para la determinación de la constante de estabilidad K se utilizan dos tipos de simplificaciones:

1. Si los complejos que forma el ion metálico son electroreducibles y electroquímicamente lábiles (por ejemplo carbonatos o hidróxidos para VRA), entonces se utiliza como medida del punto final de la titulación, el cambio del potencial de reducción del ion (o del complejo en presencia de un exceso de ligando. Esta aproximación no sirve para los complejos con ligandos orgánicos, como AH y AF, porque son electroquímicamente irreversibles y además se adsorben sobre la superficie del electrodo.

2. En el caso de complejos estables, para obtener los valores de CC y K se mide la corriente que circula en función del agregado de ion metálico. El problema se origina en la adsorción de AF/AH, y en que, por tratarse de una mezcla de compuestos, parte de ellos pueden ser electroquímicamente reducibles y por lo tanto dar un valor de metal libre mayor al verdadero (Weber et al. 1981, Park y Allen 1984, Mizuike 1987, Betti y Papoff 1988).

De todas maneras estos métodos siguen siendo los más utilizados cuando se trata de determinar la CC en aguas naturales debido a su gran sensibilidad (Betti y Papoff 1988).

c) Intercambio iónico:

Si se agrega una solución con metal libre y complejo a una resina catiónica, habrá un reordenamiento de las especies involucradas, y la proporción de metal extraído por la resina dependerá de las constantes de los equilibrios metal-resina y metal-ligando-resina, pero también de las concentraciones relativas de resina y de ligando. Además, dado

que las especies son separadas físicamente, sólo es necesario determinar la concentración total de metal en cada fase.

Una de las limitaciones de este método, surge en la determinación de la constante de estabilidad, ya que existen serias dificultades fundamentalmente para el caso de los complejos en los que la estequiometría difiere de 1:1, es decir $MP:L :: 1:n$ (Park y Allen 1984, Mizuike 1987).

Para determinar la concentración de especies de gran estabilidad, frecuentemente se usan resinas quelantes de imino diacetato (Bio-Rad Chelex-100), y el grado en que progresa el intercambio es función del tiempo (Park y Allen 1984, Sengupta et al. 1991), lo que está demostrando que el intercambio provoca, por acción de masas, un desplazamiento en la posición del equilibrio original.

Para estudiar los complejos lábiles, muchas veces se utiliza MnO_2 , que es el intercambiador inorgánico más débil, de suma utilidad para complejos con $K < 10^{10}$ y concentración de ligando de hasta $0,2 \mu M$; el problema radica en que muchas veces los ligandos orgánicos se adsorben sobre la superficie de MnO_2 (Park y Allen 1984).

De todas maneras, la utilización de resinas quelantes en estudios de especiación forma parte de la batería de métodos analíticos de elección, siempre que se trate de complejos fuertes; sino, al intercambiar el ion libre (como se lo ha indicado previamente -Park y Allen 1984, Sengupta et al. 1991-), los complejos lábiles terminan por desaparecer (Mizuike 1987).

D) Diálisis:

La difusión de especies pequeñas a través de una membrana de diálisis con tamaño de poro entre 5 y 1 nm (que se corresponde con la retención de sustancias de peso molecular entre 10^3 - 10^4 daltons), permite separarlas de las especies mayores (muchas veces coloidales) presentes en aguas naturales. Generalmente se supone que el metal libre (o unido a ligando de bajo PM, normalmente $PM < 10^3$ - 10^4 daltons), no el complejo con ligandos de alto peso molecular, puede atravesar la membrana porosa. (Mizuike 1987).

Para las determinaciones "in situ", se llena con agua purificada un saco de diálisis y se lo coloca en el cuerpo de agua a analizar. De esta manera, se recogen exclusivamente las especies pequeñas. Alcanzar el estado de equilibrio requiere normalmente unas 48 hs según la metodología aplicada (Truitt y Weber 1981 b).

Una técnica actualmente muy difundida es la diálisis fundada en el efecto Donnan, donde se utiliza una membrana intercambiadora catiónica permeable a cationes pero no a AH ni complejos aniónicos, que permite concentrar las especies hidratadas o lábiles en una solución salina; en este proceso son necesarios solamente unos 30 minutos (Cox 1984).

Al utilizar este sistema se encuentran frecuentemente dos tipos de problemas: que una parte del metal quede retenido por la membrana de diálisis, y, en estudios de sistemas naturales, que parte de la materia orgánica pueda permear la membrana. Con este sistema se han realizado estudios de complejación para AF-Cd(II) y AF-Cu(II) y determinaciones de la capacidad complejante de aguas naturales, de distintos orígenes, para dichos iones metálicos (Truitt y Weber 1981 b, Park y Allen 1984, Mizuike 1987).

E) Espectrofotometría de fluorescencia:

Las sustancias húmicas presentan un pico de emisión fluorescente característico centrado en 440-450 nm, al ser irradiado con un haz de luz de 350 y 370 nm (Ryan y Weber 1982 a Weber et al. 1983).

Por otro lado, y tal como ocurre con otras moléculas orgánicas, los MP y en particular sus iones paramagnéticos, como Cu(II), pueden causar una disminución en la intensidad de la emisión fluorescente. Esta propiedad, claramente observada al incorporar Cu (II) a una solución de AF, permite estudiar las características de la asociación Cu-AF y cuantificarla (Ryan y Weber 1982 b, Weber et al. 1983).

F) Respuesta biológica:

Dado que la complejación de MP por ligandos orgánicos produce generalmente una disminución del efecto tóxico propio de los metales, mediante la determinación de la variación de algún parámetro representativo de la actividad metabólica (velocidad de crecimiento, consumo de O_2 , comportamiento, etc.) sensible al agregado de MP, es posible tener una idea del grado de complejación de los ligandos analizados para el metal estudiado (Demayo y Taylor 1981, Laegreid et al. 1983, Newell y Sanders 1986, Blaise et al. 1988).

La ventaja de este tipo de ensayos es su gran sensibilidad; sin embargo la presencia de cualquier otro material distinto al metal en cuestión puede interferir en el desarrollo de los experimentos, y esta situación es particularmente crítica en estudios de aguas naturales. Generalmente se mide la cantidad de complejante necesario para disminuir en un 50 % la actividad medida y se utilizan sustancias complejantes de capacidad conocida como EDTA, NTA, glicina, etc (Demayo y Taylor 1981, Petersen 1982, Park y Allen 1984); existen también ejemplos de estudios realizados con AH y aguas naturales (Demayo y Taylor 1981, Laegreid et al. 1983, Newell y Sanders 1986).

Para este tipo de estudios se utilizan con frecuencia representantes del fitoplancton (por ejemplo *Thalassiosira pseudonana*, *Scenedesmus quadricauda* y *Selenastrum capricornutum*), del zooplancton (copépodos, rotíferos) y peces (fundamentalmente salmónidos); de todos ellos, los microbioensayos son actualmente los más utilizados (Demayo y Taylor 1981, Petersen 1982, Newell y Sanders 1986, Blaise et al. 1988).

G) Solubilización:

Se basa en la formación del hidróxido del MP y el agregado de un ligando, de manera de medir cuánto del MP permanece en solución al complejarse. Por ejemplo, trabajando a pH 10-11, se puede medir cuánto del $Cu(OH)_2$ formado se disuelve al agregar el complejante (Campbell et al. 1977). La gran ventaja del método reside en su

simplicidad para determinar el Cu complejado. Sin embargo, presenta serias dificultades como la adsorción de ligandos y complejos al precipitado, su insensibilidad para varios ligandos débiles, y que el pH alcalino -necesario para asegurar la disociación del reactivo quelante y suficiente concentración de ligando- no es representativo del pH natural en que se encuentran estos ligandos.

Fueron ensayados otros sistemas como $(Cu)_3(PO_4)_2$, CuS y $CaCO_3$, que en general presentan el mismo tipo de problemas (Park y Allen 1984).

H) Filtración por geles:

Esta técnica se basa en la introducción, y posterior elución, de solutos a través de una columna que contiene algún tipo de gel polimérico poroso (por ej. gel a base de dextrano como el Sephadex) que actúa como tamiz molecular. De esta manera pueden ser separadas las especies menores de las mayores, y las mayores entre sí; en la medida que sus diámetros aparentes estén comprendidos dentro del intervalo de tamaño de poros del gel (Mizuike 1987).

Por medio de esta técnica cromatográfica de exclusión, es posible separar el metal libre del complejado con materia orgánica de alto peso molecular (AF, AH) (Park y Allen 1984).

De esta manera fué posible determinar la K de estabilidad para Cd, Cu, Zn, Mn, Co, Mg, Hg, Ni con ligandos orgánicos naturales. (Park y Allen 1984)

I) Filtración y centrifugación:

La centrifugación y sobre todo la ultracentrifugación son de gran utilidad para separar material particulado, coloides y fase solución. Incluso incorporando membranas de tamaño de poro cada vez menor (0,60-0,20 μm), es posible fraccionar no sólo la materia orgánica en fase solución sino también AF y AH (Sanders 1982, Visser 1983, Mizuike 1987).

Para la separación de la fase acuosa y el material suspendido, generalmente son suficientes 3500 rpm durante 15-30 minutos (Mizuike 1987), mientras que para la separación de los coloides se necesitan entre 25000 y 30000 g (Visser 1983).

La combinación ultracentrifugación -membranas con cortes nominal entre 500-30 0000 daltons, permite obtener subfracciones de AF y AH para la comparación de sus propiedades como la asociación con MP, acidez, aromaticidad, relación O/C, capacidad formadora de halometanos, etc. (Sanders 1982, Visser 1983).

J) Separación con espumas:

El término separación con espumas comprende dos procesos sustancialmente diferentes entre sí: flotación y fraccionamiento por espumas (sublación). El primer término se refiere a la utilización de espumas (es decir la concentración selectiva de sustancias tensoactivas puras o asociadas con compuestos no tensoactivos), para la separación de partículas en suspensión, mientras que el segundo se aplica al caso de sustancias disueltas (Grieves 1975, King 1981).

La separación por espumas es una técnica de enriquecimiento y fraccionamiento de una gran versatilidad, y que se puede caracterizar a través de las siguientes propiedades:

- *economicidad*: por eso se la emplea, por ejemplo, en la recuperación de los isótopos radioactivos ^{134}Cs y ^{89}Sr de grandes volúmenes de aguas de refrigeración de reactores nucleares (Grieves 1975, Bikerman 1973 pp. 263-305).

- *eficiencia*: sobre todo a nivel de trazas, para la separación y concentración tanto de sustancias orgánicas (hormonas, enzimas antibióticos, indicadores; Roca 1971, Bikerman 1973 pp. 263-305), como inorgánicas: por ejemplo, mediante el uso de ligandos auxiliares se logra la recuperación de 95 a 99 % de Cu(II) (Hobo et al. 1978, Dick y Talbot 1971).

- *selectividad*: pueden separarse distintos complejos clorurados de MP (Zn (II), Cd (II), Hg (II) y Au (III)) en función de la

concentración de cloruros (Grievés et al. 1976). Otro tanto puede hacerse con los distintos cationes alcalinos y alcalinos térreos de una mezcla común en función de parámetros experimentales (pH, tipo de tensoactivo, fuerza iónica; Bikerman 1973 pp.283-285), o bien recoger distintas especies de Cu-EDTA, utilizando tensoactivos de distinto tipo, con un acuerdo muy bueno entre los resultados experimentales y los valores calculados teóricamente (Catoggio y Porta 1991)

- *enriquecimiento*, que puede llegar a alcanzar valores de 1000 o 2000 veces según sean las características del ensayo (Bikerman 1973 pp. 263-305, Porta-Catoggio 1989).

No obstante, pese a que se han encontrado referencias sobre su aplicación al estudio de la concentración de iones metálicos (Hobo et al. 1978, Dick y Talbot 1971, Bikerman 1973 pp. 263-305), e incluso de la aplicación de la flotación en estudios de especiación con resultados muy alentadores (Mizuike 1987), no se han hallado antecedentes de su utilización para la separación de diferentes grupos genéricos de especies de determinado carácter, o tipo de carga de un mismo elemento en fase disuelta.

1.4. OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION.

Dado que esta investigación se enmarca dentro del estudio global sobre la calidad de los cuerpos de aguas del sector cercano del Río de la Plata y Río Santiago, que viene realizándose en el CIMA (Centro de Investigaciones del Medio Ambiente, UNLP) desde el año 1985, se cuenta con la posibilidad de acceder a una buena y reciente colección de datos, referidos a las características físicoquímicas de dicho sistema natural, por un lado, y se considera relevante la realización de estudios sobre la especiación de MP y de su incidencia en dicho sistema natural, por el otro; se plantearon para este trabajo los siguientes objetivos y pasos metodológicos:

- 1.- Caracterizar el tipo de especies reales en que se distribuye el ion cúprico en el agua filtrada de la zona en estudio, para lo cual:
 - 1.a. Se elige al Cu (II) por ser un elemento traza esencial, que en la zona en estudio se encuentra con una concentración promedio de 0,018 ppm y valores máximos que llegan a 0,062 ppm (Ronco et al. 1991) mientras que la concentración recomendada para la protección de la vida acuática, es 0,002 ppm (Demayo 1981, Secr. Recursos Hídricos, R.A. 1987).
 - 1.b. Para los estudios de especiación se escoge como técnica analítica el fraccionamiento por espumas, en función de su selectividad y su capacidad para no distorsionar los equilibrios preexistentes en el sistema natural estudiado, propiedades que deberán ser corroboradas adecuadamente. De todas maneras, y como primera medida, será necesario optimizar las distintas variables que inciden en la recuperación, la separación y el enriquecimiento alcanzados valiéndose de dicha metodología.
- 2.- Determinar cómo inciden los complejos de Cu con ligandos orgánicos naturales en el sistema acuático elegido y cómo actúa dicha asociación sobre las propiedades del metal, dado que una de las características del Cu (II) es la de asociarse fuertemente con este tipo de ligandos. Para ello es fundamental no sólo estudiar esta asociación desde un punto de vista global (todos los ligandos orgánicos naturales presentes), sino también algunos casos particulares como lo es la asociación AF-Cu; en este sentido se intentará:
 - 2.a. Caracterizar el agua natural en cuanto a su capacidad complejante, contenido en materia orgánica, presencia de otros ligandos inorgánicos (CO_3^- , OH^- , HCO_3^-), e incluso, explorar el grado de representatividad de los AF como agentes de la CC de la materia orgánica disuelta.

2.b. Aislar y caracterizar adecuadamente los AF de la zona en estudio, no sólo en lo referido a sus propiedades generales (acidez, espectros IR, UV y fluorescente, composición centesimal, grupos funcionales más importantes, etc.) sino fundamentalmente en cuanto a la asociación con Cu (II), es decir CC, constante condicional de estabilidad y variación de la toxicidad.

2. FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS

2.1. FUNDAMENTACION DEL METODO. APLICACIONES.

2.1.1. *TEORIA DEL FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS. NOMENCLATURA, VENTAJAS MAS DESTACADAS DE LA TECNICA.*

La separación por espumas es un procedimiento antiguo, en cuanto a sus principios, pero actual en sus aplicaciones desarrolladas y potenciales (Rubin y Gaden 1962, King 1981).

Ha sido exitosamente utilizado para separar y concentrar selectivamente una gran variedad de solutos a partir de sus soluciones acuosas diluídas, como colorantes, vitaminas, enzimas, antibióticos, isótopos radioactivos, etc. (Roca 1971, Bikerman 1973 pp. 263, Grieves 1975, King 1981).

Se basa en la adsorción de sustancias con actividad superficial (agentes tensoactivos), en la interfase gas-líquido de las burbujas generadas al introducir, mediante un dispersor adecuado, una corriente de gas inerte en una solución acuosa de las mismas. Estas burbujas, a medida que ascienden transportan selectivamente las especies tensoactivas con ellas, mientras que el resto de la solución, arrastrada inicialmente con las mismas, refluye; permitiendo de esta manera la concentración de las especies tensoactivas en la espuma formada en la parte superior. Esta espuma puede ser posteriormente separada de la fase solución y licuada obteniéndose un producto líquido enriquecido en solutos tensoactivos. (Rubin y Gaden 1962, Grieves 1975, King 1981).

Una unidad de separación por espumas, consiste esencialmente entonces, en un recipiente contenedor de la solución de tensoactivos por donde también se introduce el gas, conectado a un sistema de columnas que permite el reflujo y conduce la espuma hacia un pequeño reservorio con una salida final para retirar dicha espuma, una vez que el procedimiento de separación fué completado; como se muestra en la figura 4 (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968, Roca 1971).

ESQUEMA DEL DISPOSITIVO UTILIZADO

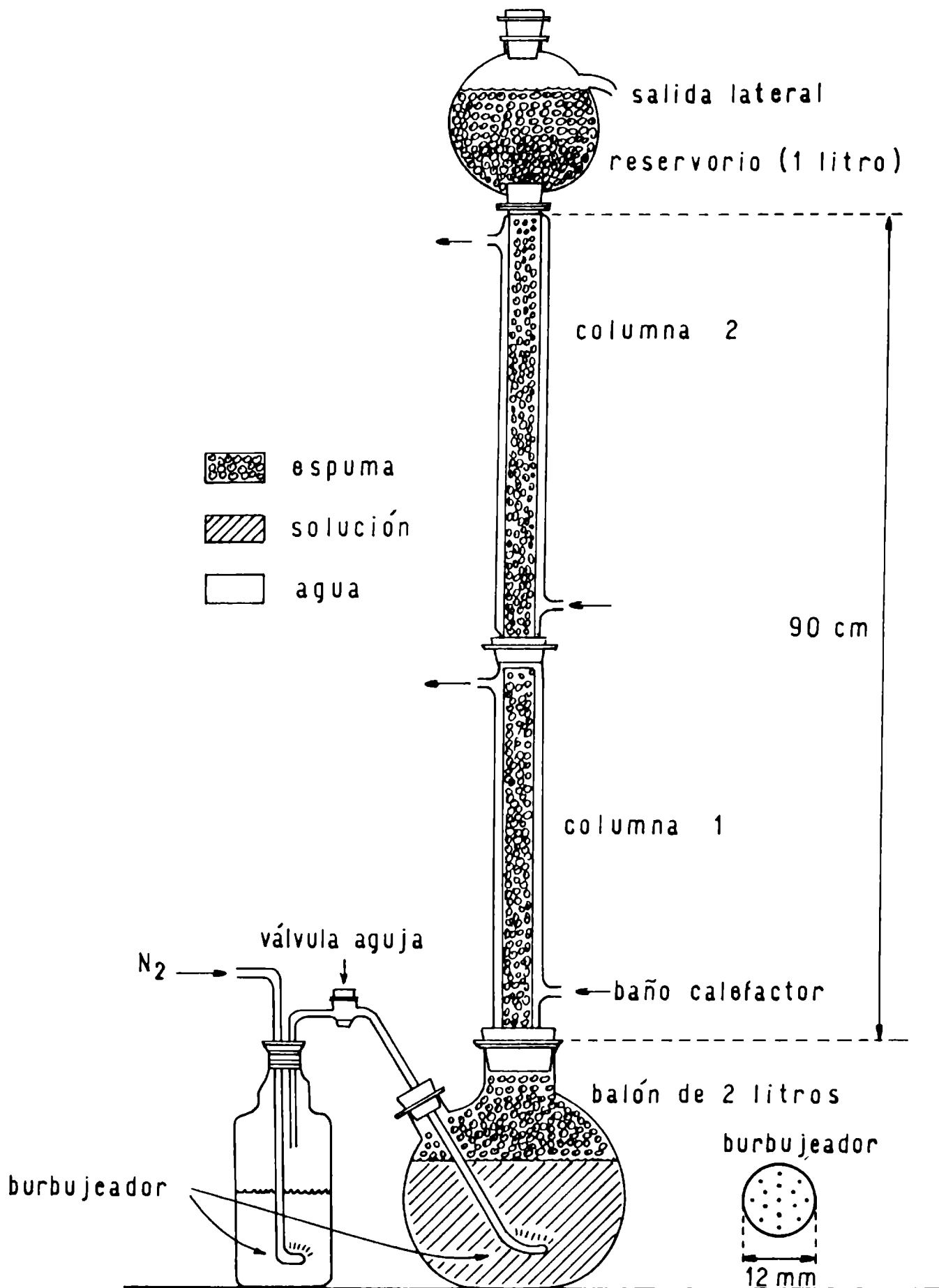


Figura 4

Cabe hacer una distinción entre separación y fraccionamiento por espumas. El término separación por espumas comprende dos procesos que, si bien parecen similares, son sustancialmente diferentes entre sí: fraccionamiento por espumas y flotación. Fraccionamiento por espumas (FPE), es el proceso por el cual se obtiene la separación de especies disueltas, mientras que en la flotación lo que se separa en la interfase gas-líquido de las burbujas de la espuma son partículas originalmente suspendidas en el sistema (Lemlich 1968, Grieves 1975, King 1981). Esta última se encuentra ampliamente difundida por ejemplo para la concentración de minerales metalíferos (menas) a partir de las rocas en que de ordinario se encuentran (Bikerman 1973 pp. 263-305) e incluso ha sido utilizada para la concentración de sustancias húmicas provenientes de agua dulce (Mizuike 1987).

Las sustancias sin actividad superficial pueden ser también concentradas por este método, a través de su complejación con ligandos que presenten actividad superficial, o por asociación con sustancias tensoactivas de carga opuesta. En estos casos, se suele denominar al soluto inactivo *coligando* y al tensoactivo *colector* (Lemlich 1972, Grieves 1975). Ejemplos de la aplicación de FPE a sustancias no tensoactivas son la separación de coligandos aniónicos como indicadores derivados de la sulfonftaleína (Roca 1971), de aniones inorgánicos en general (Grieves 1975), o de complejos aniónicos de MP como $[MP(Cl)_n]^{m-}$ (Grieves et al. 1976), y $[(Fe(CN)_6)]^{4-}$, $[Fe(CN)_6]^{3-}$ (Shimoiizaka et al. 1972), mediante su asociación con colectores catiónicos; y de coligandos catiónicos como 1-naftilamina (Poncha y Karger 1965) y Anaranjado de metilo (Karger et al. 1966) a pH = 2; Cu(II) y Cd(II) (Huang y Talbot 1973); Cu(II) (Grieves 1975); y ^{90}Sr y ^{90}Y (Bikerman 1973 pg. 283) recuperados mediante el uso de tensoactivos aniónicos. Se encuentran descritos en la bibliografía consultada algunos ejemplos de FPE utilizando colectores no iónicos, es el caso de la recuperación de ácidos orgánicos como el 1-naftoico a pH << 7 con colectores derivados del polietilenglicol (Bikerman 1973 pg. 293)

Las propiedades más destacadas del FPE son su *efectividad* a bajas concentraciones -entre 1,0 y 0,01 μM - (Lemlich 1972, Grieves 1975, King 1981); su *economicidad* por la sencillez del equipo necesario para su aplicación y en cuanto al costo de los reactivos involucrados (Grieves 1975, King 1981); su gran *versatilidad* no sólo en cuanto a que es aplicable a una gran variedad de sustancias, sino porque puede aplicarse para separar y concentrar sustancias termosensibles (como proteínas y enzimas) o a sistemas poco estables (Rubin 1962, Bikerman 1973 pp. 295-298, Grieves 1975), y su *selectividad* para el fraccionamiento de sustancias de propiedades similares como los clorocomplejos de Hg(II), Fe(III) y Co(II) (Karger y Miller 1969), o los aniones inorgánicos SCN^- , I^- , y NO_2^- , por un lado, y ClO_3^- , NO_3^- y BrO_3^- , por el otro, en función de la altura de la columna de espuma y la fuerza iónica (Grieves 1975).

Una ventaja adicional de la separación por espumas es la posibilidad de su utilización como técnica de enriquecimiento continuo, de esta manera Karger y sus colaboradores (1966) pudieron recuperar completamente el indicador anaranjado de metilo a partir de una concentración de 0,5 micromoles por litro (0,5 μM) luego de tres horas de reflujo total; mientras que Hobo y sus colaboradores (1978) obtuvieron entre 96 y 100 % de recuperación de Cu(II) , en condiciones experimentales definidas, luego de tiempos de reflujo entre 40 minutos (96%) y 150 minutos (100%).

2.1.2. FUNDAMENTOS DEL METODO:

La cantidad de agente tensoactivo adsorbida en la interfase puede calcularse en forma aproximada a partir de la ecuación para la isoterma de Gibbs (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968):

$$\Gamma = - \frac{a}{RT} \frac{d\gamma}{da} \quad (1)$$

donde:

Γ = el exceso de moles por unidad de area en la interfase, con respecto a un area de dimensiones equivalentes tomada dentro de la solución en equilibrio (o moles de material adsorbido por cm^2 de superficie interfacial).

a = actividad del agente tensoactivo en la solución, en moles / cm^3 .

γ = tensión superficial, en dinas / cm.

R = constante de los gases, en ergios / $^{\circ}\text{k mol}$

T = temperatura, en grados kelvin ($^{\circ}\text{k}$)

Una de las condiciones fundamentales para la validez de la aplicación de la isoterma de adsorción de Gibbs a la separación por espumas, es que la concentración de tensoactivo se mantenga inferior a su concentración micelar crítica (cmc). En estas condiciones es válido suponer que la composición de la solución en equilibrio con la interfase G-L se mantiene constante y que Γ corresponde a una capa monomolecular de la sustancia tensoactiva (Rubin y Gaden 1962).

De todas maneras, la descripción propuesta nos da una idea aproximada, pues la ecuación es aplicable estrictamente para una solución en equilibrio; por lo tanto cabe esperar que existan algunas discrepancias con el sistema dinámico del fraccionamiento por espumas. Sin embargo, se encuentra un buen acuerdo entre esta descripción y los resultados experimentales obtenidos para sustancias tensoactivas individuales (Karger y De Vivo 1968).

La ecuación indica que Γ es positivo si la derivada ($d\gamma/da$) es negativa; es decir, si el soluto disminuye la tensión superficial del disolvente puro, se concentrará en la interfase (Rubin y Gaden 1962, Lemlich 1968, Roca 1971).

Suponiendo que se trate de una solución ideal, o francamente diluida, podríamos reemplazar actividad (a) por concentración (c), transformándose (1) en :

$$\frac{\Gamma}{c} = - \frac{1}{RT} \frac{d\gamma}{dc} \quad (2)$$

dónde Γ / c puede ser considerado un *factor de distribución* ya que es una medida de la efectividad de la separación obtenida, por cuanto es el cociente entre la cantidad de moles de tensoactivo adsorbido por unidad de superficie y la concentración de moles de tensoactivo en la solución en equilibrio.

Incluso si en la solución se encontraren más de una sustancia con actividad superficial, los respectivos Γ/c brindan una idea de la adsorción preferencial de uno con respecto del otro (o los otros), es decir, de la posibilidad de obtener un fraccionamiento de la mezcla inicial (Rubin y Gaden 1962, Karger y de Vivo 1968).

Para el caso de sustancias no tensoactivas, no es correcta la utilización de la isoterma de Gibbs como descripción ni de Γ/c como medida de la eficiencia de la separación. En estos casos hay dos aproximaciones que permiten comprender y de alguna manera cuantificar la situación:

1.- Modelo Termodinámico: considera a la interfase G-L como un intercambiador catiónico móvil, entonces es posible plantear un coeficiente de afinidad, K_{int} , por el intercambiador. Supongamos que queremos aplicar FPE al sistema formado por un ion metálico M^{n+} como coligando y un tensoactivo aniónico en la forma de su sal sódica como colector, entonces se puede plantear que:

$$K_{int} = \frac{[Na^+]_s [M^{n+}]_i^{1/n}}{[Na^+]_i [M^{n+}]_s^{1/n}}$$

donde: "s" se refiere a la concentración en la fase solución.
 "i" se refiere a la concentración en la interfase G-L.

El valor de la Kint. dependerá de las afinidades relativas de cada uno de los cationes por el grupo aniónico, y de sus solubilidades relativas en agua, dado que la concentración en la superficie es:

$$[M^{n+}]_i = \frac{\Gamma_{M^{n+}}}{d} \text{ y } [Na^+]_i = \frac{\Gamma_{Na^+}}{d} \quad ; d = \text{espesor de la interfase}$$

Reemplazando en la ecuación anterior, se obtiene:

$$\frac{\Gamma_{M^{n+}}}{[M^{n+}]_s^{1/n}} = K_{int.} \frac{\Gamma_{Na^+}}{[Na^+]_s^+}$$

Esta expresión indica que la remoción de una sustancia no activa en superficie puede ser controlada por varios factores, como la concentración del contraion del tensoactivo y la fuerza iónica (que aportan cationes que compiten con M por los sitios de intercambio), la concentración de coligando adecuada para una buena separación, y como en todo equilibrio, más aún tan sensible en su estabilidad como lo es una espuma, la temperatura a la cual se realiza la experiencia (Karger y de Vivo 1968).

Existen ciertos colectores que no sólo actúan como intercambiadores iónicos, sino que también forman complejos con el coligando, aumentando la velocidad de remoción, su eficiencia y la selectividad (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968).

2.- Modelo cinético: aplicando la isoterma de Langmuir que considera las velocidades de adsorción y de desorción sobre la superficie, es posible plantear la siguiente expresión:

$$\frac{\Gamma_{M^{n+}}}{[M^{n+}]_s} = \frac{K_1 K_2}{1 + [M^{n+}]_s}$$

donde K₁ y K₂ son constantes que se determinan experimentalmente.

Si la concentración de M es pequeña, $[M^{n+}] \ll 1$, entonces $\Gamma/[M^{n+}]_0$ (que es el equivalente al coeficiente de distribución de las sustancias tensoactivas Γ/c) es constante. Al aumentar la concentración del coligando M^{n+} , comienzan a predominar los fenómenos de desorción y se observa una disminución de la eficiencia de la separación (Karger y De Vivo 1968).

2.1.3. MEDIDA DE LA EFICIENCIA DEL FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS:

Básicamente son utilizadas tres relaciones de concentraciones que permiten establecer la efectividad del FPE:

- 1.- La relación entre la concentración del soluto en la espuma licuada y la concentración del mismo que persiste en el líquido residual, denominada "*Coeficiente de distribución*" (Grieves 1975) o "*Relación de enriquecimiento*" (Rubin y Gaden 1962, Karger y Miller 1969). Presenta como ventaja su correlación directa con Γ/c , pero cuando la recuperación de soluto es buena o muy buena (80-100%), su determinación es poco precisa, como en el caso de toda relación de distribución muy grande o pequeña (Karger y Miller 1969).
- 2.- La relación entre la concentración del soluto en la espuma licuada y la concentración de soluto en la solución inicial o de partida, conocida como "*Relación de concentración*" o "*Factor de enriquecimiento*" (Karger y Miller 1969) o "*Coeficiente de fraccionamiento mayor*" (Grieves 1975). Ambos autores citados prefieren su utilización en situaciones de buena recuperación.
- 3.- La relación entre la masa de soluto en el líquido residual y la masa del mismo en la solución de partida, denominada "*Relación residual*" (Grieves 1975) y "*Coeficiente de fraccionamiento menor*" cuando se trata de la relación entre las concentraciones, no las masas, respectivas (Grieves 1975).

Otro parámetro de utilidad, para medir el grado de separación alcanzado, es la relación porcentual entre las masas del soluto en la espuma y en la solución de partida, conocida como "*Porcentaje de recuperación*" (Karger y Miller 1969).

Para la presentación de los resultados obtenidos en este trabajo, se adoptan dos coeficientes:

$$\text{Factor de enriquecimiento (E)} = \frac{(\text{concentración de soluto})_{\text{espuma}}}{(\text{concentración de soluto})_{\text{inicial}}}$$

$$\text{Porcentaje de recuperación (\%R)} = \frac{(\text{masa de soluto})_{\text{espuma}}}{(\text{masa de soluto})_{\text{inicial}}} \times 100$$

2.1.4. FACTORES QUE AFECTAN LA EFECTIVIDAD DEL FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS:

2.1.4.1. REFLUJO, SELECTIVIDAD Y ENRIQUECIMIENTO:

Dado que el tipo de espuma generado en un sistema de FPE es un material compuesto de burbujas -sobre cuyas superficies se concentran selectivamente las sustancias tensoactivas-, y de líquido intersticial atrapado entre ellas, el factor limitante para alcanzar un importante enriquecimiento relativo de sustancias tensoactivas en la espuma será la calidad y la cantidad de la fase líquida que permanezca atrapada entre las burbujas, en el momento de separar y licuar la espuma. Por lo tanto, para mejorar el enriquecimiento, se pueden seguir fundamentalmente dos estrategias: permitir que dicho líquido refluya todo lo que sea posible, o, si permanece entre las burbujas, que en él también se logre concentrar selectivamente las especies tensoactivas (Lemlich 1968, Karger y de Vivo 1968, Bikerman 1973 pp. 159-181, Grieves 1975).

En el primer caso, el grado de humectación (wetness) de la espuma puede ser controlando eligiendo adecuadamente el caudal de gas, el tipo de dispersor, el tamaño de las burbujas, el diseño de las columnas, la concentración inicial del tensoactivo, la temperatura y el tiempo de reflujo, de manera de permitir un buen drenaje y mejorar el enriquecimiento (Lemlich 1968, Karger y De Vivo 1968, Grieves 1975).

Por otro lado, para mejorar el enriquecimiento del líquido atrapado, se puede favorecer el reciclado de las especies concentradas por la espuma - reflujo total-, de manera de sustituir al líquido intersticial por el más concentrado, resultante del colapso de celdas de la espuma en la columna, con ese propósito se puede provocar la ruptura de la espuma en la porción superior de la columna, o bien reintroducir en la unidad de FPE la espuma enriquecida separada (Karger y De Vivo 1968, Bikerman 1973 pp. 159-181, Grieves 1975).

Obtener un buen reflujo es particularmente crítico en el caso del fraccionamiento de solutos no tensoactivos, ya que al permitir un buen intercambio se favorece la atracción selectiva, según el tipo de tensoactivo que se utilice, de los solutos deseados por la superficie interfacial G-L. Por ello es que mediante un sistema con reflujo total durante un tiempo prolongado, es como se consiguen las mejores separaciones (Karger y De Vivo 1968, Bikerman 1973 pp. 159-181, Grieves 1975).

Trabajando adecuadamente es posible obtener valores de factores de enriquecimiento entre 500 y 1000 veces (Rubin 1962, Lemlich 1968, Karger 1968, Bikerman 1973, Grieves 1975). En particular, a lo largo de este trabajo fueron alcanzados valores de enriquecimiento de hasta 1400 veces, como se puede observar de la tabla XI a la XVII (ver luego a partir del punto 2.2.4. "Metodología final aplicada").

2.1.4.2. FACTORES FUNDAMENTALES Y FACTORES DERIVADOS:

Los factores que afectan el enriquecimiento y la selectividad de un FPE pueden dividirse en dos grandes grupos:

A. Factores fundamentales: aquéllos que pueden adoptar distintos valores (dentro de intervalos razonables) independientemente de los que adopten los otros factores, por ejemplo: tipo de gas, concentración de colector y coligando, pH, temperatura, tipo de solvente.

B. Factores derivados: quedan determinados por los valores asignadas a las variables anteriores, ejemplos: solubilidad, tensión superficial, viscosidad, tiempo de reflujó, estabilidad de la espuma, dimensiones y distribución de las burbujas, velocidad de burbujeo, diseño del equipo (Rubin y gaden 1962, Karger y de Vivo 1968, Roca 1971).

FACTORES FUNDAMENTALES

1.- Características principales del colector y del coligando:

Para la separación de solutos no tensoactivos, por ejemplo iones metálicos, el agente utilizado para remover un ion particular debe poseer tres características:

- a) Debe ser tensoactivo o al menos formar un compuesto con el ion activo en superficie.
- b) Debe poseer una atracción preferente, o al menos equivalente a la de otros iones presentes en solución, por el ion metálico a remover .
- c) Debe ser capaz de producir una espuma de estabilidad razonable. (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968).

2.- Concentración, pH, Tensión superficial:

En realidad las más importantes serán las dos primeras, ya que sus valores condicionarán el de tensión superficial.

En cuanto a la concentración de colector, se trata de una situación de compromiso, ya que a menor concentración se observa una menor estabilidad de la espuma, pero un mayor enriquecimiento ya que disminuye el espesor de las paredes de las burbujas aumentando el área superficial y el reflujó interno, mejorando el drenaje de la fase líquida. A su vez, la concentración del coligando se encontrará limitada por su solubilidad en las condiciones experimentales elegidas (solvente, fuerza iónica, temperatura, pH, etc.), y por el tipo de interacción que regule su atracción por el colector, de manera de asegurar un exceso razonable de este último para permitir un enriquecimiento cuantitativo de la espuma (Rubin y Gaden 1962, Lemlich 1968, Karger y De Vivo 1968).

El pH, se elige básicamente en función de la química propia de los solutos, de manera de mejorar la separación o el fraccionamiento. Por ejemplo para favorecer la afinidad del soluto por la interfase, o la estabilidad de los complejos, eventualmente formados, en función del grado de disociación de los electrolitos débiles en general y de los que generan los ligandos, en particular (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968, Lemlich 1968).

3.- Temperatura y viscosidad:

La temperatura óptima para una separación dada debe ser encontrada experimentalmente, ya que si bien por un lado un aumento de temperatura produce una disminución de la viscosidad (y por lo tanto un reflujo más efectivo), simultáneamente, por el otro, afecta adversamente la adsorción. Y, de ordinario, provoca una menor estabilidad de la espuma (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968, Lemlich 1968).

FACTORES DERIVADOS:

1.- Tiempo de reflujo y Estabilidad de la espuma:

Se trata de una situación de compromiso, ya que si es poco estable mejora el enriquecimiento por reflujo interno, pero no permite trabajar con tiempos de reflujo (t_R) prolongados para mejorar el enriquecimiento por reflujo externo. Sin embargo, espumas de excesiva estabilidad no son convenientes ya que no permiten un drenaje adecuado (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968, Lemlich 1968). En la figura 5 se puede observar la dependencia mutua entre el enriquecimiento, la densidad de la espuma y el caudal del gas (Rubin y Gaden 1962, 373).

2.- Caudal de gas y tamaño de las burbujas:

Normalmente, un mayor caudal genera una espuma de gran densidad, con altos contenidos de líquido atrapado entre las burbujas, disminuyendo, por lo tanto el enriquecimiento. Por otro lado, si bien las burbujas más pequeñas generan espumas de mayor área, se ha observado experimentalmente que el drenaje es más

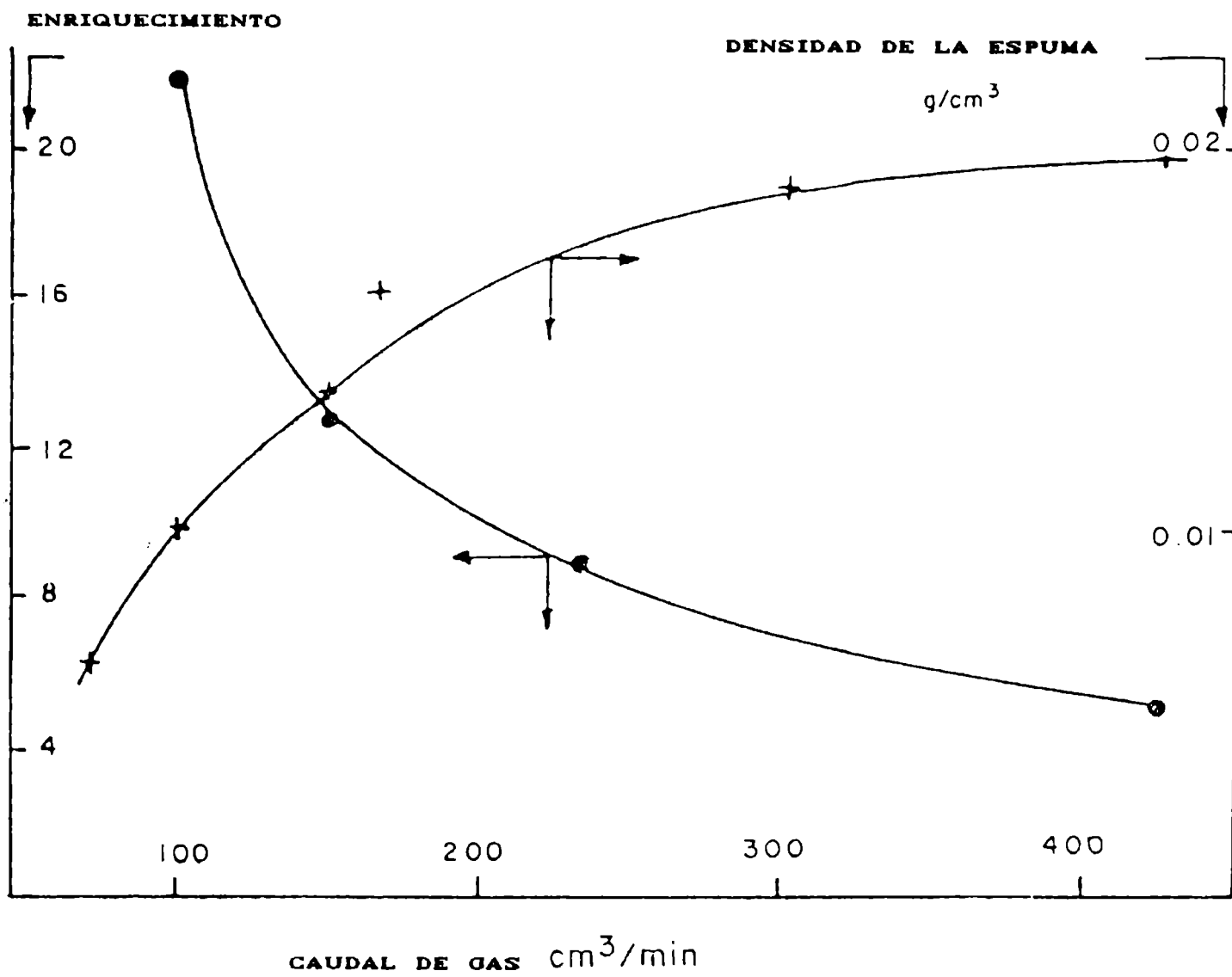


Figura 5. EFECTO DEL CAUDAL SOBRE EL ENRIQUECIMIENTO (Rubin y Gaden 1962).

efectivo con las burbujas de mayor radio. Los valores de diámetro de burbujas informados como exitosos se encuentran entre los 50 y los 150 μm (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968, Roca 1971, Lemlich 1972).

Para la construcción de los dispersores en FPE normalmente se utilizan tres tipos de materiales: capilares de vidrio, láminas de metal noble cribadas con perforaciones de diámetro uniforme, y vidrio fritado. El capilar es sin duda el recomendado para estudios de los factores fundamentales, dado que se pueden generar burbujas grandes y reproducibles de fácil medición, pero para obtener espumas estables es necesario utilizar varios capilares, que difícilmente produzcan burbujas equivalentes.

El vidrio fritado es de suma utilidad para aplicaciones generales como separaciones y fraccionamientos, ya que permite generar burbujas pequeñas y esféricas, pero de diámetro variable (la variación en el diámetro de las burbujas entre las más pequeñas y las más grandes es de hasta de 4-5 veces), y una espuma estable; es el dispersor de elección para el caso de sistemas en gran escala.

La lámina cribada, por último, permite obtener burbujas de diámetro uniformes (con una variación en los diámetros menor del 15%) y una espuma estable. Es de gran utilidad para estudios básicos como la determinación del factor distribución y el establecimiento de índices de estabilidad de la espuma en distintas condiciones. Es con este sistema que se consigue los mayores valores de enriquecimiento, ya que la forma que adoptan las burbujas (dodecahédrica pentagonal) permite un drenaje muy eficiente del líquido intersticial (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968, Lemlich 1972, Ross 1980).

3.- Geometría del aparato:

Una mayor altura de la columna mejora el enriquecimiento al aumentar el tiempo de residencia de la espuma en la columna, y, por lo tanto, el reflujo. Un tiempo de residencia prolongado de las burbujas en la solución también mejora el enriquecimiento, ya

que permite alcanzar una situación cercana al equilibrio de adsorción (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968, Lemlich 1968).

Para obtener espumas "secas" con un buen enriquecimiento, normalmente son de gran utilidad columnas largas que permiten un buen drenaje del líquido intersticial. Incluso son frecuentemente usados "promotores de drenaje" como secciones expandidas (de mayor diámetro) en la parte superior de la columna, sectores termostatizados a mayor temperatura, etc. (Karger y De Vivo 1968, Lemlich 1968)

Una problema importante a superar es la obtención del colapso de la espuma una vez aislada de la solución. Cuando se realizan estudios sobre equilibrios, factor de distribución, etc., son necesarios sistemas específicos de colapso como cambio brusco de temperatura (en más o en menos), o aplicación de fuerza centrífuga a través de canastos rotatorios ("spinning basket"), de acero inoxidable o polietileno, a 1000-1500 rpm.

Para estudios de separación o fraccionamiento, se obtienen buenos resultados recogiendo la espuma y logrando su colapso por enfriamiento a 0°C (Karger y De Vivo 1968, Lemlich 1968, Roca 1971). En otros casos es posible agregar saponinas u otra sustancia con propiedades de antiespuma. Una alternativa interesante por su simplicidad, y porque evita el agregado de sustancias extrañas que puedan modificar la composición de la espuma enriquecida o el excesivo manipuleo de métodos mecánicos o eventualmente eléctricos (calentamiento externo por medio de resistencia, arrollada, incompatible con sustancias termolábiles), consiste en forzar a la espuma a pasar a través de un capilar, obteniéndose su licuación de manera casi inmediata (Vetoshkin y Kutepov 1977).

2.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

2.2.1. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DEL EQUIPO UTILIZADO:

La geometría del aparato queda definida por las características propias del fraccionamiento por espumas; por esta razón, una unidad de FPE generalmente se compone de tres partes principales:

- a) Un recipiente donde se coloca la solución de sustancias tensoactivas, y por donde ingresa un gas inerte (generalmente N_2) a través de un dispersor para generar las burbujas.
- b) Un sistema de columnas termostatzables que mantenga la estabilidad de la espuma formada y permita su enriquecimiento,
- c) Un reservorio con un capilar vertedor (o un sistema equivalente) que permita retirar la espuma enriquecida.

En general, estas partes se encuentran unidas a través de juntas esmeriladas cónicas, que es el sistema utilizado a lo largo de este trabajo, sea 19/38 (contenedor-columna, columna-reservorio) o 24/40 (dispersor-contenedor).

El diseño final del equipo utilizado a lo largo de este trabajo quedó definido en función de la bibliografía consultada (ver figura 4), de los objetivos planteados y de los resultados obtenidos al ensayar las distintas posibilidades, como se describe a continuación.

2.2.1.1. CARACTERISTICAS DEL CONTENEDOR:

Dado que el $Cu(II)$ en el agua natural se encuentra en concentraciones menores que $0,1 \mu M$, será necesario trabajar con un volumen de solución no menor de un litro, de manera de poder contar con una masa de $Cu(II)$ detectable, luego de concentrado con las espumas, al trabajar con muestras de agua natural. Con este condicionamiento en mente fueron ensayados dos geometrías distintas,

a) Modelo balón:

Consiste en soldar en la parte superior de un balón de dos o tres litros de capacidad un par de juntas esmeriladas (u otro sistema de conexión entre las partes) que permiten unir el balón a las columnas y al dispersor (figura 4).

- Ventajas: simple de termostatar, cierre hermético y seguro, fácil de lavar y manipular.
- Desventajas: es bastante frágil (sobre todo en los lugares donde se realizaron las soldaduras), la complicada geometría del burbujeador asociado y un volumen muerto (donde la corriente de N_2 no llega eficientemente) importante (Rubin y Gaden 1962, Bikerman 1973 pp. 263-305).

b) Modelo ampolla invertida:

Como su nombre lo indica se trata de utilizar las dos salidas con la que cuenta un ampolla de decantación de dos a tres litros de capacidad, para introducir el burbujeador por la inferior y conectar las columnas mediante juntas apropiadas (figura 6A).

- Ventajas: el burbujeador queda conectado directamente en el fondo del contenedor, disminuyendo el volumen muerto y la fragilidad del mismo; la forma de la ampolla permite que se comienza a formar la columna de espuma ya dentro de ella, aumentando la altura de la misma y mejorando por lo tanto el refluo.
- Desventajas: su manipuleo y limpieza es más difícil; por otro lado su termostatación se vería afectada por las posibles pérdidas en la entrada del burbujeador en donde es difícil lograr un cierre hermético dado el peso ejercido por el volumen de la solución (Huang y Talbot 1973).

Luego de ensayar ambas posibilidades, y en función de los materiales con los que se podía contar fué seleccionada la primera opción, dado que se obtenían enriquecimientos equivalentes en ambos casos y el modelo b presentaba como principal obstáculo la

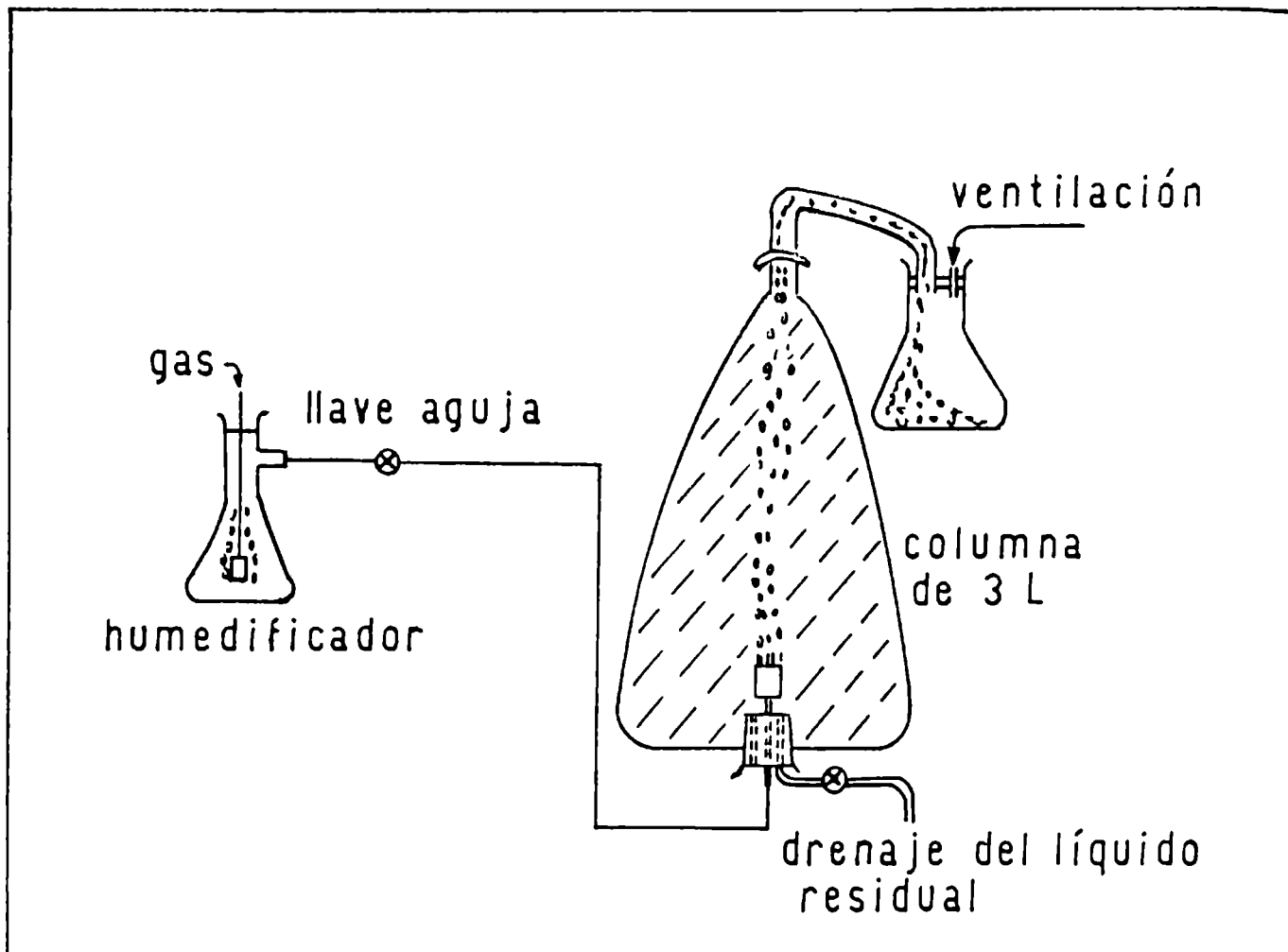


Figura 6A. Contenedor modelo "Ampolla invertida"

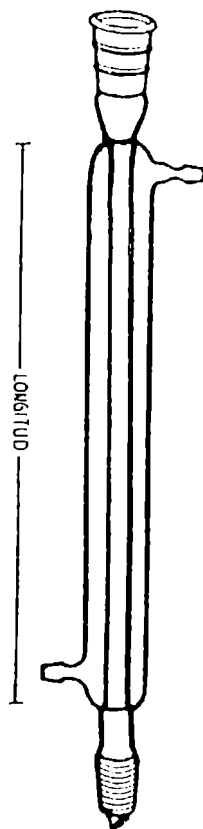


Figura 6B. COLUMNA RECTA
(tipo Liebig, J-10 catálogo IVA 71, pp. 59)

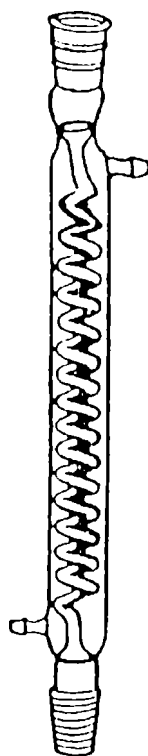


Figura 6C. COLUMNA HELICOIDAL
(tipo Graham, J-11 catálogo IVA 71, pp. 61)

pérdida de solución por la base donde se colocó el dispersor, mientras que la pérdida en eficiencia debido al volumen muerto es compensada ajustando las otras variables.

Por otro lado, el balón superior (el que está conectado en el tope de las columnas) consiste simplemente en un balón de 500 ml al que le fué soldado un tubo de unos 3 mm de diámetro por donde sale la espuma.

2.2.1.2. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA DE COLUMNAS:

Con el objeto de obtener un buen enriquecimiento de la espuma, y dado que un mayor tiempo de residencia de la espuma en la columna mejora el reflujo, se fueron probando distintas variantes como refrigerantes "tipo Liebig" conectados en serie mediante juntas esmeriladas (columna recta, figura 6B) con una buena recuperación de cobre pero pobres enriquecimientos (entre 200 y 350 veces), o los mismos Liebig alternados con un refrigerante "tipo Graham" (columna helicoidal, figura 6C) que significó un importante aumento en el enriquecimiento (entre 350 y 750 veces), pero una importante cantidad del Cu (II) queda retenido en el equipo (entre el 30 y el 45 %). Por último se utilizó columna rellena de pequeñas perlas de vidrio, con la idea de aumentar el reflujo interno, obteniéndose otra vez un mayor enriquecimiento pero una gran cantidad de cobre adsorbido en el equipo (ver tablas I y II).

Finalmente se retornó al sistema original de la columna recta (dos Liebig unidos por junta esmerilada cónica 19/38 con una altura final de la columna de espuma de 90 cm) modificando los parámetros restantes, encontrándose niveles de enriquecimientos de unas 1000 veces (ver luego en 2.2.4. metodología final adoptada).

Experimentos realizados para elegir el tipo de columna:

En todos los casos descriptos a continuación se partió de una solución 0,1 μM de Cu(II) en NaCl 7 mM, a pH = 7,40, realizada en agua desionizada y libre de cobre (por electrodeposición catódica); sobre la que fueron agregados de manera sucesiva, luego

de cada corrida (tiempo de reflujo = 45 min. en todos los casos), los tres tensoactivos (dos veces cada uno) utilizando 10,0 ml y 7,0 ml de NaDBS; 15,0 ml y 10,0 ml de CTABr y 20,0 ml y 15,0 ml de Tergitol, en todos los casos de sus respectivas solución madre de concentración 0,01 M.

Esto es, se trata de un único experimento donde se analiza la recuperación final de Cu(II) luego de la generación de los tres tipos de espumas (aniónica, catiónica y neutra) en su seno.

A.- Ensayo realizado con una columna helicoidal:

En este caso, se intentó aumentar la altura de la columna de una forma práctica, por ello se intercaló una columna con un serpentín entre el balón superior y otra columna recta. Dado que esta columna tiene 12 espiras de 3,5 cm de diámetro, llevaría su longitud a 132 cm, esta cantidad sumada a la de la columna recta significa una altura total de 172 cm. Como se muestran a continuación, si bien hubo un aumento considerable en el factor enriquecimiento, se pierde una gran parte del cobre, que probablemente queda adsorbido en las paredes del serpentín. De todas maneras, se puede observar cómo las especies aniónicas (las recogidas con CTABr) son las predominantes (40 % del Cu(II) agregado inicialmente).

TABLA I

Recuperación y enriquecimiento en Cu(II) con columna espiralada

Corrida	Tensoac.	vol. espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup. %	Enriquecim.
1	NaDBS	0,32	0,0170	17,0	531 x
2	NaDBS	0,25	0,0092	9,2	368 x
3	CTABr	0,30	0,0230	23,0	767 x
4	CTABr	0,27	0,0170	17,0	630 x
5	Tergitol	0,21	0,0086	8,6	410 x
6	Tergitol	0,24	0,0058	5,8	242 x

- Cu (II) remanente: 0,0043 μ moles
- Cu (II) total recuperado: 0,0806 μ moles
- Recuperación total Cu (II): 80,6 %

B.- Ensayo realizado con una columna recta rellena de perlas de vidrio:

Con el objeto de aumentar el reflujo interno, se reemplazó la columna helicoidal de la experiencia anterior por una columna rellena con perlas de vidrio (diámetro medio 0,30 cm), con una altura total de la columna de 95 cm (altura del Liebig más la altura de la columna que contiene las perlas, sin tener en cuenta la equivalente generada por la superficie de éstas). También en este caso se obtuvo una baja recuperación del Cu(II), presumiblemente adsorbido sobre la superficie de las perlas. En este caso, como el anterior, se observa el predominio de las especies aniónicas con una recuperación del 38,9 % del Cu(II) inicialmente agregado.

TABLA II

Recuperación y enriquecimiento en Cu(II) con columna rellena con perlas de vidrio

Corrida	Tensoac.	vol.espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup. %	Enriquecim.
1	NaDBS	0,42	0,0165	16,5	392 x
2	NaDBS	0,55	0,0076	7,6	138 x
3	CTABr	0,38	0,0225	22,5	592 x
4	CTABr	0,43	0,0164	16,4	381 x
5	Tergitol	0,45	0,0071	7,1	158 x
6	Tergitol	0,40	0,0056	5,6	140 x

- Cu (II) total remanente: 0,0056 μ moles
- Cu (II) recuperado: 0,0757 μ moles
- Recuperación Total Cu (II): 75,7 %

2.2.1.3. CARACTERÍSTICAS DEL DISPERSOR:

Contando con la posibilidad de disponer de tres láminas de platino cribadas todas de 12 mm de diámetro y con 16 perforaciones, pero cada una de diferente diámetro (0,00508; 0,01016 y 0,01524 cm, respectivamente, ver figura 4), y dadas las ventajas de este tipo de dispersor como la posibilidad de obtener espuma de características más reproducibles y un mejor enriquecimiento, fueron utilizados alternativamente estas laminillas, encontrándose una respuesta más satisfactoria con los orificios mayores, en coincidencia con los resultados registrados en bibliografía (Karger y De Vivo 1968, Roca 1971, Lemlich 1972).

Por otro lado, al elegir como contenedor el "modelo balón", para disminuir al máximo el volumen muerto (fracción de la solución sin interacción con las burbujas) para instalar el dispersor en el seno de la solución de tensoactivo, y lo más al fondo posible, fué soldada la lámina cribada a un tubo de vidrio, que se remata por el otro extremo en una junta esmerilada 24/40 (ver figura 4). Se ensayaron dos disposiciones alternativas para el dispersor, la primera ubicando éste de manera que dirija las burbujas hacia el fondo del balón permitiendo una buena interacción con la solución y mínimo volumen muerto, encontrándose sin embargo como inconveniente que las burbujas de esta manera originadas eran de diámetro variable. Si, por la ubicación del dispersor, las burbujas ascienden directamente desde la lámina cribada (segunda posición), el diámetro de las mismas se mantiene uniforme, y, si bien queda la posibilidad de cierto volumen muerto, en las sucesivas experiencias realizadas, y presentadas más adelante, se obtuvieron valores satisfactorios de enriquecimiento y recuperación, razón por la cual se puede considerar esta fracción como despreciable, al menos en función de los objetivos planteados en este trabajo.

2.2.2.- VARIABLES ENSAYADAS:

2.2.2.1. ELECCION DEL GAS Y VELOCIDAD DE BURBUJEO:

Por razones de economicidad y simplicidad, se trabajó directamente con N₂ ("super especial" A.G.A.) como gas generador de las burbujas.

Al desarrollar un fraccionamiento por espumas, normalmente, y éste es el caso, se trabaja con dos valores distintos de caudal (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968, Roca 1971, Grieves 1975).

a) Valores máximos, que permiten tanto el llenado de la columna con espuma como la remoción de la misma, una vez enriquecida en las especies de carga opuesta a la propia.

b) Valores mínimos, que permitan que el volumen de espuma generada inicialmente se mantenga en niveles aproximadamente constantes a lo largo del tiempo de reflujo, de manera de obtener una situación cercana al estado estacionario, para favorecer el enriquecimiento.

Los valores finales adoptados se muestran en la tabla III.

2.2.2.2. TIEMPO DE REFLUJO:

Fué ensayada la recuperación y el enriquecimiento en Cu(II) a 60 y 45 minutos, valores utilizados con mayor frecuencia en experimentos equivalentes (Karger 1969, Roca 1971, Lemlich 1972, Grieves 1976). Al no encontrarse diferencia significativa entre ellos, se ensayó con 35 minutos como tiempo de reflujo, observándose que en este caso se obtenía un enriquecimiento menor en un 10-15 % al obtenido en los ensayos anteriores.

2.2.2.3. TEMPERATURA, pH Y FUERZA IONICA:

Si bien la recuperación es dependiente de estos parámetros, y sería de interés el ahondar en el efecto de las variaciones de las mismas sobre las recuperaciones de las distintas especies de cobre, dado que el interés de este trabajo está centrado en las especies particulares que existan de metales pesados en medios naturales, se prefirió adoptar los valores naturales de la cuenca

en estudio (Área del Río Santiago). Los valores correspondientes se adoptaron en función de los valores obtenidos en los sucesivos muestros practicados por el CIMA en la zona (1985-1989), además de otros datos anteriores (1960-1976) provistos por el Laboratorio de Ingeniería Sanitaria (Dpto. de Hidráulica, Fac. Ingeniería, UNLP).

- fuerza iónica (I) = 7 mM NaCl
- pH = 7,40 ± 0,20

El valor de fuerza iónica, fué calculado según la ecuación de Lewis y Randall: $I = 1/2 \sum (C_i Z_i^2)$ (Kolthoff 1979, pp.42) en función de las concentraciones promedio de los aniones y cationes más representativos encontrados en las aguas en estudio (Cloruro, sulfato, nitrato, bicarbonato; sodio, potasio y calcio).

En el caso de la temperatura, fué solamente regulada la de las columnas, y el valor escogido para cada tensoactivo, optimizado para obtener el mejor enriquecimiento, se muestra en la tabla III.

2.2.2.4. ELECCION DE LOS TENSOACTIVOS Y CONCENTRACION DE LOS MISMOS.

En función del grado de pureza de los productos disponibles, el conocimiento que se tiene sobre sus propiedades y la persistencia de la espuma generado con ellos ("foaminess"), fueron elegidos los siguientes tensoactivos:

- Tensoactivo catiónico: *Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio* (o Cetiltrimetilamonio): CTABr
- Tensoactivo aniónico: *Dodecilbencenosulfonato de sodio* : NaDBS
- Tensoactivo no iónico: *Tergitol NPX* (M.R.), (Eter de Nonilfenil-polietylénglicol).

En cuanto a la elección de sus concentraciones, está relacionada con dos fenómenos antagónicos: por un lado, a medida que la concentración es mayor, es mayor la persistencia y la uniformidad de la espuma formada, favoreciéndose la repetibilidad de los ensayos pero presenta como desventaja bajos valores en la recuperación de los coligandos. Con bajas concentraciones, se obtienen altas recuperaciones y grandes enriquecimientos,

originados en el importante reflujo interno que se genera dado que en estas condiciones las "celdas" de la espuma son de paredes delgadas, pero encuentra su limitación en la reproducibilidad de las condiciones experimentales dada la escasa estabilidad de la espuma y en la necesidad de caudales de N_2 muy elevados (Rubin y Gaden 1962, Karger y De Vivo 1968, Bikerman 1973 pp. 159-181, Grieves 1975, Ross 1980).

Los valores óptimos encontrados, luego de ensayar distintas combinaciones caudal-concentración, se presentan en la tabla III.

ORDEN SECUENCIAL DE LOS TENSOACTIVOS:

Una vez definidos y optimizados los valores de las distintas variables en juego, se comenzó a estudiar el orden secuencial en el agregado y uso de los distintos tensoactivos de manera de optimizar la recuperación y el fraccionamiento de las distintas especies coexistentes.

Inicialmente fueron agregados sucesivamente sobre la misma solución de $Cu(II)$ CTABr, NaDBS y Tergitol, utilizando las distintas combinaciones de orden, siendo con esta primera con la que se obtuvo el mejor valor de enriquecimiento (450 veces), pero en ningún caso se obtuvo recuperación cuantitativa del $Cu(II)$ agregado inicialmente, sino que permanecía en la solución residual entre el 30 y el 50% del mismo.

El realizar dos corridas secuenciales por tipo de tensoactivo (con el consiguiente aumento de sus respectivas concentraciones) mejoró la recuperación, ubicándola entre 75 y 95% (ver tabla V), pero se comenzaron a observar la formación de micelas, fenómeno muy habitual al utilizar mezclas de tensoactivos de cargas contrarias cuando sus concentraciones aumentan acercándose al valor correspondiente a la "concentración micelar crítica" de cada tensoactivo por separado (Scamehorn 1986).

Se ensayó por último, la recuperación y el enriquecimiento en $Cu(II)$ utilizando tres corridas secuenciales por tensoactivo, con un incremento muy marcado de la formación de micelas, por lo que

se decidió realizar experiencias por separado para cada tensoactivo. En este último caso, la recuperación fué mayor que el 95% (estos resultados son presentados en la tabla X).

Los valores finales de concentraciones adoptados para cada tensoactivo se presentan en la tabla III.

TABLA III

	CTABr	NaDBS	Tergitol NPX
Concentración	0,15 mM	0,10 mM	0,20 mM
termostatizado	35,0 ^o C	40,0 ^o C	55,0 ^o C
Caudal Nz (ml/min)			
1. Llenado y descarga columna	500	350	550
2. Reflujo	280	250	300

CTABr = Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

NaDBS = Dodecilbencenosulfonato de sodio

Tergitol NPX = Eter de nonilfenilpolietilén-glicol.

2.2.2.5. CONCENTRACION INICIAL DE COBRE (II) UTILIZADA; RAZONES.

Inicialmente los parámetros y reactivos utilizados se ajustaron para una concentración inicial de cobre de 1,0 μM sin encontrarse mayor dificultad, pero dado que el objetivo es llegar a interpretar la especiación de los MP en aguas naturales, se consideró necesario partir con una concentración de Cu(II) 0,1 μM .

Con tal objeto, fueron utilizados reactivos de calidad analítica (AR-ACS), y eventualmente se purificaron aquéllos que no cumplieran tal requisito y fundamentalmente el agua utilizada para la preparación de las distintas soluciones.

Se encontró que el agua bidestilada (en material de vidrio tipo Pyrex y con KMnO_4 en el balón de destilación) contenía cobre en el orden de $0,080 \mu\text{M}$ y la desionizada (por resinas de intercambio fuertes) en el orden de $0,020 \mu\text{moles/litro}$, por lo que se introduce un factor importante de error (ambos valores fueron en cada caso obtenidos por aplicación del FPE, unificando las fracciones de espuma licuada, y determinando finalmente su contenido en Cu(II) con ditizona).

La metodología final utilizada para lograr agua de buena calidad consistió en separar el cobre por electrodeposición catódica aplicando 2,5-3,0 voltios durante 45 minutos (Kolthoff 1979, 960-971).

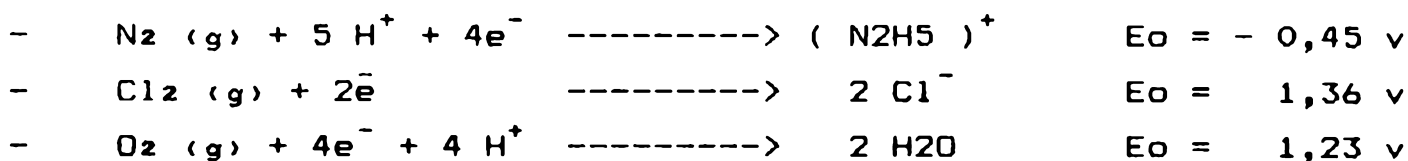
PURIFICACION DE LOS REACTIVOS:

a) Agua para las soluciones:

El agua bidestilada (en vidrio tipo pyrex y con KMnO_4) fué desionizada por resinas catiónicas de intercambio fuerte, con grupos sulfonato (R-SO_3^-) Zeocarb 225 (grado de entrecruzamiento 8 % DVB y un diámetro de grano entre 0,40 y 1,20 mm), y Amberlite IRA 400, aniónica fuerte, con grupos amonio cuaternario ($\text{R-CH}_2\text{-N(CH}_3)_3^+$), grado de entrecruzamiento 8% DVB y granulometría entre 0,30 y 1,20 mm.

Se utilizó un volumen de lecho de aproximadamente 25 ml y ambas resinas fueron activadas con HCl 0,1 N y NaOH 0,1 N respectivamente, lavadas hasta pH neutro y cargadas en columnas de vidrio con reservorio. El caudal utilizado para la desionización fué de 10 ml/minuto (Standard Methods 1985, 7-9).

El electrodeposición catódica de cobre se realizó aplicando 2,5-3,0 voltios durante 45 minutos, encontrándose que la concentración de cobre se mantiene por debajo del límite de detección del método (1,0 nM) como se muestra en la tabla V. Se utiliza NaCl 7mM como electrolito soporte y sulfato de hidrazina como despolarizante para evitar la formación de Cl_2 u O_2 en el ánodo, de acuerdo con los respectivos potenciales normales de reducción:



(Weast 1981, D155-D160)

Se determinó el contenido de cloruros en el agua luego de la electroreducción para comprobar el grado de protección logrado con hidrazina, mediante su titulación con Hg(II) a pH entre 2 y 3,5, y difenilcarbazona como indicador de punto final (Standard Methods 1985, 288-290). Los resultados, presentados en la tabla IV, muestran que la concentración de cloruros se mantiene dentro de los niveles iniciales.

TABLA IV

Determinación de cloruros en el agua electrolizada

Concentración NaCl inicial (mM)	ml Hg(NO ₃) ₂ 0,0456 N	Concentración NaCl determinada (mM)
70 mM (sin electrolizar)	7,81 7,73	0,0712 0,0705
70 mM (electrolizada)	7,75 7,69	0,0707 0,0701
7 mM (electrolizada)	0,77 0,78	0,0069 0,0074

b) Acidos y bases:

Son utilizados para llevar a pH. Para el caso de los ácidos se elige el HCl de calidad "pro analysi" (cobre máximo 0,000005%) del cual se realizan las diluciones que fueran necesarias con agua desionizada, en el caso de las bases se elige NaOH calidad

analítica (ACS) en lentes con las que se prepara una solución saturada (625g/L), dejándola reposar, durante al menos 48 hs en un recipiente de polipropileno, para que sedimenten los carbonatos presentes (entre ellos el CuCO_3 con una constante de formación $\log K_f = 6,82$, Byrne y Miller 1985), y utilizando el sobrenadante (15 N) para las diluciones que fueran necesario realizar (Standard Methods 1985 contratapa interna).

c) Tensoactivos:

Dado que al realizar la extracción con ditizona de soluciones concentradas de los mismos (2,0 M) la reacción fué negativa para cobre (su límite de detección es $0,8 \mu\text{M}$, ver luego en 2.2.3.2.), se decidió no realizar purificaciones de ningún tipo.

Los resultados obtenidos luego del proceso generalizado de purificación de reactivos y solventes se muestran en la tabla V.

2.2.3. PROBLEMAS QUE SUSCITA LA RECOLECCION Y MEDICION DE Cu(II) EN LA ESPUMA LICUADA.

2.2.3.1. TECNICAS DE COALESCENCIA DE LA ESPUMA:

Descartados todos aquellos métodos que produzcan enturbiamiento del sistema (caso de las saponinas), o bien pudieran generar alteración en las especies (como el calor), la búsqueda se centró en métodos típicamente mecánicos: ultrasonido, ultracentrifugación, etc., encontrándose serias limitaciones de orden práctico (tamaño de los equipos disponibles, altos costos y excesiva manipulación). Finalmente se optó por soldar al balón superior un tubo de 3 mm de diámetro interno y bañar la superficie interna de éste con una solución de polietilenglicol 6000 al 15 % en agua:propanol (10:90) para evitar la adsorción de Cobre en sus paredes.

Tabla V

Recuperación y enriquecimiento en Cu(II) luego de la purificación generalizada de reactivos y solventes, a partir de una solución 0,10 μM de Cu(II).

Corrida	Tensoact.	vol. espuma licuada (ml)	$\mu\text{moles Cu(II)}$ encontrados	Recup. %	Enriquecim
1	NaDBS	0,85	0,0182	18,2	214 x
2	NaDBS	0,92	0,0096	9,6	104 x
1	CTABr	0,82	0,0305	30,5	372 x
2	CTABr	0,75	0,0201	20,1	268 x
1	Tergitol	0,80	0,0093	9,3	116 x
2	Tergitol	0,87	0,0075	7,5	96 x

- Cu (II) inicial: 0,1000 μmoles
 - Cu (II) remanente: 0,0075 μmoles
 - Cu (II) total recuperado: 0,0952 μmoles
- % Recuperación por tipo de espuma:
- aniónica: 29,2
 - catiónica: 53,2
 - no iónica: 17,6
- (100% = 0,0952 μmoles)

2.2.3.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE Cu(II) EN LA ESPUMA LICUADA, TECNICAS ABSORCIOMETRICAS: METODO DE LA DITIZONA

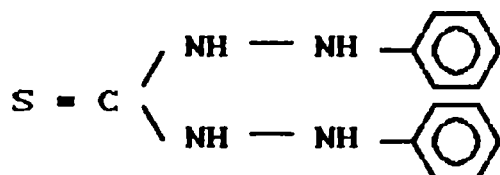
Una vez producido el colapso de la espuma, es posible aplicar sobre ella la batería de métodos de la analítica clásica para determinar su contenido en Cu(II). En particular, y al no poder disponer en el momento de un equipo de absorción atómica, se ensayaron distintas técnicas absorciométricas de sensibilidad adecuada, aprovechando la especificidad de métodos fundados en la formación, en un sistema acondicionado, de complejos solubles en fase orgánica y la disponibilidad del equipamiento necesario.

Luego de ensayar con distintos métodos como PAN {1-(2-piridilazo)-2-naftol}/ alcohol amílico/ pH 8,5 (Cheng 1955, Stary 1972 pp. 127-130); Dietilditiocarbamato de sodio/ CCl4/ pH 9 (Sandell 1950 pp. 305-311, Stary 1972 pp. 156-163) y Ditizona {difeniltiocarbazona}/ CCl4/ pH 2 (Sandell 1950 pp. 296-304, Stary 1972 pp. 136-150), se encontró muy buena reproducibilidad y un mínimo de interferencia debido a los tensoactivos con el último sistema, por lo que se lo eligió.

Un problema adicional surge al disminuir la concentración inicial de cobre a 0,1 µM del que permanece sin recuperar entre un 10 y un 25 %, por lo que su posterior determinación se hace sumamente dificultosa. Por esta razón, y dado el gran volumen de que se dispone (aprox. 1 L), se utiliza como método de preconcentración la extracción líquido-líquido del cobre como complejo en 10 ml de CCl4.

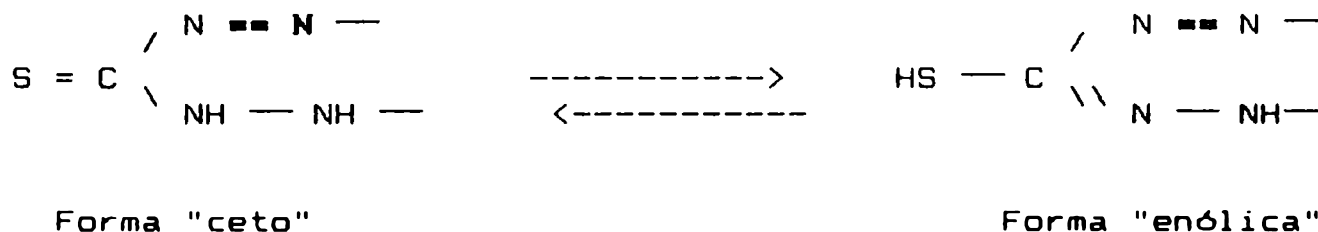
TECNICA DE LA DITIZONA (DIFENILTIOCARBAZONA) :

INTRODUCCION:



Difeniltiocarbazona (PM: 256,3)

El grupo reactivo de la ditizona coexiste en un equilibrio ceto-enólico:

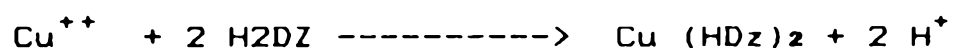


La ditizona (H₂Dz), se encuentra habitualmente en forma de un polvo cristalino violeta oscuro, es prácticamente insoluble en agua y en ácidos minerales, mientras que en soluciones básicas se disuelve y forma ditizonatos del metal alcalino completamente disociado de color generalmente amarillento; si se neutraliza la solución, la ditizona precipita.

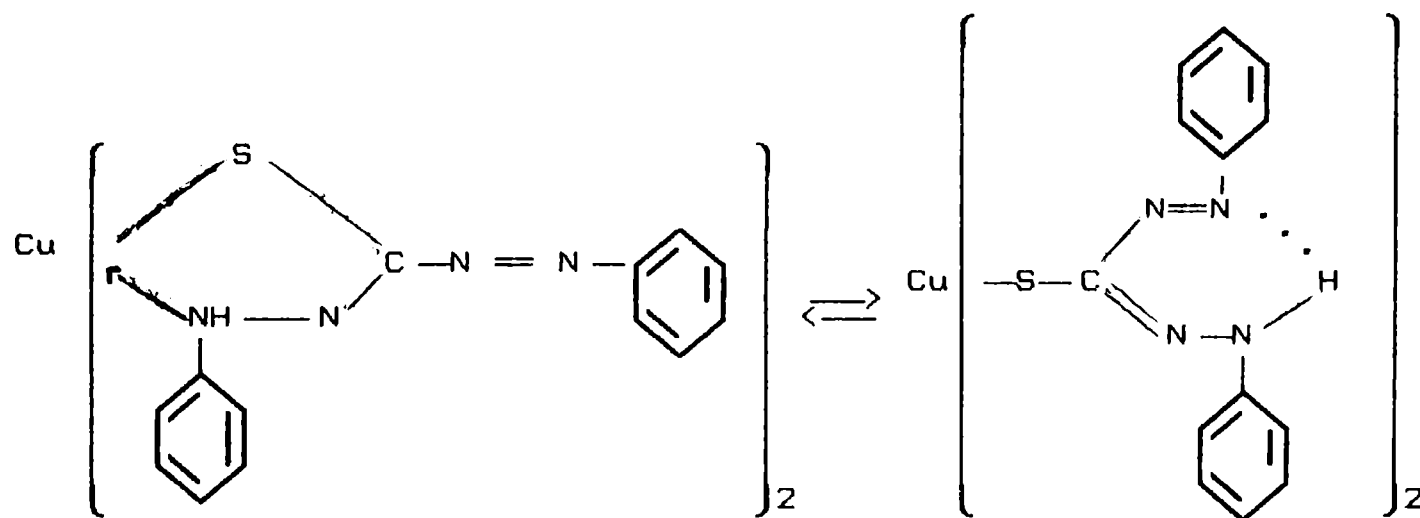
Por otro lado, es poco soluble en hidrocarburos pero se disuelve bien en cloroformo (solubilidad = 68 mM) y un poco menos en CCl₄ (2,5 mM), siendo estos dos solventes los usados casi exclusivamente para la preparación de soluciones de ditizona de color verde. Los coeficientes de partición de ditizona entre fase orgánica y acuosa son elevados ($K_{\text{CCl}_4} = 1,1 \times 10^4$ y $K_{\text{HCCl}_3} = 2,0 \times 10^5$), lo que favorece la recuperación cuantitativa de los ditizonatos formados cuando se usa la ditizona para determinar MP (Sandell 1950 pp. 87-112, Stary 1972 pp. 136-150).

Las soluciones de ditizona pueden ser fácilmente oxidadas, aún en un medio debilmente oxidante, a difenilcarbodiazona, de color amarillo pardusco, por lo que muchas veces es recomendado agregar hidroxilamina, ácido ascórbico, hidrazina u otro agente protector (Sandell 1950 pp. 87-112, Stary 1972 pp. 136-150).

La ditizona puede reaccionar con más de 20 cationes (entre ellos Mn (II), Fe (II), Co (II), Ni (II), Cu (I) y (II), Ag (I), Au (III), Hg (I) y (II), Cd (II), Pb (II), Tl (I), Zn (II), etc.). Regulando el pH de la fase acuosa y acondicionando el medio por agregado de distintas sustancias complejantes es posible desarrollar un método suficientemente sensible y específico para la determinación de metales. Por ejemplo, ajustando el pH a 1,5 - 2 y mediante el agregado de KI se logra eliminar las interferencias de varios metales pesados, entre ellos Pb(II) y Zn(II) en la determinación de Cu(II) (ver luego en 2.2.3.4.). De esta manera la ditizona reacciona con Cu (II) formando ditizonatos primarios, con una constante de asociación $\log K = 10,53$:



(Sandell 1950 pp. 87-112, Stary 1972 pp. 136-150).



PROBABLES ESTRUCTURAS PARA LOS DITIZONATOS PRIMARIOS
 (Stary 1972 pág. 137)

METODOLOGIA APLICADA:

a) Se utiliza la técnica de la absorción aditiva de Ditizona y los complejos $\text{Cu}(\text{HDz})_2$ ("mixed colour"), dado que se recomienda no aislar la ditizona libre del complejo cúprico por cuanto este paso requiere normalmente el lavado con NH_3 , que conduciría a un pH neutro o levemente alcalino en cuyo caso se formarían ditizonatos secundarios de cobre. La absorbancia total se lee a 510 nm, donde se hace mínimo el aporte de la ditizona pura (Sandell 1950 pp. 296-304, Stary 1972 pp. 136-150).

b) Se utiliza una solución de ditizona en CCl_4 de 40 ppm a partir de la cual se hacen diluciones 1/10 en el momento de usarla. Esta solución, al resguardo de la luz, mantiene un título constante y con formación despreciable de productos de oxidación a lo largo de unos 6 meses (Sandell 1950 pp. 108-109). Se prefirió usar CCl_4 en vez de HCCl_3 , ya que en el primer caso la formación del complejo $\text{Cu}(\text{HDz})_2$ es instantánea, mientras que con cloroformo se ve retardada, a tal punto que se propone utilizar este comportamiento como fundamento de un método cinético para separar $\text{Cu}(\text{II})$ de $\text{Hg}(\text{II})$, ya que el complejo $\text{Hg}(\text{HDz})_2$ en cloroformo es de formación casi inmediata (Laitinen y Harris 1975)

c) El protocolo consiste en llevar a $\text{pH} = 2,0$ la muestra en la que se desea determinar cobre (II), agregar 10,0 ml de solución de 4 ppm de ditizona en CCl_4 , agitar enérgicamente durante 2 minutos, dejar separar ambas fases (muchas veces fué necesario centrifugar para romper la emulsión formada con la espuma licuada), secar al extracto orgánico con Na_2SO_4 anhidro y leer su absorbancia a 510 nm llevando a 100% la transmitancia con un blanco de agua desionizada extraída de la misma manera.

d) Para la curva de calibración se realizaron repetidas lecturas de la absorbancia de soluciones de cobre de concentración conocida, eligiéndose puntos entre 0,10 ppm y 0,50 ppm. En la tabla VI se muestran los distintos valores obtenidos para la absorbancia en cada caso y la desviación media calculada para, por lo menos diez medidas independientes realizadas en cada punto.

TABLA VI

Curva de calibración para Cu(HDz)₂

Muestra	Ag.desion. ml.	ml Cu(II) 10 ppm	ml HCl 10 N	ml H2Dz 4 ppm	Absorb.
Blanco 1	9,9	0,000	0,100	10,0	0,000
Blanco 2	9,9	0,000	0,100	10,0	0,000
0,10 ppm	9,8	0,100	0,100	10,0	0,044
0,10 ppm	9,8	0,100	0,100	10,0	0,048
0,20 ppm	9,7	0,200	0,100	10,0	0,084
0,20 ppm	9,7	0,200	0,100	10,0	0,089
0,30 ppm	9,6	0,300	0,100	10,0	0,137
0,30 ppm	9,6	0,300	0,100	10,0	0,141
0,50 ppm	9,4	0,500	0,100	10,0	0,225
0,50 ppm	9,4	0,500	0,100	10,0	0,212

Los valores de absorbancia promedios hallados para unas 10 determinaciones por punto fueron:

- 0,10 ppm = 0,0466 ($\sigma = 0.00537$)
- 0,20 ppm = 0,0896 ($\sigma = 0.00740$)
- 0,30 ppm = 0,1390 ($\sigma = 0.00475$)
- 0,50 ppm = 0,2183 ($\sigma = 0.0189$)
- Con un coeficiente de correlación para la recta Absorbancia vs. concentración de Cu(II) = 0,9575 entre 0,10 y 0,30 ppm de Cu(II). Por encima de 0,30 ppm y hasta 0,50 ppm, se pierde linealidad en la curva de calibración.

2.2.3.3. LINEALIDAD DEL METODO ELEGIDO EN PRESENCIA DE TENSOACTIVOS:

Otro ensayo que se realizó vinculado con la determinación de cobre usando ditizona, consistió en construir la misma curva de calibración pero colocando en la fase acuosa una cantidad de tensoactivo equivalente en cada caso a la concentración final del mismo en la espuma licuada. Para ello, como primera medida se

determinó la concentración de cada uno de ellos en la espuma licuada, luego de realizar una corrida triple en condiciones equivalentes a las definidas en 2.2.4., pero sin agregar Cu(II). Los valores correspondientes se muestran en la tabla VII.

Conocidas las concentraciones de los tensoactivos en la espuma licuada, se realizó una nueva curva de calibración con Cu(II) a distintas concentraciones agregando las cantidades correspondientes de dichos agentes. Los valores de absorbancia hallados estuvieron siempre dentro de los límites de variación encontrados para la primer curva sin tensoactivos, como se muestra en la tabla VIII.

TABLA VII

Concentración de los distintos tensoactivos en la espuma licuada

	CTABr	DBS	Tergitol NPX
Técnica usada para la determinación	Titulación potenciométrica (de Br ⁻ con AgNO ₃ a pH 1).	Asociación con a. de metileno (extrn./ HCCl ₃ , absorc./652nm)	Asociación con KSCN + Co(NO ₃) ₂ (extrn./H ₂ CCl ₂ absorc./620nm)
Referencia	(Farmacopea USA 1980, 1057-59)	(St. Methods 1985, 581-84)	(St. Methods 1985, 585-87)
Concentración de tensoactivo en espuma lic. (milimoles por litro)	17,5 ± 7,5	24,4 ± 1,1	5,08 ± 2,21

- Las variaciones en las medidas respectivas se refieren a los valores de la concentración del tensoactivo en cada corrida individual (ver concentraciones iniciales en tabla III)

TABLA VIII

Curva de calibración para la determinación de Cu(II) en presencia de tensoactivos.

Concentr. de Cu(II)	Concentr. de CTABr	Concentr. de DBS	Concentr. de Tergitol NPX	A/510
0,10 ppm	----	----	----	0,048 ± 0,007
	2,5 mM	----	----	0,055 ± 0,006
	----	3,5 mM	----	0,058 ± 0,005
	----	----	1,0 mM	0,052 ± 0,012
0,30 ppm	----	----	----	0,133 ± 0,006
	2,5 mM	----	----	0,140 ± 0,008
	----	3,5 mM	----	0,146 ± 0,011
	----	----	1,0 mM	0,129 ± 0,012

% CV	0,10 ppm Cu(II)	0,30 ppm Cu(II)
CTABr	9,6	3,6
NaDBS	13,3	6,6
Tergitol	5,7	5,5

$\%CV = S / \bar{x} =$ coeficiente de variación porcentual
 $S =$ desviación estándar para pocas mediciones
 $\bar{x} =$ valor medio con respecto al blanco respectivo
 (Kolthoff 1979, cap. 16)

2.2.3.4. ELIMINACION DE POSIBLES INTERFERENCIAS DE Pb(II) Y Zn(II).

Dado que en el agua de la zona en estudio coexisten junto con el Cu(II) otros MP, fundamentalmente Pb(II) y Zn(II), se consideró que era importante verificar las condiciones adecuadas para la determinación de Cu(II) en presencia de los otros dos cationes. A partir de las recomendaciones encontradas en bibliografía (Sandell

1950 pp. 87-112, Stary 1972 pp. 136-150) se ensayó la determinación de Cu(II) por el método de la ditizona ajustando el pH a valores entre 1,0 y 1,5 (zona en que vira el verde de malaquita), agregando KI (1M) para enmascarar Zn(II) y cristales de hidroxilamina para evitar la eventual oxidación de la ditizona.

En función de la concentración media de Pb(II) y Zn(II) hallada en aguas de Río Santiago (0,005-0,015 ppm y 0,010-0,020 ppm respectivamente, Ronco et al. 1991) se agregaron a soluciones con distintas concentraciones de cobre cantidades de zinc y plomo como para alcanzar concentraciones finales que superaron en 20 veces las encontradas en el medio natural.

En la tabla IX se presentan los resultados obtenidos, en por lo menos tres ensayos independientes.

TABLA IX

Absorbancia de Cu(HDz)₂ frente a Pb(II) y Zn(II)

CONCENTRACION DE Cu(II)	CONCENTRACION DE Pb(II)	CONCENTRACION DE Zn(II)	ABSORBANCIA (510 nm)
0,1 mg/L	-----	-----	0,052 ± 0,005
	0,9 mg/L	-----	0,045 ± 0,006
	-----	0,4 mg/L	0,047 ± 0,009
0,3 mg/L	-----	-----	0,197 ± 0,008
	0,3 mg/L	-----	0,192 ± 0,019
	-----	0,4 mg/L	0,198 ± 0,011

% CV	0,10 ppm Cu(II)	0,30 ppm Cu(II)
Pb(II)	10,2	2,6
Zn(II)	7,1	0,5
%CV = S / \bar{x} = coeficiente de variación porcentual S = desviación estándar para pocas mediciones \bar{x} = valor medio con respecto al blanco respectivo		

EN TODOS LOS CASOS SE AGREGO KI 1M, SE AJUSTO EL pH Y SE COLOCARON CRISTALITOS DE HIDROXILAMINA COMO ANTIOXIDANTE

Como conclusión, mediante la metodología utilizada se obtiene la separación cuantitativa de los iones interferentes, Pb(II) y Zn(II) los que permanecen en fase acuosa, mientras que el cobre pasa a fase orgánica de CCl₄ formando el complejo con ditizona. Por lo tanto queda demostrado que se puede controlar las posibles interferencias de plomo y zinc ajustando adecuadamente las condiciones de extracción.

2.2.4. METODOLOGIA FINAL APLICADA.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad "analytical reagent, ACS" o equivalente.

El agua utilizada para la preparación de las distintas soluciones, fué bidestilada, desionizada y privada de Cu(II) por electrodeposición catódica del mismo.

La solución madre de Cu(II) (71,375 mM) se preparó por disolución de una barra de cobre electrolítico (pureza 99,9997%) en HNO₃ concentrado hasta eliminación de NO_x y posterior dilución con agua desionizada. Las respectivas soluciones fueron preparadas por dilución de esta primera.

PROCEDIMIENTO SEGUIDO:

Se agrega en el balón inferior (fig. 4) una solución de las siguientes características: Cu (II) 0,1 μ M ,pH = 7,40 ; F. iónica = 7 mM y un volumen determinado de tensoactivo según se lo indica en la tabla III.

Se permite entonces la entrada de N₂ manteniendo su caudal elevado (ver tabla III) hasta llenar las columnas con espuma, se lo disminuye luego durante 45 minutos para mantener la columna de espuma favoreciendo el reflujo, y se lo vuelve a elevar finalmente para recoger una cantidad de espuma enriquecida, que al licuarse no supere en lo posible un volumen de 0,50 ml.

Las condiciones particulares de caudal de N₂ , concentración y temperatura de termostatación correspondiente a cada uno de los tensoactivos utilizadas para optimizar el reflujo y la estabilidad de la espuma formada, se presentan en la tabla III.

Como se discute en el punto 2.2.2.4., dado que sólo se llega a recoger de esta manera una fracción de la espuma enriquecida, se repite el mismo procedimiento dos veces más para cada tensoactivo agregando en cada caso la cantidad correspondiente según se indica en la tabla III.

De esta forma, se obtienen tres cantidades de Cu (II) que se suman para dar el Cu (II) recuperado total y terminado el procedimiento completo queda en el balón inferior una cantidad de Cu (II) remanente. Se determinan ambos valores para verificar el grado de recuperación alcanzado.

En la tabla X se muestran los resultados obtenidos al trabajar en estas condiciones.

TABLA X

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA METODOLOGIA OPTIMIZADA.

Corrida	Tensoact.	vol.espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1	NaDBS	0,23	0,0165	16,5	717 x
2	NaDBS	0,25	0,0105	10,5	408 x
3	NaDBS	0,28	0,0042	4,2	161 x
1	CTABr	0,22	0,0278	27,8	1260 x
2	CTABr	0,27	0,0221	22,1	818 x
3	CTABr	0,24	0,0053	5,3	221 x
1	Tergitol	0,31	0,0112	11,2	361 x
2	Tergitol	0,25	0,0077	7,7	308 x
3	Tergitol	0,25	0,0025	2,5	100 x

Tensoactivo	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
NaDBS	0,0704 μ M (69,3 %)	0,0312 μ M (30,7 %)
CTABr	0,0486 μ M (46,8 %)	0,0552 μ M (53,2 %)
Tergitol	0,0835 μ M (79,6 %)	0,0214 μ M (20,4 %)
Recuperación Total de Cu (II):		104,3 %

2.3. APLICACION DEL FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS AL ESTUDIO DE LA ESPECIACION DEL Cu(II) FRENTE A LIGANDOS INORGANICOS.

2.3.1. RECUPERACION DE Cu(II) FRENTE A UN AUMENTO DE LA CONCENTRACION DE LA CONCENTRACION DE NaCl .

Una vez optimizadas las condiciones de trabajo, y dada la complejidad inherente al medio acuático natural, se comenzó a estudiar gradualmente el comportamiento del Cu(II) frente a las dos clases principales de ligandos que se encuentran en dicho medio.

En tal sentido, se comenzó por los ligandos inorgánicos y como primera medida se analizó la recuperación de Cu(II) con cada tipo de tensoactivo (catiónico, aniónico y no iónico) con una concentración de cloruros equivalente a la que se encuentra en aguas dulces (Río Santiago, 7 mM) y en condiciones equivalentes a la del agua de mar (512 mM). Paralelamente, y para confirmar que un comportamiento diferencial se deba a la asociación Cu-Cl^- y no a una modificación en la fuerza iónica del medio, fué ensayada la recuperación de Cu(II) sustituyendo al NaCl por NaNO_3 en molaridad equivalente. Se eligió esta sal dado que el NO_3^- no forma complejos estables con el ion cúprico.

En todos los casos se operó según las condiciones descritas en el apartado anterior; las únicas variantes son las concentraciones de NaCl (7 mM y 512 mM) y NaNO_3 (512 mM) utilizadas.

También en este caso, se obtuvieron tres valores sucesivos de Cu(II) en las respectivas fracciones de espuma licuada con cada tensoactivo, que se suman conformando el Cu(II) recuperado total y se determina el valor de Cu(II) remanente en el balón inferior luego del procedimiento completo.

En las tablas XI, XII y XIII, son presentados los valores promedio de los resultados obtenidos para cada tensoactivo en experiencias independientes realizadas por duplicado.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Existe un claro aumento en la cantidad de Cu(II) que forma parte de especies aniónicas (recogidas con CTABr) al pasar de NaCl 7 mM a NaCl 512 mM, mientras que no ocurre lo mismo con NaNO₃ 512 mM. Esta situación descarta una posible explicación centrada en el aumento de la fuerza iónica y en cambio fortalece una hipótesis que tenga en cuenta la asociación entre Cu(II) y Cloruros.

En tal sentido, si bien el tipo de complejos que se pueden formar entre el ion cúprico y cloruros se caracterizan por su baja estabilidad (los valores correspondientes al logaritmo decimal de las constantes asociación para las especies $[\text{Cu(II)(Cl)}_n]^{(2-n)}$ con $n > 3$ se encuentran entre - 2,29 (n=3) y -4,59 (n=4), Parkhurst 1990), por tratarse de un equilibrio químico cumple con el principio de Le Chatelier, y en consecuencia por acción de masas al aumentar la concentración de los reactivos, aumenta la de los productos.

Por otro lado, dada la concentración de oxhidrilos de la solución, es de esperar que se trate de clorohidroxocupratos más que de clorocupratos, complejos aquéllos de mayor estabilidad, como ocurre en realidad en el agua natural (Stumm y Brauner 1975, Salomons y Förstner 1984, Mizuike 1987).

TABLA XI

RESULTADOS OBTENIDOS CON NaCl 7 mM

Corrida	Tensoact.	vol.espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1	NaDBS	0,23	0,0173	17,3	723 x
2	NaDBS	0,21	0,0097	9,7	444 x
3	NaDBS	0,35	0,0045	4,5	124 x
1	CTABr	0,27	0,0256	25,6	882 x
2	CTABr	0,21	0,0172	17,2	762 x
3	CTABr	0,30	0,0101	10,1	313 x
1	Tergitol	0,24	0,0079	7,9	291 x
2	Tergitol	0,50	0,0063	6,3	112 x
3	Tergitol	0,22	0,0052	5,2	209 x

Tensoactivo	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
NaDBS	0,0718 μ M (69,5 %)	0,0315 μ M (30,5 %)
CTABr	0,0470 μ M (47,0 %)	0,0529 μ M (53,0 %)
Tergitol	0,0822 μ M (80,9 %)	0,0194 μ M (19,1 %)
Recuperación Total de Cu (II): 102,6 %		

TABLA XII

RESULTADOS OBTENIDOS CON NaCl 512 mM

Corrida	Tensoact.	vol.espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1	NaDBS	0,32	0,0103	10,3	311 x
2	NaDBS	0,28	0,0068	6,8	338 x
3	NaDBS	0,25	0,0057	5,7	220 x
1	CTABr	0,25	0,0286	28,6	1090 x
2	CTABr	0,23	0,0217	21,7	899 x
3	CTABr	0,30	0,0194	19,4	616 x
1	Tergitol	0,19	0,0082	8,2	375 x
2	Tergitol	0,22	0,0065	6,5	257 x
3	Tergitol	0,23	0,0032	3,2	121 x

Tensoactivo	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
NaDBS	0,0776 μ M (77,3 %)	0,0228 μ M (22,7 %)
CTABr	0,0296 μ M (29,8 %)	0,0697 μ M (70,2 %)
Tergitol	0,0832 μ M (82,3 %)	0,0179 μ M (17,7 %)
Recuperación Total de Cu (II): 110,6 %		

TABLA XIII

RESULTADOS OBTENIDOS CON NaNO₃ 512 mM

Corrida	Tensoact.	vol.espuma licuada (ml)	μmoles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1	NaDBS	0,23	0,0137	13,7	578 x
2	NaDBS	0,30	0,0112	11,2	362 x
3	NaDBS	0,32	0,0074	7,4	225 x
1	CTABr	0,59	0,0283	28,3	457 x
2	CTABr	0,53	0,0145	14,5	261 x
3	CTABr	0,66	0,0085	8,5	123 x
1	Tergitol	0,25	0,0094	9,4	358 x
2	Tergitol	0,40	0,0076	7,6	181 x
3	Tergitol	0,42	0,0061	6,1	138 x

Tensoactivo	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
NaDBS	0,0679 μM (67,8 %)	0,0323 μM (32,2 %)
CTABr	0,0495 μM (49,2 %)	0,0513 μM (50,8 %)
Tergitol	0,0758 μM (76,6 %)	0,0231 μM (23,4 %)

Recuperación Total de Cu (II): 106,4 %
--

2.2.3.1. CONCLUSIONES:

1. En función de los resultados obtenidos, es evidente que el grupo mayoritario de especies en que se distribuye el Cu(II), en estas condiciones es el aniónico (50,3 %), donde el anión cloruro es uno de los ligandos involucrados. El segundo grupo en importancia es el catiónico (30,5%), y por último el conjunto de las especies no iónicas que forman el 19,1 %.

2. La otra conclusión importante es que el fraccionamiento por espumas no genera modificaciones en las condiciones de equilibrio existentes, independientemente de que se trate de asociaciones poco estables. Esta propiedad, como se lo manifestaba previamente en la introducción general, es de gran importancia para el estudio de sistemas naturales complejos como los acuáticos.

3. Que la recuperación sumada de Cu(II) supere el 100 %, es producto de la dificultad de considerar experimentos independientes como partes de un mismo experimento global, ya que el ajuste es bueno para las corridas practicadas para cada tensoactivo particular (como se puede apreciar de la suma de los totales de Cu(II) recuperado y remanente para cada tensoactivo en las respectivas tablas). Por ello, y dado que la diferencia global encontrada se mantiene dentro del 10% se la acepta como válida. Por lo demás, de ser corridas sucesivas, es poco menos que imposible que en la solución intersticial que acompaña a la espuma licuada queden especies de otro tipo, que de ser reflujo total y perfecto, volverían al balón y quedarían como Cu(II) remanente.

4. Por otro lado, los niveles de enriquecimiento obtenidos son buenos, en particular para CTABr con valores cercanos a las 1000 veces. Estos valores dan cuenta del grado de optimización alcanzado luego de los sucesivos ajustes realizados en los ensayos preliminares.

5.- Por último, estos resultados ponen en evidencia otra propiedad importante del fraccionamiento por espumas, como lo es su alta selectividad que hace que funcionen como un intercambiador catiónico, aniónico o no iónico según sea el tipo de tensoactivo utilizado.

2.3.2. RECUPERACION DE CU(II) A PARTIR DE UNA SOLUCION DE AGUA DULCE SINTETICA.

En esta segunda etapa, el objetivo es determinar el tipo de especies que forma el Cu(II) en una situación más cercana a la existente en el medio acuático natural. A los cloruros presentes en las experiencias anteriores, se suman ahora los otros compuestos inorgánicos de mayor relevancia, sea por su concentración o por el tipo de complejos o asociaciones que forman con el Cu(II), es decir carbonato, bicarbonato y los óxidos básicos de Fe(III).

A tal efecto, se desarrollaron sucesivas corridas independientes con CTABr, NaDBS y Tergitol sobre la solución compuesta por: Cu(II), 0,1 μ M; FeCl₃ · 6H₂O, 0,416 ppm; NaHCO₃, 96 ppm; CaSO₄ · 2H₂O, 60 ppm; MgSO₄ · 7 H₂O, 29,5 ppm; y KCl, 4 ppm; donde las concentraciones de las sales se corresponden con la tipificación de agua dulce sintética de Snell y Persoone (que es la misma que se utiliza más adelante en la experiencia de toxicidad del Cu(II) para rotíferos, Snell y Persoone 1989) y la cantidad de Fe(III) es el equivalente a la concentración promedio encontrada en Río Santiago (Ronco et al. 1991).

Dado que el Fe(III) es una interferencia en la determinación de Cu(II) con ditizona (Stary 1975), se realizó una nueva curva de calibración de Cu(II) con Fe(III) -que queda en la fase acuosa en las condiciones de trabajo-, e hidroxilamina (usada como antioxidante protector de la ditizona). Los valores encontrados, que se corresponden bien con los valores medios hallados previamente, para Cu(II) solo, se muestran en la tabla XIV.

En todos los casos se aplicó la misma metodología que fuera descripta en el punto 2.2.4.

También en este caso, se obtienen tres valores de Cu (II) de las tres fracciones de espuma licuada que se suman conformando el Cu (II) recuperado total y un valor de Cu (II) remanente en el balón inferior luego del procedimiento completo.

Se realizaron todos los ensayos por duplicado y los resultados obtenidos se muestran sucesivamente en las tablas XV, XIV, XVII.

ANALISIS DE LOS RESULTADOS.

RESULTADOS GENERALES PROMEDIO % CU(II) TOTAL RECUPERADO:

- * CTABr: 65,5 %
- * NaDBS: 24,5 %
- * Tergitol: 23,2 %

Indudablemente, la presencia de los nuevos ligandos favorece la formación de nuevas especies de carga negativa. Era el comportamiento predecible, como se lo expresara en la introducción general, no sólo en lo que respecta a la asociación $\text{Cu(II)-CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$, sino también en cuanto a la interacción entre el ion cúprico y los distintos tipos de óxidos férricos hidratados que coexisten a pH neutro, sea formando complejos o adsorbidos sobre la superficie de dichos coloides (Stumm y Brauner 1975, Salomons y Förstner 1984, Byrne y Miller 1985).

Con respecto a la asociación Cu-Carbonato, es importante señalar que incluso la EPA (Agencia de Protección Ambiental de los E.E.U.U.) modifica los niveles de concentración máximos admitidos para Cu(II) (entre otros MP), para la protección de vida acuática, en función de la dureza del cuerpo de agua analizado; así: para una dureza de 50 ppm (CaCO_3) se lo fija en 12 μg de Cu(II) por litro y para una dureza de 200, en ppm 43 $\mu\text{g/L}$ (Betti y Papoff 1988).

Con respecto al papel del Fe en la capacidad complejante, por un lado se ha encontrado que existe una buena correlación (0,936) entre ésta y la concentración de Fe(III) (Truitt y Weber 1981 a). Por otro lado, existen evidencias de que para los pH habituales en los cursos de agua dulce (6-8) buena parte de la distribución del Cu(II) está controlada por su adsorción sobre hidróxido férrico amorfo, que incluso al filtrar mediante membranas de 0,45 μm de poro, queda en la solución filtrada (Johnson 1986, Fox 1988).

De todas maneras, en agua dulce, que es el sistema que se pretende estudiar, la presencia de la materia orgánica, y en particular la presencia de ligandos orgánicos naturales disueltos en las mismas, modifican sustancialmente esta distribución, no sólo en lo que respecta al tipo y cantidad de especies que forma, sino, fundamentalmente, en las propiedades que exhiban los productos de asociación del cobre con aquéllos (Engels et al. 1981, Salomons y Förstner 1984, Mizuike 1987).

TABLA XIV

Curva de calibración para Cu(HDz)₂, en presencia de Fe (III) ([Fe] = 0,086 ppm) e hidroxilamina.

Muestra	Ag. desion. ml.	ml Cu(II) 10 ppm	ml HCl 10 N	H ₂ Dz 4ppm en CCl ₄	Absorb. en fase orgánica
Blanco 1	9,9	0,000	0,100	10,0	0,000
Blanco 2	9,9	0,000	0,100	10,0	0,000
0,10 ppm	9,8	0,100	0,100	10,0	0,050
0,10 ppm	9,8	0,100	0,100	10,0	0,046
0,30 ppm	9,6	0,300	0,100	10,0	0,137
0,30 ppm	9,6	0,300	0,100	10,0	0,146

TABLA XV

RESULTADOS OBTENIDOS EN AGUA DULCE SINTETICA CON AGREGADO DE Fe (III), PARA [Cu(II)] = 0,1 μM

1. - CTABr

Corrida	vol.espuma licuada (ml)	μmoles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1 A	0,34	0,0341	34,1	829 x
2 A	0,31	0,0195	19,5	520 x
3 A	0,27	0,0138	13,8	422 x
1 B	0,19	0,0284	28,6	1410 x
2 B	0,22	0,0219	21,9	939 x
3 B	0,27	0,0128	12,8	447 x

Corrida	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
A	0,0326 μM (32,6 %)	0,0674 μM (67,4 %)
B	0,0364 μM (36,7 %)	0,0631 μM (63,3 %)

Recuperación promedio de Cu (II): 65,4 %

TABLA XVI

RESULTADOS OBTENIDOS EN AGUA DULCE SINTETICA CON AGREGADO DE Fe (III), PARA [Cu(II)] = 0,1 μM

2. - NaDBS

Corrida	vol.espuma licuada (ml)	μmoles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1 A	0,15	0,0108	10,8	615 x
2 A	0,21	0,0065	6,5	264 x
3 A	0,29	0,0034	3,4	101 x
1 B	0,37	0,0102	10,2	263 x
2 B	0,22	0,0093	9,3	403 x
3 B	0,24	0,0074	7,4	294 x

Corrida	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
A	0,0774 μM (78,9 %)	0,0207 μM (21,1 %)
B	0,0716 μM (72,7 %)	0,0269 μM (27,3 %)

Recuperación promedio de Cu (II): 24,5 %

TABLA XVII

**RESULTADOS OBTENIDOS EN AGUA DULCE SINTETICA CON AGREGADO DE Fe (III), PARA [Cu(II)] = 0,1 μ M
3.- Tergitol NPX**

Corrida	vol.espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1 A	0,13	0,0101	10,1	723 x
2 A	0,24	0,0104	10,4	403 x
3 A	0,33	0,0058	5,8	164 x
1 B	0,31	0,0123	12,3	378 x
2 B	0,27	0,0045	4,5	159 x
3 B	0,22	0,0027	2,7	117 x

Corrida	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
A	0,0729 μ M (73,5 %)	0,0263 μ M (26,5 %)
B	0,0789 μ M (80,2 %)	0,0195 μ M (19,8 %)

Recuperación promedio de Cu (II): 23,2 %	
--	--

CONCLUSIONES:

1. La consideración de la coexistencia de Cu(II) con $\text{CO}_3^{=}$, HCO_3^- y Fe(III), en medio neutro, genera una nueva distribución, que si bien no modifica el orden encontrado al utilizar sólo cloruros, aumenta significativamente la cantidad de especies aniónicas presentes. Es decir que el ion cúprico, en agua dulce libre de materia orgánica, se encuentra fundamentalmente (65 %) en la forma de especies aniónicas.

2. Nuevamente, la suma del porcentaje de especies recogidas es mayor que 100 (113,2 %); vale en este caso la justificación presentada en el caso del aumento de la concentración de cloruros, y más aún si se considera que es éste un medio de mayor complejidad, en cuanto a las distintas y muy variadas especies de Fe(III) que pueden coexistir en un sistema neutro, muchas de ellas en estado coloidal.

3. Finalmente, para obtener una descripción ajustada del medio real, es necesario incorporar la materia orgánica, y analizar qué ocurre con la especiación del Cu(II) en estas circunstancias, lo que se hará en el punto 2.4.

2.4. ESTUDIO DE LA ESPECIACION DE Cu(II) CON LIGANDOS ORGANICOS UTILIZANDO EL FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS:

2.4.1. ESPECIACION DE Cu(II) FRENTE A EDTA EN MEDIO NEUTRO.

Dado que el EDTA (etilendiaminotetracetato) es un complejante de propiedades bien definidas, tanto en sus características ácido-base (se encuentran descritas en bibliografía las constantes de disociación para los cuatro protones que podría unir a pH ácido, Kolthoff 1979, cap. 6), como en su capacidad de formar quelatos de alta estabilidad con la mayoría de los cationes (entre ellos el Cu(II), Kolthoff 1979, 1185-89), se lo elige para confrontar los resultados que se obtengan de aplicar el fraccionamiento por espumas al sistema Cu(II)-EDTA-pH 7,40, y los resultados que se esperarían para dicha situación en función de las constantes de asociación y disociación que rigen el sistema.

En tal sentido se realiza un análisis estadístico sobre los valores obtenidos, cuyos resultados se presentan en las tablas XVIII y XIX junto con los valores individuales obtenidos. Por otro lado, para realizar una confrontación completa, fueron seleccionadas cuatro relaciones de concentración Cu/EDTA: 1/1,5; 1/1; 1/0,75 y 1/0,50.

En todos los casos, se respetan los valores de las demás variables utilizados en los ensayos anteriores, excepto, claro está, el agregado de EDTA. Para preparar las soluciones de EDTA, se utilizó su sal disódica, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, calidad "pro analysi".

También en este caso, se obtienen tres valores de Cu (II) en la espuma licuada que se suman conformando el Cu (II) recuperado total (Cu(II)_T), (tablas XVIII y XIX), y un valor de Cu (II) remanente en el balón inferior, luego del procedimiento completo.

Para cada tensoactivo en las distintas relaciones EDTA/Cu, se desarrollaron experiencias por triplicado y se comparan los valores obtenidos en cada caso (ver tablas XVIII y XIX).

ANALISIS DE LOS RESULTADOS

En función del pH de trabajo, la concentración de EDTA, las constantes sucesivas de disociación ácida del EDTA y la constante de asociación Cu-EDTA, las especies más importantes en equilibrio para el sistema en estudio (despreciando aquellas de concentración menor que 0,1 nM), son:

a. - EDTA/Cu = 0,50	(CuH ₂ EDTA) ⁰ = 2,73 nM
	(CuHEDTA) ⁻ = 47,22 nM
b. - EDTA/Cu = 0,75	(CuH ₂ EDTA) ⁰ = 4,08 nM
	(CuHEDTA) ⁻ = 70,92 nM
	(CuEDTA) ⁼ = 0,98 nM
c. - EDTA/Cu = 1,00	(CuH ₂ EDTA) ⁰ = 5,44 nM
	(CuHEDTA) ⁻ = 94,56 nM
	(CuEDTA) ⁼ = 0,13 nM
d. - EDTA/Cu = 1,50	(CuH ₂ EDTA) ⁰ = 8,16 nM
(valores teóricos limitados por la [Cu] _T)	(CuHEDTA) ⁻ = 141,80 nM
	(CuEDTA) ⁼ = 0,22 nM

Por otro lado, si la fracción de Cu(II) no complejoado con EDTA se comportara de manera equivalente a la encontrada anteriormente (con NaCl 7mM, tabla XI), es decir para el mismo sistema pero sin EDTA, nos encontraríamos frente a las siguientes proporciones:

especies catiónicas = 53,0 %
especies aniónicas = 30,5 %
especies no iónicas = 19,1 %

Sumando las especies de igual tipo de signo resultantes de las consideraciones anteriores se obtienen los valores correspondientes a "Moles Cu (II)_T calculados" (tablas XVIII y XIX).

En el caso de las especies recogidas con CTABr, el acuerdo entre los valores experimentales y los calculados es muy bueno (tabla XVIII).

Como era de esperar, cuando la relación EDTA/Cu = 1,50, la recuperación del catión es cuantitativa, mostrando la aptitud de la metodología aplicada para la recuperación de iones de metales desde una matriz líquida o como sistema descontaminante alternativo.

Al utilizar NaDBS o Tergitol, la situación no es tan clara. Aquí la correlación entre Cu (II) recuperado y Cu (II) calculado no es buena. Una explicación de este comportamiento podría encontrarse considerando la presencia de interacción EDTA-tensoactivos, por ejemplo entre el grupo sulfonato del NaDBS y las aminas protonadas del EDTA (que a pH neutro actuaría como un "zwitterion"), ó en el caso del Tergitol por formación de puentes de hidrógeno entre los oxhidrilos del glicol y los grupos carbonilo del EDTA.

CONFIRMACION DE LAS INTERACCIONES EDTA-DBS Y EDTA-Tergitol

Para confirmar estas posibles interacciones, se estudió el efecto del agregado de EDTA (manteniendo el pH, la fuerza iónica y la concentración de Cu(II) en las proporciones que se establecen durante el fraccionamiento por espumas), sobre las propiedades anfipáticas de ambos detergentes. Con tal objeto se utilizó Merocianina 540 (MC 540) como sustancia marcadora.

MC 540 es un cianina colorante aniónica, que en solución acuosa presenta dos picos de máxima absorción en el espectro visible, en 502 y 534 nm, correspondientes al equilibrio dímero-monómero, respectivamente, y que interacciona con estructuras hidrofóbicas organizadas (micelas, liposomas) favoreciéndose la forma monomérica en la medida que predomina la interacción con la zona hidrofóbica (por ejemplo mediante una mayor exposición de la zona central de las micelas a la merocianina) ó la formación de dímeros en la medida que prevalece la interacción con la zona hidrofílica (Krasne 1980, Lelkes y Miller 1980).

Para explicar dicho comportamiento, se propone la existencia de un intercambio dinámico entre ciertas moléculas de la sustancia formadora de la micela, o el liposoma, y las de MC 540 en la medida que los sitios hidrofóbicos quedan expuestos a la solución que los contiene (Krasne 1980, Lelkes y Miller 1980).

Para la interacción con tensoactivos en particular, el aumento de la concentración de los mismos provoca un desplazamiento del equilibrio dímero-monómero, favoreciendo la formación de los segundos, que se manifiesta con un pico de absorción, proporcional a la cantidad de tensoactivo, que se ubica en la zona de los 550-570 nm (Dodin et al. 1987). En nuestro caso en particular dicho pico se encuentra en 556 nm para MC 540-NaDBS y en 564 nm al utilizar Tergitol.

Por otro lado la presencia de una tercer sustancia que interactúe a su vez con el tensoactivo, como se supone que ocurre con EDTA, genera una variación en la altura del nuevo pico, posiblemente al modificar la exposición de los grupos hidrofóbicos a MC 540 (Krasne 1980).

Como se muestra en la tabla XX, al agregar EDTA a MC 540-NaDBS o MC 540-Tergitol se produce una modificación en la absorbancia. Por otro lado, que los valores de absorbancia obtenidos para MC 540-Tergitol sean más elevados que los correspondientes a MC 540-NaDBS es probablemente debido a la interacción más débil en el segundo par (MC 540-NaDBS) producida por la repulsión culómbica entre cargas de igual signo (Dodin et al. 1987).

Una manera de analizar esta variación de la absorbancia, es estableciendo el cociente $A/556 : A/502$ (ó $A/564 : A/502$), y observar su variación en función del aumento de la relación Tensoactivo:EDTA (ver Tabla XX).

Para el caso de NaDBS, se puede ver cómo al aumentar la relación NaDBS/EDTA el cociente 556/502 disminuye hasta mantenerse básicamente constante y en el orden de la absorbancia obtenida para la interacción NaDBS-MC 540. Este comportamiento es concordante con lo esperado en función de la interacción EDTA-NaDBS planteada inicialmente, y la consiguiente mayor la exposición de los grupos hidrofóbicos interiores de las micelas del NaDBS a la merocianina, provocada por la presencia de EDTA. Por otro lado, el que justamente se observe un valor notablemente mayor para la relación 556/502 cuando la relación es 1:1, es decir la máxima concentración de EDTA, se debería a su vez al efecto de un aumento del momento dipolar del medio al que la MC 540 es sumamente sensible (Dodin et al. 1987).

En el caso de Tergitol, se puede observar cómo solamente para las dos primeras relaciones Tergitol-EDTA el valor del cociente 564/502 es menor -que el correspondiente para detergente:MC 540-, cabe plantearse un efecto protector más que de exposición, posiblemente relacionado con la ausencia de grupos cargados en el tensoactivo; mientras que el resto presenta valores constantes equivalentes a las del tensoactivo puro.

TABLA XVIII

RESULTADOS OBTENIDOS CON CTABr

a. - EDTA/Cu = 0,50	b. - EDTA/Cu = 0,75
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0760 2.- 0,0732 3.- 0,0685</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0726$ $S_R = 0,0038$ ----> % CV = 5,2</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0827 2.- 0,0798 3.- 0,0785</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0803$ $S_R = 0,0022$ ----> % CV = 2,7</p>
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,0734$</p> <p>$(\bar{x}_R + x_C) / 2 = 0,0730$ $S_{RC} = 0,0006$ ----> % CV = 0,8</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,0846$</p> <p>$(\bar{x}_R + x_C) / 2 = 0,0825$ $S_{RC} = 0,0030$ ----> % CV = 3,7</p>
c. - EDTA/Cu = 1,00	d. - EDTA/Cu = 1,50
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0907 2.- 0,0923 3.- 0,0971</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0933$ $S_R = 0,0028$ ----> % CV = 0,75</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0980 2.- 0,0983 3.- 0,1005</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0987$ $S_R = 0,0011$ ----> % CV = 1,1</p>
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,0947$</p> <p>$(\bar{x}_R + x_C) / 2 = 0,0940$ $S_{RC} = 0,0007$ ----> % CV = 0,75</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,1000$</p> <p>$(\bar{x}_R + x_C) / 2 = 0,0995$ $S_{RC} = 0,0006$ ----> % CV = 0,6</p>

TABLA XIX

RESULTADOS OBTENIDOS CON NaDBS Y TERGITOL

NaDBS	Tergitol
a. - EDTA/Cu = 0,50	a. - EDTA/CU = 0,50
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0280 2.- 0,0320 3.- 0,0353</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0317$ $S_R = 0,0026 \text{ ----> } \% \text{ CV} = 8,2$</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0380 2.- 0,0349 3.- 0,0358</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0362$ $S_R = 0,0013 \text{ ----> } \% \text{ CV} = 3,6$</p>
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,0153$</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,0122$</p>
b. - EDTA/Cu = 0,75	b. - EDTA/Cu = 0,75
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0418 2.- 0,0409 3.- 0,0415</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0414$ $S_R = 0,0004 \text{ ----> } \% \text{ CV} = 1,0$</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0454 2.- 0,0494 3.- 0,0456</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0469$ $S_R = 0,0018 \text{ ----> } \% \text{ CV} = 3,8$</p>
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,0076$</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,0088$</p>

TABLA XIX (continuación)

NaDBS	Tergitol NPX
c. - EDTA/Cu = 1,00	c. - EDTA/Cu = 1,00
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0515 2.- 0,0495 3.- 0,0517</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0509$ $S_R = 0,0012 \text{ ----> } \% \text{ CV} = 2,4$</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0607 2.- 0,0560 3.- 0,0586</p> <p>$\bar{x}_R = 0,0584$ $S_R = 0,0024 \text{ ----> } \% \text{ CV} = 2,9$</p>
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,0000001$</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ calculados</p> <p>$x_C = 0,0054$</p>

Nomenclatura: (Kolthoff 1979, cap. 16)

$$S = \left(\left[\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(N - 1)} \right] \right)^{1/2} = \text{desviación estándar para pocas mediciones.}$$

N = número de mediciones realizadas

$$\% \text{ CV} = (S / \bar{x}) \times 100 = \text{coeficiente de variación porcentual}$$

\bar{x} = media aritmética.

TABLA XX

**ESTUDIO ESPECTROSCOPICO DE LA INTERACCION
EDTA-NaDBS Y EDTA-TERGITOL**

Relación NaDBS/EDTA	A ₅₀₂	A ₅₅₆	A ₅₅₆ / A ₅₀₂
1,0	0,156 ± 0,003	0,536 ± 0,007	3,40
5,0	0,181 ± 0,004	0,498 ± 0,012	2,76
10,0	0,204 ± 0,014	0,500 ± 0,018	2,42
50,0	0,210 ± 0,005	0,420 ± 0,010	2,00
100,0	0,219 ± 0,011	0,415 ± 0,011	1,89
NaDBS/MC540 (1:1)	0,177 ± 0,012	0,375 ± 0,024	2,12
MC 540 0,01 ppm	0,266 ± 0,025	0,127 ± 0,015	0,48
EDTA/MC540 (1:1)	0,305 ± 0,012	0,146 ± 0,015	0,48

Relación Tergitol/EDTA	A ₅₀₂	A ₅₆₄	A ₅₆₄ / A ₅₀₂
1,0	0,245 ± 0,006	0,558 ± 0,017	2,27
5,0	0,235 ± 0,003	0,592 ± 0,009	2,52
10,0	0,223 ± 0,004	0,617 ± 0,015	2,77
50,0	0,209 ± 0,010	0,581 ± 0,009	2,78
100,0	0,212 ± 0,005	0,586 ± 0,020	2,76
Terg./MC540 (1:1)	0,214 ± 0,011	0,592 ± 0,010	2,77
MC 540 0,01 ppm	0,266 ± 0,025	0,106 ± 0,009	0,40
EDTA/MC 540 (1:1)	0,305 ± 0,012	0,125 ± 0,015	0,41

(valores medios para al menos tres determinaciones en cada caso)

2.4.1.1. CONCLUSIONES.

1. La buena correlación encontrada entre los resultados experimentales y los valores calculados, convalidan por un lado, los supuestos adoptados para la deducción, y por el otro confirman la selectividad de la metodología para la separación de iones según el signo de su carga.

2. Con la ayuda de merocianina, fué posible demostrar la interacción entre EDTA y los tensoactivos NaDBS y Tergitol NPX, situación que al quedar aclarada convalida los supuestos iniciales sobre la especificidad del fraccionamiento por espumas para desarrollar estudios de especiación.

3. En cuanto a su aplicabilidad para la recuperación de metales en efluentes líquidos, es un tema a profundizar fundamentalmente en lo que se refiere a su aislamiento final de la solución concentrada obtenida al producirse el colapso de la espuma, por electrodeposición catódica del mismo, sea destruyendo materia orgánica por ataque ácido-oxidante, o, si se encuentra un potencial de depósito adecuado, directamente a partir de la espuma licuada.

2.4.2. APLICACION DEL FRACCIONAMIENTO POR ESPUMAS AL ESTUDIO DE LA ESPECIACION DE Cu(II) FRENTE A LIGANDOS NATURALES (AF) EN MEDIO NEUTRO.

2.4.2.1. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL AF "K&K":

Una vez corroborado el fraccionamiento por espumas como herramienta analítica adecuada para estudiar la especiación de cobre, en bajas concentraciones, frente a ligandos orgánicos; el objetivo fundamental del grupo de experiencias que se presentan a continuación es completar el estudio iniciado sobre el comportamiento del Cu(II) frente a ligandos inorgánicos, al incorporar ligandos orgánicos naturales.

En este sentido, y dado que los ácidos fúlvicos (AF) son considerados como el grupo de complejantes de origen natural responsable principal de la Capacidad Complejante, en fase acuosa (0,45 μm), de los cuerpos de agua dulce (Cabaniss y Shuman 1988, Mac Carthy y Suffet 1989), se decidió aplicar el fraccionamiento por espumas a un sistema que mantenga el pH y la fuerza iónica de Río Santiago, para distintas relaciones AF/Cu(II).

Se comenzó utilizando un ácido fúlvico aislado de una mezcla comercial de sustancias húmicas (SH) provista por la firma "ICN Biomedicals, K & K Labs" (lote N° 04686 X), de composición centesimal y picos ^{13}C -NMR bien definidos y característicos de las sustancias húmicas (ver tabla XXI), y sobre la fracción de AF (cuyo procedimiento de aislamiento será descrito más adelante en el punto 3.3.) se determinó su capacidad complejante, su acidez total y su espectro IR (las metodologías utilizadas serán descritas luego en los puntos 3.2.4., 3.2.2. y 3.2.3.1. respectivamente), cuyos valores se muestran en la tabla XXI.

Una vez conocida su capacidad complejante para Cu(II) (milimoles de Cu(II) unidos por gramo de AF) a pH 7,40, fué posible diseñar el experimento aplicando la metodología habitual del fraccionamiento por espumas (como fuera expresada anteriormente en el punto 2.2.4.), a situaciones donde la relación AF/Cu adopta para cada ensayo, valores comprendidos entre 0,50 y 2,00.

Como es habitual, se obtienen tres valores de Cu (II) recuperado que se suman conformando el Cu (II) recuperado total, Cu(II)_T, (tablas XXII, XXIII Y XXIV) y un valor de Cu (II) remanente en el balón inferior luego del procedimiento completo.

Esta metodología se aplicó por triplicado para cada tensoactivo en las distintas relaciones AF/Cu, los valores obtenidos son presentados en las tablas XXII, XXIII y XXIV.

ANALISIS DE LOS RESULTADOS.

En el caso de CTABr se observa una clara correlación lineal entre el aumento en la concentración relativa de AF y el de recuperación de Cu(II) como especie aniónica,

- FA/Cu = 0,00 (s/AF):	% Cu recuperado = 53,0
- FA/Cu = 0,50	% Cu recuperado = 70,3
- FA/Cu = 1,00	% Cu recuperado = 83,7
- FA/Cu = 2,00	% Cu recuperado = 99,5

(para el valor de Cu recuperado sin AF, fueron utilizados los resultados obtenidos en los experimentos anteriores de especiación con NaCl 7 mM, tabla XI)

No ocurre lo mismo para los otros dos tensoactivos, es más se observa que la recuperación de Cu(II) en ambos casos se mantiene básicamente constante frente a las distintas relaciones AF/Cu, de donde se puede inferir que no existe una dependencia, esto es que no se forman especies Cu-AF positivas o sin carga en cantidades significativas.

TERGITOL NPX:

- FA/Cu = 0,00 (s/AF):	% Cu recuperado = 19,0
- FA/Cu = 1,00	% Cu recuperado = 25,0
- FA/Cu = 2,00	% Cu recuperado = 28,0

NaDBS:

- FA/Cu = 0,00 (s/AF):	% Cu recuperado = 30,5
- FA/Cu = 1,00	% Cu recuperado = 39,2
- FA/Cu = 2,00	% Cu recuperado = 42,2

A modo de confirmación, se desarrollaron corridas electroforéticas de AF sólo o asociado con Cu(II), corroborando que las especies mayoritarias formadas entre AF y Cu, a pH 7,40, son aniónicas, ya que se pudo observar la migración de varias bandas (entre 3 y 4) hacia el ánodo. Existen incluso referencias bibliográficas con resultados equivalentes (Davis y Gloor 1981, Kononova 1982 pp. 294-297, Musani-Marazovič et al. 1986, Amy et al. 1989).

Por otro lado, si se comparan los valores obtenidos en este caso con Tergitol y NaDBS con los obtenidos en ausencia de AF, es muy probable que la diferencia esté estrechamente vinculada con el grado de complejidad de los AF y del sistema utilizado para este estudio, ya que por ejemplo podrían formarse inclusive compuestos ternarios AF-Cu-Tensoactivo; de todas maneras, esta diferencia está dentro del margen de error experimental, ya que se encuentra, en el orden del 10%.

TABLA XXI

<p>A. CARACTERIZACION DE LA MEZCLA DE SH "K&K"</p> <p>Composición centesimal: 63,25 % C, 5,17 % H, 32,22 % O, 0,68 % N 4,49 % S, 0,15 % P, 22,48 % cenizas (1)</p> <p>Picos ¹³C-NMR: 0-50 (alifático saturado) (expresados 108-165 (aromático y alifático) en ppm, δ) 165-190 (carboxílico) (1)</p>	
<p>B. CARACTERIZACION DEL AF AISLADO "K&K"</p> <p>Capacidad complejante, pH 6,0, Cu(II): 3,24 mmol Cu(II)/gr AF</p> <p>Capacidad complejante, pH 7,4, Cu(II): 9,50 mmol Cu(II)/gr AF</p> <p>Acidez total: 4,65 meq./ gramo de AF</p> <p>Bandas IR (2): 3400; 2920; 1720 (grupo -COOH) (cm⁻¹) 1720 > 1640 (-COOH > -CONH) 1720 > 2920 (-COOH > -C=O)</p>	
<p>(1) Malcolm 1986.</p> <p>(2) ver en 3.2.3.1.</p>	

TABLA XXII

Resultados obtenidos con CTABr:

a. - AF/Cu = 2,00	b. - AF/Cu = 1,00
<p>★ μmoles Cu (II)τ recuperados</p> <p>1.- 0,0957 2.- 0,0988 3.- 0,1040</p> <p>\bar{x} = 0,0995 S = 0,0042 ----> % CV = 4,2</p>	<p>★ μmoles Cu (II)τ recuperados</p> <p>1.- 0,0829 2.- 0,0868 3.- 0,0815</p> <p>\bar{x} = 0,0837 S = 0,0028 ----> % CV = 3,3</p>
<p>★ μmoles Cu (II)τ remanentes</p> <p>EN TODOS LOS CASOS < 0,0050</p>	<p>★ μmoles Cu (II)τ remanentes</p> <p>1.- 0,0144 2.- 0,0173 3.- 0,0173</p> <p>\bar{x} = 0,0163 S = 0,0017 ----> % CV = 10,3</p>

TABLA XXII
Resultados obtenidos con CTABr (continuación):

c. - AF/Cu = 0,50	
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0737 2.- 0,0672 3.- 0,0693</p> <p>\bar{x} = 0,0701 S = 0,0033 ----> % CV = 4,7</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ remanentes</p> <p>1.- 0,0283 2.- 0,0318 3.- 0,0288</p> <p>\bar{x} = 0,0296 S = 0,0019 ----> % CV = 6,4</p>

TABLA XXIII
Resultados obtenidos con NaDBS:

a. - AF/Cu = 2,00	b. - AF/Cu = 1,00
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0459 2.- 0,0409 3.- 0,0440</p> <p>\bar{x} = 0,0436 S = 0,0025 ----> % CV = 5,8</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0421 2.- 0,0367 3.- 0,0389</p> <p>\bar{x} = 0,0392 S = 0,0027 ----> % CV = 6,9</p>
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ remanentes</p> <p>1.- 0,0612 2.- 0,0576 3.- 0,0586</p> <p>\bar{x} = 0,0591 S = 0,0019 ----> % CV = 3,1</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ remanentes</p> <p>1.- 0,0617 2.- 0,0610 3.- 0,0592</p> <p>\bar{x} = 0,0606 S = 0,0013 ----> % CV = 2,2</p>

TABLA XXIV

Resultados obtenidos con Tergitol:

a. - AF/Cu = 2,00	b. - AF/Cu = 1,00
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}_{\tau}$ recuperados</p> <p>1.- 0,0292 2.- 0,0284 3.- 0,0263</p> <p>\bar{x} = 0,0280 S = 0,0015 ----> % CV = 5,4</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}_{\tau}$ recuperados</p> <p>1.- 0,0234 2.- 0,0257 3.- 0,0247</p> <p>\bar{x} = 0,0246 S = 0,0012 ----> % CV = 4,7</p>
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}_{\tau}$ remanentes</p> <p>1.- 0,0748 2.- 0,0684 3.- 0,0722</p> <p>\bar{x} = 0,0718 S = 0,0032 ----> % CV = 4,5</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}_{\tau}$ remanentes</p> <p>1.- 0,0761 2.- 0,0747 3.- 0,0753</p> <p>\bar{x} = 0,0754 S = 0,0007 ----> % CV = 1,0</p>

Nomenclatura: idem tablas XVIII y XIX (Kolthoff 1979, cap. 16)

2.4.2.2. Resultados obtenidos con el AF "Saladero".

En este caso se aplica el fraccionamiento por espumas al estudio de la asociación entre Cu(II) y AF aislado de las aguas de Río Santiago a pH neutro. La caracterización completa de dicho AF y la metodología aplicada para su aislamiento se encuentran descritas más adelante (punto 3.4). La capacidad complejante para Cu(II) y pH 7,4, en este caso vale 3,23 mmol/gramo.

La metodología aplicada es equivalente a la utilizada en la experiencia anterior con AF "K&K". Se realizaron como primera medida las experiencias correspondientes a las relaciones AF/Cu 0,5 y 1,0 con CTABr, y, al observarse un comportamiento similar al encontrado con el AF K&K (tabla XXV), se consideró redundante continuar con las otras relaciones y con los otros tensoactivos.

TABLA XXV

Resultados obtenidos con CTABr:

c. - AF/Cu = 0,50	d. - AF/Cu = 1,00
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0431 2.- 0,0443</p> <p>\bar{x} = 0,0437</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ recuperados</p> <p>1.- 0,0752 2.- 0,0814</p> <p>\bar{x} = 0,0783</p>
<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ remanentes</p> <p>1.- 0,0675 2.- 0,0639</p> <p>\bar{x} = 0,0657</p>	<p>★ $\mu\text{moles Cu (II)}\tau$ remanentes</p> <p>1.- 0,0247 2.- 0,0192</p> <p>\bar{x} = 0,0219</p>

2.4.2.3. CONCLUSIONES:

1. Como era de esperar, cuando la cantidad de AF es suficiente, todo el cobre presente se encuentra asociado con éste, formando una(s) especie(s) aniónica(s) que es cuantitativamente extraída(s) por el tensoactivo catiónico.

2. Por otro lado, como en el caso anterior con EDTA, que los AF, independientemente de su origen, mantengan una dependencia casi lineal entre las proporciones relativas y la cantidad de Cu(II) asociado, señala una buena estabilidad de estos compuestos, la que se hace aún más evidente cuando se calcula en función de los resultados experimentales (al titular AF con Cu(II) y un adecuado sistema de cálculo) la constante de asociación que caracteriza al complejo Cu(II)-AF; esta discusión y los resultados correspondientes será retomada más adelante en el punto 3.4.7.

Los otros tensoactivos, presentan un nivel basal que se mantiene aproximadamente constante para las sucesivas relaciones AF/Cu, de lo que se deduce que el único tipo de especie predominante es el aniónico.

3. Por último, y como para comenzar a presentar un análisis que reaparecerá en los próximos puntos y fundamentalmente en la parte referida a los ensayos de toxicidad y predicciones de impacto, estos resultados muestran que si la concentración de AF es superior a la necesaria para mantener una relación 1:1 con la concentración de Cu(II) la asociación es cuantitativa (99,5 % para 2:1 y 80-85 % para la 1:1) y éste se encuentra unido al AF y sus propiedades ya no se corresponden con las del ion libre.

2.4.3. RECUPERACION DE Cu(II) CTABr, NaDBS Y TERGITOL FRENTE A AGUA DULCE AGUA NATURAL FILTRADA, Y AGUA DULCE NATURAL ACIDIFICADA A pH < 2 Y FILTRADA.

Conocido el comportamiento de Cu(II) frente a AF en un agua sintética a pH 7,40, se pretende ahora contrastar estos resultados con aquéllos que provengan de aplicar el fraccionamiento por espumas a las mismas aguas de Río Santiago, filtradas, para confirmar el peso en la especiación de Cu(II) de la presencia de AF en el medio natural.

El agua en cuestión es extraída de la misma zona de donde fué aislado el AF Saladero, cuyas características fisicoquímicas se presentan en la tabla XXXI (3.4.1.).

El filtrado del agua natural, por membrana de 0,45 μm de poro, se adopta como límite entre la fase "disuelta" y la fase en suspensión (o particulada). Por otro lado si antes de filtrar se acidifica a pH entre 1,7 y 2,0, la materia orgánica que permanece en solución está constituida fundamentalmente por ácidos fúlvicos (este tópico se retomará luego en el punto 3.3). El objetivo de estos ensayos es comparar qué ocurre al aplicar el fraccionamiento por espumas al agua con toda la materia orgánica disuelta (COD) y un agua en la que sólo permanecen AF como representantes del COD.

Se siguen respetando las condiciones de operación especificadas previamente: se parte de una concentración de Cu(II) 0,1 μ M y se reemplaza la solución 7 mM de NaCl por un litro de agua natural filtrada llevando todo a pH = 7,40.

También en este caso, se obtienen tres valores de Cu (II) en las respectivas fracciones de espuma licuadas, que se suman conformando el Cu (II) recuperado total (tablas XXVI, XXVII y XXVIII) y un valor de Cu (II) remanente en el balón inferior luego del procedimiento completo.

Esta metodología se aplicó por duplicado para cada tensoactivo en las distintas relaciones AF/Cu, los valores obtenidos con cada tensoactivo son promediados (tablas XXVI, XXVII y XXVIII).

Se presentan también en la tabla XXIX los valores de Cu(II) recuperado, obtenidos con CTABr, a partir del agua filtrada "entera" (con toda la materia orgánica disuelta) .

ANALISIS DE LOS RESULTADOS:

RESULTADOS GENERALES: PROMEDIO %Cu(II) TOTAL RECUPERADO:

- * CTABr: 47,5 %
- * NaDBS: 33,7 %
- * Tergitol: 24,8 %

Tanto en los ensayos con agua entera, como en el caso del agua acidificada y luego filtrada (es decir donde la materia orgánica disuelta está compuesta fundamentalmente por AF), contrasta el porcentaje obtenido de especies aniónicas (cercano al 50%) no sólo con respecto a la obtenida con agua dulce sintética (65%), sino y fundamentalmente, con respecto a la correspondiente a las experiencias realizadas con AF (80-85% para AF/Cu 1/1 y 95-100% para AF/Cu 2/1).



Estos resultados llaman la atención dado que, si se tiene en cuenta que la concentración promedio de AF en el agua de Río Santiago es de unas 15 ppm (calculada por comparación entre la absorción a 254 nm del agua filtrada y patrones de AF, ver tabla XXXI), por lo tanto superior en unas 20-30 veces la utilizada en las anteriores experiencias con AF, se esperaría, en principio, una recuperación cuantitativa de Cu(II).

Más allá de la complejidad del sistema utilizado, existe una situación particular que es necesario tener presente; se trata de la naturaleza anfipática de las sustancias húmicas (SH), que se pone de manifiesto por ejemplo al aumentar la solubilidad en fase acuosa de sustancias no polares, como plaguicidas clorados o hidrocarburos policíclicos, al permitir su "disolución" en la microfase orgánica presente en la zona central hidrofóbica de las SH (Kile y Chiou 1989, Leenheer et al. 1989).

Otro ejemplo de dicha propiedad, se encuentra en la capacidad de las SH de formar agregados de tipo micelar, que se mantienen en suspensión a partir de una concentración crítica, que normalmente se encuentra en el orden de los 100-300 mg/L según sean AF o AH, el pH, la fuerza iónica del medio, los contraiones presentes y el solvente utilizado (Beckett et al. 1989, Kile y Chiou 1989, Leenheer et al. 1989).

En este sentido, cuando las concentraciones de AF son bajas, o al menos menores en uno a dos órdenes de magnitud que la de CTABr, AF sólo actúa como complejante de Cu(II), sin interactuar de manera significativa con el tensoactivo catiónico como para producir una modificación importante de sus propiedades.

Cuando las concentraciones respectivas son equivalentes, la interacción se hace importante, y por lo tanto, podrían llegar a formarse micelas mixtas (donde la carga externa es la suma de sus componentes, negativas y positivas), originando en consecuencia una disminución de la carga superficial positiva, y en algunos casos pudiendo llegar a neutralizarla originándose la precipitación de las mismas, como se ha observado en distintas

experiencias realizadas con mezclas de detergentes de cargas opuestas (Chang y Rosano 1986). De hecho, se encuentran en la bibliografía estudios sobre la interacción entre ácidos húmicos y CTABr, donde en función de la relación CTABr/AH, del pH y la fuerza iónica, se observa la formación de suspensiones, precipitados y redisolución de estos últimos (De Nobili et al. 1989).

Si bien la relación utilizada en el experimento desarrollado con el agua natural se mantiene en tres órdenes de magnitud por debajo de la relación crítica, indudablemente, y en función de los resultados obtenidos, el grado de interacción entre AF y CTABr es lo suficientemente importante como para generar esta respuesta inesperada.

Con respecto a los otros dos tensoactivos, los resultados obtenidos para la recuperación de Cu(II) se mantienen dentro de los límites del error de la metodología y son coincidentes con los encontrados previamente en el estudio de la especiación de Cu(II) con AF.

TABLA XXVI

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL AGUA ACIDIFICADA (pH<2) Y FILTRADA CON CTABr

Corrida	vol.espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1 A	0,34	0,0218	21,8	838 x
2 A	0,31	0,0194	19,4	1141 x
3 A	0,27	0,0119	11,9	372 x
1 B	0,19	0,0148	14,8	644 x
2 B	0,22	0,0223	22,3	719 x
3 B	0,27	0,0097	9,7	285 x

Corrida	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
A	0,0506 μ M (48,8 %)	0,0531 μ M (51,2 %)
B	0,0597 μ M (56,22%)	0,0466 μ M (43,8 %)

Recuperación promedio de Cu (II): 47,5 %

TABLA XXVII

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL AGUA ACIDIFICADA (pH<2) Y FILTRADA CON NaDBS

Corrida	vol.espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1 A	0,35	0,0186	18,6	531 x
2 A	0,16	0,0115	11,5	718 x
3 A	0,26	0,0044	4,4	169 x
1 B	0,47	0,0166	16,6	353 x
2 B	0,31	0,0098	9,8	316 x
3 B	0,52	0,0092	9,2	177 x

Corrida	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
A	0,0651 μ M (65,4 %)	0,0345 μ M (34,6 %)
B	0,0729 μ M (67,2 %)	0,0356 μ M (32,8 %)

Recuperación promedio de Cu (II): 33,7 %

TABLA XXVIII

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL AGUA ACIDIFICADA (pH<2) Y FILTRADA CON TERGITOL NPX

Corrida	vol.espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1 A	0,47	0,0147	14,7	313 x
2 A	0,31	0,0084	8,4	271 x
3 A	0,52	0,0076	7,6	146 x
1 B	0,24	0,0105	10,5	438 x
2 B	0,49	0,0073	7,3	149 x
3 B	0,63	0,0036	3,6	57 x

Corrida	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
A	0,0752 μ M (71,3 %)	0,0307 μ M (28,7 %)
B	0,0820 μ M (79,3 %)	0,0214 μ M (20,7 %)

Recuperación promedio de Cu (II): 24,8 %

TABLA XXIX

RESULTADOS OBTENIDOS EL AGUA FILTRADA (ENTERA) PARA CTABr

Corrida	vol.espuma licuada (ml)	μ moles Cu(II) encontrados	Recup.%	Enriquecim.
1 A	0,34	0,0258	25,8	758 x
2 A	0,31	0,0149	14,9	480 x
3 A	0,27	0,0081	8,1	300 x
1 B	0,19	0,0194	19,4	1020 x
2 B	0,22	0,0158	15,8	718 x
3 B	0,27	0,0097	09,7	359 x

Corrida	Cu (II) remanente	Cu (II) total recuperado
A	0,0554 μ M (53,2 %)	0,0488 μ M (46,8 %)
B	0,0603 μ M (57,3 %)	0,0447 μ M (42,7 %)

Recuperación promedio de Cu (II): 44,8 %

2.4.3.1. CONCLUSIONES:

1. La primera conclusión es que la elección de CTABr como tensoactivo catiónico no es la adecuada para un sistema como el acuático natural, donde el contenido en sustancias húmicas es suficiente como para generar una situación donde ocurren interacciones distintas de aquellas únicamente coulombicas, aún cuando la relación de concentraciones respectivas sea menor en unos dos a tres órdenes de magnitud al umbral de solubilidad.

2. Una primer opción para resolver esta situación sería intentar estudiar el sistema recurriendo a un tensoactivo catiónico que no interaccione con las sustancias húmicas, lo cual requeriría poner a punto nuevamente una metodología apropiada al caso, lo que excedería el objetivo de este estudio.

Otra opción alternativa, consistiría en efectuar medidas complementarias, como son la determinación de la capacidad complejante del agua de Río Santiago filtrada, por un lado; y la medida de los espectros de fluorescencia y en el visible-ultravioleta de ambos tipos de agua, por el otro.

Estas medidas darían una idea del aporte real de los AF a las propiedades del agua natural, filtrada, y permitirían por lo tanto predecir, en una primera aproximación, la especiación del Cu(II) en ella y por lo tanto el posible impacto de las distintas situaciones que podrían presentarse en el sistema estudiado, dadas sus características propias (pH, salinidad y contenido en SH, por ejemplo) y la intervención del hombre a través de las distintas actividades locales, en cuanto al aporte de metales pesados presentes en efluentes industriales que, en ocasiones, puede ir acompañado de importantes modificaciones del pH (caso del vuelco de líquidos de decapados sin neutralizar).

Se eligió esta segunda opción, y los resultados obtenidos son presentados conjuntamente con el aislamiento y caracterización de AF "Saladero" en los puntos desarrollados a continuación.

3. SUSTANCIAS HUMICAS.

3.1. DEFINICIONES Y CARACTERISTICAS GENERALES.

La expresión *sustancias húmicas* (SH) se refiere a un grupo complejo y heterogéneo de compuestos orgánicos de origen natural, normalmente de color pardo-amarillento, que pueden ser extraídos de suelos o sedimentos por ataques combinados con álcalis y sales neutras (NaOH/Na₄P₂O₇, típicamente), o bien que pueden ser aislados de cuerpos de aguas mediante distintas técnicas, como adsorción en resinas hidrofóbicas, extracción con solventes orgánicos, etc. (Bornemisza 1982, Kononova 1982 pp. 262-274, MacCarthy y Suffet 1989).

La heterogeneidad de las SH se pone de manifiesto cuando al aplicarles diversas técnicas de separación más eficientes (fundamentalmente cromatográficas) se obtienen grupos, lógicamente, de mayor homogeneidad entre sí, cada uno de ellos, pero en ningún caso estas fracciones pueden ser consideradas "puras" en el sentido estricto del vocablo, como especie química de composición definida. Es decir, las SH representan una categoría especial de productos naturales en la que su esencia es la heterogeneidad misma (MacCarthy y Suffet 1989).

La imposibilidad de definir categóricamente a las SH en términos químicos, hace necesario clasificarlas desde un punto de vista operacional; así por ejemplo, las distintas fracciones obtenidas a partir de la extracción de SH de suelo, sedimento o agua, son definidas en función de las propiedades que manifiestan a lo largo de dicho proceso de aislamiento, distinguiendo tres grandes grupos (Kononova 1982 pp. 27-59, Beckett et al. 1989, MacCarthy y Suffet 1989), a saber:

- 1.- Huminas : Residuo orgánico insoluble en agua.
- 2.- Ácidos húmicos: fracción que es soluble en agua a $\text{pH} \geq 2$ e insoluble a $\text{pH} < 2$.
- 3.- Ácidos fúlvicos: fracción remanente en solución a $\text{pH} < 2$.

En la figura 7, se presenta de forma esquemática el procedimiento habitualmente utilizado para el aislamiento de SH.

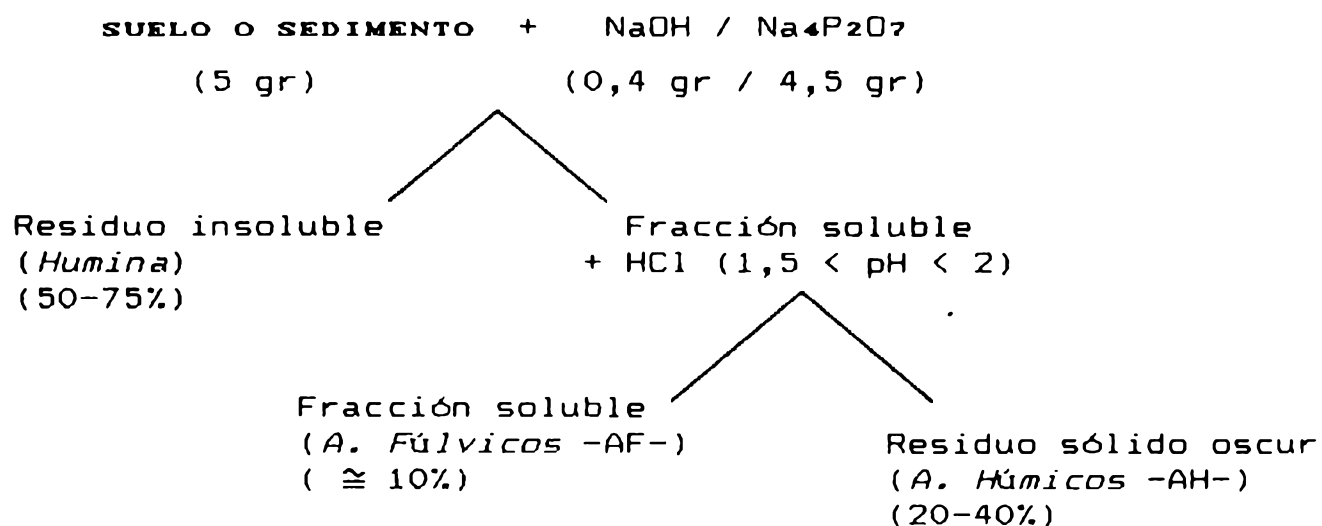


Figura 7: AISLAMIENTO Y FRACCIONAMIENTO DE LAS SH DESDE SUELO O SEDIMENTO (Kononova 1980, pp. 270-271; Bornemisza 1982).

Recientemente fué caracterizada una *humina* de origen acuático con respecto a sus principales grupos constituyentes, en función de su fraccionamiento mediante sucesivas extracciones con el solvente metilisobutilcetona (MIBC) a distintos pH (ver figura 8). La humina estaría formada por la agregación de cuatro grandes grupos de compuestos (bituminoso, lípidos unidos a la humina, ácidos húmicos unidos a la humina y residuo insoluble). Estas fracciones, a su vez, serían las responsables de ciertas propiedades características de la humina, como su hidrofobicidad (fracción bituminosa y fracción lipídica unida a la humina), su capacidad complejante sobre MP (fracción de AH unida a la humina) y su comportamiento como intercambiador de iones, del que sería responsable el residuo insoluble (Rice y MacCarthy 1989)

La fracción húmica manifiesta propiedades espectroscópicas (espectros IR y ^{13}C -RMN) similares a las de los AH aislados de agua; la fracción lipídica, por otro lado, estaría básicamente conformada por ácidos grasos de cadena alifática (con predominio de C_{16} y C_{18}), con alto grado de ramificación y saturación (entre 1 y 2 dobles enlaces por molécula). La fracción bituminosa, está

compuesta principalmente por hidrocarburos alifáticos de 16 y 33 átomos de carbono, con un predominio de alcanos con número impar -en particular de C₂₇- de átomos de carbono (característico de los hidrocarburos detríticos por degradación de biomasa, Lytle et al. 1979, Rice y MacCarthy 1989).

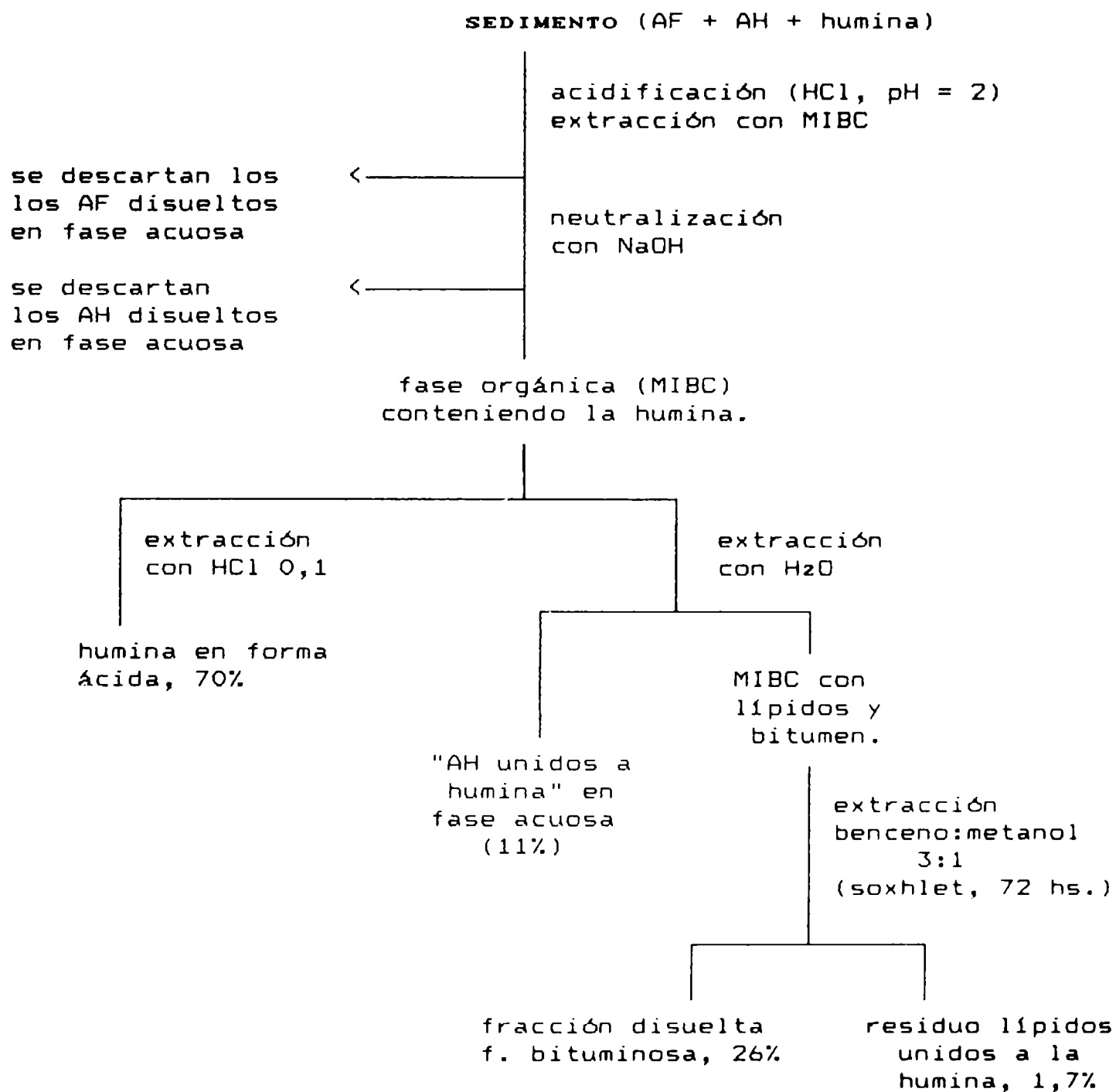


Figura 8. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA DISGREGACION DE LA HUMINA EN SUS COMPONENTES PRINCIPALES.
(Rice y Perdue 1989)

En la fracción bituminosa la presencia de ácidos grasos sería minoritaria, y de mayor peso molecular que los encontrados en la fracción lipídica. Por último, los estudios realizados sobre el residuo insoluble, mediante la aplicación de difracción con rayos X, muestran que éste se encuentra conformado por minerales de arcilla, cuarzo y feldespato (Rice y MacCarthy 1989).

Las sustancias húmicas (AF y AH en particular) son importantes componentes de la biósfera, encontrándose presentes en la mayoría de los sistemas acuáticos y terrestres; y si bien se acepta en forma generalizada que son el resultado de una combinación de procesos de degradación y condensación de productos de origen vegetal o animal, no se conocen con certeza los mecanismos involucrados en su génesis (Bornemisza 1982, Kononova 1982 pp. 64-105 y 157-174, Beckett et al. 1989, MacCarthy y Suffet 1989).

Juegan un papel crucial en muchos procesos biogeoquímicos como lo son el transporte, almacenamiento y reactividad de distintas especies químicas, orgánicas e inorgánicas, a nivel de trazas. Una de sus propiedades más características es la capacidad para el intercambio de cationes. Esta propiedad se manifiesta, por un lado, en su marcada afinidad por los metales pesados; por ejemplo, para el logaritmo de la constante condicional de asociación Cu-AF se dan valores de entre 4 y 8, según el pH. Por otro lado, dicha capacidad determina la condición de fertilidad de los suelos, mediante la regulación de los niveles de disponibilidad de micronutrientes y del equilibrio ácido-base. (Bornemisza 1982, Kononova 1982 pp. 111-148, Saar y Weber 1982, McCarthy 1989, MacCarthy y Suffet 1989).

En el medio acuático, recientemente se profundizaron los estudios sobre las SH, ya que por un lado, se ha comprobado que al clorar aguas con alta carga de materia orgánica se generan millares de precursores de compuestos halogenados de conocida actividad mutagénica, como los trihalometanos (HCCl₃, HCB₃,

HCB₂Cl y HCB₂Cl₂ fundamentalmente), de los que se conoce con certeza que el cloroformo es carcinogénico para ratas y ratones (Bull et al. 1982); y que lo mismo sucede al agregar cloro a soluciones o dispersiones de sustancias húmicas, AH en particular (Collins et al. 1986, MacCarthy y Suffet 1989, Wolfe 1990).

Por otro lado, a raíz de su capacidad complejante, desempeñan un papel protágónico en la biodisponibilidad de los metales pesados (MP) para las especies vivas, al modificar la especiación de muchos de ellos (Pb(II), Hg(II), Cu(II), Al(III)), fundamentalmente en aguas dulces (Demayo y Taylor 1981, Laegreid et al. 1983, McCarthy 1989, MacCarthy y Suffet 1989). Incluso, muchas veces se encuentran formando películas alrededor de sólidos en suspensión, controlando de esta manera las propiedades superficiales de dichas partículas como su carga y los equilibrios de adsorción de los MP y compuestos orgánicos entre la superficie del sólido (en suspensión o sedimentado) y la solución (Salomons y Förstner 1984, Allan 1986, Beckett et al. 1989).

Se ha observado también que la presencia de sustancias húmicas en la fase acuosa favorece la disolución de sustancias orgánicas poco polares, como hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas organoclorados o bifenilos policlorados. En realidad no se trataría de una solución verdadera, ya que las SH se encontrarían formando estructuras de tipo micelar; y es en tal sentido que se propone una partición de las sustancias hidrofóbicas en la microfase orgánica formada por la zona central hidrofóbica de las SH, fundamentalmente los AH (Grant et al. 1987, Kile y Chiou 1989).

3.2. PROPIEDADES MAS IMPORTANTES.

Las propiedades más relevantes de las SH, características de su naturaleza polielectrolítica y macromolecular, son su comportamiento ácido-base (típicamente el de un poliácido), su capacidad complejante, con gran afinidad por ciertos MP como

Cu(II), Pb(II) y Hg(II), y su naturaleza anfipática, que le permite favorecer la solubilización de compuestos no polares (Ryan y Weber 1982 a, Marinsky y Ephraim 1986, Kile y Chiou 1989, Leenheer et al. 1989).

3.2.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICION:

Hasta la fecha no se conoce detalladamente la estructura química de las SH, fundamentalmente debido a su heterogeneidad intrínseca. Sin embargo, a través de la degradación de AF y AH, por oxidación con KMnO_4 , Cl_2 u CuO , o mediante su hidrólisis alcalina, por un lado, y el uso de CGL/EM, o la determinación de su espectro ^{13}C -RMN y ^1H RMN, por el otro, ha sido posible inferir los grupos funcionales más importantes y las estructuras dominantes (Wershaw et al. 1981, Kononova 1982 pp. 31-59, Buddrus et al. 1989, Sonnenberg et al 1989).

Según los resultados obtenidos en dichos estudios, las SH contarían básicamente con un esqueleto principal constituido por estructuras policíclicas de anillos bencénicos, furanósicos e incluso del tipo de piridina, unidos a través de cadenas cortas (de 4 a 6 átomos de carbono), con una gran cantidad de ciclos simples multisustituídos asociados con grupos funcionales cetonas, carboxílicos, alcohólicos, metoxilos, éteres, etc. Sobre este esqueleto se incorporarían grupos de hidrocarburos alifáticos, de carbohidratos o polipeptídicos (Wershaw et al. 1981, Kononova 1982 pp. 31-59, Buddrus et al. 1989, Sonnenberg et al. 1989).

Un ejemplo de estas "estructuras base" propuestas se muestra en la figura 9.

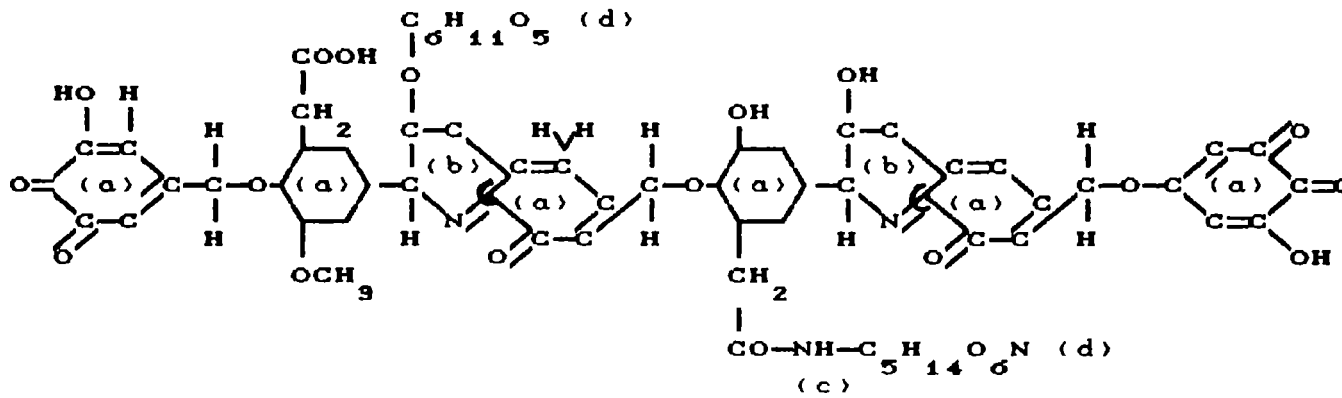


Figura 9: MODELO DE ESQUELETO PARA ACIDOS HUMICOS

(Kononova 1982 pp. 42):

- (a).- Núcleo aromático de tipo fenólico, con dos o tres átomos de oxígeno, algunos en forma quinónica.
- (b).- Nitrógeno cíclico (tipo piridínico).
- (c).- Nitrógeno en cadenas laterales.
- (d).- Restos de carbohidratos "N" sustituidos.

La mayor solubilidad de los AF, con respecto a los AH, quedaría explicada en función de su menor peso molecular (entre 800 y 2000 daltons), la presencia de cadenas de carbono de menor longitud (Visser 1983, MacCarthy y Suffet 1989), su menor aromaticidad, expresada como la relación entre el área del pico 108-165 ppm de espectro ¹³C-RMN -correspondiente al carbono aromático- y el área total del espectro (Malcolm y MacCarthy 1986) y la mayor proporción de oxígeno (Visser 1983, MacCarthy y Suffet 1989).

En el ambiente acuático, los AF se presentan como un grupo más homogéneo que los AH, o al menos menos polidispersos, según resulta de su fraccionamiento por ultrafiltración con membranas de distinto poro (entre 100 000 y 1000 daltons de peso molecular nominal) o por métodos cromatográficos desde capa fina a los más sofisticados como "field-flow fractionation" (FFF) (Visser 1983, Becket et al. 1989, Leenheer et al. 1989). Este último procedimiento, se encuentra relacionado con los métodos cromatográficos, pero mientras la cromatografía, aprovecha la diferente afinidad de los componentes

de una mezcla por las fases estacionaria para lograr su separación, el FFF reemplaza la fase estacionaria por un campo o gradiente externo (campo eléctrico, magnético o gravitacional; gradiente de temperatura) perpendicular al sentido de flujo de la fase móvil, obteniéndose así un sistema de una gran capacidad resolutive. Es muy útil para resolver sistemas de gran complejidad, para macromoléculas, sistemas de partículas, etc. (Giddings 1988, Beckett et al. 1989).

Comparativamente con los AH presentes del suelo, los AH acuáticos se caracterizan por ser menos aromáticos, poseer un peso molecular más bajo (entre 2000 y 5000 daltons) y un mayor contenido de oxígeno (Visser 1983, Malcolm y MacCarthy 1986, MacCarthy y Suffet 1989).

En cuanto a AF aislados de aguas subterráneas, exhiben (al igual de lo que sucede con la proporción de isótopos del S en los $\text{SO}_4^{=}$) la particularidad de constituir materiales que permiten (por contenido en ^{14}C) la datación de aguas de distinto origen, entre 1270 y 5250 años; se ha podido observar, también, pequeñas variaciones en la composición, encontrándose que aquéllos más antiguos poseen un menor contenidos en oxígeno y nitrógeno y mayor relación COOH/OH ; y que además ofrecen más alta resistencia a la degradación, razón por la cual se los propone como adecuados indicadores de la edad de las aguas subterráneas. Aparte de estas características, presentan propiedades análogas a las de los AF aislados de aguas superficiales (Pettersson et al. 1989).

Se ha observado que la composición y la concentración de las SH disueltas puede modificarse estacionalmente y en función de las precipitaciones pluviales (fundamentalmente en lagos o zonas ribereñas), y de las características propias del terreno que atraviesan, para el caso de los ríos y arroyos. De hecho, se ha comprobado que luego de lluvias intensas aumenta en aguas la concentración de las SH provenientes del suelo (Perdue y Reuter 1977, Laegreid et al. 1983, Visser 1983).

Las SH se verán modificadas estacionalmente en mayor o menor medida, en función de las características propias del cuerpo de

agua (tipo de lecho, aporte externo de materia orgánica o generación in situ, salinidad, grado de eutroficación, etc.). Por ejemplo lagos eutrofizados y con bajo contenido de carbono orgánico disuelto (COD), se verán influenciados considerablemente por los ciclos bióticos, y por lo tanto, las propiedades de las SH se verán modificadas cíclicamente (Sanders 1982, Laegreid et al. 1983, Leckie et al. 1990).

Por esta razón, la composición de las SH en los ambientes costeros o marinos se encuentran influenciadas principalmente por la producción in situ (autóctona), encontrándose incluso una gran proporción de otros ligandos orgánicos, generalmente productos generados por hongos, bacterias, algas, o fitoplancton en general, de composición definida (ácidos hidroxámicos, por ejemplo), y con una marcada capacidad para asociarse con los metales pesados (Laegreid et al. 1983, Liebezeit 1988, Wangersky et al. 1989, Sunda y Gessner 1989)

3.2.2. COMPOSICION CENTESIMAL, CARACTERISTICAS ACIDO-BASE Y GRUPOS FUNCIONALES MAS IMPORTANTES

De las aguas incoloras superficiales, aproximadamente un 50% del COD consiste en SH, mientras que en las aguas superficiales coloreadas las SH aportan al COD entre el 60 y el 95%. Típicamente, el 90 % de estas sustancias húmicas disueltas son AF y el 10% restante AH. Esta relación se encuentra revertida en suelos, donde la mayor parte de las SH son AH (Perdue y Reuter 1977, Bruchet et al. 1989, Eikebrokk et al. 1989, MacCarthy y Suffet 1989).

En particular, en un estudio realizado para determinar la influencia de las SH en los procedimientos de potabilización de aguas, se encontró que sólo un 5-15% de los compuestos orgánicos detectados con métodos cromatográficos (CGL-EM o CL-EM) se correspondían con compuestos específicos, mientras que el 85-95 % restante lo constituían SH (Bruchet et al. 1989).

Otros procedimientos más sencillos, pero no menos precisos, para conocer el aporte de SH al COD, consisten en comparar la

absorción a 250-265 nm del agua filtrada (a través de membrana de 0,45 μm de poro medio) con la de soluciones de AF de concentración conocida, o comparar los respectivos espectros de fluorescencia (Truitt y Weber 1981, Liebezeit 1988, Tambo et al. 1989). Los alcances y aplicación de los mismos serán abordados en los puntos 3.2.3.2. y 3.2.3.3.

Las sustancias húmicas se caracterizan por estar compuestas por un 50-55 % de carbono, un 3,5-5,0 % de hidrógeno, un 33-43 % de oxígeno, un 1-3 % de nitrógeno, un 1-2 % de azufre y un 0-0,6 % de fósforo. Para el caso particular de AF, se observa un cantidad relativamente mayor de oxígeno (36-43 %) y una pequeña disminución en el contenido de nitrógeno (1-2,5 %) (Malcolm y MacCarthy 1986, Kile y Chiou 1989, MacCarthy y Suffet 1989). En la tabla XXX se presentan los valores correspondientes a SH de distinto origen.

Las relaciones H/C, O/C y C/N permiten también caracterizar a las distintas SH. En general, las SH de suelo, con mayor grado de condensación, es decir mayor aromaticidad, presenta valores más pequeños para la relación H/C que las SH de agua (Visser 1983).

Por otro lado, los valores de H/C correspondientes a AF son mayores que los de AH, coincidentemente con el mayor contenido de cadenas laterales alifáticas de los primeros; en general la diferencia se acentúa en las SH provenientes de suelo (Visser 1983, Malcolm y MacCarthy 1986). La relación O/C también permite diferenciar AF de AH, encontrándose valores superiores para los primeros (Visser 1983, Malcolm y MacCarthy 1986).

Por último, también es posible caracterizar SH de origen microbiano (como representativa de las SH sintetizadas por el fitoplancton autóctono) encontrándose que presentan altos valores en la relación H/C, índice de poca condensación o aromaticidad y mayor ramificación de cadenas alifáticas, y en la relación O/C, con respecto a sus homólogos acuáticos (Visser 1983).

Todas estas relaciones y valores respectivos para AH y AF de suelo y agua, no hacen más que indicar el sentido del proceso conocido como "humificación" o maduración de los suelos, en el sentido que humificación significa un mayor grado de condensación y polimerización, es decir pérdida de cadenas laterales y aumento de la aromaticidad (Rosell et al. 1972 a, Kononova 1980).

TABLA XXX

Análisis elemental de SH de distintos orígenes						
muestra	% C	% H	% O	% N	C/N	H/C
AQUA SUPERFICIAL:						
Rio Suwannee AF (1)	54,65	3,71	39,28	0,47	195,66	1,29
Rio Suwannee AH (1)	57,24	3,94	39,13	1,08	61,83	1,21
Rio Suwannee AF (5)	59,78	4,24	40,28	0,65	96,52	1,06
Rio Suwannee AH (5)	54,22	4,14	39,00	1,21	52,28	1,09
Rio Missouri AF (6)	54,55	5,17	36,94	1,99	45,78	0,88
Rio Missouri AH (6)	52,46	5,57	39,75	2,46	24,88	0,79
Rio Ohio AF (2)	55,09	5,24	36,08	1,42	45,22	1,14
Rio Ohio AH (2)	54,99	4,84	39,64	2,24	28,64	1,06
Lago Black AF (6)	55,1	4,58	38,43	1,16	55,42	1,01
Lago Black AH (6)	55,69	4,13	35,43	1,97	32,95	1,12
AQUA SUBTERRANEA:						
LFX AF (1)	62,67	6,61	29,14	0,42	174,08	0,79
LFX AH (1)	62,05	4,92	23,45	3,21	22,55	1,05
Biscayne AF (1)	55,44	4,17	35,99	1,77	36,54	1,11
Biscayne AH (1)	58,28	3,39	30,14	5,84	11,64	1,43
SEDIMENTO:						
Rio Suwannee AF (4)	51,30	4,32	----	0,56	106,88	0,99
Marino 1 AH (4)	47,22	6,13	----	7,64	7,21	0,64
Marino 2 AH (4)	47,76	6,92	----	8,96	6,67	0,69
-SUELO:						
Sanhedron A1 AF (2)	48,71	4,36	49,35	2,77	20,51	1,07
Sanhedron A1 AH (2)	58,09	3,64	33,59	3,26	20,76	0,75
podzolico NH AF (3)	41,52	3,01	----	0,65	74,52	0,87
podzolico NH AH (3)	54,1	4,67	----	3,51	17,98	0,97
Citas: (1) Thurman y Malcolm, 1981. (2) Malcolm y MacCarthy, 1986. (3) Grant et al., 1986. (4) Grant et al., 1987. (5) Chiou et al., 1987. (6) Reckhov et al., 1990.						

A su vez, el mayor contenido en oxígeno de los AF, con respecto a los AH, se corresponde con la mayor acidez de aquéllos. En general, tanto para AH como para AF, las propiedades ácido-base derivan fundamentalmente de los grupos carboxílicos y fenólicos que componen su estructura. De todas maneras existen otros grupos funcionales minoritarios (metoxilos, oxhidrilos cercanos a grupos carbonilos, etc.) para cuyo reconocimiento es necesario recurrir a la titulación de SH en medios no acuosos (Malcolm y MacCarthy 1986, Marinsky y Ephraim 1986, Ephraim et al. 1989)

DETERMINACION DE LA ACIDEZ CARBOXILICA, FENOLICA Y TOTAL DE SH:

Debido a su naturaleza poliácida, la titulación directa en medio acuoso de SH,, aún con bases diluídas (por ejemplo NaOH 0,01 N), sólo permite establecer con cierto grado de certeza la acidez total, pero los puntos de inflexión de los grupos individuales son de ordinario poco definidos. Por este motivo, normalmente se recurre a dos estrategias alternativas para determinar el aporte particular de los grupos más importantes:

1.- La titulación potenciométrica en medio no acuoso (N-metil acetamida, dimetilformamida, etc.) utilizando bases derivadas del amonio como hidróxido de tetrabutilamonio. Por otro lado, la elección del ácido p- hidroxibenzoico como referencia interna permite una buena reproducibilidad de los datos y puntos de inflexión bien definidos (Marinsky y Ephraim 1986, Ephraim et al. 1989, Pettersson et al. 1989).

Esta metodología requiere de un trabajo cuidadoso, y una adecuada adaptación del instrumental , pero los resultados que se obtienen son mucho más reproducibles y los puntos de inflexión correspondientes a los distintos grupos quedan claramente definidos, si bien los valores resultantes dependen del compuesto que se utilice como referencia interna (Ephraim et al. 1989, Fish y Bonn 1991).

Esta es la vía de elección para determinar los grupos minoritarios. (Rossel et al. 1972 b, Marinsky y Ephraim 1986, Ephraim et al. 1989). En la figura 10 se presenta un ejemplo de este tipo de titulaciones.

2.- El agregado de acetato de calcio a una solución de SH, debido a la reactividad diferencial del grupo carboxílico con el Ca(II), y la consiguiente formación de ácido acético por el anión del reactivo con los protones liberados de los grupos carboxílicos, al intercambiar con los iones calcio, permite titular selectivamente los grupos -COOH.

Este método presenta algunas limitaciones. Por ejemplo, otros grupos ácidos fuertes, como las hidroxiquinonas, pueden reaccionar, aún en medio acético, y por lo tanto se corre el riesgo de sobredimensionar el aporte de los -COOH. Por otro lado, este método es muy sensible a los "artefactos" que afecten la cantidad de base necesaria para la titulación, por ejemplo si la remoción de los complejos formados entre el Ca(II) y los humatos no es cuantitativa, serían titulados conjuntamente con el HAc formado los grupos ácidos débiles de los AH (Fish y Bonn 1991).

Por estas razones, en realidad la denominada "acidez carboxílica" es una categoría operacional que comprende a los grupos ácidos fuertes; sin embargo, se trata de un índice reproducible de uso extendido, que permite la comparación de SH de distintos orígenes, razón por la cual es necesario especificar claramente las condiciones de trabajo (Kononova 1982 pp. 286-288, Garbarini y Lion 1986, Fish y Bonn 1991).

Por otro lado, si a la solución de SH se le agrega $Ba(CH_3COO)_2$ y se lleva el pH a 12 con NaOH, se puede determinar por diferencia con un blanco la acidez total, ya que el Ba(II) logra desplazar los protones unidos tanto al grupo carboxílico como al fenólico (Kononova 1982 pp. 286-288, Garbarini y Lion 1986, Fish y Bonn 1991). Este método, como el anterior presenta la ventaja que las SH al reaccionar con Ca o Ba precipitan y por lo tanto por filtración se los puede separar, evitándose la pérdida de definición del punto final por desplazamiento del equilibrio (Fish y Bonn 1991).

También es posible realizar una titulación exhaustiva por agregado de cationes que desplacen a los protones que permanecen unidos a SH, como Cu(II) o La(III) (Marinsky y Ephraim 1986,

Ephraim et al. 1989). Por ejemplo, por quelación del Cu(II) con AF "Suwannee" la acidez aumentó en un 25-30% (ver figura 10), el origen de esta acidez "extra" estaría en grupos ácidos muy débiles, por ejemplo oxhidrilos fenólicos vecino a un grupo carboxílico, como es el caso del ácido salicílico $pK_{COOH} = 2,97$ y $pK_{OH} = 13,4$ (Marinsky y Ephraim 1986, Weast 1981 pp. D 161-D 166)

En este trabajo se utiliza la segunda opción por carecer de la infraestructura adecuada para aplicar la primera, obteniéndose buenos resultados que pudieron ser confirmados al titular una muestra de AF patrón y obtener valores coincidentes con los de referencia. Dichos resultados se presentan, conjuntamente con la descripción metodológica en el punto 3.4.4.

En la figura 10 se presenta un ejemplo de titulación total y exhaustiva en medio acuoso (Marinsky y Ephraim 1986).

3.2.3. CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS

3.2.3.1. ESPECTRO IR

Las sustancias húmicas se caracterizan por presentar, cuando han sido convenientemente aisladas y se encuentran en la forma ácida, una importante banda de absorción ubicada aproximadamente en 1750 cm^{-1} . Se trata de la banda correspondiente al estiramiento (stretching) C=O del grupo carboxilo no salificado. La intensidad de la banda es mayor en AF que en AH, y es utilizada frecuentemente como parámetro de confirmación del grado de separación alcanzado (Malcolm y MacCarthy 1989).

Otras bandas importantes se encuentran centradas en 3400 cm^{-1} y 2920 cm^{-1} asignables a la unión O-H (carboxilos, agua, alcoholes) y al estiramiento C-H respectivamente. La presencia de las bandas: 3400 y 1750 cm^{-1} indica la presencia del grupo carboxilo (Vogel 1979, Kononova 1982 pp. 32-34 y 295-298, Grant et al. 1987, Malcolm y MacCarthy 1989).

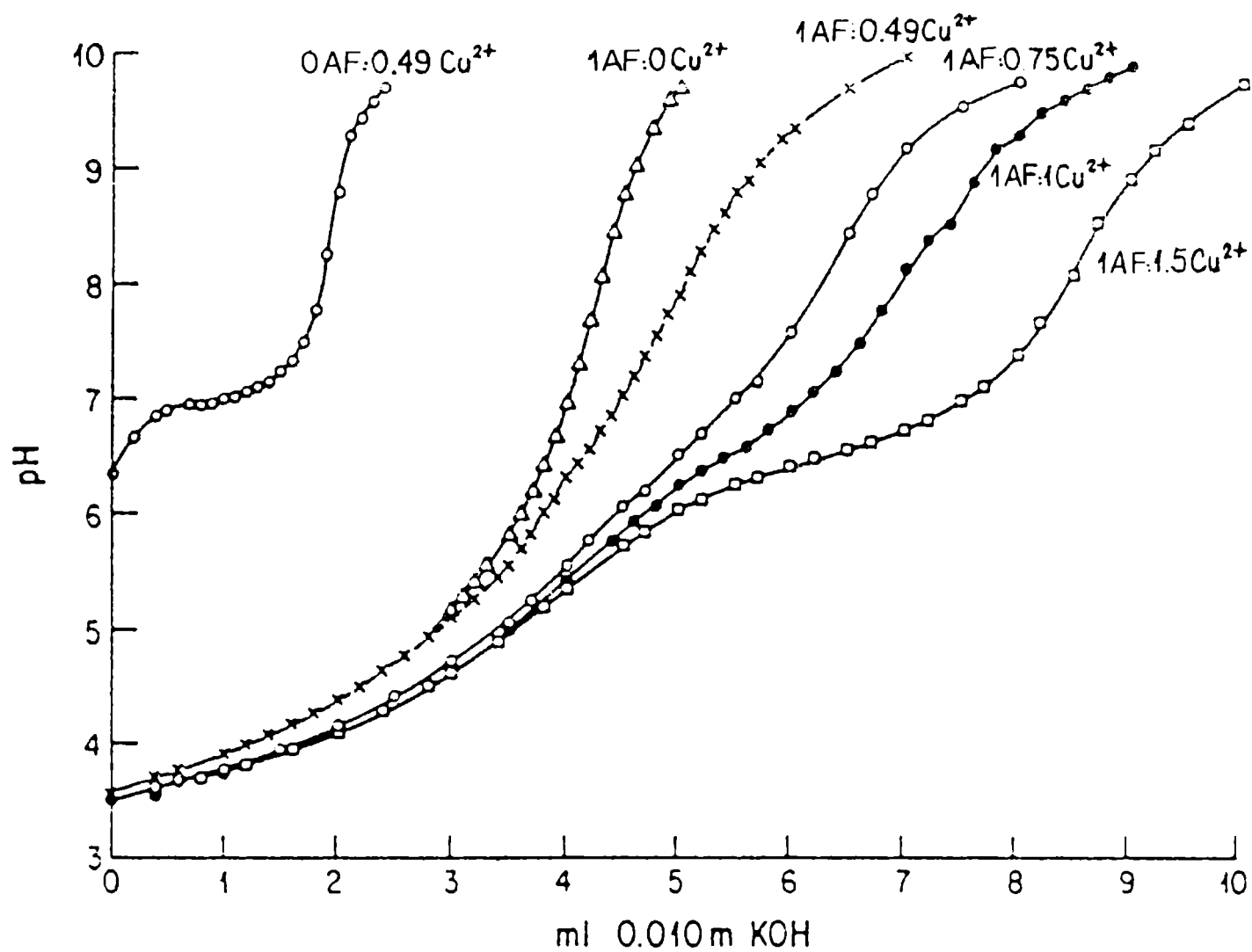


Figura 10. TITULACION POTENCIOMETRICA DEL AF "SUWANNEE" CON KOH PARA DISTINTAS RELACIONES AF/Cu(II) (Marinsky y Ephraim 1986).

Una cuarta banda característica se ubica en la zona de 1650-1575 cm^{-1} y es asignable al grupo carboxilato. Que la absorción a 1750 sea superior a la de 1650 indica que la SH se encuentra en la forma ácida y que no existen cantidades importantes de especies capaces de generar cenizas por combustión (sesquióxidos de hierro, aluminio y manganeso, silicatos amorfos y cationes intercambiables como Na, Ca, Fe y Al). Complementariamente, la presencia de óxidos de aluminio o de alúminosilicatos se pone en evidencia con la aparición de una banda de absorción en 1100 cm^{-1} (estiramiento Si-O) (Grant et al. 1987, Malcolm y MacCarthy 1989).

3.2.3.2. ESPECTRO VISIBLE-ULTRAVIOLETA:

La presencia de anillos aromáticos le confiere a las SH la capacidad de absorber intensamente en la zona del ultravioleta (con un máximo entre 230 y 260 nm), este pico es frecuentemente utilizado para detectar la presencia de SH, encontrándose por ejemplo un coeficiente de correlación de 0,987 para 4 AH de distinto origen (Grant et al. 1987).

Incluso se pudo comprobar que las fracciones de distintos SH de peso molecular entre 300 y 10 000 daltons obtenidas por FFF, presentan todas el máximo a la misma longitud de onda para cada SH (Beckett et al. 1989). Existe además, otra característica de la absorción de las SH en el UV, es la de presentar un intervalo restringido para el cociente entre COD (mg/L) y $A_{260 \text{ nm}}$, con valores comprendidos entre 30 (AH disueltos, PM > 1500-2000) y 50 (típicamente AF), concordando con los respectivos grados de aromaticidad, mayor para los AH (Tambo et al. 1989).

Esta propiedad, permite conocer las concentraciones relativas de AF en una solución por comparación de su absorbancia frente a una solución de ese AF de concentración conocida, o bien comparando con algún AF de referencia como los que provee la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (IHSS) (Ryan y Weber 1982 b, Malcolm y MacCarthy 1986, MacCarthy y Suffet 1989).

Para el caso de la determinación del contenido de SH en cuerpos de agua, la absorción en el UV no puede ser utilizado como criterio de identidad, ya que, por ejemplo, otras sustancias aromáticas podrían absorber en esta zona del espectro, de hecho la correlación entre la absorción en 260 y el COD o la capacidad complejante es fluctuante según las aguas analizadas, y el procedimiento utilizado para eliminar posibles competidores de SH (Truitt y Weber 1981, Ryan y Weber 1982 b, Liebezeit 1988).

Incluso se ha encontrado buena correlación entre absorción a 260 nm y el contenido de Fe(III), en medio neutro, por lo que debe confirmarse el dato con otras medidas complementarias como el espectro fluorescente y la medida de la capacidad complejante (Truitt y Weber 1981, Ryan y Weber 1982 b).

Una última referencia al espectro visible-ultravioleta de las SH, es la caracterización de las mismas según el valor que adopte el coeficiente que resulta del cociente entre los valores de absorción en 465 nm y 665 nm. Esta relación, conocida como E4/E6, indica el grado de condensación o polimerización alcanzado por el AH en estudio, y es independiente de las concentraciones relativas de AH en la solución y su uso se encuentra muy extendido en los estudios edafológicos (Rosell et al. 1972, Kononova 1982 pp. 276-283).

3.2.3.3. *CARACTERISTICAS FLUORESCENTES DE AF Y ESPECTROS DE EMISION*

Una muestra de agua natural, con un contenido normal de materia orgánica (entre 5 y 50 ppm de C), al ser irradiada con un haz de luz de 350-370 nm emite un espectro fluorescente característico, ancho y sin ningún rasgo particular, con un pico máximo entre 420 y 450 nm dependiendo del origen de la misma y de la longitud de onda utilizada para la excitación (Truitt y Weber 1981, Ryan y Weber 1982 b, Liebezeit 1988).

Esta propiedad de las aguas naturales, viene conferida principalmente por las SH presentes en las mismas como lo confirma

la correlación de 0,963 encontrada entre las medidas de fluorescencia y el contenido en COD para seis muestras distintas de agua dulce (Ryan y Weber 1982 b). Incluso, la emisión en la zona de 420-450 nm es utilizada frecuentemente como indicador de la distribución espacial de SH en cursos de agua (Liebezeit 1988).

En tal sentido, se ha observado que corrigiendo adecuadamente los espectros obtenidos de aguas naturales filtradas (0,45 μm) y SH aisladas, en el sentido de eliminar aquellos picos generados por fenómenos de refracción de la luz incidente -efecto Tyndall y efecto Rayleigh-, por la absorción de la luz refractada por el solvente mismo -efecto Raman- y por las λ excitación y la λ emisión, los espectros obtenidos son muy similares entre sí (Ryan y Weber 1982 b, Weber et al. 1983, Grant et al. 1986, Liebezeit 1988).

Por otro lado, y tal como ocurre con otras moléculas orgánicas, los MP y en particular sus iones paramagnéticos pueden causar una disminución ("quenching") en la intensidad de la emisión fluorescente. Esta propiedad, claramente observada al incorporar Cu (II) o Eu (III) a una solución de AF, permite estudiar las características de la asociación Cu-AF y cuantificarla, con la ventaja adicional de poder medir un parámetro afectado directamente por la asociación MP-AF. En este caso el pH es importante, ya que la capacidad complejante de los AF aumenta con la alcalinidad, como la de todo ligando de ácido débil (Saar y Weber 1980, Ryan y Weber 1982 a, Carreira et al. 1991).

CARACTERISTICAS DEL ESPECTRO DE EMISION DE AF:

Usando concentraciones en el orden de las 10-35 ppm se encuentra un espectro fluorescente, ancho y sin ningún rasgo particular, con un pico máximo centrado en 435-455 nm y que no es afectado por el O_2 ni por diferencias en la fuerza iónica (entre 0,42 mM y 75 mM de KNO_3). El efecto de cambios en el pH es poco significativo ya que en ambos casos, la emisión se hace máxima a pH 5 y disminuye lentamente con cambios del mismo en ambos sentidos (Saar y Weber 1980, Ryan y Weber 1982 a).

Por otro lado, tanto el desplazamiento del máximo de emisión que se observa al utilizar luz de excitación de mayor λ (350 \rightarrow 430 nm), como la pobre definición de su máximo, indican que se trata de una mezcla de compuestos fluorescentes y no de un compuesto único, lo que viene a confirmar la heterogeneidad propia de las SH (Parker y Rees 1962, Weber et al. 1983).

3.2.4. CAPACIDAD COMPLEJANTE Y CONSTANTE DE ASOCIACION.

De entre los distintos métodos de elección (voltametría de redisolución anódica -VRA-, electrodos selectivos para iones -ESI-, intercambio iónico, separación por diálisis, ultrafiltración, etc.), en este trabajo se utiliza la determinación del Cu(II) iónico con un electrodo selectivo para cobre (ESI-Cu).

La elección de los métodos ESI-Cu, se debe fundamentalmente tanto a su simplicidad como a su especificidad, pero fundamentalmente a la posibilidad de contar con el equipamiento adecuado, no sólo en lo que a infraestructura se refiere, sino también en cuanto a la posibilidad de contar con un sistema de cálculo adecuado para los valores de la capacidad complejante y de la constante condicional de formación, en función de los datos experimentales, provisto gentilmente por E.M. Perdue, cuyas características serán discutidas en el punto 3.4.6.

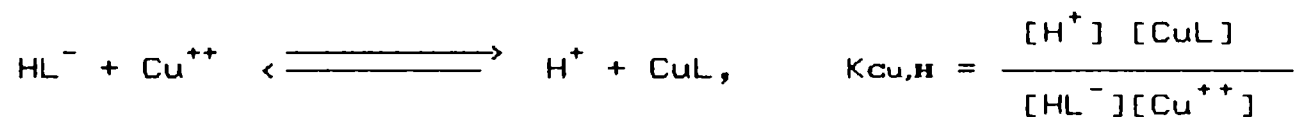
La respuesta de este tipo de electrodos puede verse modificada frente a cambios en la luminosidad y es interferida por presencia de O_2 y cloruros en la solución a medir. Por tales motivos, es necesario proteger dicha solución de la luz, purgar el O_2 presente mediante el burbujeo de N_2 y evitar el uso de cloruros para ajustar el pH y la fuerza iónica (Simpson 1979, Hulanicki 1980, Buffle et al. 1977, Marinsky y Ephraim 1986, Cabaniss y Shuman 1988).

La metodología aplicada se basa en la determinación sólo del Cu(II) que se encuentra formando complejos lábiles (especies de Cu(II) a la que es sensible el electrodo específico, Simpson 1979), a medida que se agregan alícuotas sucesivas del

complejante. Calibrando previamente con algún ligando que forme complejos con Cu(II) de estequiometría definida, por ejemplo EDTA, NTA o citrato, por un lado, y ajustando los parámetros experimentales, de los que depende el valor de la constante de asociación -por eso se trata de un parámetro condicional- (pH, temperatura, fuerza iónica, concentración inicial y final de ion cúprico e intervalo de concentraciones de AF), por el otro, es posible determinar la capacidad complejante de un determinado AF y la constante condicional que rige la asociación Cu-AF en las condiciones de trabajo (Buffle et al. 1980, Marinsky y Ephraim 1986, Cabaniss y Shuman 1988, Perdue 1989).

La asociación entre SH y MP depende en gran medida de la fuerza iónica, del pH y de las concentraciones relativas de ligando y de ion central:

A. La influencia del pH se plantea básicamente en función de la competencia entre el ion cúprico y los protones por la función intercambiadora:



El pH, influye también en la distribución de las SH en el medio natural entre las fases "disuelta" y particulada. Se ha propuesto en este sentido, que el aumento de la cantidad de Cu(II) asociada a SH al aumentar el pH no sólo se deba a un efecto de acción de masas (al aumentar el pH, disminuye la concentración de protones que compiten con el cobre por la función activa), sino que también existiría, por un lado, una mayor cantidad de SH en forma coloidal (a la que se adsorbería parte del Cu(II) de la solución), y, por el otro, a la formación de complejos mixtos AF-Cu-OH (Buffle et al. 1980, Saar y Weber 1980, Gamble 1986, Cabaniss y Shuman 1988).

Por tal motivo se recomienda no llevar el pH más allá de 7,5 y además utilizar concentraciones de SH que no superen ciertos valores límites, que en el caso de los AF están comprendidos entre 50-70 ppm (Buffle et al 1980, Marinsky y Ephraim 1986, Cabaniss y Shuman 1988).

B. Este análisis es extensible a la competencia entre Cu(II) y otros cationes como Ca(II) y Mg(II). Al respecto, se ha encontrado que en concentraciones equivalentes a las de agua dulce, la presencia de Ca(II) y Mg(II) produce a pH 7,5-8,0 una disminución de 10-15% en el Cu(II) unido a AF, mientras que en condiciones equivalentes a las del agua de mar, la influencia de dichos cationes sobre la disminución del Cu(II) asociado se duplica, como consecuencia de la fuerza iónica. Hasta el momento no está claro si se trata de una competencia por sitios específicos de unión, o a un "efecto salino", es decir una disminución de la actividad de Cu(II) por aumento de la fuerza iónica (Cabaniss y Shuman 1988).

C. Un aumento de la fuerza iónica produce una disminución en la cantidad de Cu(II) asociado a SH, probablemente debido a la distribución asimétrica de las cargas positivas, de los cationes de la sal, entre la superficie de la SH y la solución (Marinsky y Ephraim 1986). Es por ello que las extrapolaciones de resultados obtenidos utilizando altos valores de fuerza iónica (0,10 M KNO₃ o 0,10 NaNO₃) resultan en una sobreestimación de los valores del ion cúprico en los ambientes naturales (Cabaniss y Shuman 1988).

D. En cuanto a las concentraciones relativas de SH y Cu(II), se trata de una situación de compromiso, ya que por un lado cuando [SH] >> [Cu] se está al límite de la capacidad resolutive de los métodos fundados en el uso de ESI, generando datos con un gran error asociado y una gran dispersión de valores. Por otro lado, si [SH] << [Cu] existe una diferencia importante en los órdenes de magnitud de L y Me, lo que genera nuevas incertidumbres a la hora de estimar los parámetros de complejación por cálculo. A todo esto, es necesario agregar otra fuente de error asociada con la naturaleza polifuncional de AF y de AH, que hace sumamente engorroso el determinar con certeza el valor real de C_L (Buffle et al. 1980, Perdue 1989). Muchas de estas fuentes de incertidumbres y errores disminuyen eligiendo convenientemente las variables experimentales (Buffle et al. 1980, Marinsky y Ephraim 1986, Cabaniss y Shuman 1988, Perdue 1989)

3.3. AISLAMIENTO DE SH A PARTIR DE AGUAS NATURALES.

El procedimiento más difundido consiste en acidificar el agua a pH aproximadamente 2,0 con HCl, e introducirla en una columna que contenga una resina hidrofóbica (polímeros de ésteres acrílicos como el metilmetacrilato, copolímeros de estireno y divinilbenceno o equivalente) donde quedan retenidas las sustancias húmicas mientras que las sustancias de mayor polaridad son eluidas. Una vez concentradas las SH en la resina, se remueven los AF a pH 7 y a continuación los AH con NaOH 0,1 M. Finalmente los AF y los AH se hacen pasar por una columna cargada con una resina de intercambio catiónico (protonada), para obtenerlos en la forma final ácida (Thurman y Malcolm 1981, Pettersson et al. 1989, MacCarthy y Suffet 1989).

En particular, para el aislamiento de AF, el pH del agua es llevado por debajo de 2 (1,7-2,0) y posteriormente se filtra la muestra acidificada por membrana de 0,45 μm de poro. De esta manera se logran separar las fracciones AF y AH (ver figura 9). El agua filtrada se eluye por una resina hidrofóbica, del tipo de las descritas anteriormente, hasta que se observe que su capacidad de retención de AF disminuye (lo que se logra monitoreando la absorbancia del percolado a 254 nm). En este punto se lava varias veces con HCl 0,1 N para eliminar sales y otras sustancias orgánicas polares que pudieron quedar retenidas y finalmente se eluyen los AF con NaOH 0,1 N. Para obtener la forma ácida, se recurre a resinas de intercambio catiónico, previamente llevadas a la forma hidrogeniónica (Thurman y Malcolm 1981, Cabaniss y Shuman 1988, Pettersson et al. 1989, MacCarthy y Suffet 1989). Para conocer la eficiencia alcanzada en la remoción de cenizas, la forma más efectiva es recurrir al espectro IR, además de determinar sólidos totales a 750 °C (Garbarini y Lion 1986, Malcolm y MacCarthy 1986, Malcolm y MacCarthy 1989). Este es el procedimiento utilizado para aislar el AF "Saladero".

Dado que el contenido en SH de las aguas naturales es bajo, para obtener cantidades significativas de SH, en el orden de los

70-200 mg, es necesario operar con varios litros de la misma, generalmente entre 20 y 50. Por esta razón la tarea se torna tediosa, y dado que existe en el mercado ofertas de SH, muchas veces se recurre a ellas para realizar los distintos tipos de estudios. Tal decisión se encuentra fuertemente cuestionada, no sólo porque tales SH no serían representativas de las características de las aguas zonales, por lo que limitarían seriamente toda proyección o predicción medianamente generalizada, sino porque análisis realizados sobre las muestras comerciales muestras que éstas poseen un alto contenidos de cenizas (10-30%), y además generalmente se trata de mezclas de AF y AH sin poder contar con datos que permitan determinar su composición y procedencia. Por estas razones, y fundamentalmente al poder contar con sustancias húmicas de referencia (provistas, como se ha dicho, por la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas, IHSS), es que se recomienda aislar los AF que serán utilizados para los distintos estudios que se realicen (Malcolm y MacCarthy 1986, Kile y Chiou 1989, Malcolm y MacCarthy 1989).

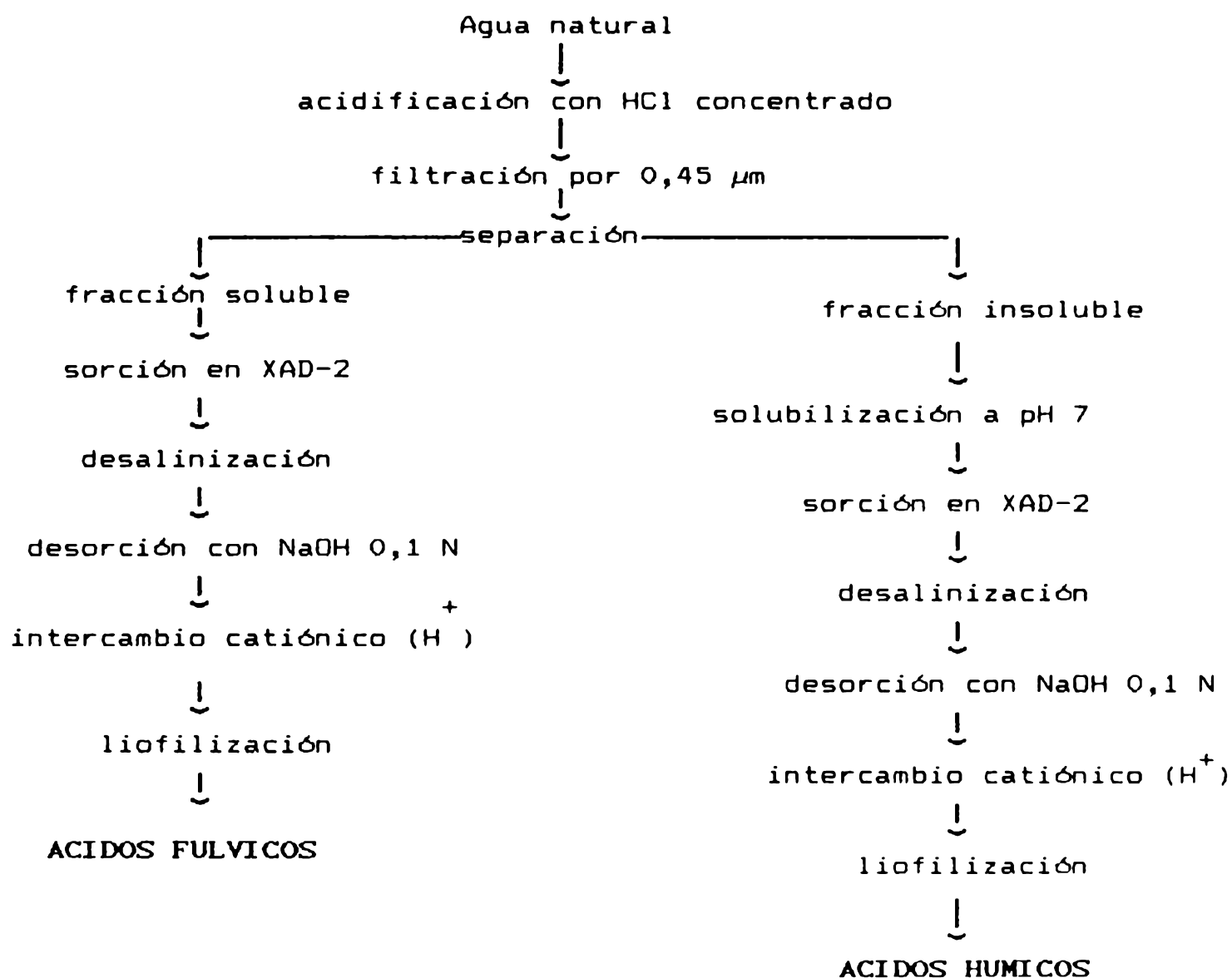


Figura 9. AISLAMIENTO Y FRACCIONAMIENTO DE LAS SH PRESENTES EN EN AGUAS NATURALES

(Thurman y Malcolm 1981, Petterssen et al. 1989)

3.4. AF "SALADERO": AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION.

3.4.1. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LAS AGUAS DE RIO SANTIAGO A LA ALTURA DEL ARROYO SALADERO.

Con un recipiente de polietileno, previamente lavado y dejado durante toda una noche con HNO₃ 10% (Harrison y Laxen 1981) fueron recogidos 25 litros de agua superficial del río Santiago en la zona de la desembocadura del A^o Saladero (Partido de Berisso), esto es en la zona cercana a las Islas Borsani.

La muestra fué procesada inmediatamente: 23 litros de la misma fueron filtrados (membrana de 0,45 µm de poro) y guardados a 4^o C en la oscuridad, mientras que con los 2 L restantes se realizaron las distintas determinaciones para caracterizar el "agua total" (sin filtrar). El agua filtrada, es utilizada mayoritariamente (21 L) para el aislamiento de los AF (AF "Saladero"), y el resto para su caracterización fisicoquímica.

Para el análisis de la muestra de agua, filtrada y sin filtrar (entera), excepto los casos donden se especifique lo contrario, fueron utilizadas metodologías normalizadas (Standard Methods 1985).

La estimación de la concentración de AF en el agua acidificada (pH < 2) y filtrada por medición de su absorbancia a 254 nm, se realizó en un espectrofotómetro visible-ultravioleta Hewlett Packard 8452 A, por comparación directa con soluciones de distintas concentraciones de AF "Saladero".

La estimación equivalente en función de la emisión fluorescente, se realizó por comparación directa de las intensidades corregidas a 442 nm de los espectros de emisión del agua acidificada y filtrada y de soluciones de AF "Saladero", determinados con un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer modelo 2000, a pH 2 y con una longitud de onda para la excitación de 364 nm (más detalles luego en 3.4.5.3.).

Los resultados obtenidos, se presentan en la tabla XXXI.

TABLA XXXI

Caracterización de las aguas de Río Santiago en las proximidades del Arroyo Saladero:

PARAMETRO MEDIDO O ESPECIE DETERMINADA	UNIDADES	AGUA TOTAL	AGUA FILTRADA (0.45 μM)
pH		7,20	7,20
T	°C	19,0	----
oxígeno disuelto	mg / L	3,4	----
DQO	mg / L	29,7	18,5
COD (1)	mg / L	----	7,2
COT (1)	mg / L	11,8	----
Sólidos 105 °C	mg / L	334,5	172,3
550 °C	mg / L	185,5	101,7
Sól. suspensión	mg / L	22,3	----
Dureza (CaCO ₃)	mg / L	63,2	----
Sulfatos	mg / L	51,0	----
Cl ⁻ + Br ⁻	mg / L	77,2	----
Conductividad	μmhos/L	560,0	----
Alcalinidad (HCO ₃ ⁻)	mg / L	72,8	----
Cu (II) (2)	mg / L	0,018	----
Fe (total) (2)	mg / L	0,086	----
Absorbancia/254nm (3)		----	0,234
Absorbancia/254nm (4)		----	0,188
Concentración AF (5)	mg / L	----	14,8
Concentración AF (6)	mg / L	----	32,1
Capacidad complejante Cu(II) (voltametría redisolución anódica)	mol / L	----	3 x 10 ⁻⁷

(1) Calculado en función de los valores de DQO (Kononova 1982 pp. 250-254)

(2) Por espectrofotometría de absorción atómica directa.

(3) Agua filtrada llevada a pH = 12 (AF + AH solubles).

(4) Agua filtrada, acidificada (pH 1,7) vuelta a filtrar y llevada a pH = 12 (AF).

(5) Por comparación con la absorbancia del AF Saladero en distintos niveles de concentraciones (Ryan y Weber 1982 b)

(6) Por comparación con la intensidad de la emisión a 442 nm del AF Saladero (λ_{exc.} 364 nm) (Ryan y Weber 1982 b, Liebezeit 1988).

ANALISIS DE LOS RESULTADOS:

Las muestras de agua utilizadas para el aislamiento del AF Saladero fueron tomadas en dos oportunidades distintas, 25 litros por vez, en los meses de Octubre 1990 y Abril de 1991, y en ambas oportunidades del mismo sitio. Los valores que se presentan en la tabla, con excepción a los parámetros referidos específicamente al AF "Saladero", o a la absorbancia del agua a 254 nm, representan un valor promedio de los valores encontrados en las sucesivas campañas realizadas por el CIMA en la zona (estación "Islas Borsani") entre 1983 y 1988.

En general, en cuanto a los parámetros inorgánicos, sus valores se encuentran dentro de los intervalos normales o habituales de aguas dulces, e incluso dentro de los recomendados para aguas destinadas al consumo humano con tratamiento convencional (Secr. Recursos Hídricos 1987).

En particular, en cuanto a la concentración de Cu(II), como fue expresado en la introducción general de la tesis, este valor promedio es 10 veces superior al sugerido para la protección de la vida acuática (Demayo y Taylor 1981, Secr.Rec.Hidr. 1987).

En cuanto a la estimación de la concentración de AF en estas aguas, si bien existe una buena correlación entre el valor de COD y la concentración de AF estimada en función de la A_{254} , en la medida que si se tiene en cuenta que los AF contienen un 50 % de carbono (MacCarthy y Suffet 1989, Malcolm y MacCarthy 1989) los valores respectivos son prácticamente coincidentes; la concentración estimada por cálculo a partir de la emisión fluorescente, duplica prácticamente a los otros dos valores.

Con respecto a estas diferencias, se corresponden con los resultados encontrados en aguas naturales de distinto origen (Ryan y Weber 1982 b) e indican además, como es lógico, que la absorbancia a 254 nm y la fluorescencia no miden la mismas propiedades; por lo demás, no hace sino corroborar la complejidad del sistema natural abordado y la heterogeneidad de las SH.

3.4.2. AISLAMIENTO DEL AF "SALADERO".

Como primera medida se separan las partículas en suspensión (PS) y los AH por acidificación de la muestra de agua con HCl conc. a pH 1,7-2,0, posterior sedimentación de los AH y filtración por membranas de acetato de celulosa de 0,45 μm de poro.

El agua, que contiene ahora los AF y otros compuestos solubles a pH < 2 (sales, ácidos orgánicos, carbohidratos, polipéptidos, de bajo peso molecular, etc.), es incorporada a una columna cargada con resina macroreticular no iónica (Amberlite XAD-2, 20-60 mallas, cuya matriz se obtiene por copolimerización de poliestireno y divinilbenceno) sometida al siguiente tratamiento de purificación antes de ser utilizada:

1. Extracción secuencial en Soxhlet con metanol, acetonitrilo, éter etílico y metanol durante 8 hs con cada solvente (unas tres a cuatro lavados completos, Junk et al. 1974).
2. Lavado continuo con HCl 0,1 N (50 veces el volumen de la resina), para eliminar todo vestigio de metanol en la resina, y después, alternativamente, tres veces con NaOH 0,1 N y HCl 0,1 N (dos volúmenes de la resina por vuelta), quedando finalmente en la forma ácida (Thurman y Malcolm 1981, Visser 1983, Garbarini y Lion 1986, Suffet y MacCarthy 1989).

A medida que se incorporan nuevos volúmenes de muestra, se monitorea el grado de retención de AF mediante la lectura de la absorbancia a 254 nm de los sucesivos percolado. Se adoptó como límite de saturación de la resina $A_{254} = 0,090$ (Visser 1983).

Una vez saturada la resina, se lava con HCl 0,1 N, para eliminar las sales que quedaron semirretenidas durante el proceso de concentración (unas 10 veces el volumen de la resina), y posteriormente con unos 50 ml de NaOH 0,1 N, obteniéndose una banda oscura claramente definida de AF, que al recobrar las cargas pasan a la fase solución y son extraídos de la resina. Esta solución concentrada de AF es pasada por una resina de intercambio catiónica fuerte, en forma hidrogeniónica, de manera de obtener los AF en la forma ácida, libre de sustancias inorgánicas, y finalmente se los liofilizan (Thurman y Malcolm 1981, Visser 1983, Suffet y MacCarthy 1989).

El éxito obtenido en el proceso de aislamiento, se determina en función del contenido final en cenizas (que no debe superar el 5%) y la absorción relativa en el IR de la banda a 1750 cm^{-1} (Thurman y Malcolm 1981, Malcolm y MacCarthy 1986 y 1989).

En el transcurso de este trabajo, se aislaron AF de aguas de Río Santiago, en la desembocadura del arroyo Saladero. Fueron pasados un total de 45 litros de agua filtrada por la resina sorbente, a razón de 3 ml/minuto, se utilizaron 320 ml de resina (suspendida en metanol) repartidos en 9 columnas de vidrio con placa filtrante, llave de teflon y reservorio de 50 ml; obteniéndose un total de 163 mg de AF.

En función del contenido potencial en AF que tienen estas aguas (aproximadamente 15 ppm, que es el valor coincidente para COD y A_{254} , Ryan y Weber 1982 b) la recuperación obtenida es baja (29 %), pero se encuentra dentro de lo esperado, ya que las columnas se cargaron con agua hasta que el percolado presentó una absorbancia a 254 nm de 0,075-0,090 (27,5 %) y las resinas del tipo de la XAD-2 retienen sorbido, aún a pH 12, entre el 30 y el 40 % del AF agregado (Aiken et al. 1979).

El contenido de cenizas, por destrucción de la materia orgánica a 750°C hasta peso constante, unas 11 hs, fué de de 3.7 % . El espectro IR, y la relación entre bandas, presentado en el punto 3.4.5.1., confirma la bondad del aislamiento efectuado.

3.4.3. COMPOSICION CENTESIMAL DEL AF SALADERO.

Fueron determinados el contenido porcentual de carbono, hidrógeno y nitrógeno por oxidación de un masa de AF Saladero en condiciones adecuadas (exceso de CuO y corriente de O_2). Los gases respectivos formados en la combustión, se recuperaron en sucesivas trampas específicas, siguiendo los pasos clásicos del análisis orgánico cuantitativo. Los resultados obtenidos fueron:

% C = 45,7	H/C = 0,85
% H = 4,1	C/N = 19,9
% N = 2,3	

Los valores están dentro del intervalo de otros resultados encontrados en la bibliografía (ver tabla XXX). El el bajo contenido relativo en carbono, movió a apelar a un método alternativo; finalmente se obtuvieron valores repetitivos utilizando para su análisis un método volumétrico, donde el volumen de CO₂ obtenido se calcula por diferencia de volumen entre el volumen total (O₂ utilizado durante la combustión más CO₂ formado en la misma) medido usando H₂SO₄ 30% como líquido de cierre, y el volumen residual (resultante de pasar el volumen total por KOH 30%).

Tanto los valores porcentuales, como los coeficientes H/C y C/N, señalarían que en su composición el AF Saladero se encuentra fuertemente influenciado por AF de origen edáfico, ya que dichos valores son muy semejantes a los citados en la tabla XXX para AF de suelo. Esto no debe sorprender, por cuanto la estación de muestreo presenta una muy baja velocidad lineal de desplazamiento de agua, abundante vegetación y consiguiente formación de importantes cantidades de detritus.

3.4.4. PROPIEDADES ACIDO-BASE DEL AF "SALADERO".

Se determinaron los valores correspondientes a la acidez total (con hidróxido de bario) y a la acidez carboxílica (con acetato de calcio), del AF "Saladero" y del AF "Suwannee". Los resultados se presentan en la tabla XXXII.

METODOLOGIA APLICADA:

1.- Acidez total: Por el método de la barita (Kononova 1982 pp. 286-288, Garbarini y Lion 1986). Sobre 1,0-1,5 mg de AF se agregaron 5 ml de Ba(CH₃COO)₂ 0,05 N, 10 ml de NaOH 0,01 N y 10 ml de agua desionizada. Se deja toda la noche, se filtra con papel de poro pequeño (2,5-3,0 μm) y se titula con HCl 0,01 N usando heliantina como indicador. La muestra se analizó por triplicado y se realizó duplicado de blancos

2.- Acidez carboxílica: A una masa de 1,0-1,5 mg de AF se agregaron 20,0 ml de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0,05 N, y se lleva el pH a 6,8-7,0. Se deja durante cuatro días agitando periódicamente. Se filtra por filtro de poro pequeño (2,5-3 μm) y se titula finalmente con NaOH 0,01 N utilizando fenolftaleína como indicador de punto final. Se realizaron los ensayos por triplicado. (Kononova 1982 pp. 286-288, Garbarini y Lion 1986).

Los valores correspondientes a la acidez fenólica se obtienen restando a la acidez total el valor correspondiente a la acidez carboxílica (Kononova 1982 pp. 286-288, Garbarini y Lion 1986, Collins et al. 1986, Fish y Bonn 1989).

ANALISIS DE LOS RESULTADOS:

Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los valores registrados en la bibliografía: entre 3,80 y 6,00 meq. H^+ /gramo AF, para la acidez carboxílica y entre 1,20 y 5,40 para los grupos fenólicos (Rosell et al. 1972, Collins et al., 1986, Garbarini y Lion 1986, Malcolm y MacCarthy 1986, Marinsky y Ephraim 1986, Ephraim et al. 1989).

Por otro lado, la diferencia hallada, en la bibliografía consultada, para los valores correspondientes a la acidez carboxílica del AF "Suwannee", es una clara muestra de la dispersión que puede haber entre los resultados al comparar distintos métodos. De todas maneras, existe una correspondencia aceptable entre el valor experimental de este trabajo y el correspondiente a la misma técnica (referencia en la tabla XXXI).

TABLA XXXII

CARACTERISTICAS ACIDO-BASE DE LOS AF "SALADERO" Y "SUWANNEE"

1. AF "Saladero"		
Acidez Total (mequiv. H ⁺ / gramo AF)	Acidez Carboxílica (mequiv. H ⁺ / gramo AF)	Acidez Fenólica (mequiv. H ⁺ / gramo AF)
5,52	3,48	2,04
2. AF "Suwannee"		
a) Resultados obtenidos en este trabajo		
Acidez Total (mequiv. H ⁺ / gramo AF)	Acidez Carboxílica (mequiv. H ⁺ / gramo AF)	Acidez Fenólica (mequiv. H ⁺ / gramo AF)
8,05	6,06	1,99
b) Valores obtenidos de la bibliografía		
Acidez Total (mequiv. H ⁺ / gramo AF)	Acidez Carboxílica (mequiv. H ⁺ / gramo AF)	Acidez Fenólica (mequiv. H ⁺ / gramo AF)
(1) 14,6 (2) 6,65	6,00 4,24	8,0 1,41
(1) Grant et al. 1986 (determinados con Ca(CH ₃ COO) ₂ y Ba(OH) ₂) (2) Marinsky y Ephraim 1986 (titulación en solventes no acuosos)		

3.4.5. CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS DEL AF "SALADERO"

3.4.5.1. ESPECTRO INFRARROJO DEL AF SALADERO:

Previo a la determinación del espectro IR, la muestra de AF fué secada adecuadamente (en estufa a 70- 80°C hasta peso constante). El armado de la pastilla se realizó bajo atmósfera de Nz (pasado previamente a través de desecadores) por mezcla al 1% en peso con KBr triturado, homogeneización y compresión (Kononova 1982 pp. 296-298, Grant 1987, Malcolm y MacCarthy 1989).

Además de correr el espectro en el IR del AF "Saladero", se determinó el correspondiente al AF "Suwannee", que es un estándar de la IHSS (ver figura 12).

El espectro fué determinado en un espectrofotómetro IR Perkin Elmer 580 B, encontrándose las siguientes bandas principales (ver figura 12'):

Frecuencia (cm^{-1}) :	asignable tentativamente a :
3400	unión H-O (carboxilos, agua, alcoholes).
2920	estiramiento C-H.
2860	tensión simétrica grupos metilo (2872) ó de grupos metileno (2853).
1720	estiramiento C=O de grupos carboxilo.
1640	idem C=O de grupos carboxilato.

(Grant et al., 1987 y Kononova 1982 pp. 296-298)

En función de estos resultados se pueden sacar las siguientes conclusiones:

Que están presentes las bandas que caracterizan a los ácidos carboxílicos, esto es 3400, 1720 cm^{-1} (Vogel 1979, Malcolm y MacCarthy 1989).

Por otro lado, que la banda de 1720 sea mayor que la de 1640 indica una eficiente remoción de los minerales o sales (Malcolm y MacCarthy 1989, Kononova 1982 pp. 296-298, Grant et al. 1987).

3.4.5.2. CARACTERISTICAS DEL ESPECTRO VISIBLE-UV DEL AF SALADERO.

Se determinó el espectro completo entre 200 y 650 nm, con un espectrofotómetro visible-ultravioleta Hewlett Packard 8452 A, con un máximo de absorción en 237 nm (ver figura 13).

También en este caso, se determinó el espectro del AF "Suwannee", encontrándose el máximo de absorción en 254 nm, coincidentemente con las referencias bibliográficas (Beckett et al., 1989), y en función de las respectivas absorbancias de soluciones de AF "Suwannee" de distintas concentraciones (entre 10 y 60 ppm) se determinó el correspondiente coeficiente de extinción (expresando la concentración en ppm) $k = 0,025$, a pH 12.

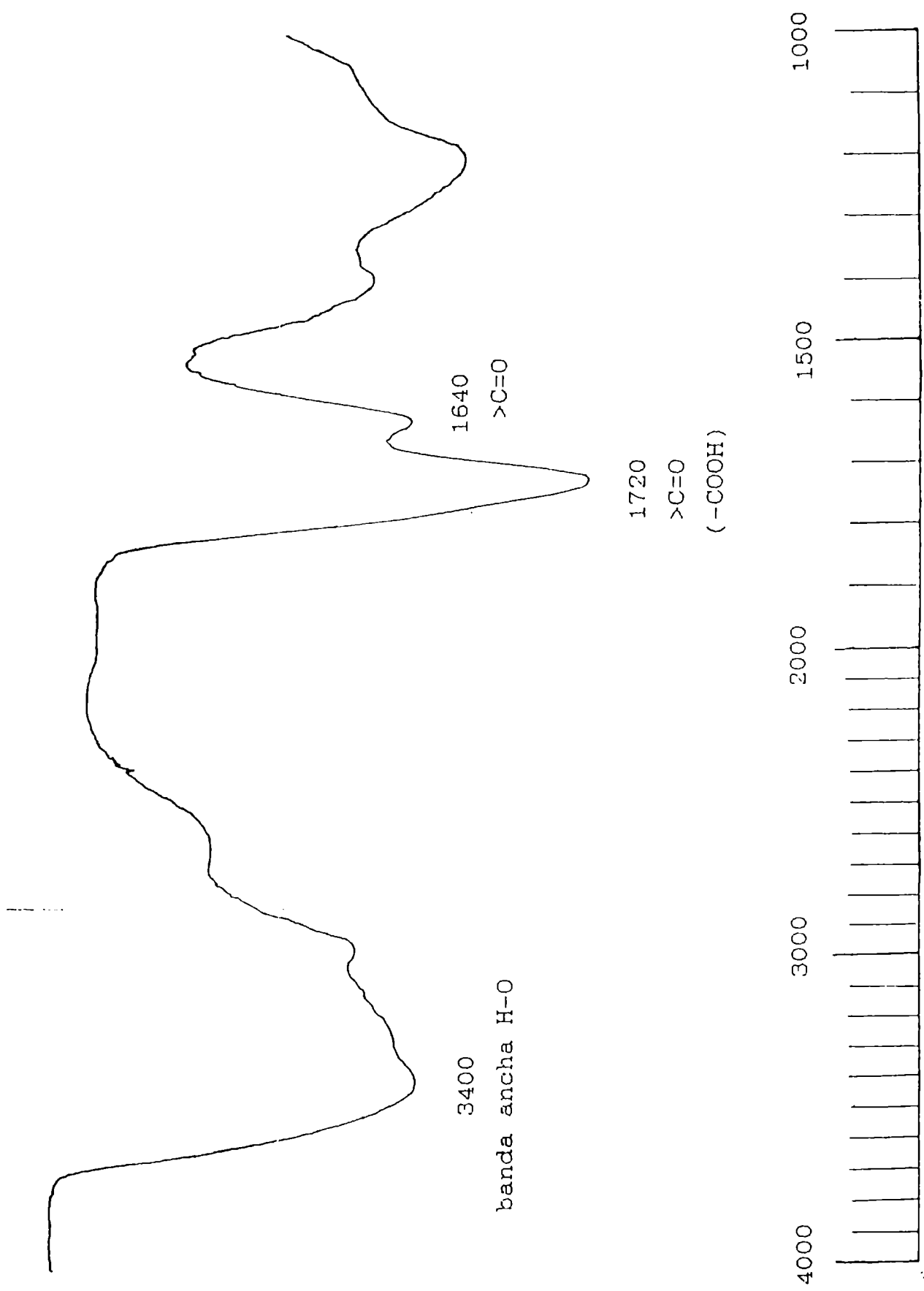


Figura 12. ESPECTRO INFRARROJO DE AF "SUWANNEE"

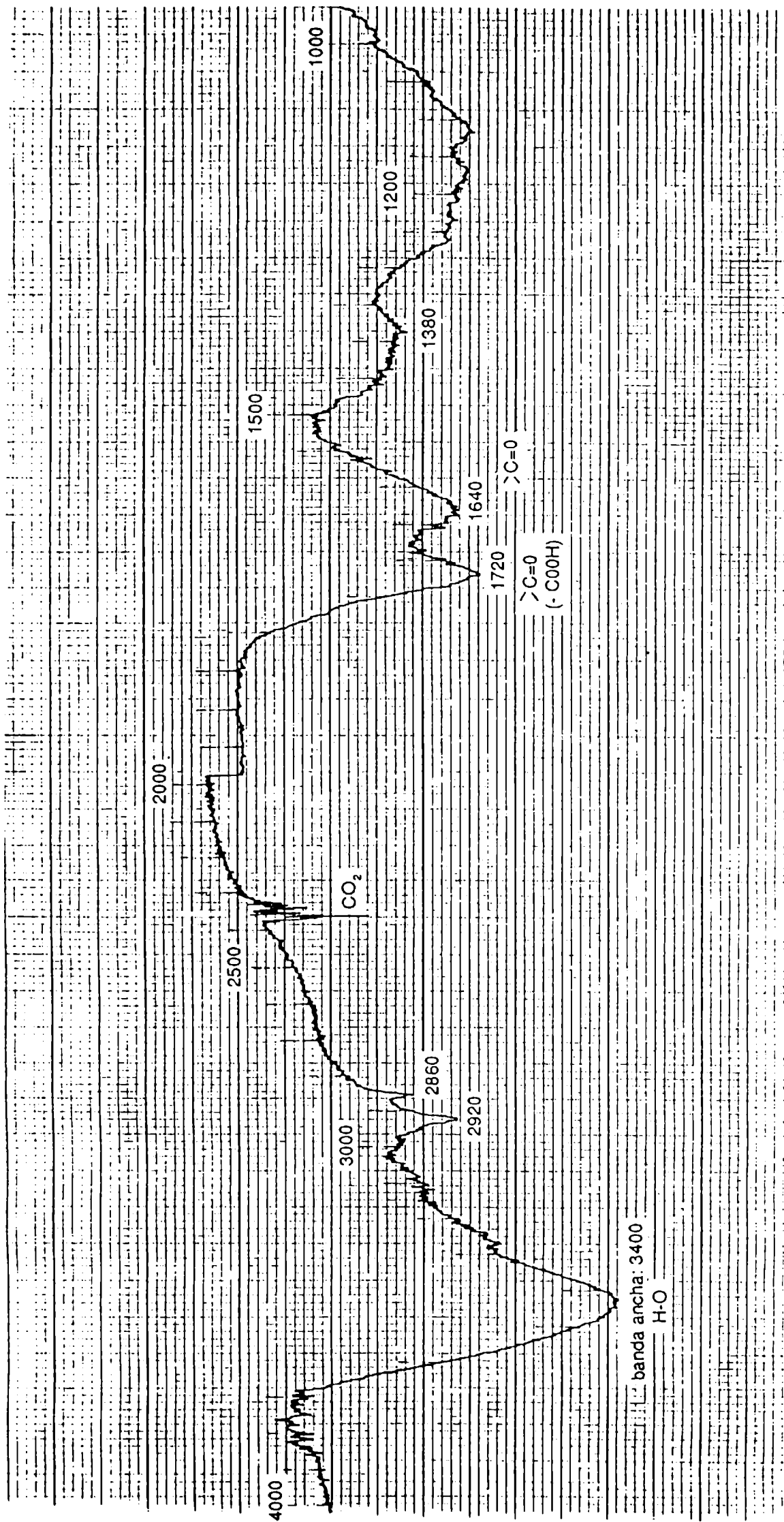


Figura 12: ESPECTRO INFRARROJO DE AF "SALADERO"

La absorbancia de AF "Suwannee" a 254 nm -30 ppm-, fue entonces utilizada como referencia para la confirmación de la concentración de las sucesivas soluciones de AF "Saladero" preparadas por pesada de porciones de AF aislado, llevadas adecuadamente a volumen. Se encontró una muy buena linealidad en la curva de calibración absorbancia vs. concentración.

Por otro lado, y como fue expresado anteriormente en la tabla XXXI, la misma A_{254} se utilizó para la estimación de la concentración de AF en agua natural filtrada y acidificada (pH<2).

Finalmente, calculada la relación COD/ A_{254} , se encontraron los siguientes valores:

Tabla XXXIII

Relaciones encontradas para COD/ A_{254} en las distintas muestras analizadas

Muestra	Absorbancia 254 nm	COD mg/L	COD/ A_{254}
Agua filtrada Río Santiago	0,221	7,2	32,6
Agua filtrada y acidificada Río Santiago	0,217	7,4	34,1
AF "Saladero"	0,309	16,8	54,4
AF "Suwannee"	0,186	10,0	53,8

Estos valores concuerdan con el intervalo característico encontrado experimentalmente para las sustancias húmicas, AF en particular, según se lo analizara en el punto 3.2.3.2.

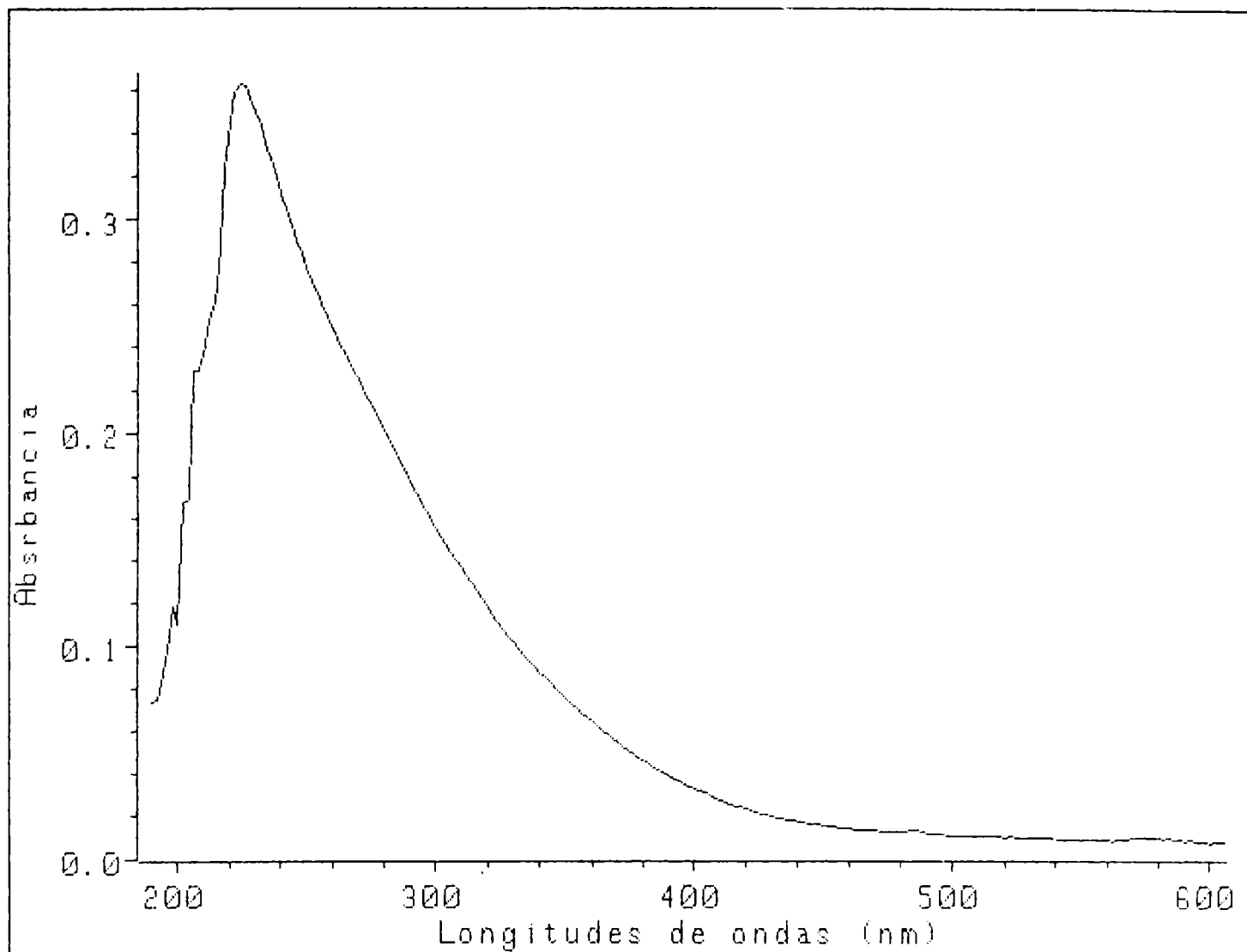


Figura 13. ESPECTRO DE ABSORCION VISIBLE-ULTRAVIOLETA DEL AF "SALADERO". Concentración: 8,44 ppm, pH = 12.

3.4.5.3. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE EMISIÓN FLUORESCENTE DEL AF SALADERO.

Los espectros fluorescentes fueron determinados con un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer modelo 2000 irradiando sobre las distintas soluciones con luz blanca proveniente de una lámpara de Xenón (6.25W/50Hz-7.5W/60Hz), de la que se selecciona un haz de 364 nm de longitud de onda (λ) mediante un filtro de interferencia (con un ancho de banda de 10-15 nm y un 40 % de transmitancia nominal), un detector de emisión (fotomultiplicador estándar) y un detector de referencia (fotomultiplicador con respuesta S-5 y cubierta de cuarzo).

La λ de emisión se selecciona mediante un monocromador con intervalo de ± 3 nm entre 390 y 750 nm.

En todos los casos se utilizaron cubetas con un camino óptico de 1,0 cm termostatzadas a 25 ± 1 °C.

Fueron determinados los espectros del AF aislado utilizando soluciones de 10-30 ppm de AF (expresadas como COD) y a dos pH distintos (2,0 y 5,0), de acuerdo con las recomendaciones encontradas en bibliografía (Weber 1983, Carreira 1991). Como blanco se utilizó agua bidestilada, acidificada al pH correspondiente con HCl.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla XXXIV.

En la figura 14 son presentados los espectros de emisión del AF Saladero, del agua filtrada y del agua acidificada y filtrada.

También se determinó el espectro fluorescente del AF Suwannee, no sólo para comparar resultados con dicho patrón internacional, sino también, como en el caso del espectro visible-UV, como referencia para calcular las concentraciones de AF en agua natural (tabla XXXI).

Para la corrección de los espectros fluorescentes se utilizó la fórmula propuesta por Parker (Parker 1968):

$$\frac{I_{\text{corr.}}}{I_{\text{obs.}}} = \frac{2,3 d A_{\text{exc.}}}{1 - 10^{-(d A_{\text{exc.}})}} 10^{(g A_{\text{em}})} \frac{2,3 s A_{\text{em.}}}{1 - 10^{-(s A_{\text{em.}})}}$$

con: $I_{\text{obs.}}$ = intensidad de emisión observada

$I_{\text{corr.}}$ = intensidad de emisión corregida

$A_{\text{exc.}}$ = absorbancia a la λ de excitación (366 nm)

$A_{\text{em.}}$ = absorbancia a la λ de emisión (492 nm)

d = camino óptico (1,00 cm)

g = distancia entre la pared de la cubeta y el margen cercano del haz de excitación (0,40 cm)

s = espesor del haz de excitación (0,10 cm)

Simultáneamente, como calibración del equipo, fueron determinados dos espectros de emisión de Merocianina 540 utilizando como disolvente agua desionizada en un caso y etanol 95 % en el otro. Los resultados obtenidos son presentados en la tabla XXXIV. Los valores obtenidos con Merocianina en distintos solventes permiten, mediante la comparación con los correspondientes valores de referencia, conocer el corrimiento que hay entre la longitud de onda de emisión y el valor acusado por el equipo.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

Estos valores acuerdan satisfactoriamente con los encontrados en las referencias bibliográficas (Ryan y Weber 1982 b, Weber et al. 1983, Liebezeit 1988).

En realidad existe una pequeña diferencia, atribuible a diferentes motivos, como por ejemplo que la longitud de onda escogida para la excitación no se corresponde precisamente con la utilizada en las distintas referencias (370 nm, Weber et al. 1983; 350 nm Saar y Weber 1980, Ryan y Weber 1982 a, 321 nm Liebezeit 1988), o que en realidad exista un desplazamiento entre la longitud de onda de emisión que marca el equipo y la real (como se

INTENSIDAD RELATIVA DE LA EMISION ENTRE 430 Y 490 NM

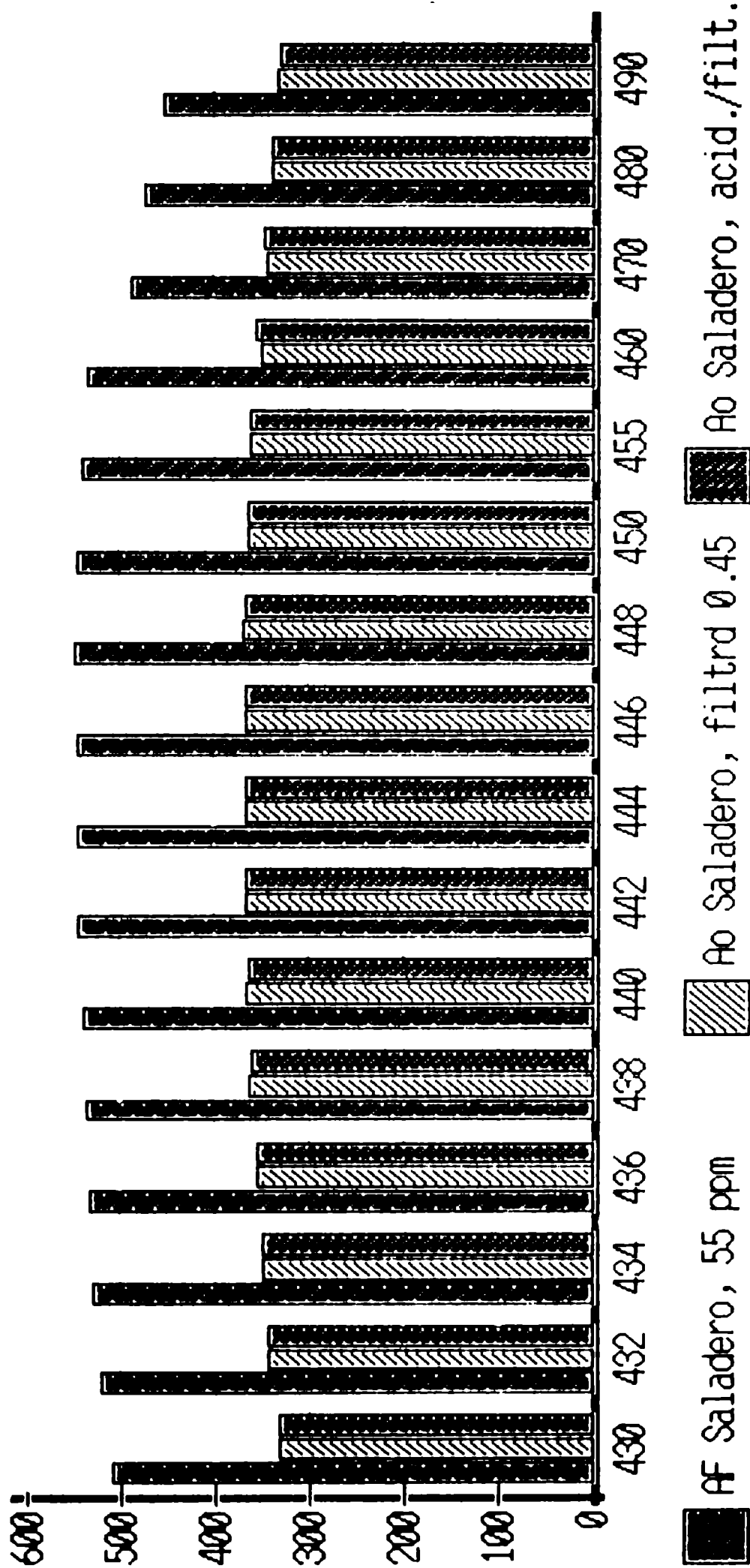


Figura 14. ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DEL AF "SALADERO" Y DEL AGUA DE RIO SANTIAGO, FILTRADA (Ao Saladero filtrd 0.45) Y ACIDIFICADA Y FILTRADA (Ao Saladero acid./filt.). Longitud de onda de excitación: 366 nm, pH = 2.

puede deducir de las diferencias encontrada con merocianina); pero dado que esta diferencia se encuentra en el orden del ancho de banda del filtro (10-15 nm), se la puede considerar como poco significativa.

TABLA XXXIV

Valores correspondientes a los máximos de emisión para AF "Saladero" y AF "Suwannee"

1. Valores encontrados para AF Saladero		Valores medios bibliografía	Referencia
pH = 2,0	$\lambda = 441 \pm 5 \text{ nm}$	$\lambda = 448 \pm 5 \text{ nm}$	Weber 1983
pH = 5,0	$\lambda = 440 \pm 7 \text{ nm}$	$\lambda = 445-450 \text{ nm}$	Weber 1980 Weber 1982 a Liebezeit 1988
2. Valores encontrados para AF Suwannee			
pH	Máximo emisión AF Suwannee	Valores medios bibliografía	Referencia
2,0	$\lambda = 452 \pm 5 \text{ nm}$	$\lambda = 448 \pm 5 \text{ nm}$	Weber 1983
3. Valores encontrados para MC 540			
Solvente	Máximo emisión	Valores medios bibliografía	Referencia
Agua desionizada	$\lambda = 587 \pm 2 \text{ nm}$	$\lambda = 572 \text{ nm}$	Dixit 1983
Etanol 95 %	$\lambda = 602 \pm 5 \text{ nm}$	$\lambda = 583 \text{ nm}$	Dixit 1983

3.4.6. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD COMPLEJANTE Y LA CONSTANTE DE ASOCIACION PARA Cu(II)-AF "SALADERO".

Se tituló soluciones de distintas concentraciones de AF (entre 10,0 y 60 ppm) con Cu(II) (la solución de Cu(II) fue previamente valorada potenciométricamente con EDTA), manteniendo constantes la fuerza iónica, el pH y la temperatura ($I = 7\text{mM}$, $\text{pH} = 7,40$ ó $5,00$, $T = 25^{\circ}\text{C}$), utilizando un electrodo sensible a la concentración de cobre (ESI-Cu, Orion 94-29) y un electrodo de referencia Ag/AgCl, de doble unión -con una solución de KNO_3 entre el KCl del electrodo y la solución a medir- (Orion 90-02), mediante un analizador de iones Orion 701 A.

Las distintas diluciones de AF fueron preparadas a partir de una solución "madre" de 84,4 ppm que se mantiene refrigerada a 4°C . En particular, se observó que en estas condiciones las propiedades ópticas de la solución madre de AF Saladero no se modificaron a lo largo de seis meses.

Para la medición del pH se recurrió a un electrodo combinado Orion modelo 91-02, y a soluciones reguladoras de pH 4,01 (biftalato de potasio 0,05M) y pH 7,40 (50 ml de KH_2PO_4 0,1 M y 39,1 ml de NaOH 0,1 M) (Weast 1981 pp. D-147 - D-153).

Todo el material utilizado fue previamente lavado con mezcla sulfocrómica y los electrodos pulidos con una superficie de esmeril adecuada, provista con tal objeto por los mismos fabricantes del electrodo, antes de cada titulación.

Las experiencias de titulación se realizaron por lo menos tres veces para cada concentración escogida y para cada pH, los resultados obtenidos son presentados en la tabla XXXV.

PROCEDIMIENTO APLICADO:

Cincuenta mililitros de una solución de AF, cuya concentración se encuentra entre 10 y 60 ppm, según los casos individuales, y fuerza iónica constante dada por una concentración 7 mM en NaNO_3 , son colocados en un recipiente opaco (cubierto con papel de aluminio) y termostatizado ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ajustando su pH a $7,4 \pm 0,05$ (o $5,00 \pm 0,05$). A continuación, se hace burbujear una

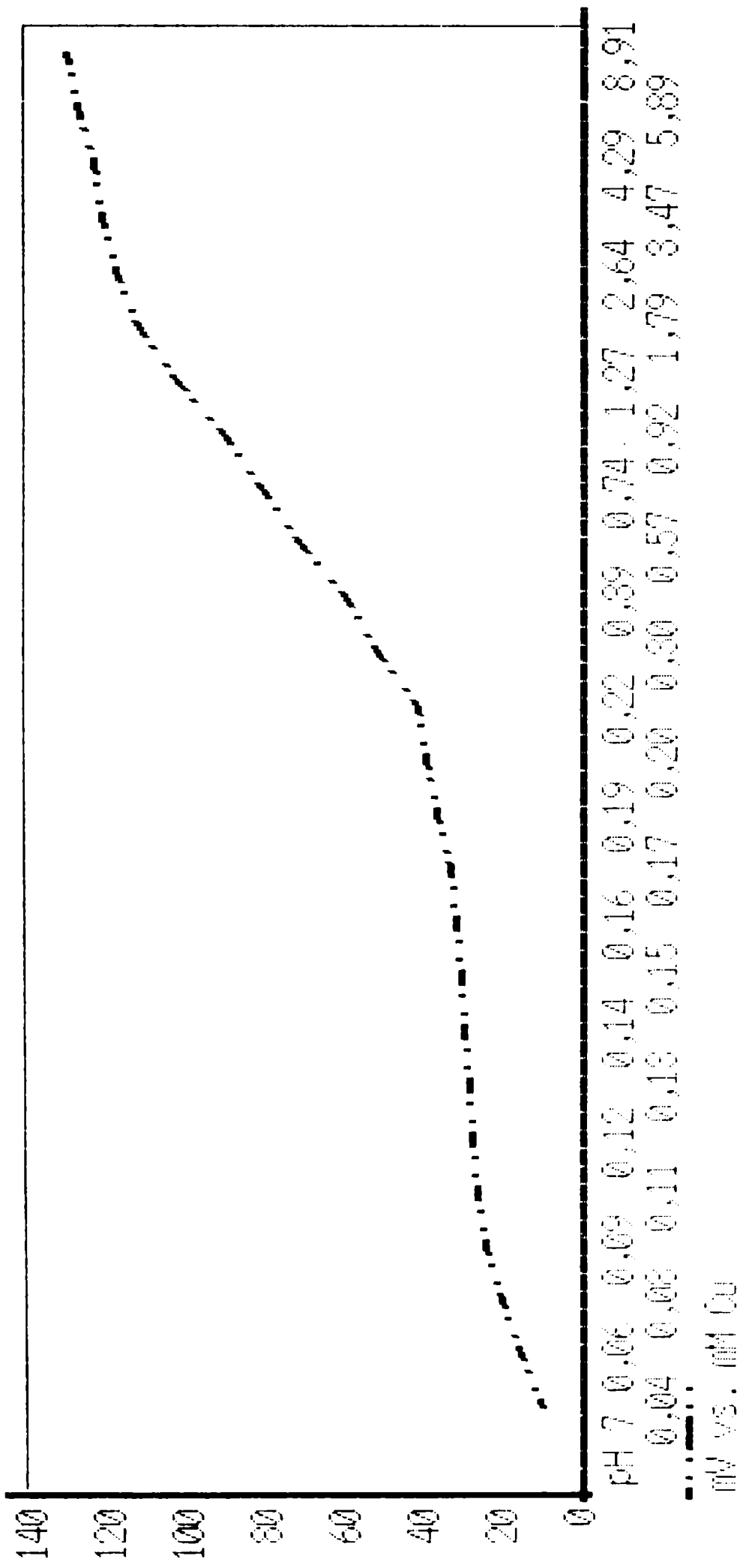


Figura 16: TITULACION POTENCIOMÉTRICA DE AF "SALADERO"
 CON Cu (II). Concentración de AF=60 ppm y pH=7,40

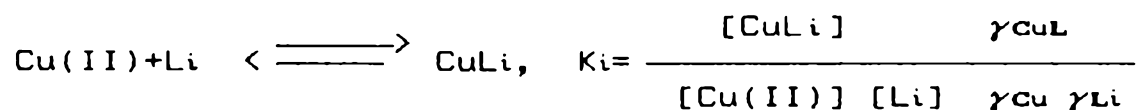
suave corriente de N₂, para purgar el O₂ que hubiera en la solución, y posteriormente se la mantiene por encima de la solución, de modo de barrer la superficie para evitar la fijación ulterior de O₂, a lo largo de la titulación. Cuando el potencial se estabiliza (aceptando un deriva menor a 0,2 mV por minuto), se comienza con el agregado de las alícuotas -entre 50 y 100 μl- de la solución de Cu(II) de título 0,01757 mM. El potencial correspondiente a cada agregado es registrado manualmente, y se detiene el agregado de Cu(II) cuando se observa que la pendiente del electrodo es la correspondiente al cobre iónico. En todos los casos la dilución final no excedió el 12 % (Buffle et al. 1977, Saar y Weber 1980, Cabaniss y Shuman 1988).

En la figura 16 se presenta una típica curva de titulación obtenida, en este caso, a pH 7,40.

SISTEMA DE CALCULO:

Para los cálculos de la capacidad complejante y de la constante condicional, se ingresaron los datos experimentales en un sistema de cálculo, denominado FGMIN. Se trata de un programa que asimila mezclas complejas de ligandos (o de distintos sitios de unión, como en el caso de las SH) a una distribución gaussiana, simple o mixta, continúa de sitios de unión para protones o iones metálicos (a pH constante) que fué elaborado conjuntamente por E.M. Perdue, R.S. Parrish y C.R. Lytle.

Desde el punto de vista químico, se supone que las reacciones entre los sitios de unión y los cationes son reversibles, y las SH son consideradas como una mezcla compleja de ácidos orgánicos (o clases de sitios de unión) independientes, cada uno de los cuales obedece a las leyes de la termodinámica. En este sentido, para la asociación Cu(II)-AF, la reacción entre el Cu(II) y un sitio de unión i:



dónde las expresiones entre corchetes representan las concentraciones de las distintas especies, y γ los respectivos coeficientes de actividad.

La ecuación para la constante K_i , puede también expresarse como:

$$K_i = K_i^c \Gamma_i, \quad \text{con} \quad K_i^c = \frac{[\text{CuLi}]}{[\text{Cu(II)}] [\text{Li}]} \quad \text{y} \quad \Gamma_i = \frac{\gamma_{\text{CuLi}}}{\gamma_{\text{Cu}} \gamma_{\text{Li}}}$$

En la expresión anterior, mientras que K_i es la verdadera constante termodinámica, independiente de la composición de la solución, K_i^c es en realidad un cociente de concentraciones, y es, como también lo es Γ_i , dependiente de la fuerza iónica del medio. De todas maneras, en función de la teoría de Debye-Hückel, cuando la fuerza iónica tiende a cero, el valor de Γ_i se hace igual a uno; es decir, trabajando con soluciones diluidas, el valor de K_i puede estimarse a partir del valor calculado para K_i^c , por extrapolación al valor cero de la fuerza iónica.

De todas maneras, en realidad la reacción entre Li y Cu(II) no es la única que puede ocurrir en las condiciones experimentales, ya que la presencia de otros ligandos y el efecto del pH, fundamentalmente, dan lugar a reacciones competitivas. Por este motivo, en realidad el valor de K que se puede calcular no es ni siquiera el de un cociente de concentraciones dependiente de la fuerza iónica, sino que se trata de un cociente condicional, que depende de la fuerza iónica, el pH y las concentraciones relativas de Cu(II) y AF. Es más, en realidad se trata de un coeficiente promedio, ya que integra en una asociación global las iésimas asociaciones de los i sitios de unión.

Se define, entonces la constante condicional, K^* , como:

$$\bar{K}^* = \frac{\Sigma [\text{CuLi}]}{[\text{Cu(II)}] \Sigma [\text{Li}]}$$

dónde $\Sigma[\text{CuLi}]$ expresa la suma de las concentraciones de todos los complejos formados entre el Cu(II) y la mezcla multiligandos (AF) $[\text{Cu(II)}]$ es la concentración de todas las especies de cobre no unidas a AF y $\Sigma[\text{Li}]$ es la suma de las concentraciones de todos los sitios de unión sin asociarse con Cu(II).

Asumiendo una serie de circunstancias, como que la estequiometría de la reacción es 1:1, que no se forman complejos entre el Cu(II) y ligandos inorgánicos como carbonato u oxhidrilo, el valor de \bar{K}^* puede ser calculado en función de datos experimentales como la concentración total de Cu(II), la concentración total de AF y la concentración de Cu(II) no unido a AF (cobre iónico) que es determinada mediante un electrodo selectivo, es decir:

$$\bar{K}^* = \frac{C_{\text{CuT}} - C_{\text{CuI}}}{C_{\text{CuI}} ([\text{AF}]_{\text{T}} - C_{\text{CuT}} + C_{\text{CuI}})}$$

con: C_{CuT} = concentración total de cobre agregado
 C_{CuI} = concentración de cobre iónico
 $[\text{CuAF}]$ = concentración de Cu(II) unido a AF
 $[\text{AF}]_{\text{T}}$ = concentración total de ácidos fúlvicos
 $[\text{AF}]$ = concentración de AF no asociada con Cu(II)

y: $C_{\text{CuT}} = C_{\text{CuI}} + [\text{CuAF}]$
 $[\text{AF}]_{\text{T}} = [\text{AF}] + [\text{CuAF}]$

Con respecto a la capacidad complejante (CC), también se trataría de un parámetro globalizador, que integra los valores correspondientes a los "i" sitios, y a la vez expresa un magnitud promedio ya que integra dichos valores no sólo en función de la fuerza de la asociación de cada clase de sitio, sino que también lo hace teniendo en cuenta la concentración relativa de cada uno de ellos, es decir, se puede escribir la capacidad complejante como:

$$\text{CC} = \frac{\Sigma (\text{CC})_i (\text{A.R.})}{\Sigma (\text{A.R.})}$$

dónde $(\text{CC})_i$ es la capacidad complejante de cada clase de sitio, y A.R. la abundancia relativa de los mismos.

Por otro lado, desde este punto de vista, se puede plantear un parámetro que cuantifique esta abundancia relativa, por ejemplo una "fracción molar de sitios de unión" C_i/C_L , donde C_i es la concentración de los sitios con una capacidad complejante para $Cu(II)$ CC_i , y C_L la concentración total de sitios, es decir $[AF]_T$.

Es este parámetro, C_i/C_L la variable utilizada por Perdue y sus colaboradores para aplicar criterios de distribución estadística. Ellos dicen que la probabilidad de unión entre un ion metálico (o un protón) y el sitio "i", dependerá del valor de la constante K_i que caracteriza esa clase de sitio. Es decir graficando la probabilidad de unión versus el logaritmo de la constante de formación, existen valores de $\log K$ (μ) donde la probabilidad es máxima.

La distribución de esta probabilidad, es de tipo gaussiana y el valor correspondiente a cada C_i/C_L es el área bajo la curva de ancho $[d\log K]$ (ver figura 15).

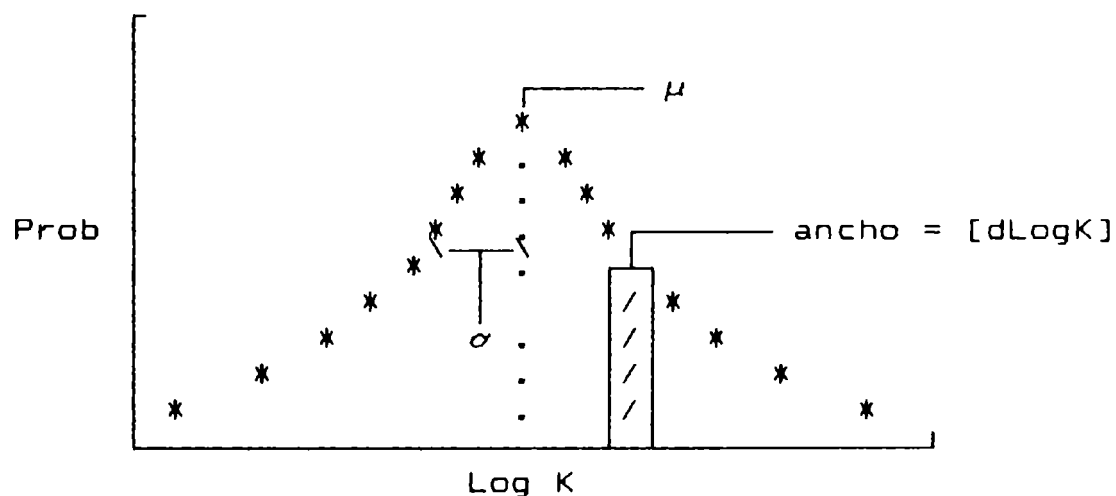


Figura 15. REPRESENTACION DE LA DISTRIBUCION DE LA PROBABILIDAD DE ASOCIACION ENTRE UN ION METALICO Y UN SITIO i.

dónde σ es la distancia entre el valor medio (μ) y cualquiera de los puntos de inflexión de la función distribución normal.

En la figura anterior, los asteriscos representan la curva de probabilidad normal, definida en este modelo como:

$$\text{Prob} = [1/(\sigma\sqrt{2\pi})] \exp[-0.5 [(\mu - \text{Log } K)/\sigma]^2]$$

Mientras que la fracción molar de los sitios de unión en el intervalo $[d \log K]$ adopta el valor correspondiente al área bajo la curva, es decir: $C_i/C_L = \text{Prob} * [d \log K]$.

Otra observación importante es que, como se trata de una curva de distribución normal, el 68% de los sitios i estarán dentro del intervalo $(\mu \pm \sigma)$.

Para más de dos clases de sitio de unión, este programa determina las concentraciones respectivas de cada uno, sus valores principales de μ y la desviación estándar asociada (σ). Para el caso particular de Cu, normalmente existe un valor principal de μ ; es el caso de los resultados presentados en este trabajo de tesis.

Entonces, en función de datos experimentales, o datos incorporados para simulación por computadora, es posible a partir de este programa calcular los valores correspondientes a μ y la capacidad complejante (Perdue y Lytle 1983, Perdue 1988 y Perdue 1989).

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

El acuerdo existente entre los valores encontrados para K y CC a pH 5, y los valores correspondientes de bibliografía es muy bueno (ver tabla XXXV). De hecho, la comparación a dicho pH es más fácil, tanto por la existencia de una gran cantidad de datos informados, como por la ausencia de otros fenómenos que pueden interferir en las determinaciones como la presencia de cantidades importantes de AF en estado coloidal, o formación de complejos mixtos del tipo AF-Cu-OH, que sí ocurren a pH 7,5 o superiores (Buffle et al. 1977, Saar y Weber 1982, Lester et al. 1986, Marinsky y Ephraim 1986, Ephraim et al. 1989 b).

Sin embargo, dado que el pH de los cuerpos de aguas naturales se encuentra habitualmente en ese pH, en el caso de Río Santiago 7,40, es necesario, llegado el momento de intentar avanzar en la comprensión del efecto de la asociación entre Cu(II) y SH y su incidencia en la toxicidad de dicho catión, trabajar a este pH. De

todas maneras, el valor encontrado para CC y K se encuentran dentro del orden de otros valores, determinados en condiciones similares (ver tabla XXXV), encontrados en bibliografía (Ryam y Weber 1982 a, Lester et al. 1986, Marinsky y Ephraim 1986, Perdue 1989).

Estos valores fueron los utilizados para calcular la cantidad de AF necesaria para obtener las distintas relaciones AF/Cu(II) para los ensayos de toxicidad realizados con rotíferos.

TABLA XXXV:
VALORES PROMEDIOS ENCONTRADOS PARA EL LOGARITMO DE \bar{K}^* Y LA CAPACIDAD COMPLEJANTE PARA NUEVE ENSAYOS INDEPENDIENTES REALIZADOS POR TRIPLICADO PARA CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES DE AF SALADERO ELEGIDAS (10, 20 Y 30 ppm AF).

PARAMETRO ANALIZADO	CAPACIDAD COMPLEJANTE (mmoles Cu(II)/g AF)	CONSTANTE DE ASOCIACION Cu(II)-AF
TECNICA UTILIZADA	ESI-Cu, pH 7.4 ESI-Cu, pH 5.0 (CALCULO FGMIN)	ESI-CU, pH=7.4 (CALCULO FGMIN)
RESULTADOS AF SALADERO	3,328 ± 0,688 (pH 7,4) 1.143 ± 0,097 (pH 5,0)	$\mu = 7.441 \pm 0,724$ ($\mu = \log K$)
VALORES MEDIOS BIBLIOGRAFIA	2,96 - 4.37 (pH 7) 1.08 - 2.22 (pH 5)	4 < μ < 6 (pH=6) 6 < μ < 8 (pH=7)

3.5. COMPLEJACION Y TOXICIDAD: efecto de la complejación de Cu(II) con AF Saladero sobre sus propiedades toxicológicas.

Una vez aislado y caracterizado AF "Saladero", fundamentalmente en lo que respecta a su capacidad complejante, por un lado, y disponiendo de un bioensayo de toxicidad aguda previamente estandarizado e intercalibrado (laboratorios de Europa, EEUU y Canadá) para Cu(II) (ROTOXKIT F: Snell y Persoone 1989, Persoone et al. 1990), por el otro; se estudió el efecto del agregado de distintas porciones de AF "Saladero" sobre la concentración letal 50 (CL₅₀) de Cu(II), es decir la concentración de Cu(II) necesaria producir la mortalidad del 50% de los organismos utilizados para el ensayo.

Se utiliza *B. calicyflorus*, rotífero de agua dulce de amplia distribución geográfica, que involucra también gran parte de los cuerpos de agua superficiales de la pampa húmeda argentina (Olivier 1963), como especie representativa de las condiciones de la zona de estudio. Por otro lado, se trata de uno de los componentes del zooplancton, que en ciertos momentos del año llegan a proporcionar la fracción mayoritaria de biomasa zooplanctónica (Pace y Ocrutt 1981).

Del mismo modo que en el caso de la capacidad complejante, fue posible caracterizar con las espumas la asociación entre Cu(II) y AF desde un punto de vista químico, resultados que quedan confirmados con el valor obtenido para la constante condicional μ ; en este caso, y también a partir de la capacidad complejante, se intenta caracterizar la asociación Cu(II)-AF, pero desde un punto de vista toxicológico. En otras palabras, así como la magnitud de μ se refleja en la recuperación del 80-85% del Cu(II) para la relación 1/1 : Cu(II)/AF con espuma catiónica, en este caso se intenta observar si la estabilidad de esta asociación es un índice que se pueda correlacionar directamente con alguna propiedad tóxica del ion cúprico.

En particular, en lo que se refiere al estudio de la incidencia de la asociación entre AF y MP sobre el efecto tóxico final de estos últimos, si bien existen estudios que relacionan la materia orgánica disuelta de un cuerpo de agua con el efecto

protector para la biota frente a distintas concentraciones de Cu(II) (Sunda y Lewis 1978, Demayo y Taylor 1981, Laegreid et al. 1983, Newell y Sanders 1986); los pocos ensayos donde se utilizan directamente SH fueron realizados con SH de origen comercial o aisladas del suelo (Demayo y Taylor 1981, Winner 1991 et al.).

Un segundo paso, indudablemente más ambicioso, es poder estimar, a partir del comportamiento tóxico del Cu(II), su impacto sobre la zona en estudio (no sólo tomando como base la concentración media de Cu(II), sino también en función de incrementos importantes esporádicos originados generalmente en vuelcos de tipo industrial), al menos en una primera aproximación, en función de la relación de concentraciones Cu/AF, y otros parámetros relacionados como la salinidad, el pH y la presencia de otros MP que compitan con el Cu(II) por su asociación con AF.

CARACTERISTICAS DEL BIOENSAYO UTILIZADO

Se trata de un ensayo de toxicidad aguda en microplacas, en el que se mide la letalidad causada por distintas concentraciones de Cu(II) sobre neonatos de rotíferos obtenidos por eclosión de huevos de resistencia en 24 horas.

Para la eclosión de los huevos de resistencia, éstos se colocan en una solución de agua dulce normalizada (la misma en composición y pH que fuera utilizada en los ensayos con espumas, ver punto 2.3.2.), incubándolos a 25°C y 500-3000lux, obteniéndose normalmente la eclosión en 32-36 horas.

Para los ensayos de toxicidad, se preparan sucesivas diluciones de Cu(II) en el agua normalizada, y posteriormente se colocan al menos diez individuos por concentración. Se los deja en la oscuridad y 25°C, y a las 24 hs. se cuenta el número de rotíferos muertos, considerando como tales a aquellos que han perdido la movilidad y se encuentran en el fondo de la cubeta.

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA CALIBRACION CON SULFATO CUPRICO.

CL₅₀ media (mg CuSO₄ .5 H₂O / L) = 0.037

Este valor promedio de CL₅₀ se determinó mediante ajustes de regresión de las curvas dosis-respuesta con un programa de cálculo estadístico para PC IBM compatible (Meier et al. 1988), trabajando con un intervalo de confianza del 95% y un coeficiente de variación de 10.1 %, con 5 replicaciones para cada una de las 6 diluciones del compuesto tóxico; mientras que el valor promedio informado para el mismo ensayo, para 102 pruebas independientes, es: CL₅₀ media (mg CuSO₄.5H₂O / L) = 0.033, con un coeficiente de variación de 48.5 % (Persoone et al., 1990).

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL AGREGADO DE AF "SALADERO".

Paralelamente se estudió el efecto del agregado de AF sobre la toxicidad de Cu(II), trabajando en las mismas condiciones que fueran utilizadas para la calibración con sulfato de cobre.

Con tal objeto fue elegida inicialmente una concentración de Cu(II) claramente letal (0,08 ppm de la sal que produce un 80 % de mortalidad) frente a agregados de AF que mantuvieran una relación AF/Cu \geq 1, usando como blanco la mayor concentración de AF de la serie, exenta de Cu(II). En todos los casos, la mortalidad fue menor o igual a 10 %, valor que es aceptado como máximo de mortalidad para el blanco. Los resultados obtenidos, promedio de al menos tres resultados independientes, se presentan en la tabla XXXVI.

Posteriormente se estudió el efecto producido al utilizar relaciones AF/Cu < 1, siempre con 0,080 ppm de sulfato cúprico, observándose un aumento real de la letalidad. La variación del % de mortalidad se muestra en la figura 17.

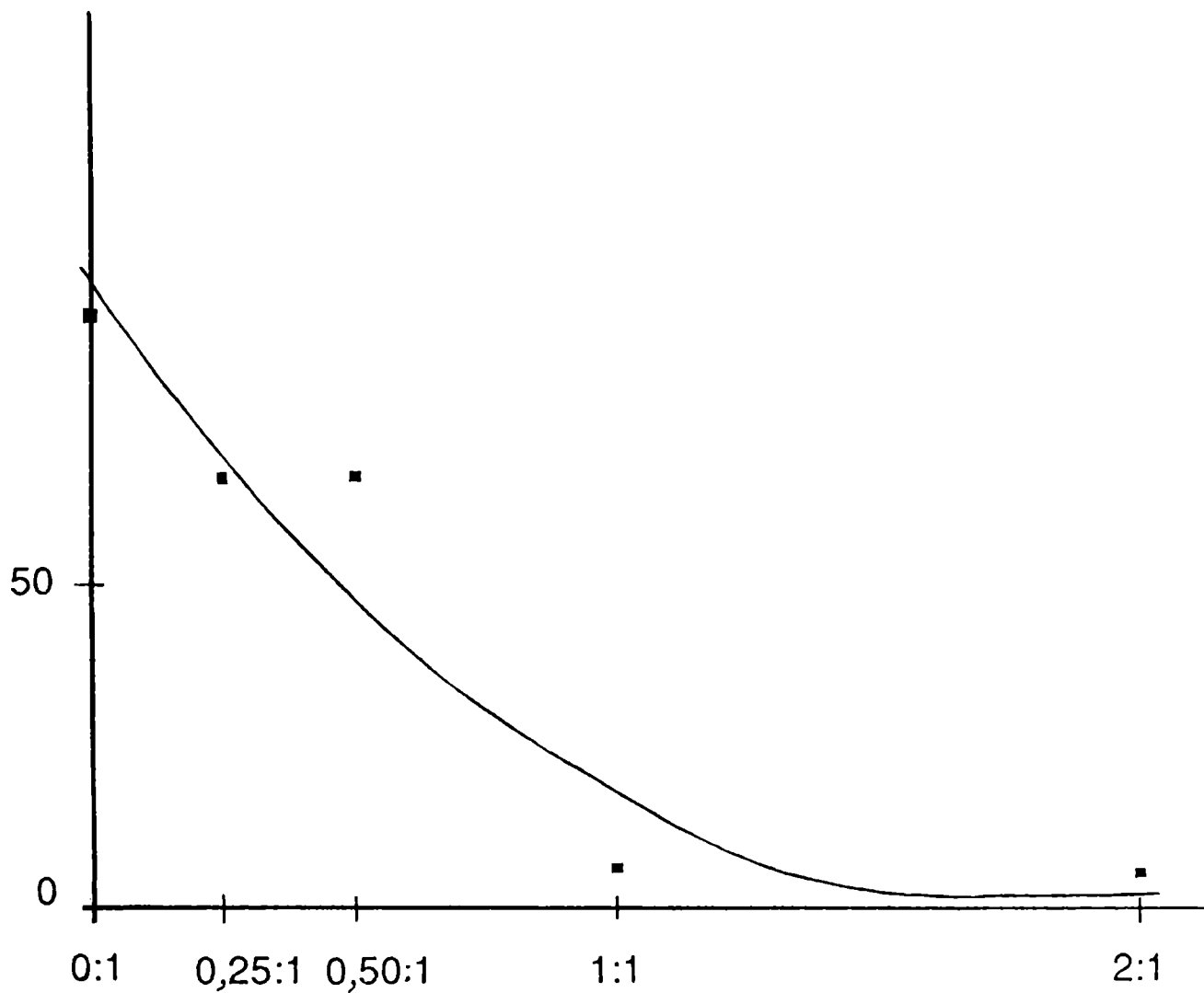


Figura 17: VARIACION DEL % DE MORTALIDAD DE *B.calicyflorus* EN FUNCION DE LA RELACION AF/CU PARA UNA CONCENTRACION DE Cu (II) DE 0.08 ppm (expresado como sulfato de cobre pentahidratado)

TABLA XXXVI.

ENSAYOS DE TOXICIDAD EN EL SISTEMA Cu(II)-AF.

PORCIENTO DE MORTALIDAD PARA LAS DISTINTAS PROPORCIONES RELATIVAS AF/Cu, CON [CuSO₄.5H₂O] = 0,080 ppm.
 (Valores promedio de al menos tres resultados independientes)

[AF] / [Cu]	0/1	0.25/1	0.5/1	1/1	2/1
CuSO ₄ .5H ₂ O (p.p.m.)					
0	< 10	<10	<10	<10	-
0.080	89.2	65.0	64.5	<10	<10

ANALISIS DE LOS RESULTADOS

En función de estos resultados queda clara la dependencia que existe entre el efecto tóxico agudo de Cu(II) sobre rotíferos, y la proporción relativa de AF agregada, como se puede ver en la figura 16; y que a partir de AF/Cu(II) ≥ 1, es decir cuando todo el cobre está complejado por AF, el efecto tóxico no se manifiesta.

Estos resultados, por otro lado, son coincidentes con los encontrados en la bibliografía consultada, en el sentido de la protección que ejerce la materia orgánica disuelta sobre el efecto tóxico de Cu(II) para especies de distintos niveles tróficos y grado de organización con un comportamiento similar al de los rotíferos, desde algas unicelulares (Sunda y Lewis 1978, Newell y Sanders 1986) a peces (Demayo y Taylor 1981). Con respecto a otros resultados obtenidos con SH, si bien existe acuerdo en el sentido de una disminución de la toxicidad del Cu(II) al asociarse con SH, los efectos no son totalmente comparables, sea porque no se describen las relaciones SH/Cu(II) utilizadas -ni los valores de la CC respectiva- (Winner et al. 1991), o porque las SH utilizadas son de origen comercial (Demayo y Taylor 1981, Stephenson y Wren 1991).

En cuanto a la extrapolación de estos resultados al medio natural, si bien la complejidad de éste -asi como el limitado conocimiento que se tiene actualmente sobre los múltiples procesos que se desarrollan en el mismo- restringen la validez de toda estimación rápida que se pretenda realizar, se podría pensar, en la información que nos brinda un parámetro global que permite componer un primer cuadro de situación: se trata de la capacidad complejante del agua filtrada.

En Río Santiago, el valor promedio hallado, determinado por voltametría de redisolución anódica, es de 0,3 μ moles de Cu(II) por litro de la misma (ver tabla XXXI), es decir 0,019 ppm de Cu(II), que es el valor de la concentración media del ion cúprico en estas aguas; y además, de acuerdo a la bibliografía consultada, los valores de CC determinados por dicha metodología resultan normalmente subvaluados en un 20-30% comparados con otras técnicas como los métodos ESI, diálisis, etc. (Weber et al. 1981, Saar y Weber 1982).

Tenemos entonces una primer conclusión: al menos en situaciones normales, es decir donde no se produzcan aumentos importantes de la concentración de Cu(II), la capacidad complejante del agua de Río Santiago es suficiente como para que el cobre (II) presente se encuentre formando complejos de gran estabilidad y por lo tanto, los rotíferos se encontrarían protegidos.

La otra aproximación, puede realizarse en función de la CC de los AF, de las concentraciones de los distintos MP involucrados en la asociación AF-MP, típicamente Cu(II), Cd(II), Zn(II), Pb(II), Co(II) y en aguas acidificadas Al(III), y la concentración estimada de AF. Por ejemplo, se puede estimar el grado de compromiso que tiene cada uno de estos MP en su asociación con AF, en función del cociente entre el producto de sus respectivas concentraciones y constantes condicionales (ver tabla XXXVII), y la suma de los productos ($[MP_i] \bar{K}_{i*} / \sum [MP_i] \bar{K}_{i*}$), que en nuestro caso particular es para las concentraciones promedio: 78,9% para Cu(II), 2,1 para Zn(II), 7,8 para Pb(II), 7,0 para Cd(II); y para

los máximos de concentraciones: 90,5% para Cu(II), 3,5 para Zn(II), 2,5 para Pb(II), 2,2 para Cd(II). Es decir que del AF total disponible, el Cu(II) sólo contará con un 79%-90%, según los casos.

Considerando que la concentración media de AF estimada es de 15 ppm (ver tabla XXXI) y que la capacidad complejante para Cu(II) es, para el pH y la salinidad promedio, de 3,328 mmol Cu(II)/g AF Saladero; entonces habría suficiente AF para complejar al Cu(II), ya que: $(3,328 \text{ mmol/g} \times 15 \text{ mg/L} \times 0,79)/1000\text{mg} = 0,040 \text{ mM Cu(II)} = 2,5 \text{ ppm Cu(II)}$. Esta concentración corresponde al máximo que podría complejar el AF presente en las condiciones naturales, y es claramente superior incluso al valor máximo encontrado en Río Santiago en estos últimos seis años.

En el análisis realizado en el párrafo anterior, no se tienen en cuenta dos de los metales que se encuentran en Río Santiago en niveles de concentración que suelen superar al los resto en un orden de magnitud, se trata de hierro y manganeso. Con respecto al primero, sólo el Fe(II) se encontraría involucrado en la asociación con AF, ya que el Fe(III), como fué dicho anteriormente en el punto 2.3.2., a pH neutro se encuentra fundamentalmente como óxido férrico hidratado, formando coloides cuya eventual interacción con AF se debe básicamente a interacciones electrostáticas.

En cuanto al equilibrio Fe(II)/Fe(III), la vida media del primero se encontraría severamente disminuída (entre horas y semanas) debido a las características propias del agua de Río Santiago, en particular a sus valores en oxígeno disuelto, pH y carbonatos (ver tabla XXXI) La cinética de la oxidación de Fe(II) por combinación directa con O₂ presenta una dependencia lineal con las respectivas concentraciones, pero de segundo orden con respecto a al pH: $-d[\Sigma\text{Fe(II)}]/dt = k [\text{Fe(II)}] \text{PO}_2 [\text{OH}^-]^2$ (Eary y Schramke 1990), por lo que si bien los tenores de O₂ en Río Santiago no son sumamente elevados, el valor del pH favorece claramente la formación de Fe(III).

En este sentido, está descripto que el Fe(OH)_2 cataliza la formación del anión superóxido, oxidándose y posibilitando la cadena de reacciones involucradas en el mecanismo propuesto por Haber-Weiss, y que además el FeCO_3 también actúa catalizando la formación de superóxido e incluso de manera más eficiente que Fe(OH)_2 (Millero 1985, Eary y Schramke 1990, Millero 1990).

Con respecto al Mn(II) , por más que su concentración es superior en un orden de magnitud a la de los restantes MP, si bien no fué posible encontrar en la bibliografía el valor correspondiente a su constante condicional, sí se conoce que su afinidad por AF es menor que la del Cd(II) (Musani-Marazovič 1986), de modo que su no inclusión en el cálculo realizado puede generar una diferencia del orden del 2-5%.

Este análisis, aún con sus limitaciones, por ejemplo nada se puede afirmar de otras especies con hábitos distintos a los rotíferos, no se tienen en cuenta los fenómenos de toxicidad crónica ni la incidencia del material en suspensión; aporta una conclusión suficientemente clara: en principio, en Río Santiago, existiría una concentración de AF suficiente como para complejar al Cu(II) presente y por lo tanto los rotíferos que estén presentes (y aquellas otras especies que interaccionen con el Cu(II) de una manera similar) estarán protegidos del efecto tóxico agudo que se produciría si el ion cúprico no se encontrara complejoado.

TABLA XXXVII
 CONCENTRACIONES MEDIA Y MAXIMAS DETERMINADAS PARA MP
 EN RIO SANTIAGO Y CONSTANTES CONDICIONALES PARA AF-MP

Cación	Concentración media	Concentración máxima	log \bar{K}^* (pH 7)
Cu(II)	0,018 ppm	0,066 ppm	5,9 - 7,9 (1)
Zn(II)	0,015 ppm	0,082 ppm	6,4 (2)
Pb(II)	0,002 ppm	0,005 ppm	5,7 - 7,5 (1)
Cd(II)	0,012 ppm	0,020 ppm	4,9 - 6,8 (1)
REFERENCIAS:			
(1) Lester et al. 1986			
(2) Ephraim et al. 1989 b.			

3.5.1. CONCLUSIONES.

1. La primer conclusión, es que siempre que la relación AF/Cu(II) se mantenga igual o mayor que 1, es decir, en la medida que todo el ion cúprico se encuentre complejado con AF, entonces tanto para rotíferos, como para aquellas otras especies con comportamiento similar no existirá efecto tóxico agudo debido a la presencia de Cu(II). En este sentido, los AF, al menos el AF "Saladero", pese a la menor estabilidad de sus complejos con Cu(II), se comportan de una manera similar a EDTA y NTA. La consecuencia directa de estos resultados es que existe un parámetro químico, la capacidad complejante, relacionado con la asociación AF-Cu(II), estrechamente vinculado al comportamiento toxicológico del elemento en cuestión.

2. En la medida en que se puedan conocer ciertos parámetros de un cuerpo de agua dulce, como su concentración en AF, las concentraciones de los MP involucrados en la asociación con AF, y la CC de estos últimos en las condiciones propias de esa agua -fundamentalmente pH y fuerza iónica-; entonces se podría llegar a estimar cuál es la concentración límite que puede considerarse no riesgosa, desde el punto de vista de la toxicidad aguda, para determinadas especies presentes en la biota de dicho sistema natural.

En particular, dado que la concentración de los AF en las aguas de Río Santiago (tomando como base 15 ppm) superan en un orden de magnitud a la necesaria para mantener una relación $AF/Cu(II) \geq 1$, se puede considerar, en una primera aproximación, que en Río Santiago existe una cantidad suficiente de AF como para proteger de las concentraciones de Cu(II) presentes, a los organismos de la especie estudiada, considerando aún las ocasiones de incrementos importantes, que llegan a 0,066 ppm.

3. Este tipo de análisis debería ser tenido en cuenta entre los criterios para la determinación de los valores guías sugeridos, o límites máximos permitidos (según sea la legislación vigente), de MP para la protección de la vida acuática.

CONCLUSIONES FINALES:

El fraccionamiento por espumas, resultó ser una herramienta adecuada para los estudios de especiación de Cu(II) con ligandos particulares, es decir para situaciones donde es posible inferir la composición del sistema. En estos casos mostró, por un lado, una gran selectividad en la recuperación de las especies de cargas opuestas -el ejemplo más concinente es sin duda la muy buena correlación encontrada entre los resultados experimentales y la distribución de especies calculada, para el equilibrio entre Cu(II) y EDTA a pH 7,4-, y por el otro, la no alteración de los equilibrios lábiles, como lo demuestra el aumento de especies aniónicas al elevar la concentración de NaCl.

Otra propiedad que se puso claramente de manifiesto es el grado de enriquecimiento alcanzado en la mayoría de los casos con espuma catiónica, con valores de hasta 1300 veces. De allí que una de las aplicaciones posibles de esta metodología, tal como se lo expresa en el texto, es la recuperación de iones metálicos presentes en sistemas acuáticos a nivel de trazas, sea para su recuperación por su valor intrínseco, como para disminuir su concentración en un efluente industrial contaminante. A tal efecto, bastaría trabajar con un ligando adecuado y elegir las concentraciones relativas ligando/MP y el tensoactivo adecuado, restando después ajustar las condiciones de laboratorio a la escala fabril, para obtener recuperaciones del orden del 100%, como ocurre para la relación EDTA/Cu(II) = 1,5.

Sin embargo, como suele ocurrir con toda metodología analítica, el fraccionamiento por espumas tiene ciertas limitaciones en su aplicabilidad. La primera de ellas es que se trata de un sistema complejo, ya que de por sí no se conocen en profundidad los mecanismos involucrados en la interacción entre la espuma formada y las especies recogidas; por este motivo su utilidad se encuentra restringida a sistemas de mediana simplicidad, o al menos a sistemas donde se conozca con certeza su composición. Esta situación quedó claramente ilustrada en el caso

de la aplicación del FPE al agua natural filtrada, donde la espuma formada dejó de comportarse como un "intercambiador inerte" para interaccionar con las SH.

Otra limitación es que para obtener una columna continua de espumas durante el tiempo de reflujos, se requiere de una supervisión permanente. Incluso, el equipo, si bien es fácil y económico de construir, es relativamente frágil, por lo que requiere de una manipulación cuidadosa; si bien a nivel industrial, podría pensarse en construirlo con otro tipo de material. Por último, al tratarse de un sistema prácticamente manual, el error asociado es importante (del orden del 10%) e incluso las condiciones de trabajo entre distintos operadores podrían no ser equivalentes. Esto no quita el poder incorporar dosificadores automáticos y sensores que permitan su semiautomatización.

En lo que respecta a la especiación del ion cúprico en aguas dulces naturales, en función de los resultados obtenidos, podemos concluir lo siguiente:

1.- El ion cúprico en un sistema acuático de condiciones equivalentes a las de un agua dulce estándar, se encuentra formando fundamentalmente especies aniónicas (65%), donde los cloruros, los oxhidrilos, el carbonato, el bicarbonato y el óxido férrico hidratado son los ligandos principales involucrados en la formación de dichas especies.

2. En presencia de AF a pH 7,40 -tanto se trate de un AF aislado de una mezcla comercial, como del aislado de las aguas de Río Santiago-, el Cu(II) se asocia con ellos formando especies aniónicas de gran estabilidad, y en particular cuando la relación AF/Cu(II) = 1, el 80% del ion cúprico se recupera con la espuma catiónica. La fuerza de la asociación entre Cu(II) y AF se pone en evidencia, no sólo en la linealidad encontrada entre el porcentaje de especies aniónicas formadas y la relación de concentraciones AF/Cu, sino también en el valor de la constante condicional asociada ($\log \bar{K}^* = 7,44$) estimada para AF Saladero por titulación potenciométrica.

3. Dicha asociación entre AF y Cu(II) actúa sobre las propiedades tóxicas del catión, observándose una dependencia de tipo logarítmica entre el porcentaje de letalidad para *B. calicyflorus* y la relación AF/Cu(II), no manifestándose el efecto tóxico agudo cuando $AF/Cu(II) \geq 1$. En otras palabras, la propiedad de los AF de asociarse con cobre, expresada cuantitativamente como "capacidad complejante", permite que en la medida que exista el AF suficiente como para complejar todo el cobre presente, lo que hace que organismos como los rotíferos no sufran el efecto tóxico agudo debido a la presencia de Cu(II).

En este sentido, AF "Saladero" se comporta de manera similar a ligandos de composición definida como EDTA y NTA en ambos sentidos: el químico, como se puso en evidencia en los resultados obtenidos por FPE para EDTA-Cu(II) y AF-Cu(II); y el toxicológico, como se manifiesta en la similitud de estos resultados con los encontrados en la bibliografía para EDTA-Cu(II) y NTA-Cu(II).

En cuanto al papel de los AF, más allá de las dificultades que existen con respecto a su caracterización fisicoquímica, por tratarse de productos intrínsecamente heterogéneos, y de las discusiones abiertas con respecto a si se los puede considerar como un representante adecuado de la materia orgánica disuelta en aguas naturales; en función de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, cabe deducir que su presencia es fundamental, por cuanto condicionan de manera determinante la especiación del Cu(II), dependiendo dicho condicionamiento primordialmente de las concentraciones relativas AF/Cu(II) y del pH.

Por otro lado, la posibilidad de contar con un método de aislamiento medianamente sencillo, permitió contar con cantidades significativas de AF local para su adecuada caracterización y los ensayos relacionados con su capacidad complejante. Incluso, este método permitiría contar en el futuro con nuevas porciones de AF, sea de Río Santiago o de otro cuerpo de agua, para continuar profundizando estos estudios, incluyendo nuevas variables.

Por último, cuando se quieren transferir estos resultados al sistema natural en estudio, si bien como ya se lo expresara, este tipo de extrapolaciones directas presentan limitaciones importantes. En el análisis desarrollado en el punto 3.5 se pudo llegar a través del uso de datos obtenidos de manera independiente a la misma conclusión: que en principio, en Río Santiago habría una cantidad suficiente de ligandos (AF) como para proteger tanto a los rotíferos como a otras especies con hábitos similares referidos a la toxicidad aguda del cobre en solución.

Quedan abiertos muchos interrogantes relacionados con la "analítica fina" de la especiación del Cu en aguas naturales (determinación de subfracciones Cu-AF ó Cu-MOD en cada fracción de distinta carga separada por espumas) llegando incluso a estudiar el efecto del aumento de la salinidad sobre estos sistemas, de manera de introducir las características de mezclas de aguas dulces y saladas.

Queda pendiente también el encontrar relaciones cuantitativas inequívocas entre COD y [AF], y de esta manera determinar hasta qué punto realmente simulan adecuadamente el comportamiento de la materia orgánica disuelta -como por ejemplo proponen Cabaniss y Shuman-, e incluso queda completamente abierto el tema de la influencia que tiene el material particulado sobre la asociación entre AF y MP.

Por último, hacen falta más estudios que involucren el equilibrio MP-AF, ampliando el espectro de organismos involucrados e introduciendo otros MP presentes en estas aguas, estudiándolos independientemente y en correlación con Cu (efectos sinérgicos y anatóxicos).

Como comentario final, tengo la impresión que esta conclusión es lo suficientemente estimulante como para promover a la realización de nuevas experiencias que apunten a ir resolviendo estos aspectos planteados, de manera de ir encontrando la lógica de estos procesos, para poder encontrar reglas de juego claras que permitan un manejo más consciente y responsable de los recursos naturales.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Aiken G.R. et al., 1979. "Comparison of XAD Macroporous Resins for the Concentration of Fulvic Acid from Aqueous Solution", *Anal.Chem.*, 5(11), 1799-1803.
- Allan R.J., 1986. "The Role of Particulate Matter in the Fate of Contaminants in Aquatic Ecosystems", Environment Canada, Scientific Series N° 142.
- Amy G.L. et al., 1989. "Effect of Humic Substances on Particles Formation, Growth, and Removal During Coagulation", en "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., A.C.S., Advances in Chemistry Series No 219, 443-452.
- Baran E.J., 1985. "Química Bio-inorgánica", Edición de la Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires.
- Beckett R. et al., 1989. "Analysis of Humic Substances Using Flow Field -Flow Fractionation", en "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., Advances in Chemistry Series N° 219, A.C.S., 65-81.
- Betti M. y P. Papoff, 1988. "Trace Metals: Data and Information in the Characterization of an Aqueous Ecosystem", *CRC Crit.Rev.Anal.Chem.*, 19(4), 271-322.
- Bikerman J.J., 1973. "Foams", Springer-Verlag.
- Blaise C. et al., 1988. "Biological Testing-Development, Application, and Trends in Canadian Environmental Protection Laboratories", *Toxic.Assess.*, vol.3, 385-406.
- Blutstein H. y R.F. Shaw, 1981. "Characterization of Copper Binding Capacity in Lake Water", *Environ.Sci.Technol.*, 15(9), 1100-1102.
- Bornemisza E., 1982. "Química de suelos", Monografía No 25, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, OEA.
- Bottero J.Y. y J.L. Bersillon, 1989. "Aluminum and Iron(III) Chemistry. Some Implications for Organic Substance Removal", en "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., Advances in Chemistry Series N° 219, A.C.S., 425-442.
- Bruchet A., et al., 1989. "Effect of Humic substances on the Treatment of drinking Water", en "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., Advances in Chemistry Series N° 219, A.C.S., 93-106.

- Buddrus J., et al., 1989. "Quantitation of Partial Structures of Aquatic Humic Substances by One -and Two- Dimensional Solution ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Anal.Chem., 61(3), 628-631
- Buffle J. et al., 1977. "Measurement of Complexation Properties of Humic and Fulvic Acid in Natural Waters with Lead and Copper Ion-Selective Electrodes", Anal.Chem., 49(2), 216-222.
- Buffle J. et al., 1980. "A Critical Comparison of Studies of Complex Formation between Copper(II) and Fulvic Substances of Natural Waters", Anal.Chim.Acta, 1980, 118(1), 29-44.
- Bull R.J., 1982. "Health Effects of Drinking Water Disinfectants and Disinfectant by-products", Environ. Sci. Technol., 16(10), 554 A - 559 A.
- Byrne R.H. y W.L. Miller, 1985. "Copper(II) Carbonate Complexation in Seawater", Geochim.Cosmochim.Acta, 49, 1837-1844.
- Cabaniss S.E. y M.S. Shuman, 1988. "Copper Binding by Dissolved Organic Matter: I. Suwannee River Fulvic Acid equilibria" y "Copper Binding by Dissolved Organic Matter: II. Variation in Type and Source of Organic matter", ibid., 52, 185-193 y 195-200.
- Campbell P.G.C. et al., 1977. "Critical Evaluation of the Copper(II) Solubilization Method for the determination of the Complexation capacity of Natural Waters", Anal.Chem., 49(14), 2358-2362.
- Carreira L.A. et al., 1991. "Continuous Multiligand Distribution Model Used to Predict the Stability Constant of Cu(II) Metal Complexation with Humic Material from Fluorescent Quenching Data", Environ.Sci.Technol., 25(8), 1427-1431.
- Catoggio J.A y A.A. Porta, 1989. "Concentration of Differently Charged Heavy Metals Species from Natural Waters. I. Copper (II)", H.R.C & C.C., vol. 12, 495-497.
- Catoggio J.A. y A.A. Porta, 1991. "Estudio de la especiación del ion cúprico en sistemas acuáticos: aplicación de la concentración selectiva por espumas al equilibrio EDTA-Cu", Afinidad (en prensa).
- Collins M.R., et al., 1986. "Molecular Weight Distribution, Carboxylic Acidity, and Humic Substances Content of Aquatic Organic Matter: Implications for Removal during Water Treatment", Environ. Sci.Technol., 20(10), 1028-1032
- Cox J.A., 1984. "Metal Speciation by Donnan Dialysis", Anal.Chem., 56(4), 650-653.

- Chang D.L. and H.L. Rosano, 1986. "Monolayer Properties of Octadecyldimethylamine Oxide and Sodium Alkyl Sulfate", en "Phenomena in Mixed Surfactants Systems", J.F. Scamehorn ed., ACS Symposium Series N° 311, 116-132.
- Cheng K.L. y R.H. Bray, 1955. "1-(2-Pyridylazo)-2-naphtol as a Possible Analytical Reagent", Anal.Chem., 27, 782-785.
- Chiou et al., 1987. "A Comparison of Water Solubility Enhancements of Organic Solutes by Aquatic Humic Materials and Commercial Humic Acids", Environ.Sci.Technol., 21(12), 1231-1234.
- Davis J.A. y R Gloor, 1981. "Adsorption of Dissolved Organics in Lake Water by Aluminium Oxide. Effect of Molecular Weight", ibid., 15(10), 1223-1229.
- Demayo A. y M.C. Taylor, 1981. "Guidelines for Surface Water Quality" Vol.1, "Inorganic Chemical Substances, Copper", Environment Canada, Inland Waters Directorate.
- De Nobili et al., 1989. "Investigation of the Interactions Between Humic Substances and a Cationic Detergent (CetylTrimethylammonium Bromide)", Sci.Total Environ., 81/82, 635-642.
- Dick J.W. y F. Talbot, 1971. "The Use of an Auxiliary Ligand in the Foam Fractionation of Copper", Ind. Eng. Chem. Fundam., 10(2), 309-312
- Dixit N.S. y R.A. Mackay, 1983. "Absorption and Emission Characteristics of merocyanina 540 in Microemulsions", J.Am.Chem Soc., 105, 2928-2929.
- Dodin G. et al., 1987. "Thermodynamic and Kinetic Studies of the Interaction of Merocyanine 540 with Hydrophobic Aggregates. 1. Binding of Merocyanine 540 to Sodium Dodecyl Sulfate Micelles", J.Phys.Chem., 91(5), 1166-1172.
- Eary E.L. y J.A. Schramke, 1990. "Rates of Inorganic Oxidation Reactions Involving Dissolved Oxygen", in "Chemical Modeling of Aqueous Systems II", D.C. Melchior y R.L. Bassett eds., ACS Symposium Series N° 416, pp. 379-395.
- Eikebrokk B. y Vik E.A., 1989. "Coagulation Process for Removal of Humic Substances", en "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., Advances in Chemistry Series N° 219, A.C.S., 385-408.
- Engel D.W. et al., 1981. "Factors Affecting Trace Metal Uptake and Toxicity to Estuarine Organisms.I. Environmental Parameters", en: "Biological Monitoring of Marine Pollutants", F.J. Vernberg, A. Calabrese, F.R. Thurberg, and W.B. Vernberg, eds., Academic Press, 127-144.

- Ephraim J.H. et al., 1989 a. "A Novel Description of the Acid-Base Properties of an Aquatic Fulvic Acid", *Environ. Sci.Technol.*, 23(3), 356-62.
- Ephraim J.H. et al., 1989 b. "Complex-Forming Properties of Natural Organic Acids", *Talanta*, 36(4), 437-443.
- Farmacopea U.S.A., 1980. "The United States Pharmacopeia", Twentieth Revision, Official from July 1, 1980. United States Pharmacopeial Convention, Inc.
- Ferris J.P., 1984. "The Chemistry of Life Origin", *Chem.Eng. News*, August 27, 21-35.
- Fish W. y B.A. Bonn, 1991. "Variability in the Measurement of Humic Carboxyl Content", *Environ. Sci.Technol.*, 25(2), 232-240.
- Fox L.E., 1988. "The Solubility of Colloidal Ferric Hydroxide and its Relevance to Iron Concentration in River Water", *Geochim.Cosmochim.Acta*, 52, 771-777.
- Gamble D.S., 1986. "Interactions Between Natural Organic Polymers and Metals in Soil and Freshwater Systems: Equilibria", en "The Importance of Chemical "Speciation" in Environmental Processes", M. Bernhard, F.E. Brinckman, and P.J. Sadler, eds., Springer-Verlag, 217-236.
- Gamble D.S. y C.H. Langford, 1988. "Complexing Equilibria in Mixed Ligands Systems: Test of Theory with Computer Simulations", *Environ.Sci.Technol.*, 22(11), 1325-1336.
- Garbarini D.L. and Lion L.W., 1986. "Influence of the Nature of Soil Organics on the Sorption of Toluene and Trichloroethylene", *ibid.*, 20(12), 1263-1269.
- Giddings J.C., 1988. "Field-Flow Fractionation", *Chem. Eng. News*, Special Report, October 10, 34-45.
- Goyer R.A., 1986. "Toxic Effects of Metals", en "Casarett and Doull's Toxicology", C.D. Klaassen, M.A. Amdur and J. Doull eds., Macmillan Pub., 582-635.
- Grant C.L. et al., 1986. "Fluorescence Quenching Method for Determining Equilibrium Constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Binding to Dissolved Humic Materials", *Environ.Sci.Technol.*, 20(11), 1162-66.
- Grant C.L. et al., 1987. "Effects of Structural and Compositional Variations of Dissolved Humic Materials on Pyrene Koc Values", *ibid.*, 21(3), 243-248.
- Grieves R.B., 1975. "Foam Separation: A Review", *Chem.Eng.J.* 9, 93-106.

- Grieves R.B., et al., 1976. "Selective Foam Fractionation of Chloride Complexes of Zinc(II), Cadmium(II), Mercury(II), and Gold(III)", *Anal.Chem.*, 48(7), 975-979.
- Harrison R.M. y D.P.H. Laxen, 1981. "Cleaning Methods for Polythene Containers Prior to the Determination of Trace Metals in Freshwater Samples", *Anal.Chem.*, 53(2), 345-350.
- Hobo T. et al., 1978. "Batch and Continuous Foam Separation of Cu(II) Ions in Water", *Bunseki Kagaku*, 27, 104-108.
- Huang R. y F. Talbot, 1973. "The removal of Copper, Cadmium, and Lead Ions From Dilute Aqueous Solutions Using Foam Fractionation", *Can.J.Chem.Eng.*, 51(12), 709-13
- Hulancki A., 1980. "3rd Symposium on Ion-Selective Electrodes", *Mátrafüred, Hungarian Academy of Sciences*, 103-122.
- Jhonson C.A., 1986. "The Regulation of Trace Elements Concentration in River and Estuarine Waters Contaminated with Acid Mine Drainage: The Adsorption of Cu and Zn on Amorphous Fe Oxyhydroxides", *Geochim.Cosmochim.Acta*, 50, 2433-2438.
- Junk G.A. et al., 1974. "Use of Macroreticular Resins in the Analysis of Water for Trace Organic Contaminants", *J.Chromatogr.*, 99, 745-762.
- Karger B.L. et al., 1966. "Foam Fractionation Under Total Reflux", *Anal.Chem.*, 38(6), 764-767.
- Karger B.L. y D. De Vivo, 1968. "General Survey of Adsorptive Bubble Separation Processes", *Sep.Sci.*, 3(5), 393-424.
- Karger B.L. y M.W. Miller, 1969. "Selectivity in Foam Separation by Control of Charge on the Extracting Solute: Metal-Chloro Complexes", *Anal.Chim.Acta*, 48, 273-290
- Kile D.E. y C.T. Chiou, 1989. "Water-Solubility Enhancement of Nonionic Organic Contaminants", *ibid.*, 131-158.
- King C.J., 1981. "Separation Processes", *Mc Graw-Hill Chemical Engineering Series*, 23-28, 164-166.
- Kolthoff I.M. et al., eds., 1979. "Análisis Químico Cuantitativo", *Librería y Editorial Nigar SRL, Bs.Aires.*
- Kononova M.M., 1982. "Materia Orgánica del Suelo", *Oikos-Tau Editorial, Madrid.*
- Krasne S., 1980. "Interaction of Voltage-Sensing Dyes with Membranes II", *Biophys.J.*, 30(6), 441-462.
- Kremling K., 1988. "Metal Cycles in Coastal Environments", en: "Metals in Coastal Environments of Latin America", U. Seeliger, L.D. de Lacerda, and S.R. Patchieelam, eds., *Springer-Verlag*, 199-214.

- Laegreid M. et al., 1983. "Seasonal Variation of Cadmium Toxicity toward the Alga *Selenastrum capricornutum* Printz in Two Lakes with Different Humus Content", *Environ.Sci.Technol.*, 17(6), 357-361.
- Laitinen H. and Harris W., 1975. "Chemical Analysis", Mc Graw Hill, New York, pp. 445-447.
- Leckie J.O. et al., 1990. "Study of Copper(II) Association with Dissolved organic Matter in surface Waters of three Mexican Coastal Lagoons", *Environ.Sci.Technol.*, 24(5), 683-688.
- Leenheer J.A. et al., 1989. "Implications of Mixtures Characteristics on Humic-Substances Chemistry", en "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., *Advances in Chemistry Series N° 219*, A.C.S., 25-40
- Lemlich R., 1968. "Principles of Foam Fractionation", in "Progress in Separation and Purification", E. Perry ed., Interscience, vol.1, Chap.1, 1-55.
- Lemlich R., 1972. "Adsorbable methods", *Recent. Develop. Sep. Sci.*, 1, 113-127.
- Lester J.N. et al., 1986. "Comparative Study of Heavy Metal Complexation by Fulvic Acid", *Environ.Technol.Letters*, 7, 495-500.
- Liebezeit G., 1988. "Distribution of Dissolved Humic Compounds in the Southern North Sea", in *Biogeochemistry and Distribution of Suspended Matter in the North Sea and Implication to Fisheries Biology*, S. Kempe, G. Liebezeit, V. Dethlefsen and U. Harms eds., SCOPE-UNEP, pp. 153-162.
- Lytle J.S. et al., 1979. "Hydrocarbons in Benthic Algae from Eastern Gulf of Mexico", *Mar.Biol.*, 51(3), 279-288.
- MacCarthy P. y I.H. Suffet, 1989. Introducción of "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., A.C.S., *Advances in Chemistry Series No 219*, xvii-xxx.
- Malcolm R.L. y P. MacCarthy, 1986. "Limitations in the Use of Commercial Humic Acids in Water and Soil Research", *Environ.Sci.Technol.*, 20(9), 904-911.
- Malcolm R.L. y P. MacCarthy, 1989. "The Nature of Commercial Humic Acids", en "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., A.C.S., *Advances in Chemistry Series No 219*, 55-64.

- Marinsky J.A. y J.H. Ephraim, 1986. "A Unified Physicochemical Description of the Protonation and metal Ion Complexation Equilibria of Natural organic Acids (Humic and Fulvic Acids)", *ibid.*, 20(4), 349-366.
- McCarthy J.F., 1989. "Bioavailability and Toxicity of Metals and Hydrophobic Organic Contaminants", "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., A.C.S., Advances in Chemistry Series No 219, 263-280.
- Meier P.G. et al., 1988. "Estimation of a Single Probit line from Multiple Toxicity Test Data", *Aquatic Toxicol.*, 12, 193-202.
- Miller I.R. y P.L. Lelkes, 1980. "Perturbations of Membrane Structure by Optical Probes: I. Location and Structural Sensitivity of Merocyanine 540 Bound to Phospholipid Membranes", *Membr.Biol.*, 52, 1-15.
- Millero F.J., 1985. "The Effect of Ionic Interactions on the Oxidation of Metals in Natural Waters", *Geochim.Cosmochim.Acta*, 49, 547-553.
- Millero F.J., 1990. "Effect of Ionic Interaction on the Oxidation Rates of Metals in Natural Waters", in "Chemical Modeling of Aqueous Systems II", D.C. Melchior y R.L. Bassett eds., ACS Symposium Series N° 416, 447-460.
- Mizuike Atsushi, 1987. "Recent developments in Trace Metal Speciation in Fresh Water", *Pure & Appl.Chem.*, 59(4), 555-564.
- Musani-Marazovič L. et al., 1986. "The Interaction of Trace Metal Radionuclides with Humic Substances", en: "Organic Marine Geochemistry", ACS Symposium Series N° 305, pp. 389-412.
- Nelson A. y R.F.C. Mantoura, 1984. "Voltammetry of Copper Species in Estuarine Waters. Part II. Copper Species Reduction at the HMDE in Estuarine Waters", *J.Electroanal.Chem*, 164(2), 253-264.
- Newell A.D. y J.G. Sanders, 1986. "Relative Copper Binding Capacities of Dissolved Organic Compounds in a Coastal-Plain Estuary", *Environ.Sci.Technol.*, 20(8), 817-821.
- Odum E.P., 1972. "El Método del Hábitat" en "Ecología", Editorial Interamericana, 330-379.
- Olivier S.R., "Rotíferos Planctónicos de Argentina (con claves de las principales especies, datos biológicos y distribución geográfica)", *Rev.Museo Cs.Nat.UNLP*, 1963, VIII (63), 193-205
- Pace M.L. y J.D. Ocrutt, 1981. "The relative importance of Protozoans, rotifers and Crustaceans in a Freshwater Zooplankton Community", *Limnol.Oceanogr.*, 26, 822-830.

- Park C.K. y H.E.Allen, 1984. "Prediction of Chemical Species of Heavy Metals in Natural Waters", "Conference on Environmental Contamination", London, pp. 237-240.
- Parker C.A. y W.T. Rees, 1962. "Fluorescence Spectrometry: A Review", *The Analyst*, 87(2), 83-111.
- Parker C.A., 1968. "Photoluminescence of Solutions", Elsevier, New York, pp. 220-232.
- Parkhurst D.L., 1990. "Ion-Association Models and Mean Activity Coefficients of Various Salts", en "Chemical Modeling of Aqueous Systems II", D.C. Melchior y R.L. Bassett eds., ACS Symposium Series N° 416, 34-36.
- Pelletier Emilien, 1988. "Acute toxicity of Some Methylmercury Complexes to *Mytilus edulis* and Lack of Selenium Protection", *Mar.Poll.Bull.*, 19(5), 213-219.
- Perdue E.M. y J.H. Reuter, 1977. "Importance of Heavy Metal-Organic Matter Interactions in Natural Waters", *Geochim.Cosmochim. Acta*, 41, 325-334.
- Perdue E.M. y C.R. Lytle, 1983. "Distribution Model for Binding of Protons and metal Ions by Humic Substances", *Environ.Sci.Technol.*, 17(11), 654-660.
- E.M. Perdue, 1988. "Measurements of Binding Site Concentration in Humic Substances", en: "Metal Speciation: Theory, Analysis and Application", J.R. Kramer and H.E. Allen, eds., Lewis Pub., pp. 135-154.
- Perdue E.M., 1989. "Effect of Humic Substances on Metal Speciation", in "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., A.C.S., Advances in Chemistry Series No 219, 281-296.
- Persoone G. et al., 1990. "TOXKITS Intercalibration Exercise in Europe, The U.S.A., and Canada. Final Report".
- Petersen Richard, 1982. "Influence of Copper and Zinc on the Grow of a Freshwater Alga, *Scenedesmus quadricauda*: The Significance of Chemical Speciation", *Environ.Sci.Technol.*, 16(8), 443-447.
- Pettersson C., et al., "Properties of Fulvic Acids from Deep Groundwaters", *Sci.Total Environ.*, 81/82, 1989, 287-296
- Poncha R.P. y B.L. Karger, 1965. "Studies of Recovery by Foam-Fractionation on 1-Naphthylamine". *Anal.Chem.*, 37(3), 422-424.
- Reckhow et al., 1990. "Chlorination of Humic materials: Byproduct Formation and Chemical Interpretations", *Environ.Sci. Technol.*, 24(11), 1655-1664.

- Rice J.A. y P. MacCarthy, 1989. "Characterization of a Stream Sediment Humin", en "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds. Advances in Chemistry Series N^o 219, A.C.S., 41-54.
- Roca A.E., 1971. "Fraccionamiento por Espuma: Estudio del Efecto de Variables, Aplicación al Enriquecimiento y Eventual Separación de Indicadores Derivados de la Sulfonftaleína", Tesis Doctoral, Fac.Cs Exactas, UNLP.
- Ronco A., A. Porta y A. Roca, 1991. "Contaminación Urbano Industrial del Río Santiago, Canal Oeste y Sector Próximo del Río de la Plata", Ciencia Hoy, en prensa.
- Ross S., 1980. "Foams", en "Kirk & Othmer Encyclopedia of Chemical Technology", Wiley, 3rd.edition, vol.11, 127-145.
- Rosell R.A. et al., 1972 a. "Estudio potenciométrico del humus. II. Determinación de varios tipos de acidez (o grupos funcionales) de ácidos húmicos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina", Turrialba, 22(3), 327-332.
- Rosell R.A. et al., 1972 b. "Estudio potenciométrico del humus. I. Determinación de ácidos e hidroxiaácidos orgánicos y de un ácido fúlvico", Turrialba, 22(3), 317-326.
- Rubin E. y E.L. Gaden, 1962. "Foam Separation", in "Chemical Engineering Separation Techniques", H.M. Schoen ed., Interscience, chapter 5th, 319-385.
- Ryan D.K. y J.H. Weber, 1982 a. "Fluorescence Quenching Titration for Determination of Complexing Capacity and Stability Constants of Fulvic Acid", Anal.Chem., 54(6), 986-990.
- Ryan D.K. y J.H. Weber, 1982 b. "Copper (II) Complexing Capacities of Natural Waters by Fluorescence Quenching", Environ. Sci.Technol., 16(12), 866-872.
- Saar R.A. y J.H. Weber, 1980. "Comparison of Spectrofluorometry and Ion-Selective Electrode Potentiometry for Determination of Complexes between Fulvic Acid and Heavy-Metal ions", Anal.Chem., 52 (13), 2095-2100.
- Saar R. y J. Weber, 1982. "Fulvic Acid: Modifier of Metal-ion Chemistry", Environ.Sci.Technol., 16(9), 510A-517A.
- Salomons W.y U. Förstner, 1984. "Metals in the Hydrocycle", Springer -Verlag, 1-24; 50-62.
- Salomons W. et al., 1988. "Behaviour and Impact Assessment of Heavy Metals in Estuarine and Coastal Zones", en: "Metals in Coastal Environments of Latin America", U. Seeliger, L.D. de Lacerda, and S.R. Patchieelam, eds., Springer-Verlag, 157-198.

- Sandell E.B. et al., 1950. "Colorimetric Determination of Traces of Metals", en "Chemicals Analysis", B.L. Clarke and I.M. Kolthoff eds., Interscience, 2nd. ed., vol.III.
- Sanders J.G., 1982. "Chlorination of Estuarine Water: The Occurrence and Magnitude of Carbon Oxidation and its Impact on Trace-Metal Transport", Environ.Sci.Technol., 16(11), 791-796.
- Scamehorn J.F., 1986. "On Overview of Phenomena Involving Surfactants Mixtures", en "Phenomena in Mixed Surfactants Systems", J.F. Scamehorn ed., ACS Symposium Series N° 311, 1-29.
- Secretaría de Recursos Hídricos de la República Argentina, Cuenca del Plata, 1987. "Niveles Guía de Calidad de Agua en Función de los Diferentes Usos del Recurso".
- Sengupta A.K. et al., 1991. "Metal(II) Ion Binding onto Chelating Exchangers with Nitrogen Donor Atoms: Some New Observations and related Implications", Environ. Sci. Technol., 25(3), 481-488.
- Shimoizaka J., et al., 1972. "Removal of Ferricyanide and Ferrocyanide Ions from Waste Water by Ion Flotation Technique". Nippon Kagaku Kaishi, 12, 2428-2432. (CA: 78:75577n)
- Simpson S.J., 1980. "Practical Techniques for Ion-Selective Electrodes", en "Ion-Selective Electrode Methodology", A.K. Covington ed., CRC Press, pp. 43-66.
- Snell T.N. y G. Persoone, 1989. "Acute Toxicity Bioassay Using Rotifers. II. A Freshwater Test with *Brachionus Rubens*", Aquatic Toxicol., 14, 81-92.
- Sonnenberg L.B., et al., 1989. "Chemical Degradation of Humic Substances for Structural Characterization", in "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., Advances in Chemistry Series N° 219, A.C.S., 3-24.
- "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 1985, 16 th. ed., preparada y publicada conjuntamente por "American Public Health Association", "American Water Works Association" y "Water Pollution Control Federation".
- Stary J., 1972. "The Solvent Extraction of Metals Chelates", Pergamon Press Ltd., Oxford, England.
- Stephenson G.L. y C.D. Wren, 1991. "The Effect of Acidification on the Accumulation and Toxicity of Metals to Freshwater Invertebrates", Environ.Pollution, 71, 205-241.
- Stumm W. y P.A. Brauner, 1975. "Chemical Speciation" in "Chemical Oceanography", J.P. Riley and R.S. Kirrow eds., Academic Press, vol.1, 222-226.

- Sunda W.G. and Lewis J.A.M., 1978. "Effect of Complexation by Natural Organic Ligands on the Toxicity of Copper to a Unicellular Alga *Monochrysis lutheri*", *Limnol.Oceanogr.*, 23(5), 870-876.
- Sunda W.G. y R.V. Gessner, 1989. "The Production of Extracellular Copper-Complexing Ligands by Marine and Estuarine Fungi", *Chem.Speciation Bioavailability*, 1(2), 65-70.
- Tambo N., et al., 1989. "Evaluation of the Extent of Humic Substances Removal by Coagulation", en "Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants", I.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., *Advances in Chemistry Series N° 219*, A.C.S., 453-472.
- Thurman E.M. y R.L. Malcolm, 1981. "Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances", *Environ.Sci.Technol.*, 15(4), 463-466.
- Truitt R.E. y J.H. Weber, 1981 a. "Copper(II) -and Cadmium (II)-Binding Abilities of Some New Hampshire Freshwaters Determined by Dialysis Titration", *ibid.*, 15(10), 1204-1208.
- Truitt R.E. y J.H. Weber, 1981 b. "Determination of Complexing Capacity of Fulvic Acid for Copper(II) and Cadmium(II) by Dialysis Titration", *Anal.Chem.*, 53(2), 337-342.
- Turner D.R. y M. Whitfield, 1987. "An Equilibrium Speciation Model for Copper in Sea and Estuarine Waters at 25°C Including complexation with Glycine, EDTA and NTA", *Geochim.Cosmochim. Acta*, 51, 3231-3239.
- Viarengo Aldo, 1989. "Heavy Metals in Marine Invertebrates: Mechanisms of Regulation and Toxicity at the Cellular Level", *CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences*, 1(2), 295-317.
- Visser S.A., 1983. "Application of Van Krevelen's Graphical-Statistical Method for the Study of Aquatic Humic Material", *Environ.Sci.Technol.*, 17(7), 412-417.
- "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry", 1979. Revised by Furniss B.S. et al., 4th. ed., Longman, 948-1000.
- Vetoshkin A.G. y A.M. Kutepov, 1977. "Study of the Hydrodynamic Characteristics of the Separation of Foam Structures of a Gas-Liquid Streams in Confusor Nozzles", *Teor.Osn.Khim.Tekhnol.*, 11(3), 423-431. (C.A: 88:39401 y)
- Wangersky P.J. y Z. Xianliang, 1989. "Study of Copper-complexing Organic Ligands: Isolation by Sep-Pak C18 Column Extraction Technique and Characterization by Chromarod Thin-layer Chromatography", *Mar.Chem.*, 26, 21-40.
- Weast R. C., ed., 1981, "Handbook of Chemistry and Physics", 60 th. ed., C.R.C. Press, Inc.

- Weber J.H. et al., 1981. "Titration of Soil-Derived Fulvic Acid by Copper(II) and Measurement of free Copper(II) by Anodic Stripping Voltammetry and Copper(II) Selective Electrode", *Anal.Chem.*, 53(14), 2275-2280.

- Weber J.H. et al., 1983. "Corrected Fluorescence Spectra of Fulvic Acid Isolated from Soil and Water", *Environ. Sci. Technol.*, 17(8), 501-504.

- Wershaw R. L. et al., 1981. "Direct ^{13}C NMR Evidence for Carbohydrate Moieties in Fulvic Acids", *ibid.*, 15(12), 1461-1463.

- Winner W.R. et al., 1991. "toxicity of copper to the Green Alga, *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) as Affected by Humic substances of Terrestrial and Freshwater Origin", *Aquat.Toxicol.*, 19, 89-96.

- Wolfe R. L., 1990. "Ultraviolet Disinfection of Potable Water", *Environ.Sci.Technol.*, 24(6), 768-773.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. J. T.', located in the lower right quadrant of the page.