



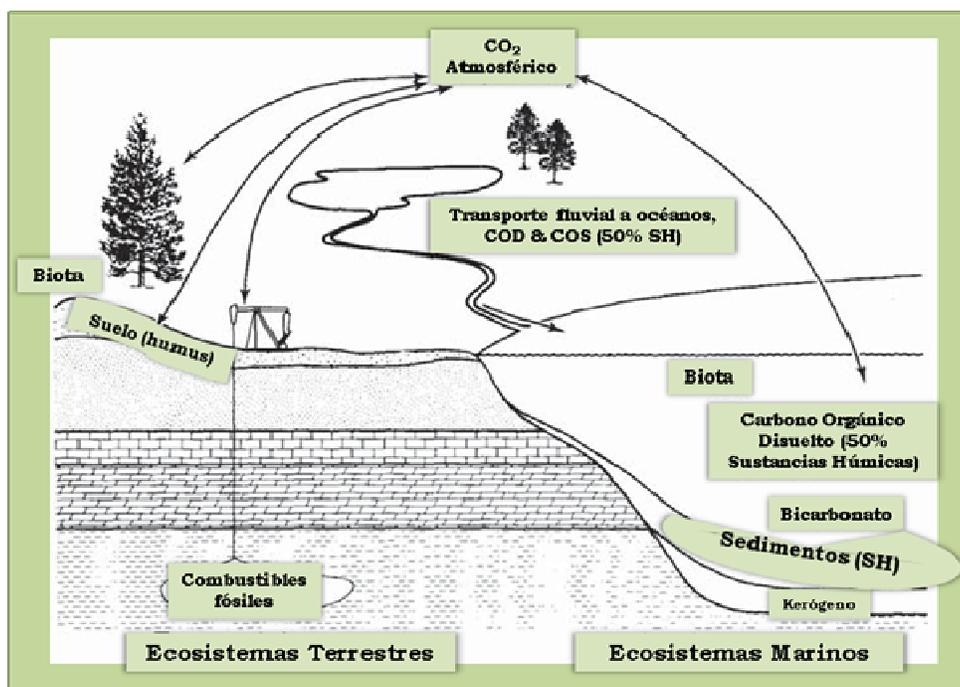
Capítulo 1

Antecedentes y Objetivos.

1.1.- Sustancias húmicas.

Las sustancias húmicas (SH) son los principales componentes de la materia orgánica en el suelo, las aguas naturales y en los depósitos geológicos orgánicos tales como los sedimentos marinos, las turbas, el lignito y las lutitas. Las SH son las responsables del color marrón característico de restos vegetales en descomposición y contribuyen al color marrón o negro en la superficie del suelo. Son las principales componentes de la materia orgánica (MO) en las aguas superficiales y en concentraciones más altas pueden impartir un color marrón oscuro, sobre todo en estanques de agua dulce, lagos y arroyos. En la hojarasca y en los materiales compostados (compost), el color puede ser amarillo-marrón a negro, dependiendo del grado de descomposición y la concentración en la que se encuentren.

Las SH son componentes muy importantes en los suelos que afectan a sus propiedades fisico-químicas y mejoran su fertilidad. En sistemas acuosos, como ríos, las SH constituyen alrededor del 50% de la materia orgánica disuelta (MOD) controlando el pH de estos medios, por su capacidad reguladora del pH (ver esquema 1.1). En los sistemas terrestres y acuáticos las SH afectan la química y la biodisponibilidad de los elementos químicos, así como el transporte y la degradación de xenobióticos y compuestos orgánicos naturales. Las SH intervienen en la productividad biológica de los ecosistemas acuáticos, así como también en la formación de subproductos de desinfección durante el tratamiento del agua. Las SH son mezclas complejas y muy heterogéneas de materiales polidispersos formados por reacciones bioquímicas y químicas durante la

Esquema 1.1.- Diferentes fuentes de sustancias húmicas.

descomposición y transformación de materiales vegetales, restos microbianos (en un proceso denominado *humificación*). La lignina y sus productos de transformación, así como también los polisacáridos, la melanina, la cutina, las proteínas, los lípidos, los ácidos nucleicos, entre otros, son componentes importantes que participan en este proceso. Las SH en suelos y sedimentos se pueden dividir en tres fracciones principales, en función de su solubilidad: ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas. Los AH y AF son extraídos del suelo y otras fuentes en fase sólida utilizando soluciones alcalinas de NaOH, KOH, urea, pirofosfato. Los AH son

insolubles a pH bajo, y se precipitan por adición de ácido fuerte (ajustando el pH a 1 con HCl). La humina no puede ser extraída, ya sea con una base fuerte o un ácido fuerte.

Las SH acuáticas sólo contienen AH y AF, estos componentes en general se eliminan del agua al reducir el pH a 2 y al adsorber ambos componentes en una columna de resina adecuada. Los AH y AF se extraen de la resina con una base fuerte y un posterior descenso del pH hasta alcanzar el valor de pH 1, para precipitar los AH. La separación con una columna de resina adecuada se utiliza también para separar los AF de los materiales no húmicos (aminoácidos, péptidos, azúcares, etc.) extraídos de los

suelos. A bajos valores de pH los AF son absorbidos en la resina, pero los materiales no húmicos pueden pasar a través de la columna.

Las SH son altamente reactivas químicamente y resistentes a la biodegradación. La mayor parte de los datos de AH, AF y huminas se refieren a las propiedades y estructuras promedio de un gran ensamble de componentes de estructura y peso molecular diversos. Las propiedades y la estructura precisa de una determinada muestra de SH dependen de la fuente de agua o suelo y las condiciones específicas de la extracción. Sin embargo, las propiedades promedio de AH, AF y huminas que provienen de fuentes diferentes son muy similares.

Un aspecto importante a tener en cuenta en el estudio de las SH es el conocimiento detallado de sus tamaños moleculares, ya que este parámetro permite entender sus propiedades fisicoquímicas y su rol en el medio ambiente.

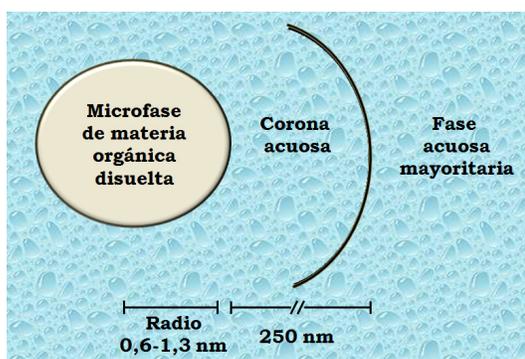
Los conceptos tradicionales originados de las observaciones de elevados pesos moleculares [1,2], postularon que las SH estaban compuestas por macromoléculas poliméricas [3]. Sin embargo, la evidencia recopilada durante la última década sobre una base de una amplia gama de técnicas proporciona una nueva visión [4]. Este

punto de vista alternativo indica que el elevado peso molecular de las SH es sólo aparente y resulta, más bien, del auto-ensamblaje de fracciones orgánicas relativamente pequeñas y heterogéneas dentro de grandes especies supramoleculares estabilizadas por fuerzas de dispersión débiles, como se ve el esquema 1.2 se forman sistemas microheterogéneos [5].

Las mismas interacciones que promueven la asociación supramolecular también conducen a la formación de agregados de SH del tipo micelas-micrométricas, en los cuales una organización intra o intermolecular produce dominios interiores hidrofóbicos separados del entorno acuoso por capas externas hidrofílicas [4,5,6]. Los valores de la concentración micelar crítica (cmc) dependen de parámetros tales como el pH, la temperatura y, la naturaleza de las SH. Recientemente, se ha demostrado que en el interior hidrofóbico de las SH, las concentraciones de $O_2(a^1\Delta_g)$ son de 2 a 3 órdenes de magnitud más altas que en la solución [7]. En esta línea, Hassett propuso que la materia orgánica disuelta cromofórica actúa como un microrreactor, el cual podría facilitar la degradación de un contaminante por ponerlo en estrecha

asociación con el $O_2(a^1\Delta_g)$ producido fotoquímicamente [8].

Esquema 1.2.- Microheterogeneidad de los sistemas agua-sustancias húmicas. Esquema adaptado de la referencia [7].



1.2.- Seguimiento del proceso de compostaje mediante diferentes técnicas.

Los residuos sólidos urbanos y agropecuarios (domiciliarios, de mataderos, de granjas, estiércoles, de la producción de aceite de oliva, etc.) constituyen un gran reservorio de MO. Sin embargo, no pueden usarse directamente para enriquecer a los suelos, sino que deben ser previamente tratados a través de procesos adecuados como el compostaje y así obtener una MO estabilizada y madura (humificada). El proceso de *compostaje* consiste en un proceso de degradación biooxidativo

controlado de los residuos iniciado por los microorganismos presentes, obteniéndose como productos finales CO_2 , agua, minerales y materia orgánica estabilizada (*compost*) libre de fitotoxinas y apta para su empleo en suelos agrícolas sin que provoque efectos adversos. En este sentido, este tipo de tratamiento ha sido aplicado a escala piloto y de planta con residuos urbanos [9,10], agrícolas [11] e industriales [12]. La aplicación de este tipo de tratamiento resulta benéfica siempre que el compost obtenido esté libre de contaminantes. Por lo tanto, dependiendo del origen de los residuos orgánicos tratados, es relevante el monitoreo de las SH cuantitativa y cualitativamente, durante el proceso de compostaje [13]. Este proceso puede seguirse mediante el empleo de diversas técnicas, como el análisis elemental y las espectroscopias UV-Vis y FTIR [14,15]. La técnica de fluorescencia también ha sido ampliamente utilizada para caracterizar a la MO en sistemas acuosos [16] y a las SH [17-19].

1.3.- Experiencias de láser flash-fotólisis de sustancias húmicas.

La técnica de láser flash-fotólisis (LFP) puede ayudar en la identificación de intermediarios de reacción y da información mecanística sobre las

transiciones electrónicas involucradas [20]. En la literatura se han realizado varios estudios de LFP con SH. Fischer y col. [21] ($\lambda^{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) emplearon SH de distintos orígenes y observaron por absorción dos componentes: uno con un máximo de absorbancia a 475 nm con un tiempo de vida en el orden de los microsegundos y otro con máximo de absorbancia a 700 nm, atribuido al electrón solvatado. Se observó desactivación dinámica por oxígeno molecular del transitorio con $\lambda^{\text{max}} = 475 \text{ nm}$ ($k_q = 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Desactivadores con energía de triplete, $E_T > 57 \text{ kcal mol}^{-1}$ mostraron una combinación de desactivación dinámica y estática. Estos resultados sugirieron que el transitorio tiene cierto carácter de triplete.

Power y col. [22] ($\lambda^{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) emplearon AF Mossy Point y observaron 4 especies transitorias. Una de ellas con $\lambda^{\text{max}} = 675 \text{ nm}$ y tiempo de vida de $1 \mu\text{s}$ a $\text{pH} = 7$ que fue atribuido al electrón solvatado. El segundo componente con $\lambda^{\text{max}} = 475 \text{ nm}$ y un tiempo de vida de $1\text{-}10 \mu\text{s}$ fue asignado a un radical catión sobre la base de su aparición conjunta con el electrón solvatado a 20 ps después del pulso del láser. El tercer componente con un espectro de absorción sin estructura y un tiempo de vida $> 100 \mu\text{s}$ fue asignado a tripletes de AF. La cuarta especie transitoria con un

tiempo de vida de 50 ns no fue identificada.

Chaikovskaya y col. [23] realizaron experimentos de LFP con una mezcla natural de AH y AF en soluciones acuosas $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Experimentos con $\lambda^{\text{exc}} = 520$ y 470 nm resultan en la formación de tripletes con una absorción con $\lambda^{\text{max}} \approx 630 \text{ nm}$ y tiempos de vida de $\sim 0,15 \text{ ms}$ en ausencia de oxígeno. Para $\lambda^{\text{exc}} = 337$ y 390 nm encontraron tripletes con tiempos de vida de aproximadamente $0,1$ y 2 ms , y espectros de absorción con máximo a 570 nm . Lang y col. [24] ($\lambda^{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$) realizaron experimentos de LFP con AH Aldrich y encontraron tres transitorios: el transitorio 1 con un tiempo de vida de $< 100 \text{ ns}$ asignado al electrón solvatado, el transitorio 2 ($\lambda^{\text{max}} = 440\text{-}450 \text{ nm}$) con un tiempo de vida de 2 ms , independiente de oxígeno, asignado a radicales cationes. El transitorio 3 de tiempo de vida mayor es una mezcla de tripletes de SH.

Más recientemente Sul'timova y col. [25] mediante LFP ($\lambda^{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$) investigaron los transitorios formados en soluciones alcalinas de AF. Asignaron las especies observadas a tripletes.

1.4.- Energías de triplete de las SH.

Zepp y col. [26] determinaron la distribución de energías de tripletes en una serie de muestras de AH empleando irradiación policromática artificial y solar. Estos autores encontraron que la distribución era ancha y se centraba alrededor de 250 kJmol⁻¹, de acuerdo con el intervalo de energías de triplete de cetonas aromáticas y quinonas [27].

Brucoleri y col. [28,29] emplearon las técnicas de dicroísmo magnético circular y fotoacústica para determinar energías de triplete y rendimientos cuánticos de AF, encontrando energías de triplete entre 167,6 y 213,7 kJ mol⁻¹ y rendimientos de triplete (medidos en el intervalo de pH entre 2,5–9) entre 0,3 y 0,8 para los AF Point Armdale y Laurentian, con diferencias de energía singulete-triplete, ΔE_{ST} , de alrededor de 29,3 kJ mol⁻¹. Estos valores se aproximan a los determinados experimentalmente para cetonas n,π^* , mientras que para estados π,π^* , son usualmente > 125,7–167,6 kJ mol⁻¹. Así, cuando se emplea excitación en el UV cercano, el valor de ΔE_{ST} medido para los AF es similar al de quinonas y cetonas aromáticas y corresponde a estados n,π^* . A estos sistemas se les asocian altos rendimientos cuánticos de triplete. Estos autores afirman que a bajos

valores de pH o alta fuerza iónica la ruta fotoquímica principal es la formación del triplete. Bajos valores de pH y fuerza iónica alta favorecen el enrollado (coiling) y la agregación de las SH, por desfavorecer las repulsiones electrostáticas que causan la extensión de las moléculas.

El fraccionamiento de la muestra del AF Laurentian indica que los tripletes están más asociados con los componentes de menor peso molecular presente en la muestra. Este resultado correlaciona con la observación del aumento de luminiscencia en las fracciones de menor peso molecular. Por el contrario, la fotoionización parece ser menos sensible a la variación del peso molecular.

1.5.- Influencia de las sustancias húmicas en el crecimiento del fitoplancton marino: Diatomeas y dinoflagelados.

En los estudios de Prakash & Rashid [30,] se demostró que las diferentes fracciones de SH obtenidas por separación con Sephadex ejercen un efecto estimulante en el crecimiento del fitoplancton marino y este depende a su vez del tamaño de las fracciones húmicas. Independientemente de su origen, las fracciones de menor peso molecular de los AH y AF mostraron

tener una respuesta de crecimiento máxima, y para las fracciones de mayor peso molecular observaron que el efecto era menor o no estaba presente, e incluso detectaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de dinoflagelados marinos. Prakash [31] observó tendencias similares cuando se estudió la influencia de las SH en el crecimiento de diatomeas marinas, las fracciones de menor peso molecular ejercen en general un efecto estimulante mayor que las fracciones de peso molecular más elevado. Droop [32] no solo observó que el crecimiento de *S. costatum* se duplicó cuando se adicionaba a un medio de cultivo sintético una fracción de “humus” de suelo, sino que también, al igual que Prakash [31], reportó que todas las fracciones obtenidas con Sephadex eran más eficientes que el material original (sin fraccionamiento).

Una característica común en los estudios de Prakash [31] es que la fase exponencial en la curva de crecimiento para los cultivos de diatomeas se prolonga por la adición de pequeñas cantidades de determinadas fracciones de AH y AF. La adición de SH puede dar lugar a una permanencia de las células en un estado de crecimiento activo.

El grado relativamente alto de estimulación del crecimiento de fitoplancton por las fracciones de bajo

peso molecular de AH y AF puede estar asociado a una respuesta de sensibilización directa de las células, a una respuesta de quelación indirecta, o a ambos factores. Tanto los AH como los AF pueden penetrar en la célula vegetal y el grado de penetración depende del tamaño molecular de las distintas entidades [33]. Las fracciones húmicas de bajo peso molecular tienen alta acidez total y un gran número de grupos carboxílicos responsables de su capacidad de retención de metales. De acuerdo a lo observado por Rashid [34], la fracción de menor peso molecular tiene una capacidad de formación de complejos metálicos de 2 a 6 veces mayor que cualquier otra fracción y la capacidad quelante disminuye con el aumento del peso molecular, lo que podría explicar por qué fracciones de bajo peso molecular son más efectivas en la estimulación del crecimiento del fitoplancton. También es posible que las diferencias en la composición elemental de las fracciones de menor y mayor peso molecular sean las responsables de las diferencias en sus propiedades biológicas. En los experimentos de Rashid y Prakash [35] para las fracciones de AH y AF de *Laminaria* y *Fucus* se observó un aumento en el contenido de carbono y nitrógeno y una disminución en el contenido de oxígeno con el aumento

del peso molecular. En relación con esto, Prakash y col. [31] proponen que la mayor absorción de ^{14}C , el incremento en el contenido de clorofila y la mayor concentración final de células obtenidos para sus experimentos pudieron deberse de manera indirecta a una mejora en el medio de cultivo al haber un mayor efecto quelante de metales. Por otro lado, la inhibición del crecimiento por la adición de húmicos en altas concentraciones se puede explicar también por un efecto sobre la quelación, ya que el exceso de quelante puede hacer que los iones esenciales para las algas no estén disponibles [36]. El valor de la concentración de las SH en el cual comienzan a ejercer un efecto de inhibición del crecimiento parece depender del compuesto en particular y las especies utilizadas en los ensayos.

Otros mecanismos diferentes a la quelación pueden estar involucrados, sin embargo, aún tendrían que ser dependientes de la concentración. La inhibición del crecimiento a altas concentraciones de SH también se ha atribuido a la absorción selectiva de la luz, al impartirle un mayor color amarillento a la solución, lo que resulta en la reducción de la fotosíntesis [31].

Las respuestas de crecimiento de diatomeas (*Fucus* y *Laminaria*) donde se utilizan como aditivos al medio de cultivo extractos húmicos dependen de la concentración, siendo las fracciones de AH en general más estimulantes que las fracciones de AF [31]. Esto también se observó para dinoflagelados [30] donde los AH generaron una respuesta de crecimiento de aproximadamente el doble respecto a las de AF.

No queda duda de que las SH pueden estimular el crecimiento del fitoplancton marino, a pesar de que el modo por el cual se produce aún no esté del todo claro.

1.6. Objetivos del Trabajo de Tesis.

Los objetivos de este trabajo de tesis son:

- ✓ *Extraer ácidos húmicos de compost y sedimentos marinos para una posterior caracterización.*
- ✓ *Caracterizar mediante técnicas resueltas en el tiempo las especies químicas generadas*

por fotólisis de sustancias húmicas.

- ✓ *Estudiar la reactividad de las sustancias húmicas con radicales inorgánicos oxidantes.*
- ✓ *Plantear los mecanismos de reacción involucrados en los dos objetivos anteriores.*
- ✓ *Estudiar el rol de las sustancias húmicas en el crecimiento de algas bentónicas aisladas del medio ambiente.*



Referencias

1. Kononova, M. M. Soil organic matter. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility, Pergamon Press: NewYork (1961)
2. Cameron, R. S., Swift, R. S., Thornton B. K. and Posner, A. M. Calibration of gel permeation chromatography materials for use with humic acid. *J. Soil Sci.* **23** (1972) 343–349
3. Ghosh, K. and Schnitzer, M. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci.* **129** (1980) 266–276
4. Sutton R. and Sposito, G. Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 9009–9015
5. Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* **75** (2002) 57–134
6. Kerner, M., Hohenberg, H., Ertl, S. Reckermann M. and Spitzzy, A. Self-organization of dissolved organic matter to micelle-like microparticles in river water. *Nature.* **422** (2003) 150–154
7. Latch, D. E. and McNeill, K. Microheterogeneity of singlet oxygen distributions in irradiated humic acid solutions. *Science.* **311** (2006) 1743–1747
8. Hassett, J. P. Dissolved natural organic matter as a microreactor, *Science.* **311** (2006) 1723–1724
9. Costas, F., García, C., Hernández, T., Polo, A. Residuos Orgánicos Urbanos. Manejo y utilización. CSIC-CEBAS. Murcia. (1991)
10. Paz, V., Umbides, R., Mishima, H., Sánchez de Pinto, M.I., Pólo, A. Experimental plant of compost elaboration from urban solid waste. In: Appropriate environmental and solid management and technologies for developing countries. G. Kocasoy, T. Atabarut, I. Nuhoglu (Eds). Turkey. **2** (2002)1371
11. Albanell, E., Plaxats, J., Cabrero, T. Chemical changes during vermicomposting of sheep manure mixed with cotton industrial wastes. *Biol. Fert. Soils* **266** (1988)
12. Elvira, C., Domínguez, J., Sampedro, L., Mato, S. Vermicomposting for the paper pulp industry. *BioCycle.* **36** (1995) 62–63
13. Bouwer, E., Crowe, P. Biological processes in drinking water treatment. *J. Am. Water Works Assoc.* **80** (1988) 82–93
14. Baddi, G. A., Hafidi, M., Gilard, V., Revel, J-C. Characterization of humic acids produced during composting of olive mill wastes: elemental and spectroscopic analyses (FTIR and ¹³C-NMR). *Agronomie* **23** (2003) 661–666
15. Brunetti, G, Plaza, C, Senesi, N. Olive pomace amendment in Mediterranean conditions: effect on soil and humic acid properties and wheat (*Triticum turgidum* L.) yield. *J Agric Food Chem.* **53** (2005) 6730–6737
16. Green, S.A. and Blough, N.V. Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **39** (1994) 1903–1916

- 17.** Pullin, M.J. and Cabaniss, S.E.. Rank analysis of the pH-dependent synchronous fluorescence spectra of standard humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **29** (1995) 1460–1467
- 18.** Yang, Y.H. and Zhang, D.H. Concentration effect on the fluorescence spectra of humic substances. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **26** (1995) 2333–2349
- 19.** Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg B., and Saccomandi, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere.* **38** (1999) 45–50
- 20.** Bruccoleri, A.G. The photophysics and photochemistry of fulvic acid. PhD. Thesis. Calgary (Canada): University of Calgary; 2000. 120 p.
- 21.** (a) Fischer, A.M., Mill, T., Kliger, D.S., Tse, D., IHSS Symp. Proc., Birmingham, UK, 23-28, 1984. (b) Fischer, A.M., Winterle, J.S., Mill, T., Photochemistry of Environmental Aquatic Systems, chapter 11, ACS Symposium Series. Washington: American Chemical Society (1987)
- 22.** Power, J., Sharma, D., Langford, C.H., Bonneau, R., Jacques, J-D. Laser flash photolytic studies of a well-characterized soil humic substance. *ACS-Symp Ser.* **327** (1987) 157–173
- 23.** Chaikovskaya, O.N., Levin, P.P., Sul'timova, N.B., Sokolova, I.V. and Kuz'min, A.V. Triplet states of humic acids studied by laser flash photolysis using different excitation wavelengths. *Russian Chemical Bulletin, International Edition.* **53** (2004) 313–317
- 24.** Lang, K., Wagnerova, D.M., Klementova, S., Kubat, P. Humic substances - excited states, quenching by metal ions, and photosensitized degradation of chlorophenols. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **62** (1997) 1159–1168
- 25.** Sul'timova, N.B., Levin, P.P., Chaikovskaya, O.N., Sokolova, I.V. Laser photolysis study of the triplet states of fulvic acids in aqueous solutions. *High Energy Chemistry.* **42** (2008) 464–468
- 26.** Zepp, R.G., Schlotzhauer, P.F., Sink, R.M., Photosensitized transformations involving electronic energy transfer in natural waters: role of humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **19** (1) (1985) 74–81
- 27.** Turro, N., *Modern Molecular photochemistry*, Chapt.9, John Wiley & Sons (1991)
- 28.** Bruccoleri, A., Langford C.H., Arbour, C. Pulsed photo acoustic evaluation of intersystem crossing quantum yields in fulvic acid. *Environmental Technology.* **11** (1990) 169–172
- 29.** Bruccoleri, A., Bhuvan C. Pant, Devendra K. Sharma, Cooper H. Langford. Evaluation of primary photoproduct quantum yields in fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* **27** (1993) 889–894
- 30.** Prakash, A., Rashid, M.A. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: dinoflagellates. *Limnology and Oceanography.* **13** (1968) 598–606
- 31.** Prakash, A., Rashid, M.A., Jensen, A., Subbarao, D.V. Influence of humic substances on growth of marine phytoplankton - diatoms. *Limnology and Oceanography.* **18** (1973) 516–524
- 32.** Droop, M. R. Comments. Proc. Int. Interdisciplinary Conf., 2nd. In C. H. Oppenheimer (Ed.), *Marine biology v. 2.* N.Y. Acad. Sci. (1966) 158–159

- 33.** Aso, S., Sakai, I. Studies on the physiological effects of humic acid. 1. Up-take of humic acid by crop plants and its physiological effects. *Soil Sci. Plant Nutr.* **9** (1963)1
- 34.** Rashid, M. A. Role of humic acids of marine origin and their different molecular weight fractions in complexing di- and trivalent metals. *Soil Sci.* **111** (1971) 298–306
- 35.** Rashid, M. A. and Phakash, A. Chemical characteristics of humic compounds isolated from some decomposed marine algae. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **29** (1972) 55–60
- 36.** Siegel, A. Metal-organic interactions in the marine environment, p. 265–295. In S. D. Faust and J. V. Hunder (Eds.), *Organic compounds in aquatic environment*. Marcel Dekker (1971)

Capítulo 2

Métodos y equipos utilizados