



Capítulo

Materiales y

Métodos.

Detalles experimentales

2.1.- Materiales

2.1.1.- Reactivos utilizados

En este trabajo se utilizaron los reactivos que se detallan en la tabla 2.1, tal como se recibieron y sin posterior purificación.

Los solventes, metanol, etanol y acetona fueron de Sintorgan, grado HPLC.

El agua destilada utilizada se filtró mediante un sistema Millipore (>18 M Ω cm, < 20 ppb de carbono orgánico).

2.1.2.- Reactivos específicos

Las sustancias húmicas comerciales que se utilizaron en este trabajo son la sal sódica del ácido húmico, marca Fluka y Aldrich, que son AH que provienen de turbas. Las muestras se purificaron y se rotularon como: FP

AP (Fluka purificado y Aldrich purificado, respectivamente). En esta purificación se remueven las trazas de iones metálicos, el material inorgánico y el material orgánico distinto del AH [1]. También se utilizaron muestras del AH Aldrich sin previa purificación (AHA). Los ácidos fúlvicos Waskish Peat y Pony Lake (WPFA y PLFA) fueron adquiridos de la International Humic Substances Society (IHSS). En la tabla 2.2 se da la composición elemental informada por los proveedores. Los otros AH fueron obtenidos de diversas fuentes naturales como se describe en páginas posteriores.

2.2.- Instrumentación y Métodos

2.2.1.- Preparación de soluciones de AH.

En todos los casos se trabajó con soluciones recientemente preparadas

Tabla 2.1: Reactivos utilizados.

Reactivo	Formula	Pureza	Marca
Azida de sodio	NaN_3	99	Sigma
Borohidruro de sodio	NaBH_4	99	Riedel-de Haën
Bromuro de sodio	NaBr	99,7	Mallinckrodt
Cloruro de potasio	KCl	99,5	Biopack
Dicromato de potasio	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	99,9	Mallinckrodt
Hidróxido de bario	$\text{Ba}(\text{OH})_2$	98	Cicarelli
Hidróxido de potasio	KOH	85	Anedra
Hidróxido de sodio	NaOH	98,2	J.T.Baker
Peroxidisulfato de sodio	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$	99	Merck
Acetato de calcio	$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	99	Cicarelli
Biftalato de potasio	$\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$	99,8	Merck
Clorofila <i>a</i>	$\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{MgN}_4\text{O}_5$	libre de Clorofila <i>b</i>	Sigma
Diadinoxantina	$\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_3$	≥ 97	ChromaDex®
Fenol	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	99,8	J.T. Baker
Fluoresceína	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$	para fluorescencia	Standard Fluka
Fucoxantina	$\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_6$	95	Sigma
Sulfato de Quinina	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	≥ 98	Fluka
β -caroteno	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$	≥ 97	Fluka
Ácido clorhídrico	HCl	36,5-38	Cicarelli
Ácido fluorhídrico	HF	48	Merck
Ácido orto-fosfórico	H_3PO_4	85	Riedel-de Haën
Ácido perclórico	HClO_4	70	Merck
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	95-98	Cicarelli

Tabla 2.2: Composición elemental de las sustancias húmicas comerciales.

Sustancia húmica	Composición elemental %				
	C	H	N	O	S
AHA	51,5	4,8	0,9	37,5	3,3
FAH (Fluka)	44,6	4,1	0,7	49,5	1,0
WPFA	53,6	4,2	1,1	41,8	0,3
PLFA	52,5	5,4	6,5	31,4	3,0

de todos los reactivos. Los AH se disolvieron en agua a la que se le adicionó NaOH hasta pH = 10 y las soluciones se almacenaron a 4°C durante 24 h, en atmosfera de argón, hasta asegurar su completa disolución. Durante este tiempo dichas soluciones se sometieron periódicamente a agitación por ultrasonido, con un sonicador ULTRasonic cleaner modelo 19H. Luego fueron filtradas a través de filtros Millipore de 0.45 µm para reducir la suspensión de partículas no disueltas. El pH final de las disoluciones se ajustó al deseado por la adición de pequeñas cantidades de solución de NaOH ó HCl concentradas. Para la determinación de las masas se utilizó una balanza electrónica marca A&D modelo ER-182A cuya precisión es de ± 0,1 mg.

Las medidas potenciométricas de pH se realizaron con electrodos selectivos

y un analizador multicanal Consort C832.

2.2.2.- Muestreo de Compost

Las muestras del material compostado fueron obtenidas por el grupo de la Dra. Inés Sánchez de Pinto (UNSE) durante una campaña de tratamientos de residuos frutihortícola en el año 2006, y gentilmente donadas para su estudio en este trabajo de tesis doctoral. Las muestras estudiadas se recolectaron por triplicado de acuerdo al siguiente procedimiento: de cada pila del material en compostaje se extrajeron tres muestras tomadas al azar de diferentes zonas de la pila, a los días 1, 12, 24, 97, 134, 146, 170, 205 y 300. Seguidamente, de cada una de estas muestras tomadas por triplicado, se tomaron sub-muestras que fueron mezcladas, de manera tal que finalmente se dispuso de una única muestra compuesta correspondiente a los días 1, 12, 24,

97, 134, 146, 170, 205 y 300 días del proceso de compostaje. La homogeneización final se logró por mezclado a mano y tamizado a través de malla de 2 mm. Finalmente las muestras se secaron a 40 °C con ventilación forzada.

2.2.3.- Muestreo de sedimento marino

Para la obtención de SH del “tipo AH” de sedimento marino (TAHSM) se tomaron muestras de sedimento de Helgoland, Alemania (54° 11´ N, 7° 53´ E) en Marzo del 2008. Las muestras fueron esterilizadas y almacenadas a - 20 °C antes de ser utilizadas.

2.2.4.- Extracción y purificación de ácidos húmicos

Para la extracción y purificación de la fracción orgánica “tipo AH” de compost y sedimento marino se emplearon pequeñas variantes de metodologías descritas por otros autores [1, 2, 3]. El proceso de extracción de AH consta de dos etapas consecutivas esenciales:

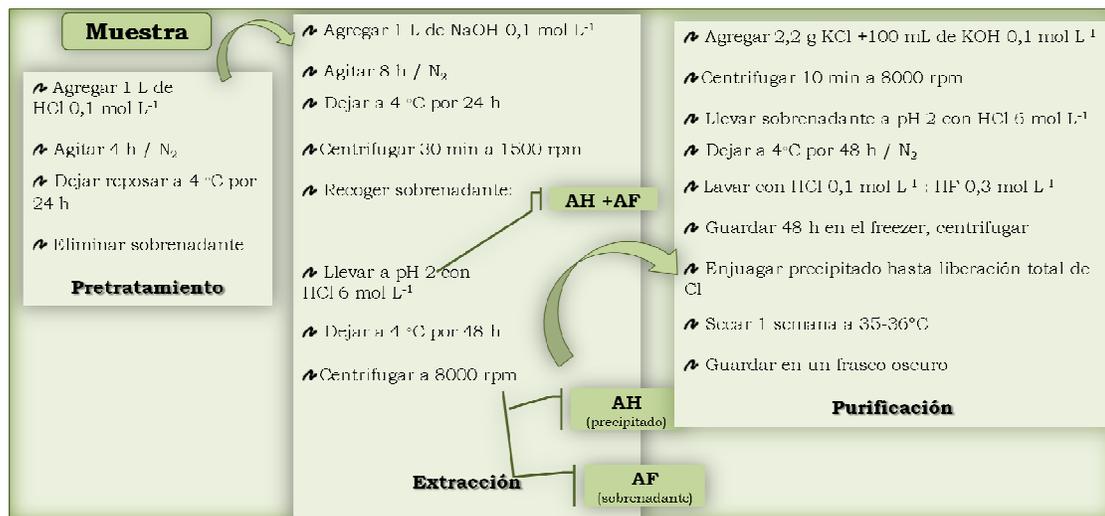
1. Pretratamiento (solubilización de carbonatos): A 200 g de compost o suelo marino se le agregó 1 L de HCl (0,1 mol L⁻¹), se agitó durante 4 h y luego se dejó decantar por el lapso de 24 h.

2. Extracción: Se eliminó el sobrenadante y al residuo sólido obtenido se le adicionó 1 L de NaOH

(0,1 mol L⁻¹), se agitó en atmósfera controlada de N₂ durante 8 h y se dejó decantar por 24 h en el refrigerador. Se centrifugó y al sobrenadante (SH Totales) se le agregó una solución de HCl 6 mol L⁻¹ hasta obtener pH ≈ 2 (precipitación de AH impuros). Se dejó decantar 2 días en ambiente refrigerado.

Se centrifugó descartando el sobrenadante, y guardando el precipitado que contiene los AH impuros.

Para purificar las muestras, a los AH se les agregó 100 mL de KOH (0,1 mol L⁻¹) y 2,2 g de KCl, agitando durante unos minutos. Se centrifugó y al sobrenadante obtenido luego de este proceso se le agregó HCl 6 mol L⁻¹ hasta pH 2 y se dejó decantar 48 h bajo refrigeración. Posteriormente se centrifugó y al precipitado (AH parcialmente purificados) se le agregaron 30 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ y 30 mL de HF 0,3 mol L⁻¹, se agitó unos minutos y se centrifugó nuevamente. Este paso se realizó varias veces consecutivas. El precipitado obtenido se refrigeró durante 2 días. Posteriormente se descongeló y fue centrifugado, descartando el sobrenadante para eliminar el agua intramolecular. El precipitado obtenido (AH purificados) fue lavado con agua destilada y recogido sobre papel al ser filtrado sobre un embudo

Esquema 2.1 Proceso de extracción y purificación de SH del tipo AH.

Büchner. Por último, se secó en estufa durante 1 semana a 35–36 °C. El esquema 2.1 resume los pasos del proceso de extracción y purificación de SH del tipo AH.

2.2.5.- Espectroscopia de Absorción y de Fluorescencia

Las medidas de absorbancia para los AH y AF extraídos y purificados fueron registradas con un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett-Packard 8453A con resolución de ± 1 nm entre 190 y 1100 nm. Las celdas utilizadas fueron de cuarzo de 1,0 cm de camino óptico. Las absorbancias de las SH se midieron con soluciones de aproximadamente 20 mg L⁻¹ cuyo pH se ajustó a 7.

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

Matrices de excitación – emisión de fluorescencia.

Los espectros de fluorescencia para la obtención de las matrices de excitación emisión (MEE) fueron registrados con un espectrofluorómetro Hitachi F-2500, figura 2.1. El equipo cuenta con un monocromador (de excitación) que permite seleccionar una determinada longitud de onda de la lámpara de Xe. El haz resultante se focaliza sobre la cubeta. La emisión de la muestra se

detecta a 90° con respecto al haz de excitación para evitar interferencias por efecto de la luz dispersada. El espectro de emisión se obtiene por barrido de un segundo monocromador (de emisión). El detector es un fotomultiplicador Hamamatsu R928 extendido al rojo (200 - 900 nm). Las rendijas de excitación y emisión se ajustaron a un paso de banda de 5 nm.

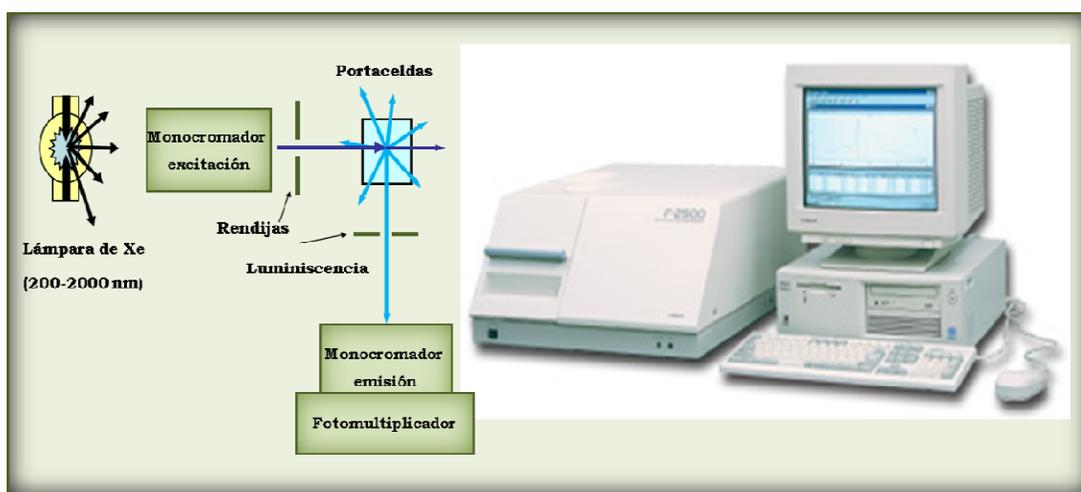
Para registrar las MEE de fluorescencia, la longitud de onda de excitación se incrementó de a 5 nm, desde 200 a 550 nm. Para cada longitud de onda de excitación se detectó la emisión desde los 300 a los 600 nm, tomando datos cada 0,5 nm a una velocidad de 1000 nm/min. Todas las muestras se prepararon por disolución de los sólidos en agua

destilada llegando a una absorbancia a 550 nm ($A^{550\text{nm}}$) de $0,050 \pm 0,005$.

Espectros de emisión de las SH

Los espectros de emisión de los AH y AF extraídos y purificados se registraron excitando a longitudes de onda en soluciones de absorbancia $\leq 0,1$. Los anchos de rendija de excitación y de emisión se fijaron a valores de 2,5/2,5 nm o 5/5 nm, respectivamente, dependiendo de la intensidad de la señal de fluorescencia emitida por la muestra. El potencial de trabajo del fotomultiplicador se fijó a 700 V. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia Φ_F se determinaron en soluciones saturadas en Ar comparando la integral del espectro de emisión de la muestra con el de un actinómetro y dependiendo de la zona

Figura 2.1. Diagrama del sistema óptico del espectrofluorómetro utilizado para la obtención de las MEE (Izq.). Espectrofluorómetro Hitachi F-2500 (Der.).



espectral estudiada se utilizó sulfato de quinina en solución de H_2SO_4 1 mol L^{-1} (en el rango de integración de 400 – 600 nm, para excitación a 360 y 355 nm) o fluoresceína en solución de NaOH 0,5 mol L^{-1} (en el rango de integración de 500 – 600 nm, para excitación a 450 nm) [4,5]. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

2.2.6.- Método de flash fotólisis

El método de flash fotólisis fue desarrollado por Norrish y Porter en 1948, utilizado para la iniciación y el estudio de procesos fotoquímicos. En esta técnica se crea una situación de

no equilibrio en la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo corto, generando intermediarios inestables en concentraciones relativamente altas.

Láser flash-fotólisis

Los experimentos de láser flash-fotólisis (LFP) se realizaron por excitación con el cuarto armónico de un láser de Nd:YAG Litron (2 ns de ancho de pulso y 6 mJ por pulso a 266 nm). Para los ensayos se utilizó una celda de fluorescencia de cuarzo de 1 cm de lado. La luz del láser y la de análisis se disponen en una geometría de 90° . La luz de análisis de

Figura 2.2.- Esquema de un equipo de LFP. MC: monocromador, PM: fotomultiplicador.

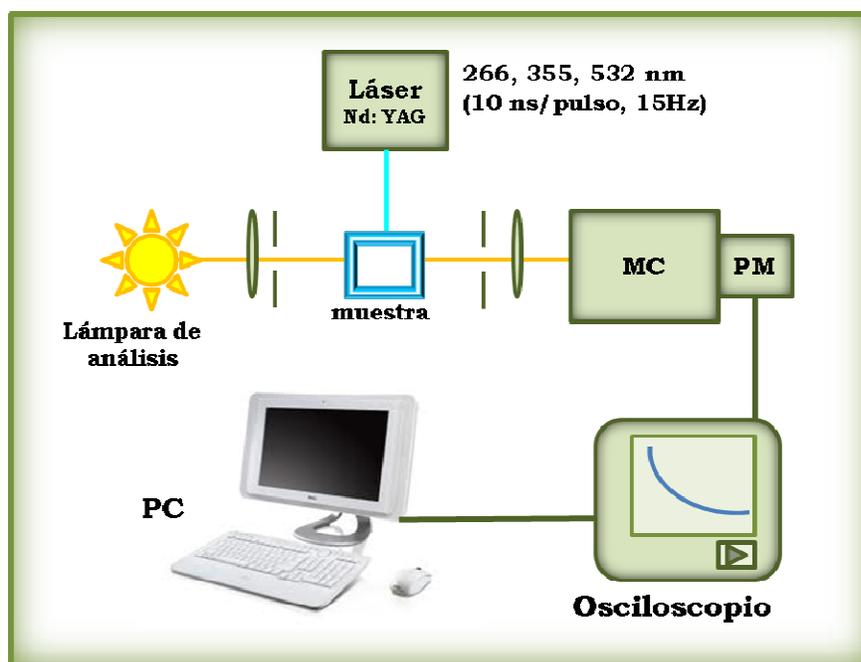
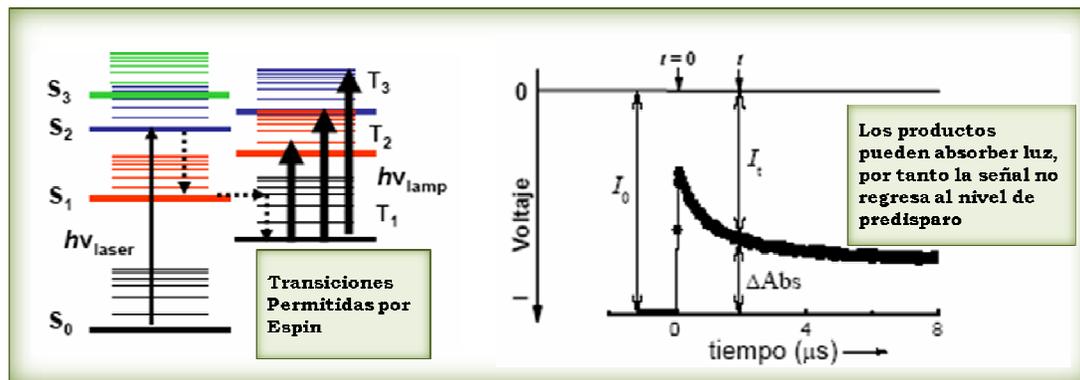


Figura 2.3.- Esquema del proceso de absorción del transitorio (Izq.) y traza cinética típica obtenida en los experimentos de LFP (Der.).



una lámpara de arco de Xe de 150 W se hace pasar por la celda y se enfoca luego en el monocromador PTI 1695 que tiene acoplado a un fotomultiplicador 1P28 PTM. Las señales finales obtenidas son el promedio de 64 pulsos, con un osciloscopio digital 500 MHz Agilent Infiniium y se transfirieron a una computadora para su posterior análisis. El esquema se muestra en la figura 2.2.

Análisis de las trazas de LFP.

En la figura 2.3 se muestra un diagrama de Jablonski [4], en el que se representan las transiciones triplete-triplete habitualmente detectadas con la técnica de LFP y una traza cinética típica obtenida en los experimentos de LFP.

Para convertir a cambios de absorbancia los valores de cambio de

intensidad de corriente registrados por el equipo de LFP, se utiliza la ley de Lambert Beer y se obtiene:

$$\Delta A_t = \log \left(\frac{I_0}{I_t} \right) = \epsilon_\lambda l c_t \tag{2.1}$$

Donde ΔA_t es el cambio de la absorbancia al tiempo t producido por el pulso de luz, ϵ_λ es el coeficiente de absorción molar de la especie transitoria a la longitud de onda λ , c_t es su concentración molar al tiempo t , y l la longitud de la celda expresada en centímetros.

2.2.7.- Espectroscopia fotoacústica resuelta en el tiempo

La fracción de la energía absorbida por las **SH** que es liberada al medio en forma rápida como calor se evaluó mediante la técnica de espectroscopia inducida por láser (LIOAS). Esta es

una aplicación fotocalorimétrica que utiliza como fundamento que la liberación de energía del estado excitado de una molécula, genera una onda acústica como producto de los cambios de presión que se producen en el solvente durante la relajación de los estados excitados, figura 2.4.

En las técnicas de fotoacústica, la amplitud de la señal acústica de la muestra, H_S , contiene información de los cambios de volumen térmico ΔV_{th} y estructural ΔV_{str} producidos luego de la absorción de luz. La contribución del ΔV_{th} está relacionada con la expansión del solvente originada por calor liberado en los procesos de decaimientos no-radiativos de los estados excitados y solo depende de los parámetros termoelásticos del solvente. Por otro lado, el ΔV_{str} es debido a la contracción o expansión producida por re-ordenamientos moleculares (soluto y solvente) en la reacción fotoquímica. Así, H_S se expresa por la ecuación 2.2:

$$H_S = K(\alpha \Delta V_{th} + \Delta V_{str}) = K \left(\alpha E_a \frac{\beta}{c_p \rho} + \Delta V_{str} \right) \quad \mathbf{2.2}$$

donde, K es una constante de proporcionalidad que incluye parámetros geométricos y electrónicos del sistema de detección, α es la fracción de energía que se libera como

calor al medio en forma rápida. β , c_p y ρ son parámetros termoelásticos del medio, es decir, el coeficiente de expansión térmico isobárico, la capacidad calorífica específica y la densidad, respectivamente. Esta es una técnica comparativa en la que deben realizarse experimentos con una *referencia calorimétrica*. Si se supone que el compuesto de referencia calorimétrica, libera en forma instantánea (< 1 ns) el 100% de la energía absorbida como calor ($\alpha = 1$) [6] y no tiene cambio de volumen estructural $\Delta V_{str} = 0$, por lo tanto, la amplitud de señal para la referencia calorimétrica H_R solo dependerá de la energía absorbida E_a y el coeficiente de expansión adiabática, $(\beta/c_p \rho)$.

Para soluciones de muestra problema y referencia con igual valor de absorbancia a la longitud de onda de excitación, la relación entre la amplitud de señal para la muestra problema y la referencia está dada por la ecuación 2.3:

$$\frac{H_S}{H_R} = \alpha + \frac{\Delta V_{str}}{E_a} \left(\frac{c_p \rho}{\beta} \right) \quad \mathbf{2.3}$$

Los valores de α proporcionan una información valiosa acerca de las propiedades fotofísicas de la molécula de la muestra.

Puede plantearse el balance energético mostrado en la ecuación 2.4.

$$E_{\lambda} = \alpha E_{\lambda} + E_F \Phi_F + E_{st} \Phi_{st} \quad 2.4$$

La energía absorbida por mol de fotones láser E_{λ} (337,3 kJ/mol a 355 nm) debe coincidir con la suma de la energía liberada como calor al medio en forma rápida, más la energía perdida en procesos radiativos rápidos de fluorescencia ($E_F \Phi_F$) y, la energía “almacenada” en especies transitorias de larga vida ($E_{st} \Phi_{st}$).

Φ_F y Φ_{st} representan los rendimientos cuánticos de fluorescencia y de generación de la especie que almacena

energía, respectivamente.

Experimentalmente se mide la amplitud de la señal acústica para la muestra problema (H_S) y para la referencia (H_R) a diferentes absorbancias y energía por pulso del láser. Como referencia calorimétrica se emplearon soluciones acuosas de $Na_2Cr_2O_7$ de diferentes concentraciones.

Los experimentos se realizaron utilizando como fuente de excitación un láser continuo Minilite II Nd:YAG con generación de pulsos a 355 nm (FWHM 10 ns). El rango de energías después de la rendija fue de 10 – 90 μJ / pulso para evitar la aparición de

Figura 2.4.- Representación esquemática del fenómeno fotoacústico.

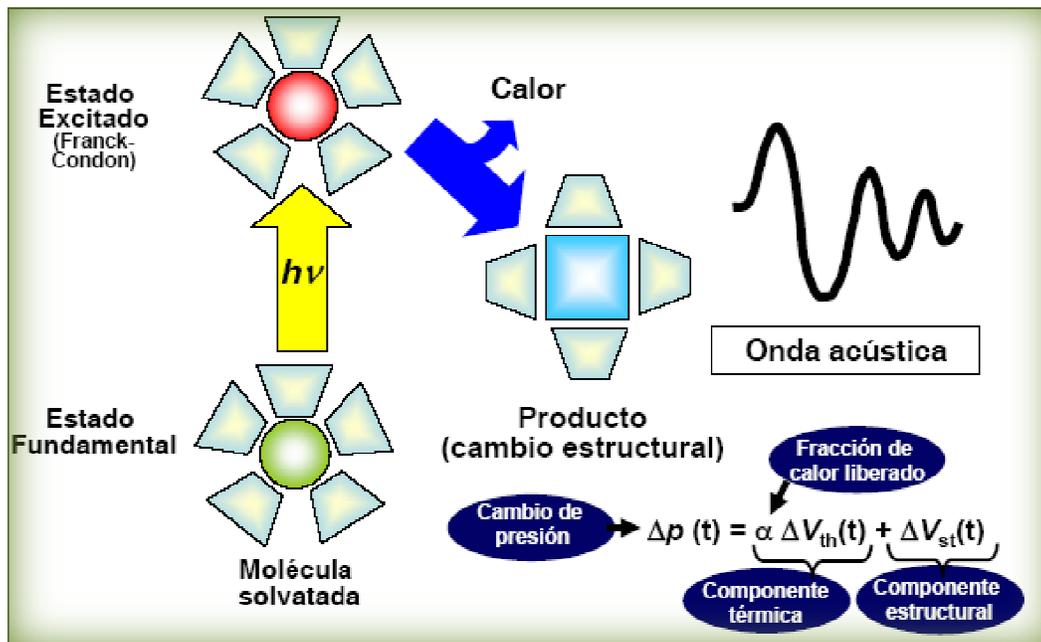
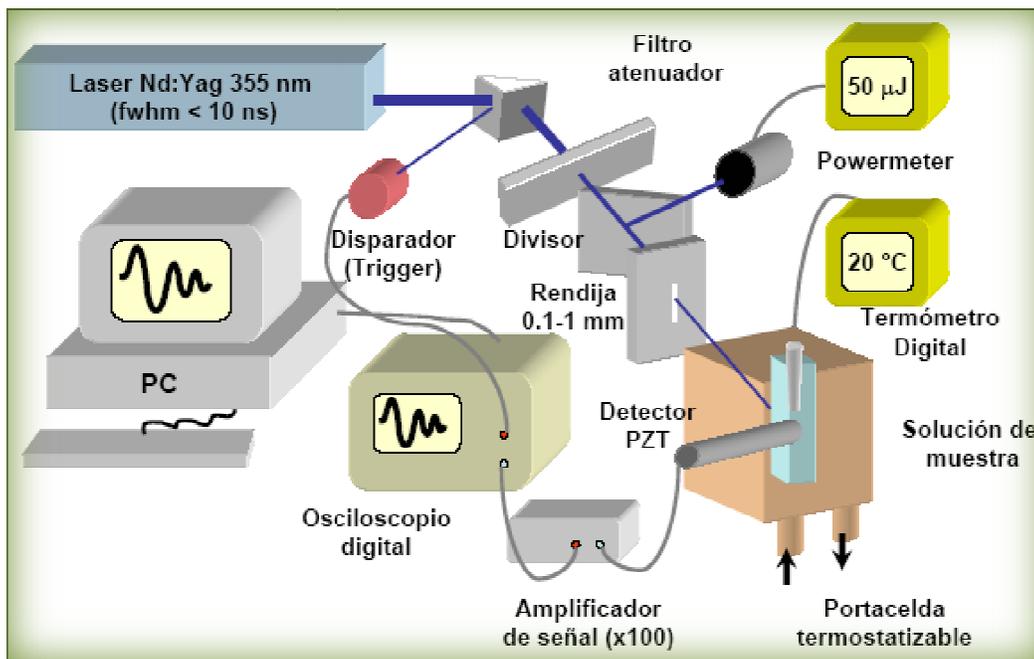


Figura 2.5.- Esquema del arreglo experimental utilizado en la técnica de fotoacústica.



fenómenos de saturación o procesos bifotónicos [7] y, se determinó con un medidor de energía piroeléctrico Melles-Griot modelo 13PEM001.

Para la detección de la señal acústica se utilizó un transductor piezoeléctrico cerámico (PZT) de 1 MHz de frecuencia colocado en el portacelda en un ángulo de 90° con respecto al haz de excitación, las señales se amplificaron 10 veces (Comlinear E103) y son enviadas a un osciloscopio digital Tektronik TDS 3032B, tal como se indica en la figura 2.5.

2.2.8.- Determinación de carbono total.

Se determinó el carbono total (CT) con un equipo Shimadzu TOC-5000A. Este modelo posee dos canales de análisis.

Uno para la medición del carbono total (CT), donde todo el carbono de la muestra es oxidado a CO₂ catalíticamente en un horno a 680 °C, y luego es transportado por medio de un flujo constante de gas portador al sistema de detección.

En el segundo canal, usado para la determinación del carbono inorgánico (CI), los carbonatos y bicarbonatos presentes en la muestra se convierten a CO₂, acidificando a baja temperatura la solución con una solución de ácido fosfórico. El CO₂ es llevado al

analizador por el mismo gas portador. Dada la temperatura relativamente baja de este canal y la ausencia de catalizador el carbono orgánico contenido en la muestra no es convertido a CO₂. Antes de entrar la muestra gaseosa en la celda de análisis, el vapor de agua es condensado y removido en el dehumificador.

El analizador utiliza una fuente de radiación infrarroja, que se divide en dos haces que atraviesan las celdas ópticas de la muestra y la referencia. La celda de la muestra recibe el flujo del canal seleccionado que consiste en gas portador que lleva consigo los productos de reacción de la muestra inyectada. La referencia es una celda que contiene N₂, que no absorbe en la región del IR utilizada para el análisis. La radiación infrarroja es absorbida por el CO₂ en la celda de la muestra, y el porcentaje de la radiación absorbida es proporcional al valor de la concentración de CO₂.

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

2.2.9.- Espectros infrarrojos con transformada de Fourier.

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) se obtuvieron con un equipo Bruker EQUINOX 25. Se registraron los espectros entre 4000 y 400 cm⁻¹ con resolución de 1 cm⁻¹. Para la preparación de la pastilla de cada una de las sustancias húmicas, se prensa con una fuerza de 3 ton una mezcla de KBr y la muestra sólida de la sustancia húmica previamente molidas. Para mejorar la relación señal:ruido se promedian 64 espectros individuales para cada muestra.

2.2.10.- Generación de los radicales inorgánicos.

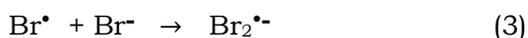
Por láser flash-fotólisis

Se generó radical sulfato por fotólisis de soluciones acuosas de Na₂S₂O₈ 5.10⁻² mol L⁻¹ a 266 nm (reacción 1), en presencia de NaBr 10⁻² mol L⁻¹.



Los iones Br⁻ presentes en las soluciones se oxidaron con radical sulfato para dar átomos de bromo (reacción 2), los que reaccionan reversiblemente con los iones bromuro (reacción 3) generando la especie Br₂^{•-}.





Para estudiar la influencia de los AH en el comportamiento cinético de la especie $\text{Br}_2^{\bullet-}$ se adicionaron a la solución diferentes cantidades de AH Aldrich, obteniendo concentraciones en el rango de $4 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ a $12 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ de AH, para las cuales: $A^{266}(\text{HA}) \ll A^{266}(\text{S}_2\text{O}_8^{2-})$.

Por radiólisis de pulso

Los experimentos de radiólisis de pulso se llevaron a cabo con un acelerador lineal de electrones modelo TB-8/16-1S en el Radiation Laboratory (USA). El arreglo instrumental y la recolección de datos computarizados para espectroscopia UV-Vis resuelta en el tiempo y la cinética de las reacciones han sido descritas en literatura [8]. La dosimetría de tiocianato se llevó a cabo al comienzo de cada sesión experimental. Los detalles de la dosimetría se han reportado en bibliografía [9, 10]. El procedimiento se basa en determinar la concentración de radicales $(\text{SCN})_2^{\bullet-}$ generados por el pulso de electrones en una solución $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de SCN^- saturada en N_2O . Los cálculos se hicieron con un valor de G (número de moléculas producidas por cada 100 eV de energía absorbida) de 6,13 y un

coeficiente de absorción para los radicales $(\text{SCN})_2^{\bullet-}$ de $\epsilon = 7,58 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 472 nm [10].

2.2.11.- Análisis computacional.

Análisis de regresión bilineal.

Los espectros de los intermediarios de reacción, se obtuvieron a partir de los perfiles de absorción a diferentes longitudes de onda, manteniendo el resto de las condiciones experimentales. Por lo tanto la absorbancia es una función de la longitud de onda y del tiempo. Teniendo en cuenta la linealidad entre la absorbancia, la concentración y el coeficiente de absorción, este análisis se aplica a la matriz de absorbancia experimental para obtener información de mínimo número de especies y sus respectivos perfiles de concentración y espectros de absorción [11].

La absorbancia se escribe en forma matricial $[A] = [\epsilon] [c]$, donde $[A]$, $[\epsilon]$ y $[c]$ representan las matrices de la absorbancia, coeficiente de absorción molar y concentración, respectivamente. El procedimiento se basa en el cálculo de las matrices $[\epsilon]$ y $[c]$ por regresiones lineales múltiples (utilizando la condición de cuadrados mínimos) por iteraciones sucesivas hasta que el sistema converge, o sea se minimizan los elementos de la

matriz error. A partir de la matriz error se obtiene la matriz de absorbancia corregida $[A^c]$. El número de especies es seleccionada como el mínimo valor que permite una aproximación razonable entre $[A^c]$ y $[A]$.

Simulaciones cinéticas.

Para simular el decaimiento de las especies transitorias generadas en los ensayos de LFP y radiólisis de pulso se utilizó un programa basado en el balance de los componentes formulado en términos de un sistema de ecuaciones diferenciales, que se resuelven por el método de Runge Kutta [12]. La concentración de radical inmediatamente después del flash o del haz de electrones (dependiendo de la técnica utilizada) se ingresa como parámetro inicial, a partir de la estimación experimental de la misma. Para esta estimación se realizan ensayos en ausencia de otras sustancias con las que pueda reaccionar. Para validar el método los resultados obtenidos se comparan con los experimentales.

2.2.12.- Ensayos microbiológicos.

Aislamiento y cultivo de algas

Para investigar la influencia de las SH en el crecimiento de algas, se escogieron dos diatomeas bentónicas aisladas del Mar Báltico; *Navicula*

ramosissima y *Enthomoneis palodosa*, también dos diatomeas céntricas aisladas del Mar del Norte; *Melosira nummoloides* y *Paralia sulcata*. Ambas diatomeas del Mar del Norte fueron aisladas de Helgoland (54°11,3'N; 7°54,0'E) en enero de 2007 (*P. sulcata*) y marzo de 2007 (*M. nummoloides*), las del Mar Báltico fueron aisladas en febrero de 2008. Las diatomeas fueron cultivadas en un medio f/2 (Guillard & Rhyter 1962) con un valor de salinidad de 18 psu para las diatomeas del Mar Báltico y 30 psu para las del Mar del Norte. Todas las diatomeas crecieron bajo condiciones constantes en una sala de cultivo con fotoperiodos de (12:12) h luz:oscuridad con aproximadamente $50 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ a 14-15°C.

Tratamientos y diseño experimental

En el diseño de los experimentos de diatomeas-SH se prepararon cuatro réplicas por cada tratamiento. El crecimiento fue monitoreado en erlenmeyers de 500 mL con aproximadamente 10 g de arena de cuarzo comercial estéril bajo diferentes concentraciones de nutrientes. El medio f/2 y el agua de mar utilizados para los cultivos se prepararon a dos valores de salinidad, 18 psu para las diatomeas del Mar Báltico y 30 psu para las del Mar del Norte.

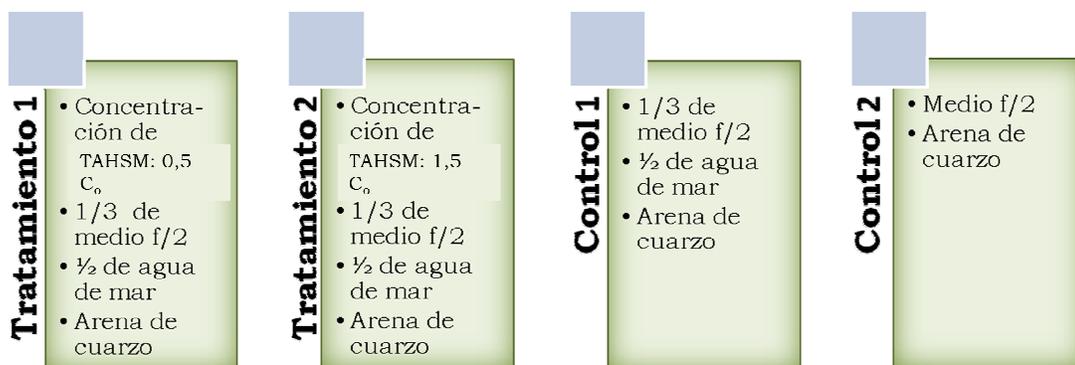
La concentración de SH del “tipo AH” de sedimento marino extraídas en Helgoland en marzo del 2008 fue de 0,02 g por gramo de sedimento marino. De 400 g del sedimento se obtuvieron 7,98 g de TAHSM. Así, la concentración de SH del “tipo AH” extraíbles en los sedimentos naturales fue de $C_0 = 0,020$ g de TAHSM por gramo de sedimento. Este valor se tomó como un límite superior de los valores naturales de la concentración de TAHSM en el sedimento de Helgoland.

Para dos de los tratamientos se emplearon dos concentraciones diferentes de TAHSM diferentes. La más baja fue $0,5 C_0$, es decir, la mitad de la concentración de TAHSM en los sedimentos naturales, (0,1 g TAHSM/ 10 g arena de cuarzo) y la más alta fue $1,5 C_0$ (0,3 g TAHSM/ 10 g arena de

cuarzo). El medio empleado en los ensayos utilizados como control fue preparado del mismo modo que los tratamientos con SH (pero sin el TAHSM), es decir, sólo con arena de cuarzo, agua de mar filtrada y medio f/2. Se preparó un segundo control para estudiar el crecimiento de las algas a elevada concentración de nutrientes a partir de; arena de cuarzo y medio f/2 (sin diluir con el agua de mar). Para cada ensayo el volumen inicial total de agua de mar filtrada y medio fue 300 ml. El biovolumen inicial utilizado para *Navicula*, *Melossira* y *Enthomoneis* fue $6,8 \times 10^7 \mu\text{m}^3/\text{mL}$ y para *Paralia* fue $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{mL}$ determinado según la fórmula de Hillebrand y col. [13].

Todas las diatomeas crecieron bajo condiciones constantes en una sala de cultivo con fotoperiodos de (12:12) h

Figura 2.6.- Esquema de tratamientos



luz:oscuridad con aproximadamente $50 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ a $14-15^\circ\text{C}$.

La distribución de cada erlenmeyer en la sala de cultivos fue elegida al azar y se modificó diariamente para evitar influencias preferenciales en la disponibilidad de la luz sobre alguna posición en particular.

Toma de muestras y análisis.

El muestreo se realizó bajo campana de flujo laminar (condiciones de esterilidad) día por medio. Antes de la toma de muestras los frascos se agitaron con suavidad. Para el recuento de células se tomaron 2 mL de muestra de cada frasco y se fijó con una gota de solución Lugol. El recuento de células se realizó utilizando cámaras de conteo viga Sedgwick (Reino Unido) bajo un

microscopio óptico (Zeiss). Para *M. nummuloides* y *P. sulcata* se contaron un mínimo de 400 cadenas. Para *N. ramosissima* y *E. palodosa* se contó un mínimo de 210 cuadrículas de la cámara de conteo. La tasa de crecimiento específica (μ , día⁻¹) se calculó de acuerdo a Frost y col. [14] con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{t_1 - t_0} \quad \mathbf{2.5}$$

Donde, **N** es la densidad celular específica al tiempo **t**.

La concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$) se midió diariamente en todas las réplicas para observar el estado de crecimiento *in situ*.

La concentración de clorofila *a* se determinó en el laboratorio utilizando

Figura 2.6.- Diseño experimental en la sala de cultivo.



un fluorómetro multialgal (BBE Moldaenke, Kiel, Alemania). Se tomaron 25 mL de muestra de agua de cada erlenmeyer en una celda de cuarzo. El analizador de algas mide la fluorescencia de diferentes pigmentos *in situ*, y calcula el contenido total de clorofila *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$). Luego de cada medida los 25 mL de muestra se regresaron al erlenmeyer y se lavó la celda de cuarzo varias veces con etanol (90 %) y agua bidestilada para evitar una contaminación entre los tratamientos.

En medio de la fase exponencial y en la fase estacionaria de la curva de crecimiento de las algas se tomaron 30 mL de muestra para cada réplica y fueron filtrados a través de una membrana de filtro de 0,45 μm (Whatmann, UK). Durante todo el procedimiento de filtración se atenúa la luz para evitar la degradación fotoquímica de pigmentos. Los filtros fueron transferidos a tubos cónicos de polipropileno de 15 mL a los que se les añadieron 2 mL de acetona (100 %) para la extracción química y luego se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad hasta la determinación de los pigmentos a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La preparación y extracción de los pigmentos a ser cuantificados por HPLC se realizó de acuerdo a los métodos de Wiltshire y col. [15] y

Knefelkamp y col. [16]. Los pigmentos se separaron a través de HPLC con un módulo de separación de Waters 2695 y se detectaron con un detector de arreglo de fotodiodos de Waters 996 [17]. La identificación de los pigmentos se llevó a cabo comparando el tiempo de retención de cada pico determinado para la muestra con los de estándares comerciales de cada pigmento (Sigma-Aldrich).

En la fase estacionaria el cultivo residual fue filtrado a través de una membrana de filtro de 0,45 μm (Whatmann, UK) y el filtrado fue guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis de nutrientes.

La determinación colorimétrica de nutrientes (concentraciones de silicato, nitrato, nitrito, amonio y fosfato) fue realizada de acuerdo al método de Grasshoff [18] utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-1100.

Análisis estadístico

Para estudiar como influyen las SH en el crecimiento de las diatomeas, las tasas de crecimiento de las diatomeas se compararon en un análisis factorial de la varianza (ANOVA) con al menos una diferencia significativa de Fisher (LSD) post-hoc de prueba y un nivel de significancia $p < 0,05$. Además, para detectar las diferencias entre las tasas de crecimiento de las diatomeas en combinación con los tratamientos se llevó a cabo un ANOVA de dos-

factorial con el LSD post-hoc (nivel de significación de $p < 0,05$). Además, la concentración de pigmento en la fase estacionaria de los cuatro diatomeas se compararon con los tratamientos de factor en un ANOVA con LSD de Fisher prueba post-hoc (nivel de significación de $p < 0,05$). Las correlaciones entre medidas de abundancia y fluorescencia *in situ* se han calculado con el coeficiente de correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos de los experimentos de crecimiento se realizaron con STATISTICA (STATISTICA 7.1, Statsoft Inc, EE.UU.).

2.2.13.- Análisis de datos

En la mayoría de los casos el análisis de datos fue realizado utilizando la planilla de cálculo del software Microcal(TM) Origin® Working Model.

2.2.14.- Cálculos teóricos

Las simulaciones de dinámicas moleculares dentro del ensamble NVT,

tanto para el estado triplete como para el radical catión del FA, fueron utilizadas para generar las geometrías de partida. El método semi-empírico AM1 [19] como implemento en MOPAC2009 [20] fue utilizado para proporcionar la energía potencial correspondiente a los núcleos.

La conformación de menor energía que se encontró previamente para el estado singlete del modelo Buffle de AF [21] fue tomada como geometría de partida para las simulaciones. Esta conformación fue re-optimizada al nivel AM1 de la teoría, para el estado triplete y el radical catión del FA.

Al final del procedimiento se obtuvieron más de 20 geometrías de partida para el radical catión y el estado triplete del AF para una mayor optimización en el marco de la teoría funcional de la densidad (DFT) [22], utilizando el paquete ADF2009.01 [23].



Referencias

- 1 Saito, T. Koopal, L. K. van Riemsdijk, W. H. Nagasaki, S. Tanaka, S. Adsorption of humic acid on goetita: isotherms, charge adjustments, and potential profiles. *Langmuir*. **20** (2004) 689-700
2. Andjelkovic, T., Perovic, J., Purenovic, M., Blagojevic, S., Niklic, R., Andjelkovic, D., Bojic, A. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. *Ecletica Química*. **31** (2006) 39-46
3. (a) Moreda-Piñero, A., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P. *Analytica Chimica Acta* **524**, 97-107 (2004) (b) Moreda-Piñero, A., Seco-Gesto, E. M., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P.. *Chemosphere* **64** (2006) 866-873
4. Lakowicz, J.R. (1999) *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd Edition, Kluwer Academics, New York.
5. Chemical Actinometry (IUPAC Report). *Pure & Appl. Chem.* **61** (1989) 187-210
6. Braslavsky S.E.; Heibel G.E., Time-resolved photothermal and photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution. *Chem. Rev.* **92** (1992) 1381-1410
7. Borsarelli, C.D.; Bertolotti, S.G.; Previtali, C.M. Thermodynamic changes in the photoinduced proton-transfer reaction of the triplet state of safranin-T. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1** (2002) 574-580
8. Thomas, S., Ruiz, G., y Ferraudi, G. Preparation and Reactivity of Pendent --CO₂Rh^{III}(phthalocyanine) Bound to a Poly(acrylate) Backbone. Effects of the Hypercoiled Backbone on the Association, Photochemical, and Thermal Redox Reactions of the Pendent Macrocycle, *Macromolecules* **39** (2006) 6615-6621
9. Hugh, G. L., Wang, Y., Schöneich, C., Jiang, P.-Y., Fesenden, R. W. Multiple time scales in pulse radiolysis. Application to bromide solutions and dipeptides. *Radiation Physics and Chemistry* **54** (1999) 559-566
10. Feliz, M. R., Ferraudi, G. Charge-Transfer Processes in (4-Nitrobenzoate)Re(CO)₃(azine)₂ Complexes. Competitive Reductions of 4-Nitrobenzoate and Azine in Thermally and Photochemically Induced Redox Processes. *Inorg. Chem.* **37** (11) (1998) 2806-2810
11. San Román, E. A. y González, M. C. Analysis of spectrally resolved kinetic data and time-resolved spectra by bilinear Regression. *Journal of Physical Chemistry*. **93** (1989) 3532-3536
12. González, M. C. y Braun, A. M. VUV photolysis of aqueous solutions of nitrate and nitrite. *Research on Chemical Intermediates*. **21** (1995) 837-859
13. Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U. y Zohary, T. Biovolume calculating for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* **35** (1999) 403-424
14. Frost, B. W. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnology and Oceanography*. **14** (1972) 805-815
15. Wiltshire, K.H., Harsdorf, S., Smidt, B., Blocker, G., Reuter, R., Schroeder, F. The

determination of algal biomass (as chlorophyll) in suspended matter from the Elbe estuary and the German Bight: A comparison of high-performance liquid chromatography, delayed fluorescence and prompt fluorescence methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **222** (1998) 113–131

16. Knefelkamp, B., Carstens, K., Wiltshire, K.H. Comparison of different filter types on chlorophyll-a retention and nutrient measurements. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **345** (2007) 61–70

17. Wiltshire, K.H. Algae and Associated Pigments of Intertidal Sediments, New Observations and Methods. *Limnologica*. **30** (2000) 205–214

18. Grasshoff, K. (1976) *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.

19. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., Stewart, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 3902–3909

20. MOPAC2009, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <http://OpenMOPAC.net> (2008).

21. David Gara, P.M., Bosio, G.N., Gonzalez, M.C., Russo, N., Michelini, M. C., Pis Diez R. and Martire, D.O. A combined theoretical and experimental study on the oxidation of fulvic acid by the sulfate radical anion. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8** (2009) 992–997

22. a) Hohenberg, P. and Kohn, W. *Phys. Rev.* **136** (1964) B864–B871; b) Kohn, W. and Sham, L. J. *Phys. Rev.* **140** (1965) A1133–A1138; c) Parr R. G. and Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, 1989.

23. a) te Velde, G., Bickelhaupt, F.M., van Gisbergen, S.J.A., Fonseca Guerra, C., Baerends, E.J., Snijders J.G. and Ziegler, T. *J. Comp. Chem.* **22** (2001) 931; b) Fonseca Guerra, C., Snijders, J.G., te Velde, G. and Baerends, E.J. *Theor. Chem. Accounts.* **99** (1998) 391; c) ADF2009.01, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, <http://www.scm.com>.

Resultados