



Caracterización y fotoquímica de sustancias húmicas de diferentes orígenes.

Marcela Martín



.л 2011 л.



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

*Caracterización y
fotoquímica de
sustancias húmicas de
diferentes orígenes.*

Marcela V. MARTIN

2011



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

*Caracterización y fotoquímica
de sustancias húmicas de
diferentes orígenes.*

Marcela V. MARTIN

2011

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

A mis padres

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

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

A Mónica, por las discusiones realizadas durante todo el trabajo.

A mis compañeros del grupo LEAR: Pedro, Janina, Laura, Paula, Verónica, María Laura, Gabriela, Valeria, Cristian, Romina, Lucho, Sebastián, Andrea y Manuel, por su apoyo, por ser mis amigos más que compañeros de trabajo.

A la gente del primer piso y la casita del INIFTA: Daniela, Laura D., Mariana P., Mariana V., Paula D., Andrés, Carolina, el Chino, Fabricio, Ezequiel, Carlos y Adela por los momentos compartidos.

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

A mis compañeros del INQUINOA: Ricardo, Eduardo, Lorena, Valentina y Valeria, por hacer agradables mis viajes a Santiago.

A la Dra Karen Wilshire y la Dra Christina Gebühr, la técnica Silvia Peters del AWI (Helgoland, Alemania) por su colaboración en los ensayos microbiológicos.

A la Dra Sandra Gómez de Sarabia del INIFTA, por haber accedido a la realización de mis ensayos microbiológicos en su laboratorio.

Al Dr Gustavo Ruiz del INIFTA, por la realización de los experimentos de radiólisis de pulso en la Universidad de Notre Dame, USA.

Al Dr Reinaldo Pis Diez, por su colaboración en los cálculos teóricos de los espectros de absorción para el radical catión y el estado triplete de ácidos fúlvicos.

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

Al Lic Ricardo Mignone, por su colaboración en los experimentos de LIOAS en el INQUINOA (Facultad de Agronomía y Agroindustrias, U.N.S.E.).

A la Dra Janina Rosso, por su colaboración en los experimentos de LFP en el INFTA.

A la Dra Inés Sánchez de Pinto (UNSE) por donar gentilmente las muestras de residuos frutihortícola para su estudio en este trabajo.

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

A la UNLP, CONICET y DAAD, por la financiación recibida durante la realización de este trabajo.

Por último, pero no menos importante:

A mis hermanos, tíos, vecinos y especialmente a Rodrigo y a mis padres por quererme, por darme su amor y apoyo incondicional.

A mí sobrino Valentín, mí ahijada Florencia, las Pandas y amigos por alegrar mis días.

A Carmen y Pedro por cuidar de mí en Buenos Aires y por las tardes de domingo en familia.

Índice

Abreviaturas y Símbolos	5
Introducción	7
Capítulo 1: Antecedentes y Objetivos	12
1.1 Sustancias húmicas	12
1.2 Seguimiento del proceso de compostaje mediante diferentes técnicas	15
1.3 Experiencias de láser flash-fotólisis de sustancias húmicas	15
1.4 Energías de triplete de las sustancias húmicas	17
1.5 Influencia de las sustancias húmicas en el crecimiento del fitoplancton marino: Diatomeas y dinoflagelados	17
1.6 Objetivos del Trabajo de Tesis	19
Capítulo 2: Materiales y Métodos	24
2.1 Materiales	24
2.1.1 Reactivos utilizados	24
2.1.2 Reactivos específicos	24
2.2 Instrumentación y Métodos	24
2.2.1 Preparación de soluciones de ácidos húmicos	24
2.2.2 Muestreo de Compost	26
2.2.3 Muestreo de sedimento marino	27
2.2.4 Extracción y purificación de ácidos húmicos	27
2.2.5 Espectroscopía de Absorción y de Fluorescencia	28
2.2.6 Método de flash fotólisis	30
2.2.7 Espectroscopía fotoacústica resuelta en el tiempo	31
2.2.8 Determinación de carbono total	34
2.2.9 Espectros infrarrojos con transformada de Fourier	35
2.2.10 Generación de los radicales inorgánicos	35
2.2.11 Análisis computacional	36
2.2.12 Ensayos microbiológicos	37
2.2.13 Análisis de datos	41

2.2.14 Cálculos teóricos	41
Capítulo 3: Caracterización de las sustancias húmicas	44
3.1 Espectroscopía UV-visible. Análisis espectrales	44
3.2 Espectroscopía de fluorescencia. Rendimientos cuánticos. Matrices de excitación-emisión	48
3.3 Determinación de grupos carboxílicos y fenólicos por titulación	53
3.4 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	54
3.5 Seguimiento del proceso de compostaje	58
3.6 Conclusiones	60
Capítulo 4: Oxidación de ácidos húmicos mediada por radicales inorgánicos	64
4.1 Introducción	64
4.2 Resultados	67
4.2.1 Estudio mediante radiólisis de pulso de la reacción del radical HO• con ácidos húmicos	67
4.2.2 Estudio mediante radiólisis de pulso de la reacción del radical N ₃ • con ácidos húmicos	74
4.2.3 Estudio mediante laser flash-fotólisis de las reacciones de los radicales Br ₂ • ⁻ / Br• con ácidos húmicos	77
4.3 Discusión	80
4.4 Conclusiones	84
Capítulo 5: Estudios resueltos en el tiempo de las especies generadas por fotólisis de sustancias húmicas	89
5.1 Introducción	89
5.2 Resultados	89
5.2.1 Láser flash-fotólisis de ácidos húmicos $\lambda^{\text{exc}} = 266\text{nm}$ a distinto pH	89
5.2.2 Láser flash-fotólisis de ácidos fúlvicos $\lambda^{\text{exc}}=355\text{nm}$	92
5.2.3 Espectroscopía optoacústica inducida por láser $\lambda^{\text{exc}} = 355\text{nm}$	97

5.3	Discusión	100
5.4	Conclusiones	103
Capítulo 6: Efecto de las sustancias húmicas en el crecimiento de algas bentónicas		107
6.1	Introducción	107
6.2	Resultados: Análisis comparativo de los ensayos de crecimiento con diferentes algas	110
6.2.1	Recuento de células	110
6.2.2	Medidas de fluorescencia <i>in situ</i> (BBE)	112
6.2.3	Cuantificación de pigmentos por HPLC	113
6.3	Discusión	116
6.4	Conclusiones	121
Capítulo 7: Conclusiones Generales		124

Abreviaturas y Símbolos

- AF** Acido fúlvico
- AH** Acido húmico
- AHA** Ácidos húmicos Aldrich
- AOPs** Procesos de oxidación avanzados
- AP** Ácidos húmicos Aldrich purificados
- AP** Ácidos húmicos Fluka purificados
- ATMM** Anchura total a la mitad del máximo
- COD** Carbono orgánico disuelto
- COT** Carbono orgánico total
- c_p** Capacidad calorífica específica
- E4/E6** Relación de absorbancia a 465 y 665 nm, respectivamente
- EAE_λ** Espectro de absorción específica
- E_T** Energía del estado triplete
- FTIR** Espectroscopía IR de transformada de Fourier
- HCHD** Radical hidroxiciclo-hexadienilo
- HOMO** Orbital molecular de menor energía no ocupado
- IHSS:** Sociedad internacional de sustancias húmicas
- k_q** Constante de desactivación
- LFP** Flash fotólisis láser
- LIOAS** Espectroscopia optoacústica inducida por láser
- LUMO** Orbital molecular de mayor energía ocupado
- MEE** Matrices de excitación – emisión
- MO** Materia orgánica
- MOD** Materia orgánica disuelta
- ¹O₂** Oxígeno molecular singulete
- PLEE** Pares de longitudes de onda de excitación-emisión
- PLFA** Ácidos fúlvicos Pony Lake
- PM** Peso molecular
- SH** Sustancias húmicas
- SSHA** Ácidos húmicos extraídos de suelo Santiagueño
- SUVA₂₅₄** Absorbancia ultravioleta específica a 254 nm
- TAHSM** Sustancias “tipo ácidos húmicos” de sedimento marino
- VCHA** Ácidos húmicos extraídos de material vermicompostado
- WPFA** Ácidos fúlvicos Waskish Peat
- Φ_F** Rendimiento cuántico de fluorescencia
- Φ_{st}** Rendimiento cuántico de producción de especies transitorias
- Φ_Δ** Rendimiento cuántico de producción de oxígeno singulete
- β** Coeficiente de expansión térmico isobárico

ϵ Coeficiente de extinción molar
 λ^{exc} Longitud de onda de excitación
 λ^{max} Longitud de onda máxima
 ρ Densidad
 τ Tiempo de vida

Introducción



Introducción

Aspectos Generales

Introducción General

El efecto de la contaminación en el medio ambiente y principalmente en *aguas superficiales* y *suelos* recibe una creciente atención [1,2]. Por otra parte, la superficie terrestre y acuática contiene una diversidad de sustancias orgánicas e inorgánicas (solubles e insolubles) presentes en sus lechos naturales.

La materia orgánica puede clasificarse en dos tipos según su origen: *no húmicas* y *húmicas* [2]. Entre los *no húmicos* se incluyen carbohidratos, proteínas, grasas, taninos y derivados provenientes de residuos de animales y plantas muertas. La materia orgánica *húmica* se produce por la degradación química y enzimática (microbiana) de los materiales *no húmicos* [2]. Otra fuente importante de formación de sustancias húmicas (SH) es el *compostaje* producido en el tratamiento bio-oxidativo controlado

de residuos sólidos orgánicos urbanos o rurales [3,4], permitiendo el reciclado de desperdicios biodegradables en la enmienda y/o fertilización de suelos.

La relevancia fotoquímica de las SH está asociada con su actividad como *fotosensibilizadores* naturales presentes en aguas superficiales, siendo capaces de activar al O_2 generando especies reactivas oxidantes [5], como oxígeno singulete 1O_2 [6], radical anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ [7], H_2O_2 [8], radical hidroxilo HO^{\bullet} [9], peróxidos orgánicos [10] y estados triplete reactivos [11]. Durante estos procesos, las SH sufren fototransformaciones como la fotodegradación [12], y fotomineralización [6].

Los cromóforos más comunes presentes en los SH son grupos fenólicos, quinónicos, amino,

carboxílicos y éteres, que posibilitan diversos caminos fotoquímicos [13]. Los diferentes grupos, incluyendo los carbonilos y quinonas se supone que son intermediarios responsables de la actividad fotosensibilizadora de las SH [14]. Sin embargo, debido al espectro de absorción no específico de las SH y a la variedad de cromóforos, una de las formas de dilucidar los mecanismos involucrados es mediante el uso de técnicas resueltas en el tiempo con excitación láser, aunque la interpretación de los resultados no resulte sencilla [15].

Por otra parte, los residuos sólidos urbanos y agropecuarios constituyen un gran reservorio de materia orgánica. Sin embargo, no pueden usarse directamente para enriquecer a los suelos, sino que hay que humificarlos (compostarlos) previamente. La aplicación de este tipo de tratamiento de remediación resulta benéfica siempre que el compost obtenido esté libre de contaminantes.

En tanto, se espera que la información obtenida en el marco de este trabajo de tesis doctoral relacionada a los métodos de compostaje a escala de laboratorio pueda emplearse en escalas mayores. Por otro lado, se busca realizar una caracterización completa de las SH obtenidas con vista a sus potenciales usos por ejemplo, como fotosensibilizadores

naturales, secuestrantes de iones. También se pretende entender de qué manera afecta a los procesos oxidativos avanzados (AOPs) la presencia de materia orgánica en suelos y aguas naturales (modelado por AH). En el caso de las sustancias húmicas extraídas de suelo marino la información es principalmente de interés ecológico.

En este sentido, nuestro punto de partida en este trabajo de tesis está dado por el estado de investigación, que especificamos en los antecedentes. Los resultados y la discusión son presentados conjuntamente para su mejor comprensión y subdivididos en cuatro partes. De manera adicional a la introducción general, en cada capítulo se realiza una introducción específica relacionada con la temática del mismo.

A continuación detallamos cómo es la organización en capítulos de este trabajo.

Capítulo 1: Se presentan los antecedentes que son nuestro punto de partida para el desarrollo de la tesis.

Capítulo 2: Se describen los métodos y equipos empleados.

En los capítulos 3-6 se presentan y discuten los resultados de:

Capítulo 3: La caracterización de las sustancias húmicas mediante diversas técnicas.

Capítulo 4: La cinética de oxidación de ácidos húmicos mediada por radicales inorgánicos.

Capítulo 5: Estudios resueltos en el tiempo de las especies generadas por fotólisis de sustancias húmicas.

Capítulo 6: La influencia de las sustancias húmicas en el crecimiento de algas bentónicas.

En el **Capítulo 7** se presentan las conclusiones generales.

Por último, esperamos que nuestro trabajo aporte información útil, para la discusión sobre el uso de enmiendas y para la optimización de los procesos de descontaminación.



Referencias

1. Holt, M.S. Sources of chemical contaminations and routes into freshwater environment. *Food Chem. Toxicol.* **38** (2000) S21–S27
2. Bohn, H.L., Mc Neal, B.L., O'Connor, G.A. *Química del Suelo*, Limusa-Grupo Noriega Ed. (1993)
3. De Bertoldi, M., Ferranti, M.P., L'Hermite, P., Zucconi, F. Compost: production, quality and use. In: Proc Symp Commission of the European Communities, Elsevier Applied Science, London New York (1987)
4. Finstein, M.S., Miller, F.C., Strom, P.F., MacGregor, S.T., Psarianos K.M. Composting ecosystem management for waste treatment. *Biotechnol.* **1** (1983) 346
5. Bushaw, K. L., Zepp, R. G., Tarr, M. A., Schulz-Jander, D., Bourbonniere, R. A., Hodson, R. E., Miller, W. L., Bronk, D. A., Moran, M.A. Photochemical release of biologically available nitrogen from aquatic dissolved organic matter. *Nature.* **381** (1996) 404–407
6. a) Zepp, R.G., Wolfe, N.L., Baughmann, G.L., Hollis, R.C. Singlet oxygen in natural waters. *Nature.* **267** (1977) 421–423; b) Haag, W.R., Hoigné, J., Gassman, E., and Braun, A.M., Singlet oxygen in surface waters – Part II: quantum yields of its production by some natural humic materials as a function of wavelength. *Chemosphere.* **641** (1984) 641–650; c) Frimmel, F.H., Bauer, H., Putzlen, J., Murasecco, P., Braun, A.M., Laser flash photolysis of dissolved aquatic humic material and the sensitized production of singlet oxygen. *Environ. Sci. Technol.* **21** (1987) 541–545
7. Goldstone, J.V., Voelker, B.M. Chemistry of superoxide radical in seawater: CDOM associated sink of superoxide in coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* **34** (2000) 1043–1048
8. Scully, N. M., Lean, D. R. S., Cooper, W. J., McQueen, D. J. Hydrogen peroxide formation interaction of UV radiation and dissolved organic carbon in lakewaters along a 43–75 °N gradient. *Limnol. Oceanogr.* **41** (1996) 540–548
9. Vaughan, P., Blough, N.V. Photochemical formation of hydroxyl radical by constituents of natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **32** (1998) 2947–2953
10. Cooper, W. J., Zika, R. G., Petasne, R. G, and Fischer, A. M. Sunlight-induced photochemistry of humic substances in natural waters: major reactive species. In *Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants*; Suffet, I. H., and P. MacCarthy, Eds.; American Chemical Society: Washington, DC (1989) pp. 333–362
11. Richard, C., Vialaton, D., Aguer, J.-P., and Andreux, F. Transformation of monuron photosensitized by soil extracted humic substances: energy or hydrogen transfer mechanism. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **111** (1997) 265–271
12. Schmitt-Koplin, P., Hertkorn, N., Schulten, H.R., Kettrup, A. Structural changes in a dissolved soil humic acid during photochemical degradation processes under O₂ and N₂ atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* **32** (1998) 2531–2541
13. Murray K., Linder P.W. Fulvic acids: structure and metal binding. *J. Soil Sci.* **35** (1984) 217–222

14. Vialaton, D, Pilichowski, JF, Baglio, D, Paya-Perez, A, Larsen, B, Richard, C. Phototransformation of propiconazole in aqueous media. *J Agric Food Chem.* **49** (2001) 5377–5382

15. Lang, K., Wagnerova, D.M., Klementova, S., Kubat, P. Humic substances-excited states, quenching by metal ions, and photosensitized degradation of chlorophenols. *Czech. Chem. Comm.* **62** (1997) 1159–1168

Capítulo 1



Capítulo 1

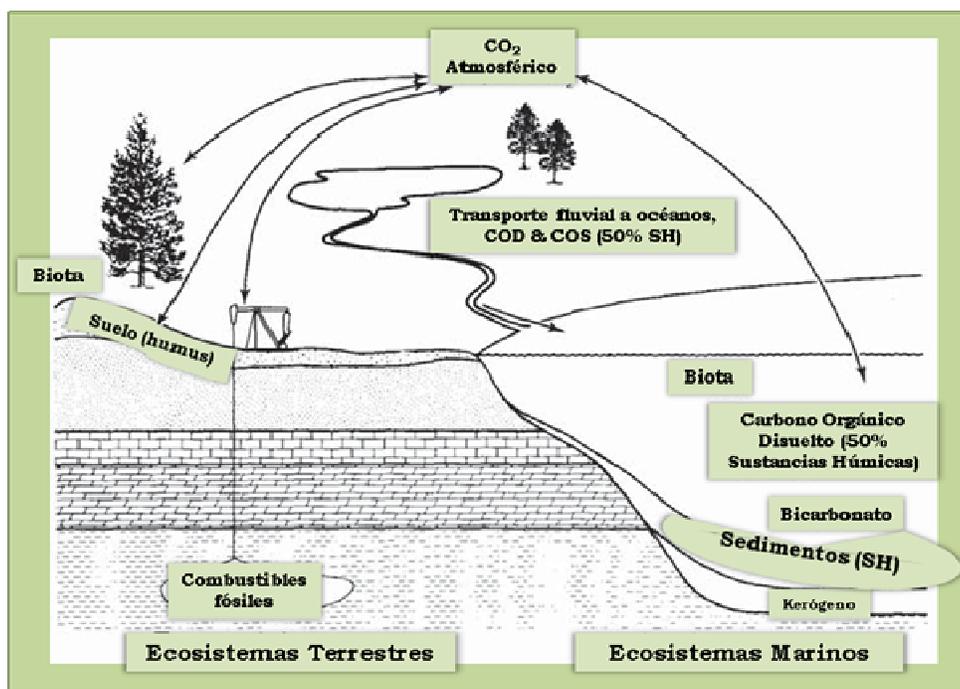
Antecedentes y Objetivos.

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.

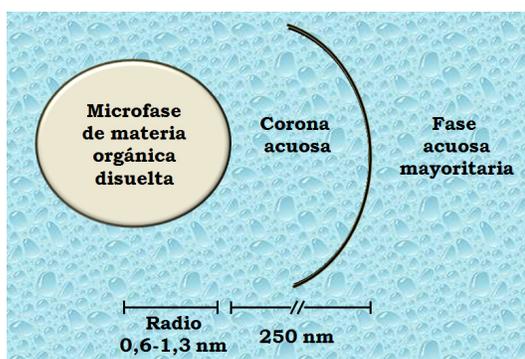
Los conceptos tradicionales originados de las observaciones de elevados pesos moleculares [1,2], postularon que las SH estaban compuestas por macromoléculas poliméricas [3]. Sin embargo, la evidencia recopilada durante la última década sobre una base de una amplia gama de técnicas proporciona una nueva 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] ($\lambda^{\text{exc}} = 350$ 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 $\lambda^{\text{max}} = 475$ nm ($k_q = 10^8$ M⁻¹s⁻¹). Desactivadores con energía de triplete, $E_T > 57$ kcalmol⁻¹ mostraron una combinación de desactivación dinámica y estática. Estos resultados sugirieron que el transitorio tiene cierto carácter de triplete.

Power y col. [22] ($\lambda^{\text{exc}} = 355$ nm) emplearon AF Mossy Point y observaron 4 especies transitorias. Una de ellas con $\lambda^{\text{max}} = 675$ nm y tiempo de vida de 1 μ s a pH = 7 que fue atribuido al electrón solvatado. El segundo componente con $\lambda^{\text{max}} = 475$ nm y un tiempo de vida de 1-10 μ 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 μ 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 mol L⁻¹ de NaOH. Experimentos con $\lambda^{\text{exc}} = 520$ y 470 nm resultan en la formación de tripletes con una absorción con $\lambda^{\text{max}} \approx 630$ nm y tiempos de vida de $\sim 0,15$ 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] ($\lambda^{\text{exc}} = 308$ nm) realizaron experimentos de LFP con AH Aldrich y encontraron tres transitorios: el transitorio 1 con un tiempo de vida de < 100 ns asignado al electrón solvatado, el transitorio 2 ($\lambda^{\text{max}} = 440$ –450 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 ($\lambda^{\text{exc}} = 337$ 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



Capítulo

2 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:

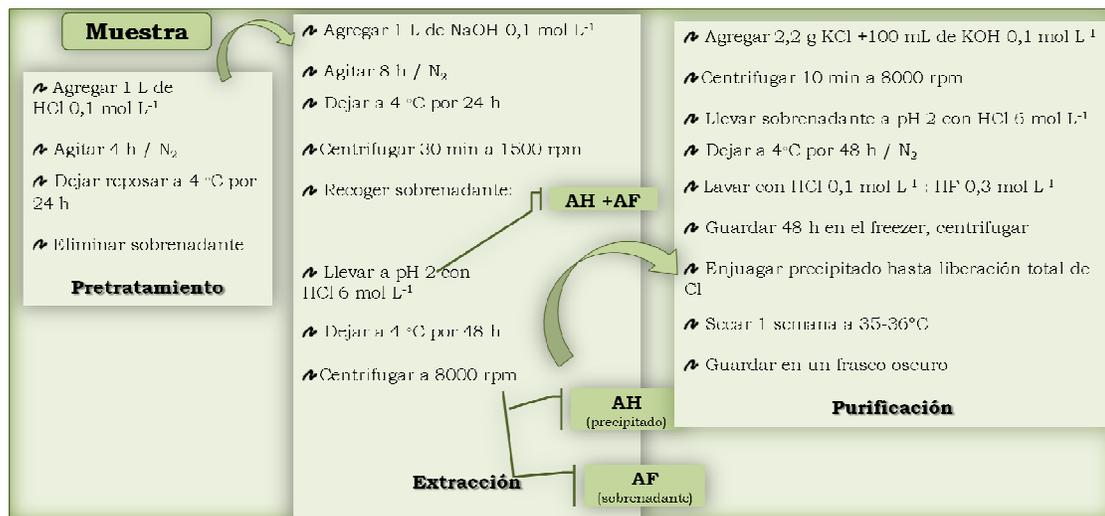
1. Pretratamiento (solubilización de carbonatos): A 200 g de compost o suelo marino se le agregó 1 L de HCl (0,1 mol L⁻¹), se agitó durante 4 h y luego se dejó decantar por el lapso de 24 h.

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.

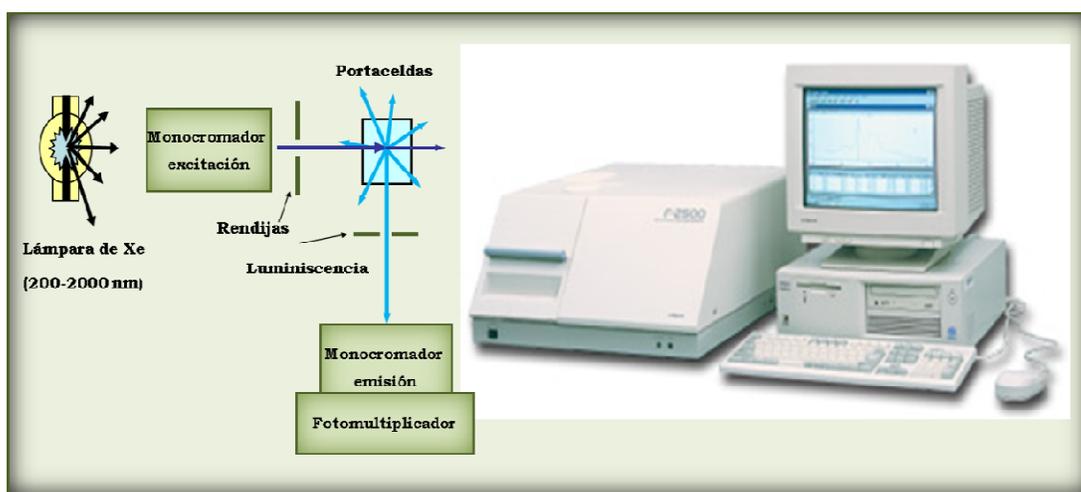
Para registrar las MEE de fluorescencia, la longitud de onda de excitación se incrementó de a 5 nm, desde 200 a 550 nm. Para cada longitud de onda de excitación se detectó la emisión desde los 300 a los 600 nm, tomando datos cada 0,5 nm a una velocidad de 1000 nm/min. Todas las muestras se prepararon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

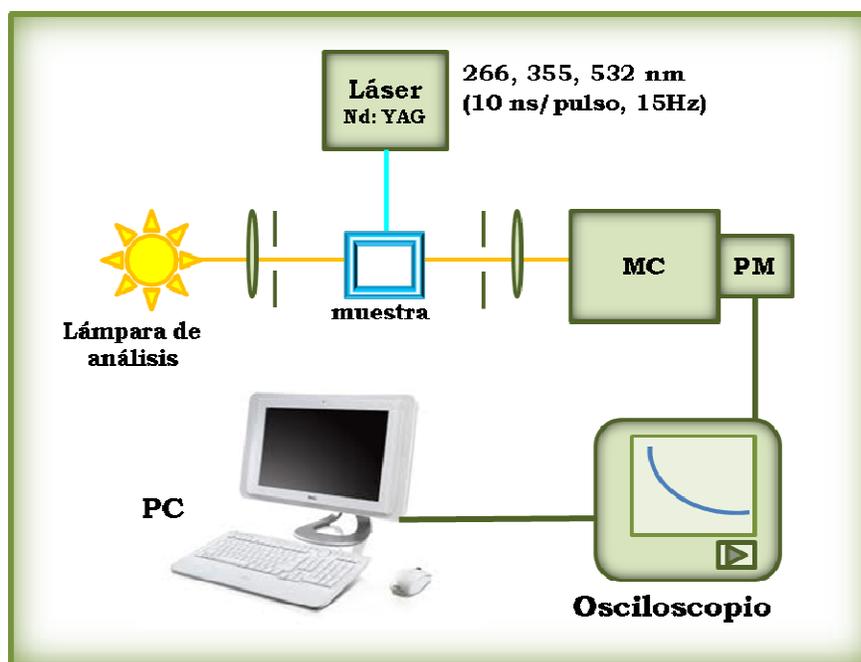
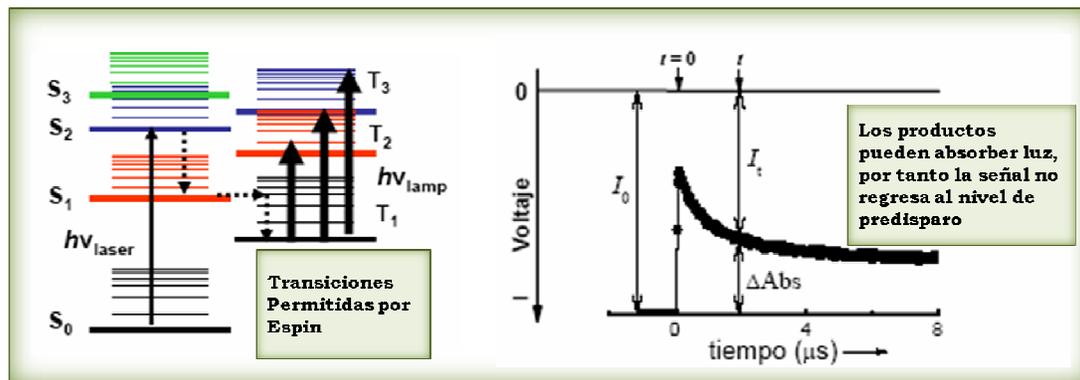


Figura 2.3.- Esquema del proceso de absorción del transitorio (Izq.) y traza cinética típica obtenida en los experimentos de LFP (Der.).



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.

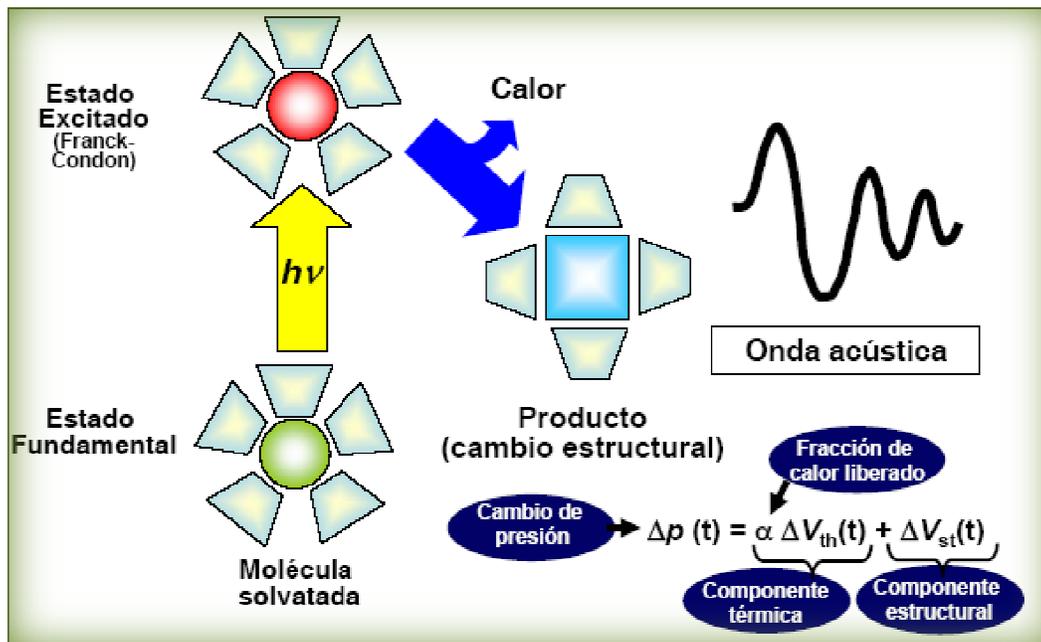
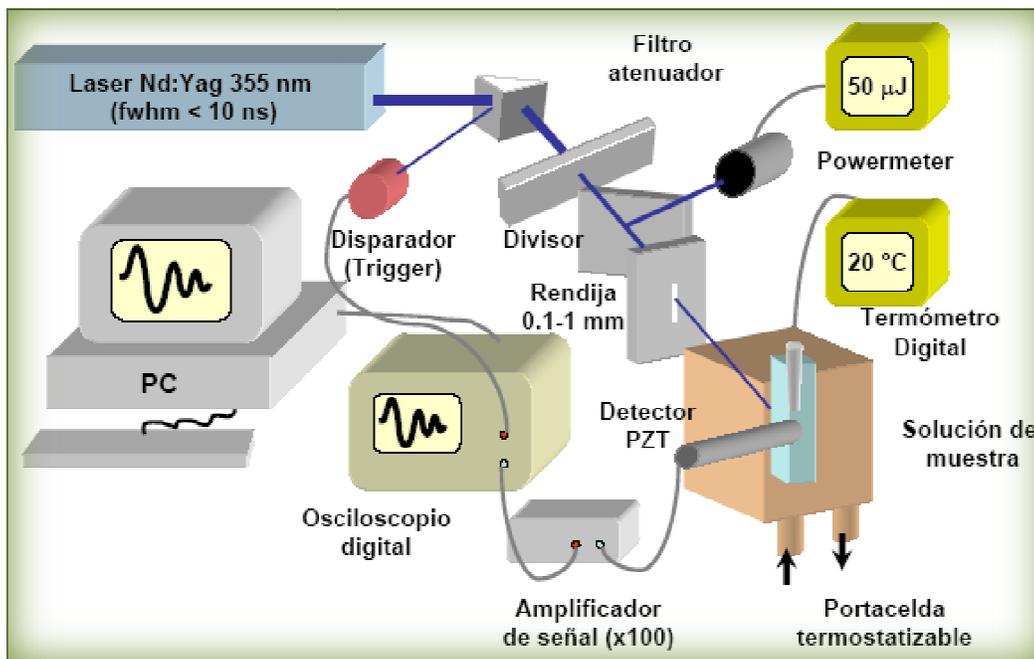


Figura 2.5.- Esquema del arreglo experimental utilizado en la técnica de fotoacústica.



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.

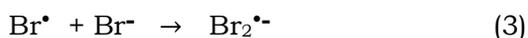
Por láser flash-fotólisis

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 nummolooides* 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. nummolooides*), 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.

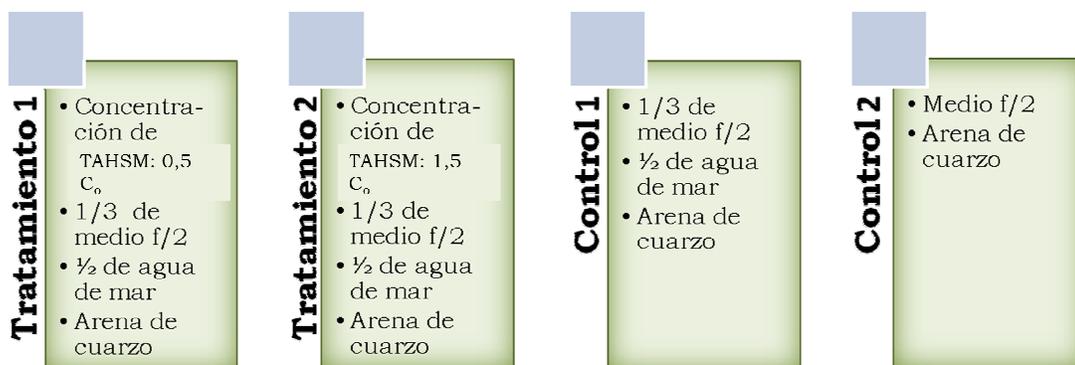
La concentración de SH del “tipo AH” de sedimento marino extraídas en Helgoland en marzo del 2008 fue de 0,02 g por gramo de sedimento marino. De 400 g del sedimento se obtuvieron 7,98 g de TAHSM. Así, la concentración de SH del “tipo AH” extraíbles en los sedimentos naturales fue de $C_0 = 0,020$ g 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. nummolooides* 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-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P. *Analytica Chimica Acta* **524**, 97–107 (2004) (b) Moreda-Piñeiro, 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. Kniefkamp, 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

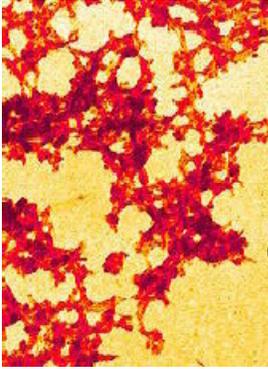
20. MOPAC2009, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <http://OpenMOPAC.net> (2008).

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



Capítulo 3

Caracterización de las sustancias húmicas.

3.1.- Espectroscopia UV-visible. Análisis espectrales.

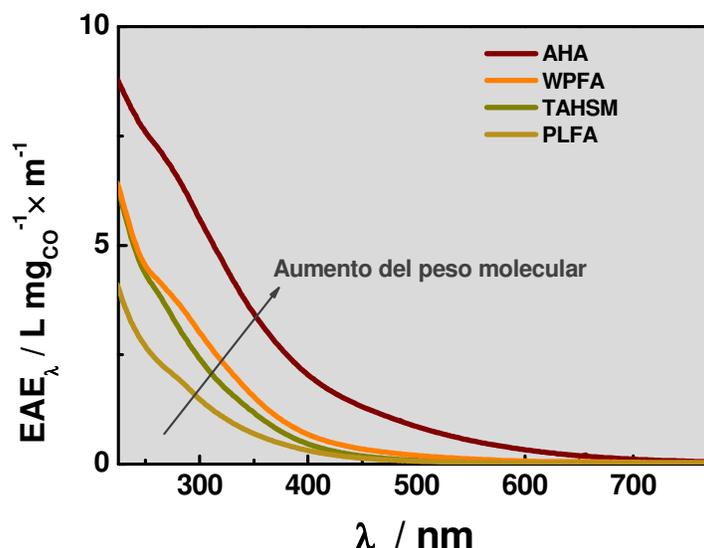
Los espectros de absorción UV-Vis de todas las muestras de SH no presentan estructura y como se observa normalmente para este tipo de materiales, muestran una disminución continua de la absorbancia con el aumento de la longitud de onda [1,2,3,4]. Para una comparación espectral cuantitativa, el espectro UV-vis (A_λ) de diferentes SH se normalizó teniendo en cuenta el contenido de COT, utilizando la ecuación 3.1 y se presenta en la figura 3.1 como espectro de absorción específica (EAE_λ):

$$EAE_\lambda = \frac{A_\lambda}{COT \times C_{HS} \times b} \times 10 \quad 3.1$$

donde, A_λ es la absorbancia a la longitud de onda λ ; COT es el porcentaje de carbono orgánico total

expresado en %p/p; C_{SH} es la concentración de SH en $g \times L^{-1}$ y, b el camino óptico en cm. Por lo tanto, EAE_λ se expresa en: $L \times (m \times mgCO)^{-1}$. A pesar de la falta de máximos de absorción, la relación de absorbancia a 465 y 665 nm (relación E4/E6) ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de las SH, siendo en general más elevados sus valores para AF que para AH [5]. También es de esperar una disminución en la relación E4/E6 con el aumento de la condensación molecular de las SH, debido a la mayor capacidad de absorción en la región de las longitudes de onda correspondientes al rojo en el espectro visible [6]. La tabla 3.1 muestra los valores de E4/E6 calculados a pH 7 para todas las muestras, los cuales presentan la siguiente tendencia: TAHSM > PLFA > WPFA > AHA. El orden observado se asocia con el incremento en la condensación molecular y la

Figura 3.1.- Espectros de absorción específica (EAE_{λ}) normalizados por mg de carbono orgánico (COT) para diferentes SH en solución acuosa a pH 7.



aromaticidad, las que son proporcionales al grado de humificación y maduración de las SH [3, 7].

La tabla 3.1 muestra también los valores de absorción específica a 254 nm ($SUVA_{254}$) [8] calculados con la ecuación 3.1. Adicionalmente, de la corrección de la absorción específica a 280 nm por el factor de 120, se obtiene la absortividad molar a 280 nm por mol de carbono orgánico (ϵ_{280} [=] $L \times mol_{CO}^{-1} \times cm^{-1}$). Estos parámetros están relacionados con el número de dobles enlaces C=C o aromaticidad (hibridación sp^2) que contienen las SH [7].

Los valores más altos de $SUVA_{254}$ y ϵ_{280} fueron obtenidos para la muestra de

AHA, lo que indica que este AH contiene un alto grado de aromaticidad y dobles enlaces conjugados en su estructura, tal como se esperaba para un material extraído de turba. Además, se ha demostrado que el ϵ_{280} se relaciona en forma lineal con el peso molecular (PM) de los ácidos fúlvicos acuáticos a través de la ecuación 3.2 [7]:

$$PM = 3,99\epsilon_{280} + 490 \quad \mathbf{3.2}$$

Para la mayoría de las SH provenientes de fuentes acuáticas o de suelos es de esperar que tengan coeficientes de extinción molar y pesos moleculares dentro de los límites de

esta relación y, la ecuación 3.2 puede ser utilizada cuidadosamente para estimaciones del peso molecular de las SH en ausencia de otras interferencias químicas (por ejemplo, óxidos metálicos, colorantes, etc.). La tabla 3.1 muestra los pesos moleculares calculados utilizando la ecuación 3.2 para las muestras de SH y se observa que el peso molecular aparente estimado de 3614 D para el AHA, se encuentra en concordancia con los valores reportados de 4100 D y 3070 D, determinados por cromatografía de alta presión de exclusión por tamaño (HPSEC) [7] y fraccionamiento de flujo de campo (FFF) [9].

Del ajuste del espectro de absorción UV con la ecuación 3.3 puede obtenerse información adicional

relacionada al grado y tipo de grupos sustituyentes cromóforos bencenoides de las SH en solución, suponiendo que la absorción UV de estas macromoléculas de SH está compuesta por tres tipos de bandas de Gauss [2]. Estas bandas se denominan localmente excitada (LE), bencenoide (BZ) y de transferencia de electrones (ET), las cuales se centran alrededor de 180, 205 y 250 nm, respectivamente.

$$A = \sum_i A_{0,i} \exp \left[- \left(\frac{2(\ln 2)^{1/2} (E - E_{0,i})}{\Delta A_{0,i}} \right)^2 \right] \quad \mathbf{3.3}$$

En la ecuación 3.3, A representa la absorbancia total, el sufijo *i* identifica

Tabla 3.1: Propiedades fisicoquímicas y de absorción UV-Vis para SH en medio acuoso a pH 7.

Sustancia húmica ^a	COT %	A _{0,ET} /A _{0,Bz}	E4/E6	SUVA ₂₅₄ L (m. mgco) ⁻¹	ε ₂₈₀ L. (cm.molco) ⁻¹	PM ^c (Dalton)
PLFA	52,5 ^b	0,11	10,51	2,56	235	1472
WPFA	53,6 ^b	0,16	8,89	4,40	442	2605
TAHSM	52,4	0,23	11,25	4,19	377	1995
AHA	44,1	1,04	6,81	7,45	783	3614

^a Abreviaturas de las sustancias húmicas: (PLFA) ácido fúlvico Pony Lake; (WPFA) ácido fúlvico Waskish Peat; (TAHSM) SH del “tipo AH” de sedimento marino y (AHA) ácido húmico Aldrich.

^b Valores reportados en <http://www.ihss.gatech.edu/elements.html>

^c PM calculados con la ecuación 3.2

a las bandas LE, Bz o ET; $A_{0,i}$, $E_{0,i}$ y $\Delta A_{0,i}$ son la absorbancia, la energía en el máximo al cual está centrada la banda y el ancho medio de la banda, respectivamente. Estos parámetros se pueden calcular ajustando los espectros de absorción utilizando la ecuación 3.3 en el rango entre 200 y 400 nm.

Es interesante, que la intensidad (A_0) de la banda ET se ve fuertemente afectada por la presencia de grupos funcionales polares en el anillo bencénico, mientras que la banda benzoide (Bz) prácticamente no es influenciada. Como resultado, la relación $A_{0,ET}/A_{0,Bz}$ calculada para compuestos modelo se incrementa de 0,03 (para el anillo bencénico) a 0,25-0,35 para compuestos fenólicos y aproximadamente 0,4 para anillos aromáticos con grupos carbonilos y carboxílicos [10]. Por lo tanto, este

parámetro puede ser una herramienta útil para una caracterización comparativa del grado de sustitución de los cromóforos aromáticos en las SH en solución. Morán y col., reportaron que durante el compostaje de residuos domiciliarios la relación $A_{0,ET}/A_{0,Bz}$ se incrementó rápidamente hasta tomar valores correspondientes a grupos carboxílicos aromáticos [3].

En el presente trabajo, se obtuvo un ajuste satisfactorio de los espectros, a través de la utilización de la ecuación 3.3, para la contribución de las bandas Bz y ET solamente, ya que la banda LE se desplaza hacia la región del UV-lejano por debajo de 200 nm. Los valores de $A_{0,ET}/A_{0,Bz}$ calculados para diferentes SH se presentan en la tabla 3.1. Para ambos AF y para la muestra de TAHSM de sedimento marino, se obtuvieron valores de $A_{0,ET}/A_{0,Bz} < 0,25$, lo que implica baja

Tabla 3.2: Propiedades de fluorescencia de diferentes SH estudiados en solución acuosa a pH 7.

SH	Excitación 360 nm		Excitación 450 nm		ATMM (cm ⁻¹)		PLEE (nm) ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$)		Relación α' / α
	$\Phi_F \times 10^3$	λ_F (nm)	$\Phi_F \times 10^3$	λ_F (nm)	λ_{exc} 360 nm	λ_{exc} 450 nm	α'	α	
PLFA	11,35	463	9,96	525	6127	4638	260/467	365/463	1,54
WPFA	5,19	475	4,30	527	6022	4669	295/358	340/468	1,97
TAHSM	6,41	460	5,77	520	7026	3914	350/460	365/520	2,12
AHA	1,81	495	2,46	525	6013	4220	280/495	360/500	3,11

complejidad molecular y/o grado de oxidación. El mayor valor de $A_{0,ET}/A_{0,BZ} = 1,04$ se obtuvo para el AH extraído de turba (AHA), el cual es un típico ejemplo de ácidos húmicos de suelo con alto grado de desarrollo y humificación, y por lo tanto con un gran contenido de cromóforos altamente oxidados [11].

3.2.- Espectroscopia de fluorescencia. Rendimientos cuánticos. Matrices de excitación-emisión

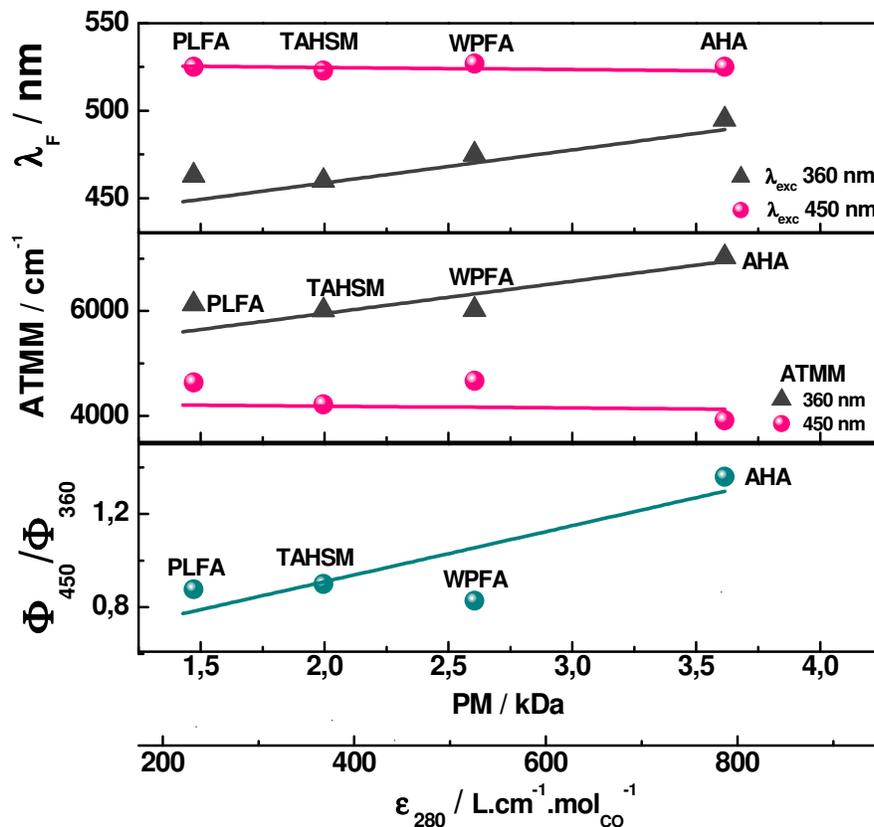
Algunos parámetros de fluorescencia que se muestran en la tabla 3.2 como máximos de emisión de fluorescencia (λ_F), rendimientos cuánticos (Φ_F^λ) y el ancho total a la mitad del máximo de la banda (ATMM) son independientes de la concentración de SH en el rango de (5-40) $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$. Sin embargo, estos parámetros dependen de la longitud de onda de excitación y de la naturaleza de la SH, lo que indica diferencias en los cromóforos presentes en estos materiales. En particular, el valor de Φ_F más alto se obtuvo para el ácido fúlvico PLFA, de composición menos compleja y menor tamaño molecular [4].

La figura 3.2 muestra la variación de estos parámetros en función del peso

molecular de las SH calculados con la ecuación 3.2.

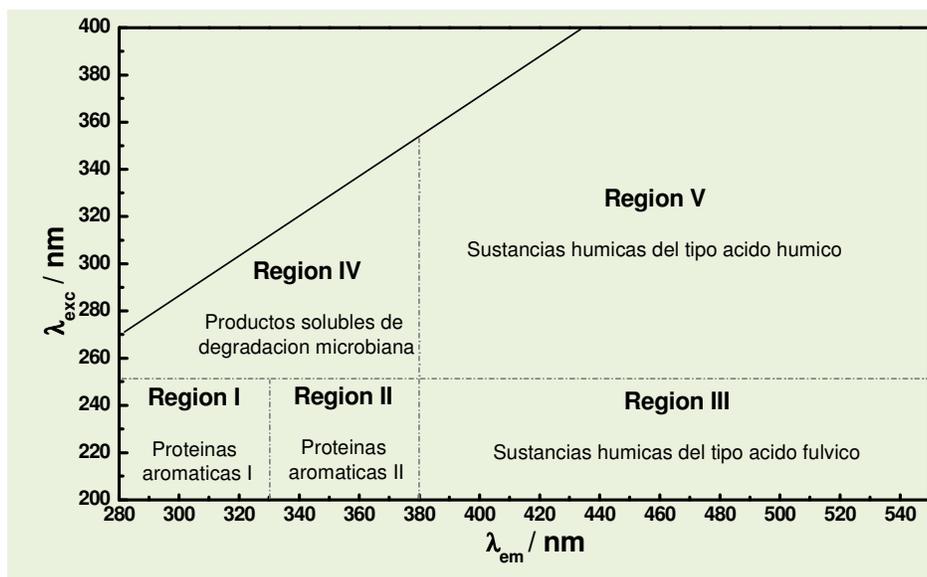
Un resultado interesante es el aumento monotónico de λ_F y ATMM con el tamaño molecular para $\lambda_{exc} = 360$ nm. En contraste estos parámetros son independientes del PM para $\lambda_{exc} = 450$ nm. Por otra parte, la relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia ($\Phi_F^{450}/\Phi_F^{360}$) aumenta de un valor de 0,88 a 1,36 con el peso molecular. Este comportamiento fue explicado para AH por Moran y col. [3] en función de la naturaleza multicromofórica y compleja de los mismos. Estos autores proponen que para las SH en general, puede esperarse la existencia de un *cuasi*-continuo solapamiento de bandas de absorción y emisión entre los cromóforos permitiendo procesos de transferencia de energía resonante (*resonance energy-transfer*) o migración de la energía de excitación [12]. Teniendo en cuenta la proximidad de los diferentes cromóforos en las SH ($< 10 \text{ \AA}$), puede esperarse un efectivo solapamiento orbital entre las moléculas donantes y receptoras de energía, siendo el intercambio de electrones o de interacción de cargas resonantes el mecanismo más probable de transferencia de energía [13].

Figura 3.2.- Dependencia con el peso molecular (PM) de las diferentes SH en solución acuosa a pH 7: A) del máximo de emisión (λ_F); B) del ancho total a la mitad del máximo de la banda (ATMM) y; C) de la relación de rendimientos cuánticos de fluorescencia por excitación a 450 y 360 nm (Φ_{450}/Φ_{360}).



Esto a su vez, concuerda con lo publicado recientemente por Del Vecchio y col. [14,15] para ácidos húmicos y fúlvicos acuáticos. Estos autores propusieron que las propiedades ópticas de las SH disueltas surgen de la absorción y emisión aproximadamente continua desde estados de transferencia de carga intramoleculares formados por grupos donores, por ejemplo, grupos aromáticos polihidroxilados, indoles, etc. y grupos aceptores más oxidados

(por ejemplo, otros aromáticos oxidados o quinonas) [14,15]. Los cambios observados en los parámetros de fluorescencia se pueden explicar teniendo en cuenta el mismo modelo propuesto, en el cual la densidad de grupos más oxidados se incrementa con el grado de humificación y / o el tamaño molecular, lo cual favorece la migración intramolecular de la energía de excitación a los estados emisores de menor energía.

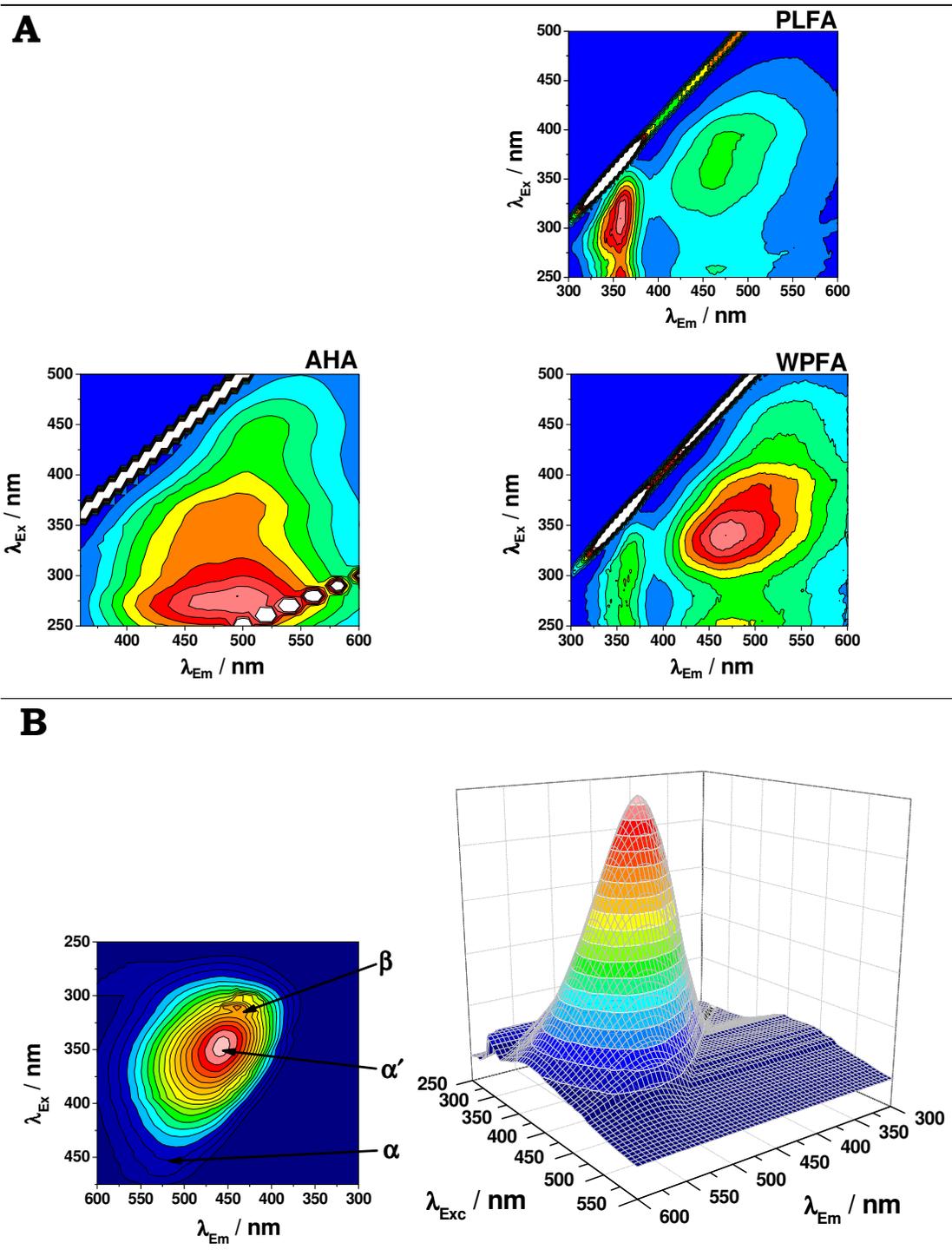
Figura 3.3.- Regiones de las MEE

El análisis de las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEE) de las SH también proporciona información interesante. Las MEE pueden dividirse en 5 regiones (figura 3.3). Los picos en cada región han sido asignados por diferentes autores a compuestos orgánicos del tipo húmicos, fúlvicos, tirosínicos, triptofánicos o fenólicos, [16,17,18]. En general, picos a longitudes de onda de excitación cortas (< 250 nm) y longitudes de onda de emisión cortas (< 350 nm) se asocian al aminoácido tirosina y a proteínas simples con alto contenido de este tipo de aminoácidos aromáticos (Regiones I y II) [19,20]. Picos correspondientes a longitudes de onda de excitación corta (< 250 nm) y a mayores longitudes de onda de emisión se relacionan con los ácidos

fúlvicos (Región III) [21]. Los picos que corresponden a longitudes de onda de excitación intermedias (250-280 nm) y longitudes de onda de emisión cortas (< 380 nm) están relacionados a productos solubles de degradación microbiana (Región IV) [18,19]. Picos a longitudes de onda de excitación más largas (> 280 nm) y también longitudes de onda de emisión más largas (> 380 nm) están relacionados con la presencia de ácidos húmicos (Región V) [22,23,24].

La figura 3.4 muestra las MEE con valores de intensidad normalizados para las muestras en estudio. Se puede observar la evolución progresiva de la “huella digital” de fluorescencia con el tamaño de las macromoléculas. Las matrices correspondientes a los AF (PLFA y WPFA) en la figura 3.4 A

Figura 3.4.- Matrices de excitación-emisión con intensidades normalizadas para diferentes SH comerciales (**A**) y para las SH “tipo AH” de sedimento marino (**B**) en solución acuosa a pH 7.



muestran que la principal fluorescencia se enmarca en las regiones IV, I y II que corresponden a productos solubles del metabolismo microbiano y a proteínas aromáticas, respectivamente. Según esta clasificación se esperaría que estas muestras presenten picos en la región III, pero no fueron observados aquí. El AHA muestra fluorescencia en todas las zonas (incluidas las zonas III y V, correspondientes a los ácidos fúlvicos y húmicos respectivamente). Por otro lado, Sierra y col. en un estudio mucho más reciente analizaron las MEE de un gran número de SH de diferentes orígenes. Según este análisis, las MEE contienen por lo menos cuatro pares de longitudes de onda de excitación/emisión relacionados a los fluoróforos α' , α , β y γ (o δ). Estos autores encontraron que los picos α' y α , son característicos de componentes del tipo húmico y están presentes en todas las muestras independientemente de su origen. Para las muestras de AF estos pares se presentan a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de ~ 260 nm/460 nm y ~ 310 nm/440 nm, respectivamente. Para las muestras de AH estos picos están corridos al rojo $\alpha' = 265$ nm/525 nm y $\alpha = 360$ nm/520 nm. El fluoróforo β ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 320$ nm/430 nm) está solo presente en algunas muestras marinas y de estuarios. Se presenta como un

hombro en el pico α y su detección depende de la intensidad de emisión del pico α [25].

El pico γ ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 270 nm /330 nm) también es característico para muestras marinas [26] y se atribuye a material orgánico fresco liberado por organismos marinos y/o algas al “pool” de materia orgánica disuelta como resultado de la actividad biológica.

Las sustancias húmicas WPFA y AHA presentan, como es de esperar, los picos α' y α y no los β y γ .

Los picos α' de WPFA y PLFA se encuentran a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 365 nm / 463 nm y 340 nm /468 nm, respectivamente, y corresponden a máximos característicos para AF.

La MEE para la muestra de PLFA es la única que presentó el pico γ a 240 nm /360 nm. Este ácido fúlvico se forma por completo a partir de biomasa que no contiene lignina. Como tal, se espera que su composición química sea la propia de ácidos fúlvicos acuáticos, con una contribución insignificante de materia orgánica terrestre.

La MEE para TAHSM (Figura 3.4 B) muestra la presencia: del pico principal α' a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 350 nm / 460 nm propio de componentes del tipo ácido fúlvico; del pico α típico para componentes del tipo ácido húmico a 365 nm/520 nm y un pico β

Tabla 3.3: Acidez total, grupos carboxílicos (COOH), grupos fenólicos (PhOH) (en meq/g de carbono orgánico) para diferentes SH.

Sustancia húmica	Acidez total (meq×g _{CO} ⁻¹)	COOH (meq×g _{CO} ⁻¹)	% COOH	PhOH (meq×g _{CO} ⁻¹)	% PhOH
PLFA	16,40	13,15	80,18	3,25	19,82
TAHSM	14,87	11,89	79,96	2,98	20,04
WPHA	13,17	9,31	70,69	3,86	29,31
AHA	10,61	8,09	76,25	2,52	23,75

a 310 nm / 440 nm. La ausencia del pico γ indica un avanzado estado de degradación.

La intensidad relativa para los picos α y α' ha sido empleada para diferenciar la materia orgánica fluorescente proveniente de fuentes terrestres de la originada en ambientes marinos, siendo los valores más altos los correspondientes a fuentes de agua de mar abierto, debido a la menor contribución del fluoróforo α en esos ambientes [27, 28, 29]. También es de esperar que para AH se obtengan valores más altos de α'/α que para AF. Para la muestra del TAHSM se obtiene un alto valor de la relación α'/α (2,12) de acuerdo con la alta contribución de los componentes del tipo húmico, como es de esperar para el procedimiento utilizado en la extracción.

3.3.- Determinación de grupos carboxílicos y fenólicos por titulación.

Los valores de acidez total y grupos carboxílicos para las muestras de TAHSM y SH comerciales se muestran en la tabla 3.3.

Se ha sugerido que la región de 300-350 nm en el espectro de excitación se debe a la presencia de cromóforos con alto contenido de grupos carboxílicos, mientras que las estructuras que contienen grupos fenólicos se ubican entre 350 y 400 nm [30]. Ambas bandas de excitación se observan en la MEE tanto de TAHSM como de las SH comerciales, de acuerdo con el alto contenido de grupos carboxílicos, así como de grupos fenólicos.

El contenido de grupos carboxílicos por gramo de carbono orgánico (expresado como meq × g_{CO}⁻¹)

correspondiente al TAHSM es mayor que el informado para WPHA (IHSS), de diferentes orígenes, incluidas las SH que se extraen de las aguas de estuarios [31] y se asemeja más a los valores obtenidos para los ácidos fúlvicos (IHSS, [31]), a pesar de que se empleó para su extracción un método para ácidos húmicos. Este resultado está de acuerdo con el componente ácido fúlvico observado en la MEE y con el bajo peso molecular de la muestra de TAHSM.

3.4.- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

En la figura 3.5 se muestran los espectros de absorción IR obtenidos para las muestras de sustancias húmicas comerciales y extraídas.

En la tabla 3.4 se resumen las principales bandas de absorción IR de las SH y la asignación de las mismas a diferentes grupos funcionales [32,33, 34,35].

La banda de absorción IR más importante en todas las muestras analizadas es la que se centra alrededor de los 3400 cm^{-1} y corresponde al estiramiento del enlace O-H de los grupos alcohol alifático, fenol o ácido carboxílico [32]. Las bandas a 2920 y 2850 cm^{-1} [32, 33] son características de los estiramientos de los enlaces C-H. La

absorción a 1720 cm^{-1} se asigna al estiramiento del enlace C=O de los grupos COOH. Las bandas que aparecen entre 1600 y 1650 cm^{-1} son debidas al estiramiento del enlace C=O en carboxilatos, cetonas y ácidos carboxílicos. El pico a 1400 cm^{-1} es debido al bending del enlace C-H alifático y al estiramiento asimétrico del COO⁻. Las bandas en 1511 y 1540 cm^{-1} son debidas al estiramiento del enlace C=C y a deformaciones del enlace N-H.

Las relaciones entre los principales picos de FTIR para ácidos húmicos son indicativas de los grados de aromaticidad y policondensación [34]. Los valores del grado de aromaticidad (relaciones de absorbancia $1650/2920$ y $1650/2850$) y del grado de policondensación ($1034/2920$, $1034/2850$ y $1034/1540$) para diferentes muestras de SH se muestran en la tabla 3.5.

La secuencia del grado de aromaticidad obtenida a partir de los espectros de FTIR es PFHA > AHA \approx AP \approx SSHA > VCHA. La figura 3.6 muestra el esperado incremento del grado de policondensación con la disminución de la relación E4/E6. La figura 3.6 también muestra una correlación positiva de la policondensación con la aromaticidad y el número de grupos carboxílicos en las muestras.

La comparación de los espectros FTIR de las muestras de ácido húmico Aldrich purificado (AP) y no purificado (AHA) muestra que las bandas más afectadas por el proceso de purificación son en torno a 1400 y 1720 cm^{-1} . La disminución de la absorción a estas longitudes de onda para la muestra de

Tabla 3.4: Bandas de IR y su asignación.

Número de onda (cm^{-1})	Asignación de la banda
775- 975	<i>Bending</i> fuera del plano del C-H aromático
1030- 1080	Estiramiento C-O-C de éteres aromáticos, carbohidratos y polisacáridos
1170	Vibraciones del grupo alcohol
1200- 1260	Estiramiento C-OH de grupos aromáticos y estiramiento C-O-C de éteres arílicos y fenoles
1380-1400	Deformación de los O-H, estiramiento C=O de fenoles, estiramiento anti-simétrico COO ⁻ y deformación C-H en alifáticos
1440- 1460	Deformación C-H alifáticos en ácidos grasos y grasas durante el proceso de compostaje
1510- 1540	Estiramiento C-C de aromáticos, deformaciones N-H
1580	Estiramiento C=N en amidas secundarias
1640- 1654	Estiramiento C=C de aromáticos, estiramiento C=O en quinonas, ácidos cetónicos y amidas primarias
2680- 2685	Estiramiento de OH con puentes de H
2840	Estiramiento asimétrico C-H de -CH ₃ y -CH ₂ - en cadenas alifáticas
2925	Estiramiento C-H alifático (simétrico y asimétrico) de -CH ₃ y -CH ₂ -
3300- 3500	Vibraciones de los grupos O-H de fenoles, alcoholes y ácidos carboxílicos y vibraciones de los N-H de amidas y aminas

Figura 3.5.- Espectros FTIR para sustancias húmicas.

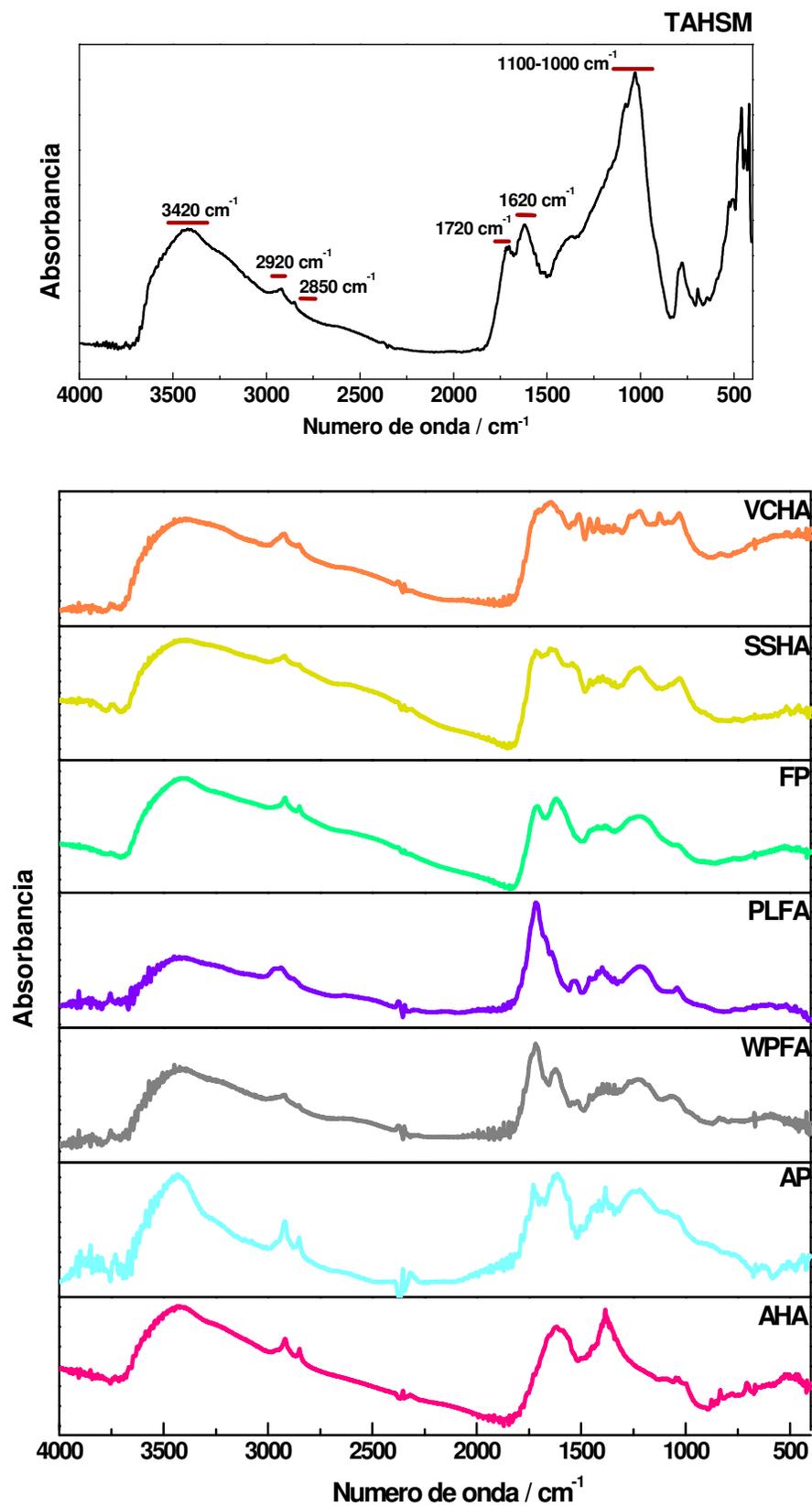
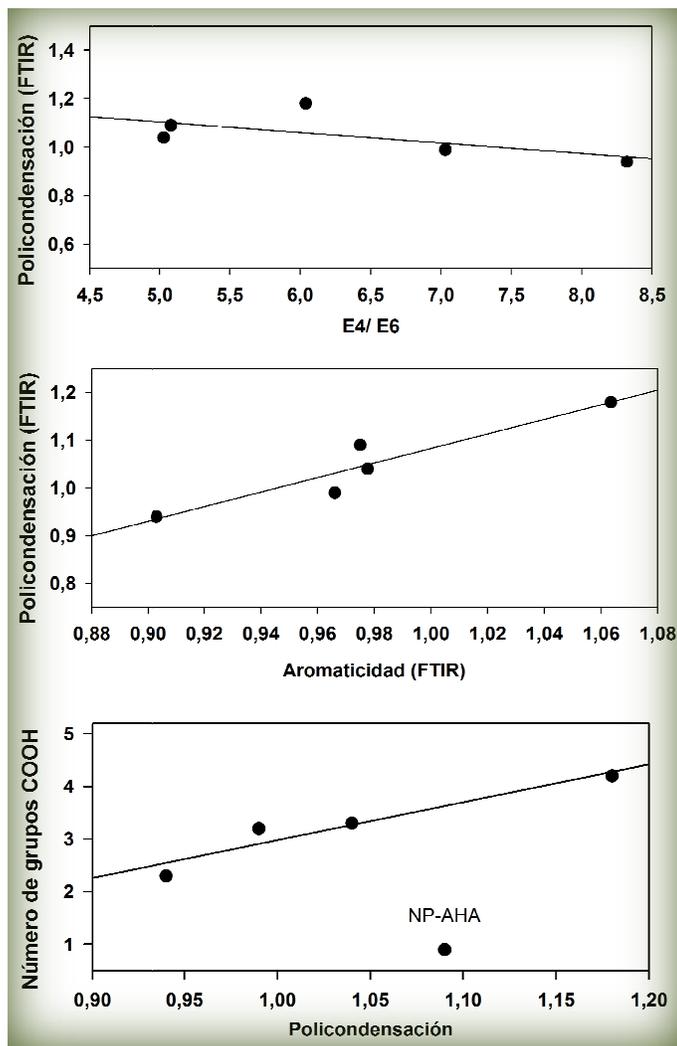


Tabla 3.5: Resultados de espectroscopia FTIR para ácidos húmicos.

Ácido Húmico	1650/2920 C=O(COO-) /C-H	1650/2850 C=O(COO-) /C-H	1720/2920 C=O(COOH) /C-H	1511* /2920	1650 /1540*	1034/2920 C-O-C /C-H	1034/2850 C-O-C /C-H	1034 /1540*
AHA	1,0111	0,9926	0,8842	0,9364	1,0607	1,1601	0,8556	0,9142
AP	1,6032	2,1986	1,6025	0,9230	0,1764	1,4964	1,4692	0,1179
FP	0,9944	1,0343	0,9609	0,8193	1,1677	1,2569	0,8229	0,9290
SSAH	1,0191	1,0423	1,0135	0,9598	1,0387	1,0824	0,9629	0,9596
VCAH	1,1109	1,1538	1,0764	1,0680	1,0698	1,0373	1,1122	1,0313

* Las bandas a 1511 y 1540 cm⁻¹ se deben a estiramiento de enlaces C=C y / o deformación N-H.

Figura 3.6.- Correlación para la policondensación con la relación E4/E6, la aromaticidad y el número de grupos carboxílicos en las muestras.



AP indica una menor cantidad de grupos COOH. Sin embargo, el contenido de grupos COO⁻ es mayor en los AP. Esto puede deberse a que las muestras se obtuvieron por precipitación de soluciones a diferentes pH. Para una mejor comparación de los espectros de FTIR los sólidos se deben obtener a partir de soluciones del mismo pH. El AP fue purificado según metodología descrita en literatura [36]. En esta purificación se remueven las trazas de iones metálicos, el material inorgánico y el material orgánico distinto del ácido húmico. Se puede observar claramente que la banda en torno a 900-400 cm⁻¹ debida a impurezas inorgánicas es más intensa para AHA que para AP. Por otro lado AP presenta bandas más intensas: **(a)** alrededor de 1200 cm⁻¹ debido a amidas III o éteres aromáticos **(b)** una banda ancha en 1100-1000 cm⁻¹ característica de éteres aromáticos, polisacáridos, **(c)** dos picos a 500 cm⁻¹ debidos a la doble sustitución del anillo aromático [34]. Todas ellas dan indicio de que durante el proceso de purificación se incrementa el grado de oxidación y / o sustitución en las moléculas del AH.

3.5.- Seguimiento del proceso de compostaje.

La figura 3.7 muestra los espectros de absorción UV-Vis de todas las

muestras de SH del “tipo AH” extraídas a diferentes tiempos del proceso de compostaje. A pesar de la falta de máximos de absorción de la inspección de la derivada primera de los espectros normalizados por mg de carbono orgánico se pueden detectar claramente los puntos de inflexión. Estos picos bien definidos en los espectros de absorción derivados, a 290 y 330 nm para la primera derivada, se encontraron como potenciales índices para la caracterización del proceso de compostaje, ya que muestran tener una marcada dependencia con el tiempo de compostaje.

Adicionalmente, la relación E4/E6 ha sido utilizada en la caracterización del proceso de compostaje y se reporta en la tabla 3.6. Se observó una disminución de la relación E4/E6 con la extensión del tiempo de compostaje. El menor valor anómalo de E4/E6 observado para la muestra de compost de 1 día puede estar relacionado a las impurezas que absorben luz roja y que siguen presentes en la mezcla de compost durante la fase de mineralización (< 60-75 días).

En la figura 3.8 se observa que en este proceso de mineralización la pérdida de carbono orgánico total (COT) es de aproximadamente un 10 % en los últimos 175 días (a partir del máximo en la curva de la figura 3.8). El

aparente incremento en la cantidad de carbono orgánico total durante los primeros 30 días de compostaje se debe a la gran pérdida de humedad de las muestras, ya que durante ese período se experimenta la etapa termófila.

Para las muestras de compost de esta tesis, tanto el $SUVA_{254}$ como el ϵ_{280} (tabla 3.6) aumentan con el tiempo de compostaje lo que indica un aumento en el grado de aromaticidad y dobles enlaces conjugados en su estructura.

Figura 3.7.- Espectros de absorción UV-Vis normalizados por mg de carbono orgánico total (COT) para AH extraídos a diferentes tiempos de compostaje (1, 15, 30, 97, 137, 170 y 205 días) en solución acuosa a pH 7.

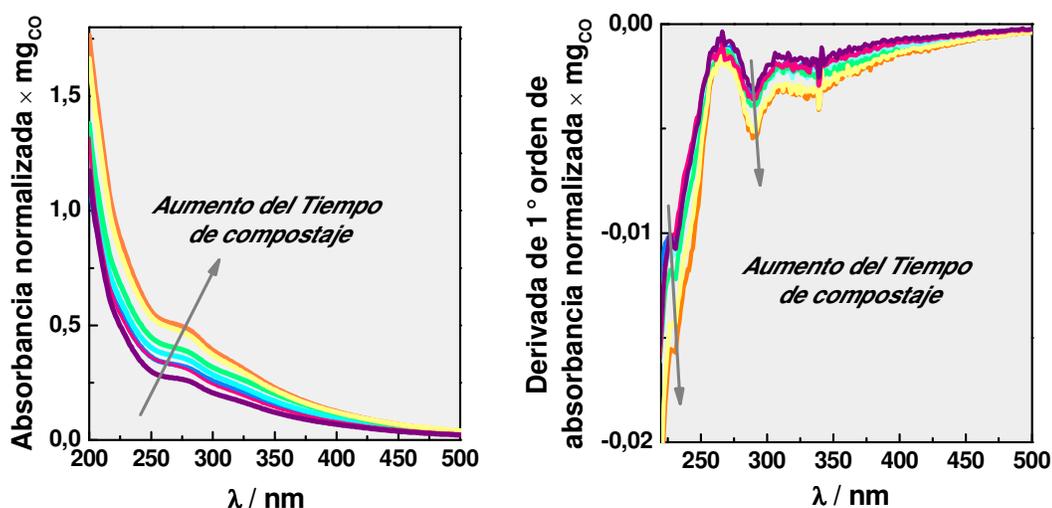
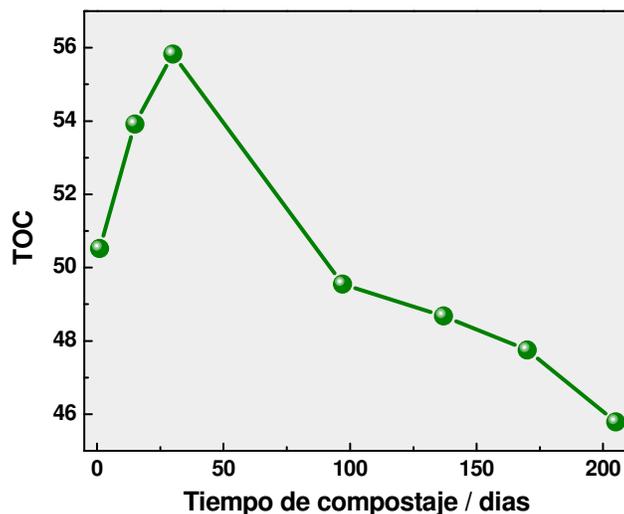


Tabla 3.6: Propiedades fisicoquímicas y de absorción UV-Vis para AH extraídos a diferentes tiempos de compostaje en medio acuoso a pH 7.

Tiempo de Compostaje (Días)	COT %	E4/E6	$SUVA_{254}$ $L.(m.mg_{CO})^{-1}$	ϵ_{280} $L.(cm.mol_{CO})^{-1}$	PM (Dalton)
1	50,5	8,64	2,85	307	1717
15	53,9	9,06	3,66	355	1908
30	55,8	9,25	4,01	380	2007
97	49,5	8,55	3,53	394	2063
137	48,7	8,45	3,51	431	2209
170	47,7	7,21	5,01	538	2636
205	45,8	6,84	5,70	615	2946

Figura 3.8.- Cambios en el contenido de carbono orgánico total con el tiempo de compostaje.



Los materiales de tiempos cortos de compostaje muestran valores de PM similares a las muestras de AF conforme a sus cortos periodos de formación y a sus grados de condensación y humificación más bajos, pero a medida que el proceso se prolonga se observan valores de PM más cercanos al de AH.

3.6.- Conclusiones

Los resultados espectroscópicos proveen evidencia de que ocurre una progresiva mineralización y humificación durante el compostaje de residuos frutihortícola. En este sentido, la relación E4/E6 puede ser

usada para monitorear la evolución de las sustancias húmicas.

La variación del rendimiento cuántico de fluorescencia de las SH con el tipo de muestra es útil para monitorear el grado de oxidación de los grupos sustituyentes, estos se modifican por la incorporación de grupos donantes de electrones, como los grupos fenólicos, ó aceptores de electrones, como son los grupos carboxílicos. El análisis de MEE también da información complementaria. El número promedio de grupos fluoróforos y el ensanchamiento y desplazamiento hacia la región del rojo de la fracción de húmicos se relaciona con el aumento en el grado de humificación de la materia orgánica.



Referencias

1. Domeizel, M., Khalil, A., Prudent, P. UV spectroscopy: a tool for monitoring humidification and proposing an index of the maturity of compost. *Biores. Technol.* **94** (2004) 177–184
2. Korshin, G. V., Li, C.-W., Benjamin, M. M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV-spectroscopy: a consistent theory. *Water Res.* **31** (1997) 1787–1795
3. Morán Vieyra, F. E., Palazzi, V., Sanchez de Pinto, M., Borsarelli, C. Combined UV-Vis absorbance and fluorescence properties of extracted humic substances-like for characterization of composting evolution of domestic solid wastes. *Geoderma.* **151** (2009) 61–67
4. Senesi, N., Miano, T. M., Provenzano, M. R., Brunetti, G. Spectroscopic and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origin. *Sci. Total Environ.* **81/ 82** (1989) 143–156
5. Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M. Information provided on humic substances by E4-E6 ratios. *Soil Science Society of America Journal.* **41** (2) (1977) 352–358
6. Lguirati, A., Ait Baddi, G., Mousadik, A., Gilard, V., Revel, J.C., Hafidi, M. Analysis of humic acids from aerated and non-aerated urban landfill composts. *International Biodeterioration & Biodegradation* **56** (2005) 8–16
7. Chin, Y. P., Alken, G., O'Loughlin, E. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ.Sci.Technol.* **28** (1994) 1853–1858
8. Potter, B.B., Wimsatt, J.C. Determination of total organic carbon and specific UV absorbance at 254 nm in source water and drinking water. USA Environmental Protection Agency. EPA Document # EPA/600/R-05/055 (2005) 415.3-1 – 415.3-56
9. Beckett, R., Jue, Z., Giddings, J. C. Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field-flow fractionation. *Environ. Sci. Technol.* **21** (1987) 289–295
10. Scott, A. I. Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products. 1964, Pergamon Press, New York.
11. Fog, K. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biol. Rev.* **63** (1988) 433–462
12. Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and Applications. Wiley-Vch Ed. New York, 2001. Capítulo 4, p. 113.
13. B. Valeur. Molecular Fluorescence. Principles and Applications. Wiley-Vch Ed. New York, 2001. Capítulo 9, p. 249.
14. Del Vecchio, R.; Blough, N. V., On the Origin of the Optical Properties of Humic Substances. *Environmental Science & Technology.* **38** (14) (2004) 3885–3891
15. Boyle, E. S.; Guerriero, N.; Thiallet, A.; Del Vecchio, R.; Blough, N. V., Optical Properties of Humic Substances and CDOM: Relation to Structure. *Environmental Science & Technology.* **43** (7) (2009) 2262–2268

- 16.** Baker, A., Fluorescence excitation-emission matrix characterization of river waters impacted by a tissue mill effluent *Environ.Sci.Technol.* **36** (2002) 1377-1382
- 17.** Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A., Booksh, K. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter *Environ.Sci.Technol.* **37** (2003) 5701-5710
- 18.** Coble, P. G. (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* **51** (1996) 325-346
- 19.** Ahmad S. R. y D. M. Reynolds. Monitoring of water quality using fluorescence technique: prospect of on-line process control. *Water Research.* **33** (1999) 2069-2074
- 20.** Determann S., R. Reuter, P. Wagner y R. Willkomm. Fluorescent matter in the eastern Atlantic Ocean. Part 1: Method of measurement and near-surface distribution *Deep Sea Reserach, Part I*, **41** (1994) 659-675
- 21.** Mounier S., N. Patel, L. Quilici, J. Y. Benaim y C.Benamou. Fluorescence 3D de la matière organique dissoute du fleuve Amazone. *Water Research.* **33** (1999) 1523-1533
- 22.** Artinger R., G. Buckau, S. Geyer, P. Fritz, M. Wolf y J. I. Kim. Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon. *Applied Geochemistry.* **15** (2000) 97-116
- 23.** Miano T., G. Sposito y J. P. Martin. Fluorescence spectroscopy of model humic acidtype polymers. *Geoderma.* **47** (1990) 349-359
- 24.** Mounier, S., R. Braucher, J. Y. Benaim. Differentiation of organic matter's properties of the Rio Negro basin by crossflow ultra-filtration and UV-spectrofluorescence. *Water Research.* **33** (1999) 2363-2373
- 25.** Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E.J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* **58** (2005) 715-733
- 26.** Parlanti, E., Morin, B., Vache, L. Combined 3D-spectrofluorometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the characterization of dissolved organic matter in natural waters. *Organic Geochemistry.* **33** (2002) 221-23
- 27.** Sierra, M.M.D., Donard, O.F.X., Lamotte, M., Belin, C., Ewald, M. Fluorescence spectroscopy of coastal and marine waters. *Mar. Chem.* **47** (1994) 127-144
- 28.** Coble, P.G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* **51** (1996) 325-346
- 29.** Sierra, M.M.D., Donard, O.F.X., Lamotte, M. Behaviour of dissolved fluorescent organic matter during estuarine mixing. *Mar. Chem.* **58** (1997) 51-58
- 30.** Silva, M.R., 1996. Estudos potenciométricos e fluorimétricos dos equilíbrios ácido-básicos e da complexação de metais com o Obisdien e as substâncias húmicas. Contaminação pelos metais em sedimentos da Ilha de Santa Catarina (Brasil). PhD Thesis, Universidad e Federal de Santa Catarina.
- 31.** Zhang, Y., Du, J., Zhang, F., Yu, Y., Zhang, J. Chemical characterization of humic substances isolated from mangrove swamp sediments: The Qinglan area of Hainan Island, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **92** (2011) 180-187

-
- 32.** Tatjana Andjelkovic, Jelica Perovic, Milovan Purenovic, Srdjan Blagojevic, Ruzica Nikolic, Darko Andjelkovic, Aleksandar Bojic. Spectroscopic and potentiometric studies on derivatized natural humic acid. *Analytical Sciences*. **22** (2006) 1553–1558
- 33.** Song, Z., Chouparova, E., Jones, K.W., Feng, H. y Marinkovic, N.S. FTIR Investigation of Sediments from NY/NJ Harbor, San Diego Bay, and the Venetian Lagoon. NLS Activity Report 2001, Z-112-Z-116
- 34.** Soumia Amir, Mohamed Hafidi, Jean-René Bailly, Jean-Claude Revel. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex® gel fractions. *Agronomie* **23** (2003) 269–275
- 35.** Samios, S., Lekkas, T., Nikolaou A., Golfinopoulos, S. Structural investigations of aquatic humic substances from different watersheds. *Desalination*, **210**, 125–137
- 36.** Takumi Saito, Luuk K. Koopal, Willem H. van Riemsdijk, Shinya Nagasaki and Satoru Tanaka. Adsorption of Humic Acid on Goethite: Isotherms, Charge Adjustments, and Potential Profiles. *Langmuir*, **20** (2004) 689–700



Capítulo

4

Oxidación de AH

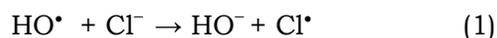
mediada por radicales inorgánicos.

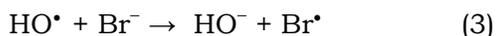
4.1.- INTRODUCCIÓN

Los procesos oxidativos avanzados (AOPs) generan como especie reactiva al radical HO^\bullet , e incluyen la irradiación con luz UV de peróxido de hidrógeno entre otros métodos. El radical HO^\bullet reacciona con una gran variedad de sustancias químicas a velocidades cercanas al límite difusional, haciendo que esta especie sea un oxidante excelente para el tratamiento de contaminantes de muy distinto tipo. Adicionalmente, los productos de reacción contienen funciones oxigenadas, lo que los hace más biodegradables [1]. Como el radical HO^\bullet es un oxidante no selectivo, en general los AOPs se aplican habitualmente a aguas relativamente puras para minimizar el consumo de los radicales por los componentes de la matriz. Sin embargo, en algunos casos estos tratamientos han sido usados o

evaluados en matrices complejas como lixiviados de rellenos sanitarios y aguas de desechos industriales [2]. Recientemente ha habido interés en la aplicación de AOPs para descontaminar concentrados de membranas de agua de desechos municipales antes de la operación de descarga [3]. Muchas de estas aguas contienen altas concentraciones de iones cloruro debido al ingreso de desechos municipales o industriales [4] y, aunque a menudo su concentración no se mide, también contienen iones bromuro porque los cloruros de grado industrial o alimenticio presentan considerables porcentajes de bromuros como impurezas.

La interacción de los radicales HO^\bullet con iones Cl^- y Br^- da lugar a las reacciones (1)-(4):





Los radicales aniones dihalogenuro $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ y $\text{Br}_2^{\bullet-}$ son intermediarios reactivos que han sido empleados extensivamente como oxidantes de un electrón, especialmente de sustratos aromáticos, ya que la oxidación por radical HO^\bullet es más compleja por la formación de aductos y por las reacciones de abstracción de H.

La fracción húmica de la materia orgánica disuelta es la principal responsable de la absorción de radiación UV-Visible y de la fotoproducción de sustratos lábiles en aguas naturales. La presencia de SH en el medio ambiente puede disminuir la efectividad de oxidantes o desinfectantes [5].

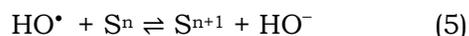
Por estas razones resulta importante el estudio cinético de las reacciones de los radicales halogenados con la materia orgánica disuelta. En este capítulo estudiamos las reacciones de los radicales HO^\bullet , Br^\bullet y $\text{Br}_2^{\bullet-}$ con AHA, como sustancia modelo de la En medios fuertemente alcalinos el radical HO^\bullet es rápidamente convertido en su base conjugada, el radical $\text{O}^{\bullet-}$:

materia orgánica disuelta. También con fines comparativos se empleó en una serie de ensayos al radical N_3^\bullet .

Radical hidroxilo.

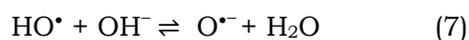
- El radical *hidroxilo* es un poderoso agente oxidante, con un potencial estándar de reducción de 2,7 V en solución ácida y 1,8 V en solución neutra.

La reacción de HO^\bullet con iones frecuentemente se representa como una transferencia electrónica simple:



donde n es la carga del ion. Es poco probable que esta reacción ocurra en un solo paso debido a la gran energía de reorganización de las moléculas de solvente involucrada en la formación del ion *hidroxilo* hidratado [6].

En su lugar, se sugiere la formación de un aducto intermediario de tiempo de vida muy corto. Este tipo de aductos se forman en las reacciones de oxidación de iones halogenuros o pseudo-halogenuros:



con $k_7 = 1,3 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-7} = 10^8 \text{ s}^{-1}$ y $pK_a(\text{HO}^\bullet) = 11,9$ [7].

En reacciones con moléculas orgánicas el radical HO^\bullet se comporta como electrófilo, mientras que el anión radical $\text{O}^{\bullet-}$ lo hace como nucleófilo.

Por lo tanto, el radical HO^\bullet se adiciona fácilmente a enlaces insaturados, pero no ocurre lo mismo para el radical $\text{O}^{\bullet-}$. Ambas especies pueden abstraer H de enlaces CH, y esto puede resultar en la formación de productos diferentes, pero cuando el pH es elevado la principal especie reactiva es $\text{O}^{\bullet-}$, en lugar de HO^\bullet . Por ejemplo, si una molécula aromática lleva una cadena lateral alifática, el radical $\text{O}^{\bullet-}$ reacciona con esta parte de la molécula por abstracción de H, mientras que el radical HO^\bullet se adiciona preferentemente al anillo aromático. Los radicales HO^\bullet y H^\bullet tienen el mismo tipo de reacción con moléculas orgánicas, pero en la abstracción de H de enlaces CH el radical HO^\bullet es más reactivo y menos selectivo que H^\bullet , debido a que la formación del enlace H-OH es 57 kJ mol^{-1} más exotérmica que la formación del enlace H-H [6].

Las reacciones entre el radical HO^\bullet y contaminantes orgánicos ocurren principalmente por abstracción de

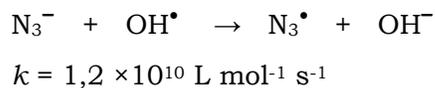
hidrógeno o adición a un anillo aromático y, generalmente, son rápidas ($k_{\text{HO}^\bullet} \sim 10^8 - 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [8]. Para moléculas orgánicas de bajo peso molecular, se sabe que la magnitud de la constante de velocidad de reacción depende del mecanismo, de las propiedades electrónicas de la molécula y de efectos estéricos [9].

En sistemas naturales y técnicos, una de las principales vías de decaimiento del radical HO^\bullet es por reacción con la materia orgánica. Dado que la materia orgánica tiene un peso molecular aparente mucho mayor que las moléculas orgánicas simples, se espera alguna dependencia adicional con la estructura tridimensional [10].

Como se describirá más adelante en este capítulo, en presencia de aniones como bromuro o azida los radicales hidroxilo generan radicales inorgánicos secundarios.

Radical azida.

- El radical N_3^\bullet puede prepararse fácilmente a partir de la oxidación del anión azida con OH^\bullet [11], mediante la siguiente reacción:

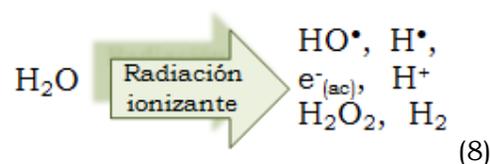


Además, tiene una banda de absorción muy estrecha a ~ 277 nm y muy poca absorción por encima de 300 nm. Esta baja absorción ofrece una importante ventaja en los estudios de radiólisis de pulso, ya que permite realizar mediciones de muchos transitorios en una región espectral donde algunos radicales tales como; $\text{Br}_2^{\bullet-}$, $(\text{SCN})_2^{\bullet-}$ y $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ enmascaran las observaciones a tiempos cortos. Por ello, se puede examinar directamente la cinética del producto primario de oxidación. Otra ventaja del radical N_3^{\bullet} es su carácter no iónico. Por lo tanto, no hay dependencia de la cinética de sus reacciones con la fuerza iónica del medio. Aunque el radical OH^{\bullet} también es neutro, frecuentemente reacciona de forma simultánea a través de varias vías, como se mencionó anteriormente. De este modo, una serie de intermediarios pueden estar presentes a tiempos cortos. Por el contrario, los radicales N_3^{\bullet} parecen reaccionar, principalmente, a través de la transferencia de electrones, simplificando la química secundaria [11].

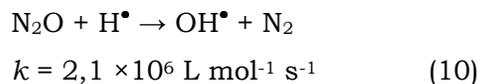
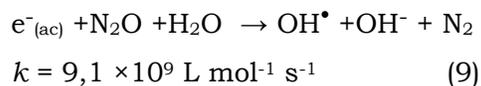
4.2.- RESULTADOS

4.2.1.- Estudio mediante radiólisis de pulso de la reacción del radical HO^{\bullet} con ácidos húmicos.

El radical HO^{\bullet} fue generado mediante la descomposición radiolítica del agua (reacción 8), al hacer incidir un haz de electrones en soluciones acuosas de AHA de concentraciones 21 y 49 mg L⁻¹ saturadas con N_2O a pH 9.



Las soluciones se saturaron en N_2O para convertir cuantitativamente los electrones hidratados, $\text{e}^-_{(\text{ac})}$ y átomos de H^{\bullet} , en HO^{\bullet} (reacciones 9 y 10), respectivamente.



La concentración de radical HO^{\bullet} generada fue de $1,33 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (los detalles del cálculo se presentaron en el capítulo 2).

Las trazas obtenidas en los experimentos de radiólisis de pulso en presencia de AHA (ver figura 4.1) constituyen un sistema complejo. Para el análisis del mínimo número de especies intermediarias involucradas en los decaimientos observados se aplicó un programa de regresión bilineal [12].

El análisis de las matrices de absorción en función del tiempo para $t \geq 1 \mu\text{s}$ obtenidas con soluciones 21 mg L^{-1} AHA muestra que el mínimo número de especies necesarias para

reproducir los datos experimentales es tres. En la figura 4.2 se muestra que dos de ellas (**A** y **B**) ya están formadas a $t \geq 1 \mu\text{s}$ y tienen un decaimiento exponencial de pseudo primer orden. La tercera especie (**C**) se forma con la velocidad de decaimiento de la especie **B** y decae solo parcialmente en la ventana de tiempo del experimento.

Figura 4.1.- Trazas experimentales de radiólisis de pulso de soluciones acuosas de AHA 21 mg L^{-1} saturadas en N_2O a pH 9 (\blacksquare) y, trazas obtenidas del análisis bilineal (\circ) a 320 nm; 410 nm y 630 nm. **Recuadro inferior.** Análisis de residuos: diferencia entre ΔA experimentales y ΔA calculados (ΔA_{calc}) por el bilineal.

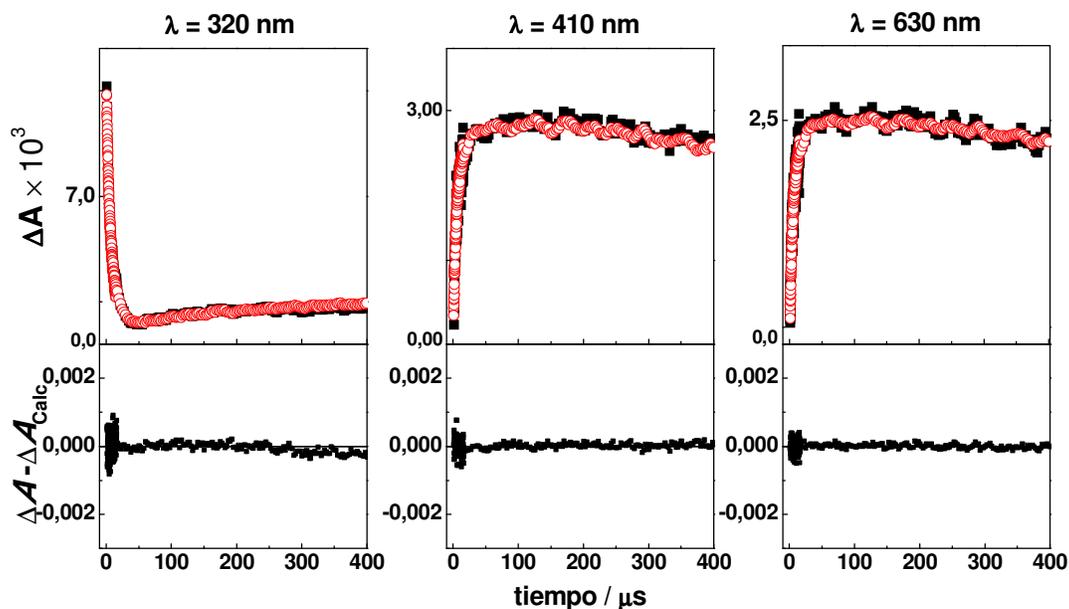
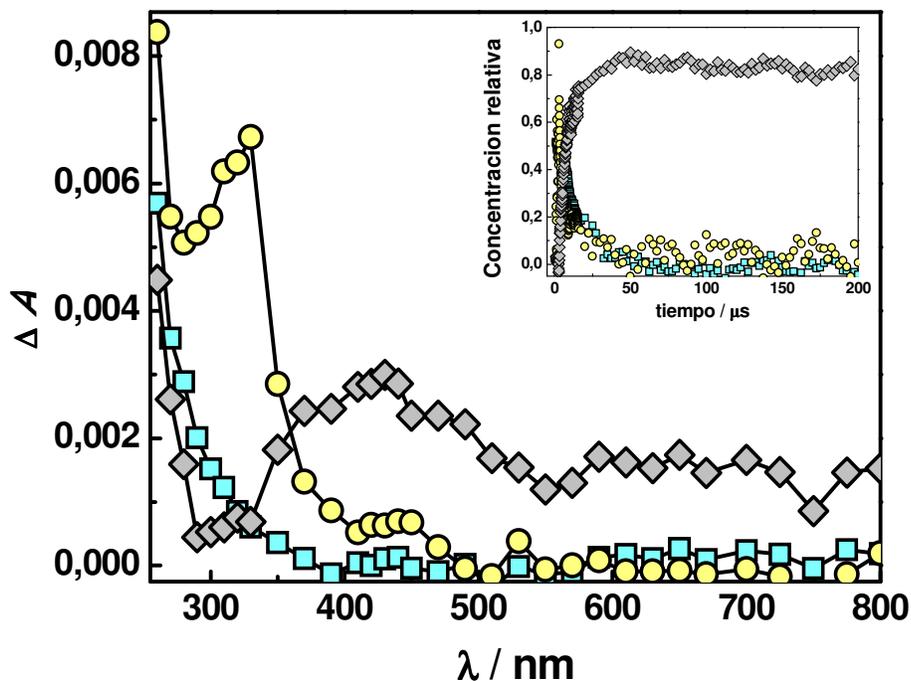


Figura 4.2.- Espectro de absorción de las especies **A** (\square); **B** (\circ) y **C** (\diamond) obtenidos del análisis bilineal de las trazas experimentales de radiólisis de pulso de soluciones acuosas de AHA 21 mg L⁻¹ saturadas en N₂O a pH 9.

Recuadro: perfil cinético obtenido del análisis bilineal para las tres especies.



En los experimentos realizados con una concentración de AHA 49 mg L⁻¹ a pH 9, solo se pudieron obtener trazas en el rango espectral de 400-800 nm debido a la alta absorción del AHA a longitudes de onda más cortas. El análisis de las trazas muestra la formación de una sola especie transitoria cuya cinética de formación y espectro de absorción son similares a los obtenidos para la especie **C**, formada a bajas concentraciones de AHA.

Para hacer una asignación de las especies **A**, **B** y **C**, las trazas

obtenidas a $\lambda > 260$ nm, para la concentración más baja de AHA (21 mg L⁻¹) fueron simuladas con un mecanismo simplificado que incluye las reacciones de la tabla 4.1. Se considera que la absorción del haz de electrones por el H₂O produce un pulso de radicales HO[•]. El valor de la concentración inicial del radical hidroxilo ([HO[•]]₀ = 1,33 × 10⁻⁵ mol L⁻¹) que se tomó fue el estimado a partir de la dosimetría con tiocianato [13]. La [AHA]₀ = 7,72 × 10⁻⁴ mol_{CO} L⁻¹ (mol_{CO} = moles de carbono orgánico) se expresó por mol de carbono

orgánico utilizando el contenido de carbono (44,1 %) obtenido en el capítulo 3 de esta tesis. Ambas concentraciones junto a la $[HO^-]_0 = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ se utilizaron como parámetros iniciales para los cálculos.

A modo ilustrativo para señalar los grupos orgánicos presentes en los ácidos húmicos, se muestra el modelo de Stevenson en la figura 4.3. Como se dijo anteriormente, los AH empleados en este capítulo contienen un 44,1% de carbono, de este un 32,4% es aromático y el 23,8% de sus grupos ácidos son fenólicos. Por esto, se consideró por un lado la reacción de adición del radical HO^\bullet a

los grupos del tipo fenólicos (reacción 11), seguida de un mecanismo similar al presentado por Bonin y col. [14] para la reacción de HO^\bullet con fenol (reacciones 13-16). Las reacciones del radical HO^\bullet con otros grupos reactivos para dar el **intermediario I**, el cual decae en la ventana de tiempo de los experimentos fueron contempladas en las reacciones 12 y 13. Todos los valores de las constantes de velocidad fueron tomados de literatura, excepto los de las reacciones 11, 12 y 13, los cuales se variaron hasta optimizar la concordancia entre las trazas experimentales y simuladas.

Figura 4.3.- Estructura modelo del ácido húmico propuesta por Stevenson y col. [15].

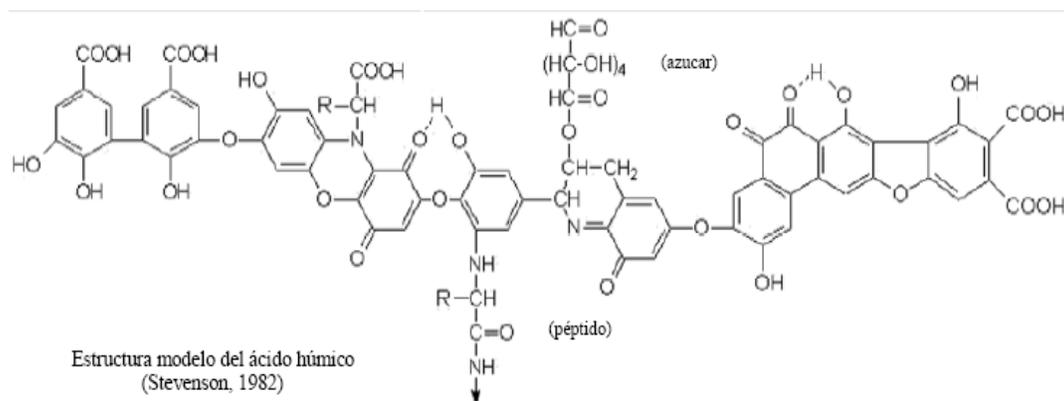
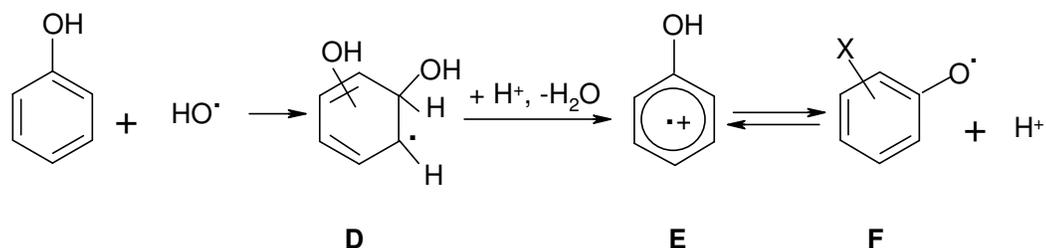


Tabla 4.1: Principales reacciones que intervienen en el decaimiento del radical HO•.

Reacciones	Constantes de velocidad	Referencia
HO• + AHA → HCHD	$k_{11} = 4,1 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (11)	(a)
HO• + AHA → producto 1	$k_{12} = 1,0 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (12)	(a)
I → producto 1	$k_{13} = 1,2 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (13)	(a)
HCHD → fenoxilo + H ₂ O	$k_{14} = 4,9 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (14)	[6]
2 HCHD → producto 2	$k_{15} = 7,9 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (15)	[14] (b)
2 fenoxilo → producto 3	$k_{16} = 7,9 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (16)	[14] (b)
HCHD + fenoxilo → producto 4	$k_{17} = 7,9 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (17)	[14] (b)
OH• + OH• → H ₂ O ₂	$k_{18} = 5,5 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (18)	[16]
OH• + HO• → O•- + H ₂ O	$k_{19} = 1,3 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (19)	[17]
O•- + H ₂ O → OH• + HO•	$k_{20} = 9,4 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (20)	[17]

(a) Valores obtenidos en este trabajo de las simulaciones de los perfiles de absorbancia.
 (b) Se tomaron los valores correspondientes a 21 °C.

Esquema 4.1.- Adición de radicales HO• a fenoles. **D:** HCHD radical derivado del fenol; **E:** Radical catión del fenol; **F:** Radical fenoxilo del fenol.



Los valores de las constantes de velocidad de las reacciones del radical HO• con el AHA utilizados en las simulaciones que mejor ajustaron los resultados experimentales fueron $k_{11} = 4,1 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{12} =$

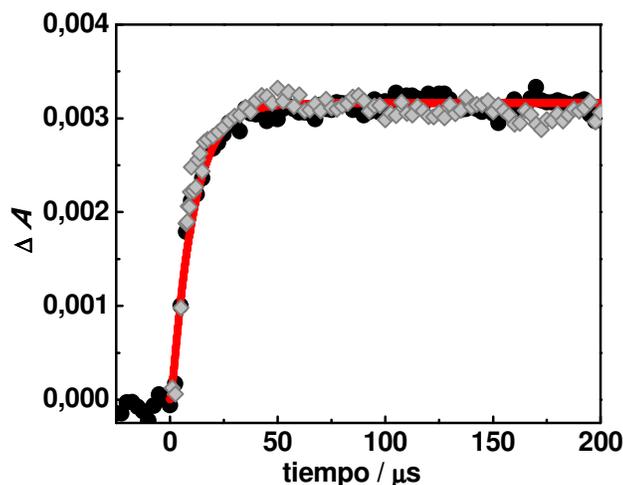
$1,0 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Se observó que con valores de k_{11} menores o mayores a $(4,1 \pm 0,1) \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ no fue posible simular los decaimientos experimentales.

- *Reacción del radical HO[•] con aromáticos.*

La eficiencia de un agente oxidante no necesariamente depende exclusivamente de su potencial redox. Por ejemplo, el radical hidroxilo, a pesar de ser un poderoso agente oxidante, por lo general no reacciona por transferencia de electrones, en su lugar da reacciones de adición [18], como se mencionó en la introducción de este capítulo. Este comportamiento en general se debe a la estabilización del aducto de adición. La adición de radicales HO[•] a fenoles da lugar a los radicales hidroxiciclo-hexadienilo (**HCHD, D**), como se muestra en el esquema 4.1

para el fenol. La conversión del **HCHD (D)** en radical catión (**E**) es catalizada por ácido y, aunque este proceso es muy rápido en soluciones ácidas, resulta mucho más lento en soluciones básicas. Es decir, se lleva a cabo en algunos microsegundos [19,20,21]. El radical catión es entonces deprotonado con una barrera de energía muy baja [22,23,24], dando lugar al radical fenoxilo (**F**). En presencia de pequeñas cantidades de agua los radicales cationes de fenoles no se detectan y el radical fenoxilo es la única especie transitoria observada [25].

Figura 4.4. Traza experimental obtenida por radiólisis de pulso a 410 nm para soluciones acuosas de AHA 21 mg L⁻¹ saturadas en N₂O a pH 9 (●); perfil cinético obtenido del análisis bilineal para la especie **C** (◇) y la línea sólida (roja) corresponde a la simulación de los datos experimentales.



Los radicales fenoxilo tienen un máximo de absorción a ~ 300 nm y uno menos intenso en torno a 400 nm, presentan una cinética de decaimiento de segundo orden y no reaccionan con el oxígeno molecular [26]. Sin embargo, si un grupo fenólico está deprotonado, la reacción del oxígeno con el radical anión se vuelve perceptible [27].

- *Asignación de las especies **A**, **B** y **C**.*

El AHA contiene un 44,1 % de carbono y de éste el 32,4% es aromático. Esto implica que la especie **B** podría tener una importante contribución de radicales del tipo hidroxiciclo-hexadienilo (**HCHD**), $\lambda_{\text{máx}} = 280\text{-}330$ nm [28], que resultan de la adición del radical HO^\bullet a los anillos aromáticos.

Los radicales **HCHD** de anillos aromáticos del tipo fenólicos por pérdida de agua dan lugar a radicales fenoxilo (ver esquema 4.1), que en el caso de tratarse de anillos con dos o más grupos OH reciben el nombre de radicales semiquinona, con absorción a $\lambda > 400$ nm [29]. Estos últimos radicales podrían asignarse a la especie **C**.

La especie **A** obtenida del análisis bilineal, se asigna al **intermediario I** que se genera por reacción de HO^\bullet

con AHA (reacción 12), el cual decae para dar el producto 1 (reacción 13).

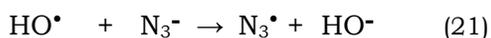
Para confirmar el mecanismo propuesto, los perfiles de concentración simulados para el radical fenoxilo se convirtieron a absorbancia a 410 nm con el valor de $\epsilon_{410} = 1360 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ que corresponde al coeficiente de extinción molar para fenoxilos de galato (compuesto modelo de húmicos) [29]. Se compararon los decaimientos simulados con los experimentales, observándose una buena concordancia entre ellos, figura 4.4. A 410 nm solo se consideró la contribución de fenoxilos (asociados a la especie **C** en el análisis bilineal) en la absorción ya que la de los radicales del tipo **HCHD** (asociados a la especie **B**) y los radicales asociados a la especie **A** es mucho menor. Ver figura 4.2.

En la figura 4.4 se muestra también que la traza experimental obtenida por radiólisis de pulso a 410 nm para soluciones acuosas de AHA 21 mg L⁻¹ saturadas en N₂O a pH 9 coincide con el comportamiento cinético obtenido del análisis bilineal para la especie **C**.

4.2.2.- Estudio mediante radiólisis de pulso de la reacción del radical N_3^\bullet con ácidos húmicos.

Los radicales N_3^\bullet fueron generados a partir de la interacción de un haz de electrones con soluciones acuosas de NaN_3 0,1 mol L^{-1} a pH 9, saturadas en N_2O y en presencia de AHA en la concentración de 21 mg L^{-1} .

Como se mencionó en la sección 4.2.1 de esta tesis, en soluciones saturadas de N_2O y a pH 9 el principal producto de la radiólisis del agua es el radical HO^\bullet , el cual en presencia del anión azida reacciona rápidamente para dar el radical N_3^\bullet , de acuerdo a la siguiente reacción:



$$k = 1,2 \times 10^{10} \text{ mol } L^{-1} \text{ s}^{-1}$$

La concentración de radical N_3^\bullet generada fue de $1,08 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} (los detalles del cálculo se presentaron en el capítulo 2).

Las figuras 4.5 y 4.6 muestran las trazas obtenidas a 280 y 410 nm, respectivamente.

Las trazas experimentales a 280 y 410 nm fueron simuladas con el mecanismo simplificado que se muestra en la tabla 4.2. Para ello, se considera que en las condiciones de nuestros experimentos la absorción del haz de electrones por la solución

produce rápidamente radicales N_3^\bullet . El valor de concentración inicial del radical azida, fue el estimado a partir de la dosimetría de tiocianato. Este valor junto a la $[AHA]_0 = 7,72 \times 10^{-4}$ mol_{CO} L^{-1} se utilizaron como parámetros iniciales para los cálculos.

En el mecanismo se considera la recombinación de los radicales azida (reacción (22) de la tabla 4.2), la transferencia de electrones de los AHA a los radicales azida, seguida de una hidrólisis de catálisis alcalina del radical HCHD (ver reacciones 23 y 24 de la tabla 4.2) y de un mecanismo similar al presentado por Alfassi y col. [11] para las reacciones del radical azida con compuestos aromáticos.

La formación del radical N_6^\bullet es despreciable en nuestras condiciones experimentales [11].

Las constantes de velocidad de las reacciones 22 y 24-28 fueron tomadas de la literatura, mientras que para la reacción 23, su valor se fue variando hasta optimizar la concordancia entre las trazas simuladas y las experimentales.

Los perfiles de concentración simulados a 280 nm se convirtieron en absorbancia (figura 4.5), teniendo en cuenta que las principales especies que absorben a

Tabla 4.2: Principales reacciones que intervienen en el decaimiento del radical N_3^\bullet .

Reacciones	Constantes de velocidad	Referencia
$N_3^\bullet + N_3^\bullet \rightarrow 3N_2$	$k = 4,4 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (22)	[11]
$N_3^\bullet + \text{AHA} \rightarrow \text{AHA}^{+\bullet} + N_3^-$	$k = 1,1 \times 10^7 \text{ L mol}_{\text{CO}}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (23)	(a)
$\text{AHA}^{+\bullet} + \text{HO}^- \rightarrow \text{HCHD}$	$k = 1 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (24)	[6]
$\text{HCHD} \rightarrow \text{fenoxilo} + \text{H}_2\text{O}$	$k = 4,9 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25)	[6]
$2\text{HCHD} \rightarrow \text{producto 2}$	$k = 7,9 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (26)	[14]
$2\text{fenoxilo} \rightarrow \text{producto 3}$	$k = 7,9 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (27)	[14]
$\text{HCHD} + \text{fenoxilo} \rightarrow \text{producto 4}$	$k = 7,9 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (28)	[14]

(a) Valor obtenido en este trabajo a partir de las simulaciones de los perfiles de absorbancia.

Figura 4.5.- Traza experimental obtenida por radiólisis de pulso a 280 nm para soluciones acuosas de NaN_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 9, saturadas en N_2O y en presencia de AHA en la concentración de 21 mg L^{-1} (●) y la simulación de los datos experimentales (○).

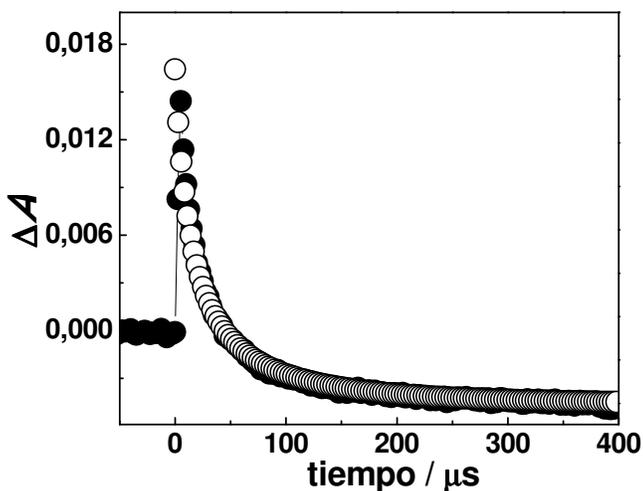


Figura 4.6.- Traza experimental obtenida por radiólisis de pulso a 410 nm para soluciones acuosas de NaN_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 9, saturadas en N_2O y en presencia de AHA en la concentración de 21 mg L^{-1} (●) y la simulación de los datos experimentales (○).

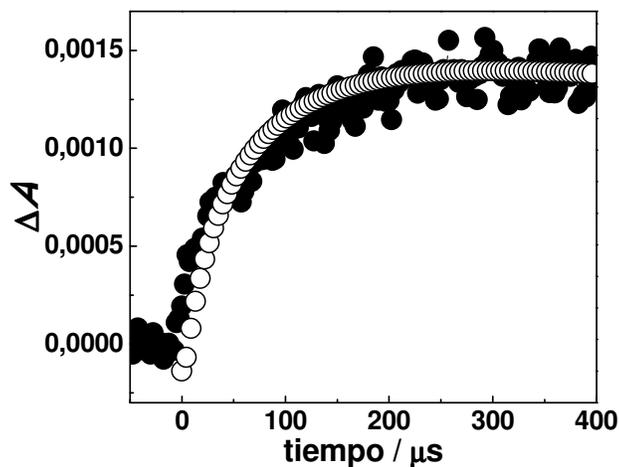
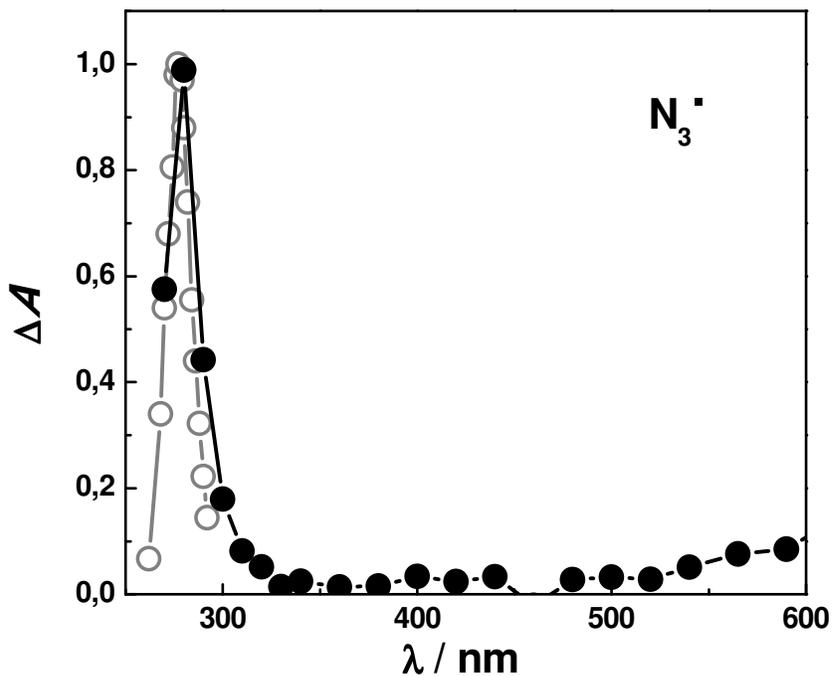


Figura 4.7.- Espectro del cambio de absorción para el radical N_3^\cdot , $\lambda_{\text{max}} = 277 \text{ nm}$, obtenido por radiólisis de pulso. (○) Datos reportados en bibliografía [30]. (●) Datos obtenidos 2 μs después del pulso de electrones para una solución acuosa de NaN_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 9, saturada en N_2O , en presencia de 21 mg L^{-1} AHA.



esta longitud de onda son el radical azida, el HCHD, el radical fenoxilo y el AHA, con los valores de ϵ_{280} de 1400 L mol⁻¹ cm⁻¹ [30], 1200 L mol⁻¹ cm⁻¹ [28], 3500 L mol⁻¹ cm⁻¹ [29] y 630 L mol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente. Como se ve hay una buena concordancia entre los perfiles experimentales y los simulados.

El máximo de absorción para el radical N₃[•] ha sido reportado a ~ 277 nm [11]. A 280 nm la principal contribución en la absorbancia a tiempos cortos después del pulso se debe al radical N₃[•] (tal como se muestra en la figura 4.7). Esto indica que una fracción de este radical aún se encuentra presente en el sistema de reacción en la ventana de tiempo utilizada en nuestros experimentos.

Los perfiles de concentración simulados para el radical fenoxilo se convirtieron a absorbancia a 410 nm con el valor de $\epsilon_{410} = 1360$ L mol⁻¹ cm⁻¹ que corresponde al coeficiente de extinción molar para fenoxilos de galato [29] y, se compararon los decaimientos simulados con los experimentales, observándose una buena concordancia entre ellos, figura 4.6.

El valor para la constante de velocidad k_{23} obtenido de la simulación de las trazas es 1,1×10⁷ L mol⁻¹ s⁻¹. Este valor es del orden de los datos reportados en literatura en

las determinaciones de constante de velocidad para la reacción del radical N₃[•] con compuestos aromáticos [11].

4.2.3.- Estudio mediante laser flash-fotólisis de las reacciones de los radicales Br₂^{•-} / Br[•] con ácidos húmicos.

Para generar el radical SO₄^{•-} se irradiaron soluciones acuosas de Na₂S₂O₈ 5×10⁻² mol L⁻¹ con luz UV; $\lambda^{exc} = 266$ nm (reacción 28, tabla 4.3). En presencia de NaBr 10⁻² mol L⁻¹ no se observó la señal a 450 nm característica del radical SO₄^{•-}, ya que los iones Br⁻ presentes en las soluciones se oxidaron con el radical sulfato para dar átomos de bromo (reacción 30, tabla 4.3). Esta reacción posee una constante de velocidad de 3,5×10⁹ L mol⁻¹ s⁻¹[31].

Los átomos de bromo reaccionan reversiblemente con los iones bromuro para dar el ion radical Br₂^{•-}, reacciones 31 y 32 con constantes de velocidad 1,2×10¹⁰ L mol⁻¹ s⁻¹ y 1,9×10⁴ s⁻¹ [32], respectivamente.

Experimentos resueltos en el tiempo con soluciones de NaBr 10⁻² mol L⁻¹ y Na₂S₂O₈ 5×10⁻²mol L⁻¹ muestran la formación de especies transitorias con un máximo de absorción a 360 nm, cuyo espectro concuerda con el

publicado para el radical $\text{Br}_2^{\bullet-}$ [30], como se muestra en la figura 4.8.

Para las condiciones utilizadas en estos experimentos y con el valor de la constante de equilibrio para las reacciones 31 y 32, la contribución de los átomos de bromo en la absorción a 360 nm puede

despreciarse, ya que el Br^\bullet presenta un máximo de absorción a 275 nm con un $\epsilon_{275} = 2900 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y, el $\text{Br}_2^{\bullet-}$ tiene un $\lambda^{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$ con $\epsilon_{360} = 9900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y ambos espectros de absorción prácticamente no se solapan [30].

Tabla 4.3: Principales reacciones que intervienen en la formación y decaimiento del radical $\text{Br}_2^{\bullet-}$.

Reacciones	Constantes de velocidad
$\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + h\nu \rightarrow 2 \text{SO}_4^{\bullet-}$	(29)
$\text{SO}_4^{\bullet-} + \text{Br}^- \rightarrow \text{Br}^\bullet + \text{SO}_4^{2-}$	$k = 3,5 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) (30)
$\text{Br}^\bullet + \text{Br}^- \rightarrow \text{Br}_2^{\bullet-}$	$k = 1,2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) (31)
$\text{Br}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Br}^\bullet + \text{Br}^-$	$k = 1,9 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (a) (32)
$\text{Br}_2^{\bullet-} + \text{Br}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Br}_3^- + \text{Br}^-$	$2,4 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) (33)
$\text{Br}^\bullet + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{BrOH}^\bullet + \text{H}^+$	$k = 1,36 \text{ s}^{-1}$ (a) (34)
$\text{Br}^- + \text{HO}^\bullet \rightleftharpoons \text{BrOH}^{\bullet-}$	$k = 1,1 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) (35)
$\text{BrOH}^{\bullet-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Br}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	$k = 1,06 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) (36)
$\text{BrOH}^\bullet + \text{Br}^- \rightleftharpoons \text{Br}_2^{\bullet-} + \text{HO}^\bullet$	$k = 1 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) (37)
$\text{SO}_4^{\bullet-} + \text{OH}^- \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{SO}_4^{2-}$	$k = 8,3 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) (38)
$\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + \text{SO}_4^{\bullet-} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_8^{\bullet-} + \text{SO}_4^{2-}$	$k = 1,2 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a) (39)
$\text{Br}^\bullet + \text{AHA} \rightarrow \text{Productos}$	$k = 6,3 \times 10^7 \text{ L mol}_{\text{CO}}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (b) (40)
$\text{Br}_2^{\bullet-} + \text{AHA} \rightarrow \text{Productos}$	$k = 5,6 \times 10^6 \text{ L mol}_{\text{CO}}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (b) (41)
$\text{OH}^\bullet + \text{AHA} \rightarrow \text{producto 1} + \text{HCHD}$	$k = 5,1 \times 10^8 \text{ L mol}_{\text{CO}}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (c) (42)

(a) NDRL-NIST Solution Kinetics Database. ©NIST, 2002. <http://kinetics.nist.gov/solution/>

(b) Valores obtenidos en este trabajo a partir de las simulaciones de los perfiles de absorbancia a 360 nm.

(c) Valor obtenido en la sección 4.2.1 de esta tesis.

Figura 4.8.- Espectro del cambio de absorción para el ion radical $\text{Br}_2^{\bullet-}$, $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$, obtenido por LFP ($\lambda^{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$). (●) Datos reportados en bibliografía. (●) Datos obtenidos en este trabajo para una solución acuosa $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ Br}^-$ y $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ S}_2\text{O}_8^{2-}$, $T = 299 \text{ K}$.

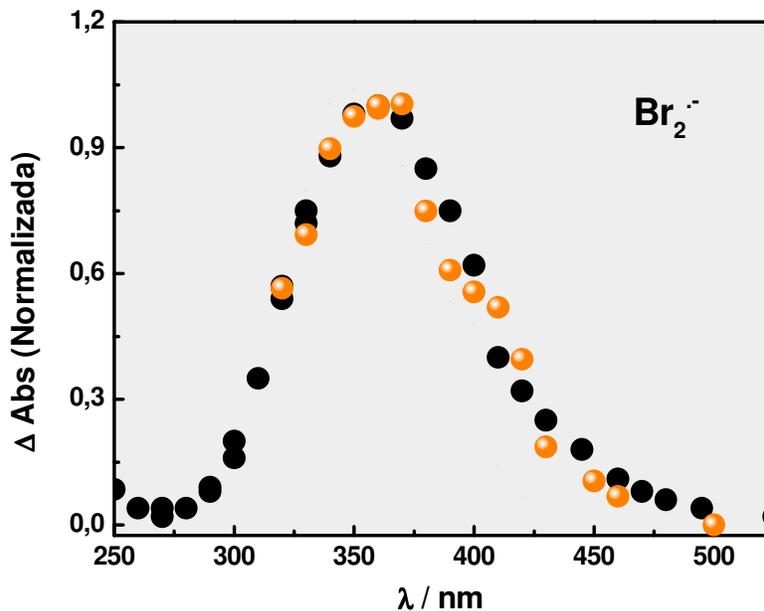
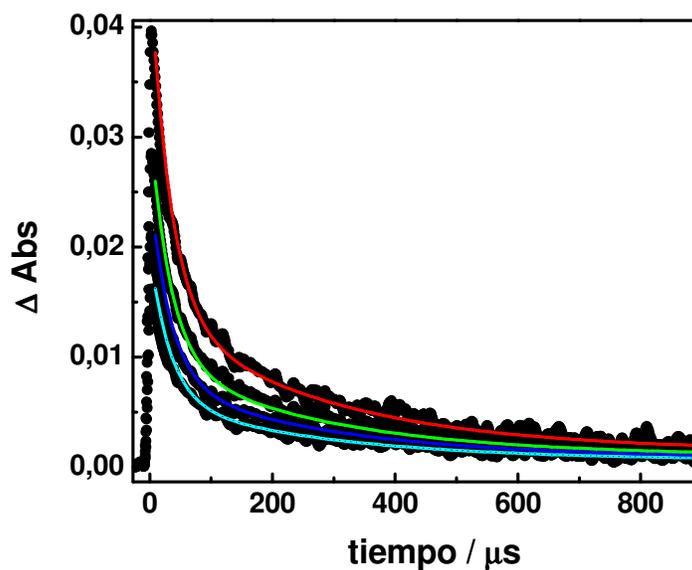


Figura 4.9.- Decaimiento a 360 nm de la especie transitoria obtenida por LFP de una solución acuosa $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ Br}^-$ y $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ S}_2\text{O}_8^{2-}$ en ausencia de AHA (rojo), en presencia de 4 mg L^{-1} de AHA (verde), 8 mg L^{-1} de AHA (azul) y 12 mg L^{-1} de AHA (celeste) a 299 K . Las líneas sólidas corresponden a las simulaciones de los datos experimentales.



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 AHA, obteniendo concentraciones en el rango de 4 mg L^{-1} a 12 mg L^{-1} en AHA, para las cuales: $A^{266}(\text{AHA}) \ll A^{266}(\text{S}_2\text{O}_8^{2-})$.

Las principales reacciones que tienen lugar en el decaimiento del radical $\text{Br}_2^{\bullet-}$ son: las reacciones reversibles 31 y 32, la recombinación de $\text{Br}_2^{\bullet-}$, reacción 33 [33] y el conjunto de reacciones de los radicales $\text{Br}^{\bullet}/\text{Br}_2^{\bullet-}$ con el solvente y los iones hidroxilo [34], reacciones 34 a 37, que se listan en la tabla 4.3.

También se consideran las reacciones del radical sulfato con los iones HO^- del medio (reacción 38) y con $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ (reacción 39).

De acuerdo a este mecanismo, las reacciones de Br^{\bullet} y $\text{Br}_2^{\bullet-}$ con agua generan radicales HO^{\bullet} . Por lo tanto, la reacción de HO^{\bullet} con AHA se consideró en el mecanismo planteado y se incluye en la reacción 42 de la tabla 4.3.

Para confirmar este mecanismo se realizaron simulaciones de los perfiles de absorbancia a 360 nm obtenidos a una temperatura de 299 K con diferentes concentraciones de AHA en el mismo intervalo que el experimental. Se consideraron las

reacciones 30 a 42. La concentración inicial del radical $\text{SO}_4^{\bullet-}$ se estimó de ensayos en idénticas condiciones en ausencia de iones bromuro y con el ϵ del radical $\text{SO}_4^{\bullet-}$ a 450 nm ($1650 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, [35]). Los perfiles de concentración simulados para el ion radical $\text{Br}_2^{\bullet-}$ se convirtieron a absorbancia con el valor de $\epsilon_{360} = 9900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [30] y se compararon los decaimientos simulados con los experimentales, observándose una buena concordancia entre ellos, figura 4.9.

4.3.- DISCUSIÓN

El valor de la suma de las constantes k_{11} y k_{12} ($k_{11} + k_{12} = 5,1 \times 10^8 \text{ M}_{\text{CO}}^{-1} \text{ s}^{-1}$) obtenido en esta tesis concuerda con los datos reportados en literatura en las determinaciones de constante de velocidad de reacciones del radical HO^{\bullet} con sustancias húmicas (ver tabla 4.4).

Para reacciones del radical HO^{\bullet} con moléculas de gran tamaño y con grupos aromáticos, las constantes de velocidad publicadas varían en un orden de magnitud ($10^7 - 10^8 \text{ L mol}_{\text{CO}}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [5]. Este radical reacciona con los sitios reactivos de

Tabla 4.4: Valores de constante de velocidad para la reacción del radical HO• con sustancias húmicas reportados en literatura.

Método	k [$s^{-1}M_c^{-1}$]	Comentarios	Referencias
Radiólisis de pulso de electrones y, basada en la cinética competitiva	$(1,2 - 12,0) \times 10^8$	HO• y tres muestras de MO natural HO• y tres muestras de MO de efluentes	[36]
Radiólisis de pulso de electrones	$2,23 \times 10^8$	HO• y materia orgánica natural (ácidos fúlvicos Suwannee River y otros ácidos húmicos)	[37]
Radiólisis de pulso de electrones	$3,24 \times 10^8$	HO• y ácidos fúlvicos Suwannee River	[1]
Radiólisis de pulso de electrones	$2,28 \times 10^8$	HO• y ácidos húmicos	[1]
Basada en la cinética competitiva de ozono	$3,6 \times 10^8$	HO• y materia orgánica natural (ácidos fúlvicos de diferentes orígenes)	[5]

moléculas grandes con constantes de velocidad limitadas difusionalmente. Estas moléculas se pliegan sobre sí mismas bloqueando algunos sitios, por lo que las constantes de velocidad observadas son menores a las esperadas para el número de sitios reactivos presentes [5].

El ácido gálico tiene valores de pK_a de 4,4; 8,2; 10,7 y 13,1 [38] y ha demostrado ser un buen modelo del comportamiento de las SH [39, 40, 41].

Como la naturaleza compleja de las SH dificulta la detección y caracterización de intermediarios o

productos de reacción, con fines comparativos Caregnato y col. [29] estudiaron las reacciones del radical $SO_4^{\bullet-}$ en soluciones de ácido gálico a pH 3,1 y 5,6, donde las principales especies presentes son el ácido gálico (AG) y su base conjugada el anión galato (G^-), respectivamente. Los valores de constantes de velocidad se presentan en la tabla 4.5. En base a la cinética de decaimiento independiente de la presencia de oxígeno y a los espectros de absorción obtenidos, los radicales orgánicos formados como intermediarios de reacción fueron

asignados a los correspondientes radicales fenoxilo generados por abstracción de H de los fenoles por el radical anión sulfato.

Dwibedy y col. [42] investigaron la reacción del ácido gálico/galato con los radicales HO• / O•-, N₃• y Br₂•- a diferentes valores de pH, quienes observaron también la formación de radicales fenoxilo (ver tabla 4.5).

Se puede decir que la reactividad de los radicales inorgánicos con ácido gálico sigue una tendencia similar que con AHA. Las constantes de velocidad para la reacción con

radicales Br₂•-, SO₄•- y N₃• fueron entre uno y dos órdenes de magnitud menores que aquellas con HO•.

Para la desactivación total de oxígeno singlete por ácido gálico en D₂O y en condiciones en las que los grupos fenólicos se encuentran no disociados (pD = 7) la constante de velocidad publicada es de $k_t = 2,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [43], aproximadamente un orden menor que las mostradas en la tabla

Tabla 4.5: Parámetros espectrales y cinéticos para las reacciones del ácido gálico / galato con radicales inorgánicos. Constantes de velocidad de reacción para el AHA con diferentes radicales inorgánicos.

Radical	E°(V) vs ENH	λ_{max} nm	ϵ_{max} M ⁻¹ cm ⁻¹	Ácido húmico Aldrich		Ácido gálico / galato		
				pH	k L molCO ⁻¹ s ⁻¹	pH	k L mol ⁻¹ s ⁻¹	λ_{max} nm
HO•	1,8	188	540	9	5,1 10 ⁸	9,7	1,2 10 ¹⁰ (c)	340, 420
N ₃ •	1,7	277	1400	9	(1,1 ± 0,2) 10 ⁷	9,7	3,3 10 ⁹ (c)	330, 400
Br ₂ •-	1,7	360	9900	5,5	(5,6 ± 0,5) 10 ⁶	6,8	3,3 10 ⁹ (c)	310, 400
Br•	2,0	275	2900	5,5	(6,3 ± 0,5) 10 ⁷			
Cl ₂ •-	2,1	340	8800		6,7 10 ⁶ (b)	0	1,62 10 ⁹ (c)	300, 360-400
Cl•	2,6				1,8 10 ⁸ (b)			
SO ₄ •-	2,4	450	1650	4	> 6 10 ⁶ (a)	3,1 5,6	5,4 10 ⁸ (a) 2,46 10 ⁹ (a)	

(a) Esta cota inferior fue calculada a partir del valor publicado por David Gara y col. [44] y los valores de C (44,1 %) y MW (3641 g mol⁻¹) obtenidos en el Capítulo 3 de esta Tesis.

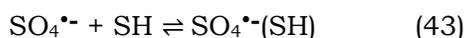
(b) Calculadas a partir del valor publicado por Caregnato y col. [29] y los valores de %C y MW del Capítulo 3 de esta Tesis.

(c) Valores publicados por Dwibedy y col. [42].

4.5 para los radicales inorgánicos.

La correspondiente constante de velocidad para la desactivación de oxígeno singlete por AHA en condiciones de pD ~ 8,5 en las que los grupos fenólicos se hallan mayoritariamente no disociados ($1.6 \times 10^6 \text{ L molCO}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [45] también es menor que las mostradas en la tabla 4.5 para los radicales inorgánicos.

Es interesante destacar que de la lista de radicales inorgánicos que aparecen en la tabla 4.5 solamente se observó una interacción reversible con AHA para el radical $\text{SO}_4^{\bullet-}$ [44]. Este comportamiento también fue publicado para la interacción del radical $\text{SO}_4^{\bullet-}$ con otras SH [44,46], reacción (43).



donde $\text{SO}_4^{\bullet-}$ y $\text{SO}_4^{\bullet-}(\text{SH})$ representan al radical sulfato libre (según el esquema 1.2 en la fase acuosa mayoritaria) y asociado a las SH (en la microfase de la materia orgánica), respectivamente.

La falta de evidencia de la existencia de una interacción reversible entre AHA y los radicales halogenados que figuran en la tabla 4.5 puede deberse a que a bajas concentraciones de ion haluro ($\text{X} = \text{Cl}^-$ o Br^-) el equilibrio $\text{X}^{\bullet} + \text{X}^- \rightleftharpoons \text{X}_2^{\bullet-}$ se halla desplazado hacia

la izquierda, es decir hacia la formación de radicales X^{\bullet} de reducidos tiempos de vida y, en consecuencia, caminos libres medios no suficientemente largos como para posibilitar la difusión entre dos entornos químicos diferentes, tal como se postula para el radical sulfato [44]. Para concentraciones de iones haluro altas, el equilibrio se desplaza hacia la formación de los radicales aniones $\text{X}_2^{\bullet-}$ cuya principal vía de decaimiento es la recombinación, no pudiendo competir otros procesos como la distribución en dos entornos químicos distintos. Por estas razones, la interacción reversible de los iones $\text{X}^{\bullet} / \text{X}_2^{\bullet-}$ con las sustancias húmicas no resultaría favorable.

Sobre la base del corto camino libre medio esperado para los radicales HO^{\bullet} también puede justificarse la no reversibilidad de la reacción entre estos radicales y las sustancias húmicas.

En el caso del radical azida su tiempo de vida y, en consecuencia, su camino libre medio podría posibilitar la observación de su interacción reversible con AHA. Sin embargo, en las condiciones de los experimentos de radiólisis de pulso la concentración de AHA (21 mg L^{-1}) es mucho más alta que las empleadas en los ensayos de flash-

fotólisis convencional realizados con radical sulfato ($\leq 0.4 \text{ mg L}^{-1}$) [44, 46] por lo que en el caso de existir el proceso reversible, este estaría completamente desplazado hacia el radical asociado con la materia orgánica.

4.4.- CONCLUSIONES

El mecanismo propuesto para la reacción del radical hidroxilo con las sustancias húmicas implica la competencia de los contaminantes y las sustancias húmicas por los radicales oxidantes durante los procesos oxidativos avanzados (AOPs). Del análisis bilineal de los datos experimentales se postula la

formación de radicales del tipo hidroxiciclo-hexadienilo (**HCHD**) y fenoxilo como intermediarios de reacción. Una buena concordancia entre las simulaciones cinéticas por computadora con las trazas experimentales, confirman el mecanismo propuesto.

También podemos concluir a partir de lo expuesto en este capítulo que los radicales Cl^\bullet y Br^\bullet presentan constantes de velocidad frente a AHA comparables en magnitud a las de los radicales HO^\bullet , mientras que los radicales dihalogenuro $\text{Br}_2^{\bullet-}$ y $\text{Cl}_2^{\bullet-}$, sulfato y azida son menos reactivos.



Referencias

1. Goldstone, J. V., Pullin, M. J., Bertilsson, S., Voelker, B. M. Reactions of hydroxyl radical with humic substances: bleaching, mineralization, and production of bioavailable carbon substrates. *Environ. Sci. Technol.* **36** (2002) 364–372
2. Grebel, J., Pignatello, J.J., and Mitchell, W.A. Effect of Halide Ions and Carbonates on Organic Contaminant Degradation by Hydroxyl Radical-Based Advanced Oxidation Processes in Saline Waters. *Environ. Sci. Technol.* **44** (2010) 6822–6828
3. Westerhoff, P.; Moon, H.; Minakata, D.; Crittenden, J. Oxidation of organics in retentates from reverse osmosis wastewater reuse facilities. *Water Res.* **43** (2009) 3992–3998
4. Weber, B.; Juanico, M. Salt reduction in municipal sewage allocated for reuse: the outcome of a new policy in Israel. *Water Sci. Technol.* **50** (2004) 17–22
5. Westerhoff, P.; Aiken, G.; Amy, G. Relationships between the structure of natural organic matter and its reactivity towards molecular ozone and hydroxyl radicals. *Water Res* **33**(10) (1999) 2265–2276
6. NDRL-NIST Solution Kinetics Database. ©NIST, 2002. <http://kinetics.nist.gov/solution/>
7. M.C. Gonzalez and D.O. Mártire. Kinetics of $O_2^{\cdot-}$ and $O_3^{\cdot-}$ in alkaline aqueous solutions of hydrogen peroxide. *Int. J. Chem. Kinet.* **29** (1997) 589–597
8. Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., Ross, A. B., Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atom and hydroxyl radicals (OH^{\cdot}/O^{\cdot}) in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17** (1988) 513–886
9. Minakata, D., Li, K., Westerhoff, P., Crittenden, J., Development of a Group Contribution Method To Predict Aqueous Phase Hydroxyl Radical (HO^{\cdot}) Reaction Rate Constants. *Environ Sci Technol.* **43** (16) (2009) 6220–6227
10. Dong, M. M., Mezyk, S. P., Rosario-Ortiz, F. L., Reactivity of effluent organic matter (EfOM) with hydroxyl radical as a function of molecular weight. *Environ Sci Technol.* **44** (15) (2010) 5714–5720
11. Alfassi, Zeev B. y Schuler, Robert H. Reaction of azide radicals with aromatic compounds. Azide as a selective oxidant. *J. Phys. Chem.* **89** (1985) 3359–3363
12. San Roman, E.A. y Gonzalez, M. C. Analysis of spectrally resolved kinetic data and time-resolved spectra by bilinear regression. *J. Phys. Chem.* **93** (1989) 3532–3536
13. 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
14. Bonin, J., Janik, I., Janik, D. and Bartels, D. Reaction of the Hydroxyl Radical with Phenol in Water Up to Supercritical Conditions. *J. Phys. Chem. A.* **111** (2007) 1869–1878
15. Stevenson F. J. 1994. Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. 512 páginas. John Wiley and Sons: Nueva York, USA.

- 16.** Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., Ross, A.B. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}$) in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **17** (1988) 513-886
- 17.** Zehavi, D., Rabani, J. Pulse radiolytic investigation of O_{aq}^- radical ions. *J. Phys. Chem.* **75** (1971) 1738-1744.
- 18.** Steenken, S. -One Electron Redox Reactions between Radicals and Organic Molecules. An Addition/ Elimination (Inner-Sphere) Path, in *Top. Curr. Chem.*, Vol. 177, Electron Transfer II, Ed. J. Mattay, Springer, Berlin 1996, p. 125.
- 19.** Holcman, J., Sehested, K. J. Anisole radical cation reactions in aqueous solution. *Phys. Chem.* **80** (1976) 1642-1644
- 20.** Mohan, H., Mittal, J. P. *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 6519, H. Mohan, J. P. Mittal, J. Phys. Chem. A, **103** (1999) 379, H. Mohan, J. P. Mittal, *Chem. Phys. Lett.* **235** (1995) 444.
- 21.** Kciuk, G., Mirkowski, J., Hug, G.L., Bobrowski, K. Radiation-induced oxidation of dipeptides containing tyrosine and methionine -influence of amino acid sequence and pH. Annual Report 2005 Institute of Nuclear Chemistry and Technology. Editors: Jacek Michalik, Wiktor Smulek, and Ewa Godlewska., pp. 20-22
- 22.** Yi, M., Scheiner, S. Proton transfer between phenol and ammonia in ground and excited electronic states. *Chem. Phys. Lett.* **262** (1996) 567-572
- 23.** Dixon, W. T., Murphy, D. Determination of the acidity constants of some phenol radical cations by means of electron spin resonance. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2.* **72** (1976) 1221
- 24.** Bordwell, F. G., Cheng, J. P. Substituent effects on the stabilities of phenoxy radicals and the acidities of phenoxy radical cations. *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 1736
- 25.** Gadosy, T. A., Shukla, D., Johnston, L. J. Generation, Characterization, and Deprotonation of Phenol Radical Cations. *J. Phys. Chem. A.* **103** (1999) 8834-8839
- 26.** a) Dzengel, J., Theurich, J. Bahnemann, D. W. *Environ. Sci. Technol.* **33** (1999) 294; b) Merga, G., Aravindakumar, C. T., Rao, B. S. M., Mohan, H., Mittal, J. P. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **90** (1994) 597
- 27.** Von Sonntag, C., y Schuchmann, los radicales peroxilo HP en soluciones acuosas. En los radicales peroxilo, ZB Alfassi, ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1997) 173-234
- 28.** Leon M. Dorfman, I. A. Taub and R. E. Bühler. Pulse Radiolysis Studies. I. Transient Spectra and Reaction-Rate Constants in Irradiated Aqueous Solutions of Benzene. *The Journal of Chemical Physics.* **36** (11) (1962) 3051-3061
- 29.** Paula Caregnato, Pedro M. David Gara, Gabriela N. Bosio, Mónica C. Gonzalez, Nino Russo, María del Carmen Michelini and Daniel O. Mártire. A Theoretical and Experimental Investigation on the Oxidation of Gallic Acid by Sulfate Radical Anions. *J. Phys. Chem. A.* **112** (2008) 1188-1194
- 30.** Hug G. L.. Optical Spectra of Nonmetallic Inorganic Transient Species in Aqueous Solution. National Standard Reference Data System, **69**. National Bureau of Standards, USA, Washington. (1981)

- 31.** Redpath, J.L., Willson, R.L. Chain reactions and radiosensitization: Model enzyme studies. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys., Chem. Me.* **27** (1975) 389 – 398
- 32.** Merenyi, G., Lind, J. Reaction mechanism of hydrogen abstraction by the bromine atom in water. *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 7872 – 7876
- 33.** Frank, A. J., Gratzel, M. y Kozak, John J. On the Reduction of Dimensionality in Radical Decay Kinetics Induced by Micellar Systems. *Journal of the American Chemical Society.* **98** (11) (1976) 3317-3321
- 34.** Klaning, U.K., Wolff, T. Laser flash photolysis of HClO, ClO⁻, HBrO, and BrO⁻ in aqueous solution. Reactions of Cl⁻ and Br⁻ atoms. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **89** (1985) 243–245
- 35.** McElroy W. J. y S. J. Waygood. Kinetics of the reactions of SO₄^{•-} radicals with SO₄^{•-}, S₂O₈²⁻ and Fe⁺². *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions.* **86** (1990) 2557 - 2564
- 36.** Garrett McKay, Mei Mei Dong, Jonathan L. Kleinman, Stephen P. Mezyk and Fernando L. Rosario-Ortiz. Temperature Dependence of the Reaction between the Hydroxyl Radical and Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* **45** (16) (2011) 6932–6937
- 37.** Westerhoff, P., Mezyk, S. P., Cooper, W. J., Minakata, D. Electron pulse radiolysis determination of hydroxyl radical rate constants with Suwannee River fulvic acid and other dissolved organic matter isolates. *Environ. Sci. Technol.* **41** (13) (2007) 4640–4646
- 38.** Land, E. J. and Ebert, E. Pulse radiolysis studies of aqueous phenol. Water elimination from dihydroxycyclohexadienyl radicals to form phenoxy. *Trans. Faraday Soc.* **63** (1967) 1181
- 39.** Tipping E. (2002). Cation Binding by Humic Substances. 444 páginas. Editado por: P. G. C. Campbell, R. M. Harrison y S. J. de Mora. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.,
- 40.** Stevenson F. J. (1994). Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. 512 páginas. John Wiley and Sons: Nueva York, USA.
- 41.** Giannakopoulos E. , K. C. Christoforidis, A. Tsipis, M. Jerzykiewicz e Y. Deligiannakis. Influence of Pb(II) on the radical properties of humic substances and model compounds. *Journal of Physical Chemistry A* , **109** (2005) 2223 - 2232
- 42.** Dwibedy P., G. R. Dey, D. B. Naik, K. Kishore y P.N. Moorthy. Pulse radiolysis studies on redox reactions of gallic acid: one electron oxidation of gallic acid by gallic acid–OH adduct. *Physical Chemistry Chemical Physics.* **1** (1999) 1915 - 1918
- 43.** Pajares, A., Bregliani, M., Montaña, M.P., Criado, S. Massad, W., Gianotti, J. Gutiérrez, I., García N.A. Visible-light promoted photoprocesses on aqueous gallic acid in the presence of riboflavin. Kinetics and mechanism. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **209** (2010) 89–94
- 44.** David Gara, P., Bosio, G., Gonzalez, M. and Mártire, D. Kinetics of the sulfate radical-mediated photooxidation of humic substances. *Int. J. Chem. Kinet.* **40** (2008) 19–24
- 45.** Carlos, L., Pedersen, B.W., Ogilby, P.R. and Mártire, D.O. The Role of Humic Acid Aggregation on the Kinetics of Photosensitized Singlet Oxygen Production and Decay.

Photochemical & Photobiological Sciences. **10** (2011) 1080–1086

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



Capítulo 5

Estudio resuelto en el tiempo de especies generadas por fotólisis de SH.

5.1.- INTRODUCCIÓN

El interés de estudiar las propiedades fotoquímicas de las sustancias húmicas se debe a que estas pueden actuar como fotosensibilizadores y favorecer la degradación de contaminantes orgánicos del medio ambiente. Hasta el momento se llegó a la conclusión de la participación de estados triplete de ácidos húmicos en la degradación fotosensibilizada de contaminantes a partir de datos indirectos, por ejemplo, la identificación de los productos de reacción, o el efecto de desactivadores de los estados triplete [1]. Los estudios de los productos intermedios de la fotólisis de las SH por métodos directos, como por ejemplo, láser flash fotólisis (LFP), son restringidos [2]. La mayoría de las mediciones descritas en la literatura utilizan longitudes de onda de excitación mayores a 308 nm.

En este trabajo llevamos a cabo un estudio espectral de las características cinéticas de productos intermedios de la fotólisis de ácidos húmicos y fúlvicos en solución acuosa con excitación a 266 y 355 nm.

5.2.- RESULTADOS

5.2.1.- Láser flash-fotólisis de ácidos húmicos ($\lambda^{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) a distinto pH.

Los intermedios de vida corta obtenidos luego de la irradiación de las soluciones de AHA a diferentes valores de pH fueron estudiados por LFP a la longitud de excitación (λ^{exc}) de 266 nm. Debido a que el sistema es muy complejo, los datos fueron interpretados con la ayuda de un

programa de análisis de regresión bilineal.

con tiempos de vida τ_2 y τ_3 , independientes de la longitud de onda de análisis.

Datos obtenidos a pH 4.0

El programa muestra que todas las trazas de absorbancia ($\lambda^{exc} = 266$ nm) obtenidas en soluciones de AHA saturadas en Ar o aire a pH = 4 pueden ser expresadas como una combinación lineal de la absorbancia de dos especies (**A** y **B**), ambas caracterizadas por amplios espectros de absorción con máximos alrededor de 530 nm (figuras 5.1 y 5.2). La especie **A** muestra una mayor absorción que **B** en el intervalo de longitudes de onda de 480 - 500 nm.

El decaimiento de **A** se describe por una ley exponencial (Ecuación 5.1) con un tiempo de vida τ_1 independiente de la longitud de onda de análisis. Las cinéticas de formación y decaimiento de **B** se ajustan mejor a una ley biexponencial (Ecuación 5.2)

$$\Delta A = c_1 + A_1 e^{-t/\tau_1} \quad \mathbf{5.1}$$

$$\Delta A = c_2 + A_2 e^{-t/\tau_2} + A_3 e^{-t/\tau_3} \quad \mathbf{5.2}$$

Los pequeños términos constantes c_1 y c_2 (menores al 1 % en el máximo de absorbancia) están asociados a la absorción de especies de tiempos de vida mayor.

La introducción de oxígeno en la solución está acompañada de la disminución de τ_1 , τ_2 y τ_3 , como se muestra en la tabla 5.1. También se muestran las correspondientes constantes de desactivación por oxígeno molecular k_1 , k_2 , y k_3 , estimadas desde los valores de tiempo de vida (τ_1 , τ_2 y τ_3 , respectivamente) obtenidos en soluciones de AHA saturadas en Ar y aire.

Tabla 5.1: Tiempos de vida τ_1 , τ_2 y τ_3 en soluciones de AHA saturadas en Ar y Aire.

	τ_1 ms	k_1 $M^{-1}s^{-1}$	τ_2 ms	k_2 $M^{-1}s^{-1}$	τ_3 ms	k_3 $M^{-1}s^{-1}$
Ar	$0,34 \pm 0,01$	$3,14 \times 10^7$	$0,45 \pm 0,01$	$1,97 \times 10^7$	$0,48 \pm 0,02$	$0,56 \times 10^7$
Aire	$0,10 \pm 0,01$		$0,10 \pm 0,08$		$0,30 \pm 0,02$	

Figura 5.1.- Cambio de absorbancia en función de la longitud de onda y el comportamiento cinético de los intermediarios **A** (●) y **B** (○) formados por LFP ($\lambda^{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) con soluciones de AHA a pH = 4,0 saturadas en Ar.

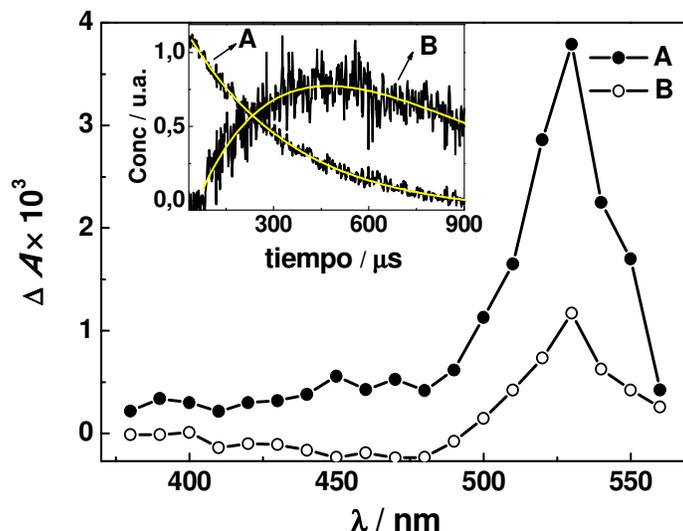
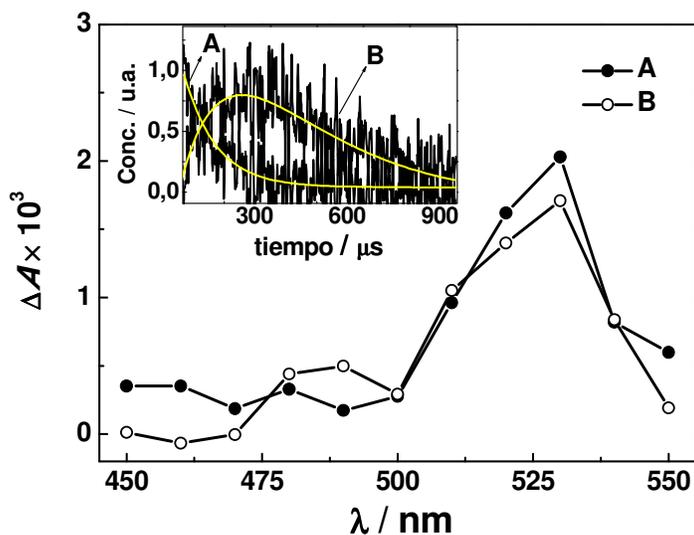


Figura 5.2.- Cambio de absorbancia en función de la longitud de onda y el comportamiento cinético de los intermediarios **A** (●) y **B** (○) formados por LFP ($\lambda^{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) con soluciones de AHA a pH = 4,0 saturadas en aire.



Datos obtenidos a pH 7,0 y 11,7

También se realizaron experimentos de LFP de soluciones de AHA

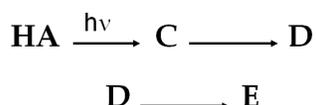
saturadas en Ar a pH = 7,0 y a pH = 11,7 con $\lambda^{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$. En estos casos el programa muestra que las trazas

pueden ser expresadas como una combinación lineal de la absorbancia de tres especies (**C**, **D**, y **E**), figura 5.3. El decaimiento de **C** se describe por una ley exponencial (ecuación 5.1) con un tiempo de vida de $\tau = (0,11 \pm 0,01)$ ms que coincide con la constante de velocidad de formación de **D**.

aproximadamente $\tau = 0,34$ ms. El intermedio **E** fue originado con el decaimiento de **D**. El comportamiento cinético y el número de especies transitorias a pH = 7,0 y a pH = 11,7 son similares pero exhiben diferencias en sus propiedades de absorción de la luz.

Esquema 5.1.

Mecanismo propuesto:



El mecanismo propuesto en el esquema 5.1 estaría de acuerdo con la transferencia de energía T-T que fue propuesta para ácidos húmicos [3]. El tiempo de vida de **D** fue de

5.2.2.- Láser flash-fotólisis de ácidos fúlvicos ($\lambda^{\text{exc}} = 355$ nm).

Para obtener más información acerca de las especies transitorias generadas por irradiación de sustancias húmicas se realizaron experimentos de LFP ($\lambda^{\text{exc}} = 355$ nm) con los ácidos fúlvicos Pony Lake (PLFA) y Waskish Peat (WPFA).

Figura 5.3.- Espectro de absorción y comportamiento cinético de intermediarios generados por LFP ($\lambda^{\text{exc}} = 266$ nm) de soluciones de AHA saturadas en Ar a pH = 7,0.

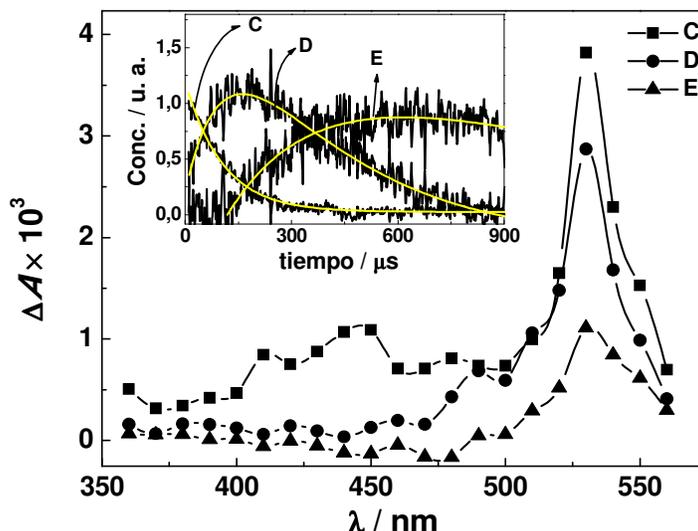
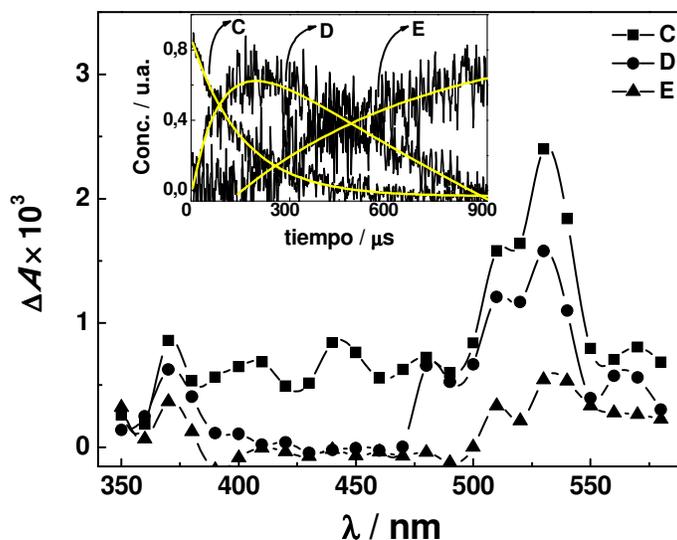


Figura 5.4.- Espectro de absorción y comportamiento cinético de intermediarios generados por LFP ($\lambda^{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) de soluciones de AHA saturadas en Ar a pH = 11,7.



El pH de las soluciones de ácidos fúlvicos fue menor a 2 para asegurarnos de que los ácidos carboxílicos presentes en las muestras estén protonados, lo que permite hacer una comparación entre los espectros de absorción de transitorios experimentales, con los obtenidos de cálculos teóricos utilizando el modelo de Buffle protonado para AF [4,5].

La figura 5.5 muestra los espectros de absorción de las especies transitorias obtenidas a $t = 0$ después del pulso láser para los ácidos fúlvicos PLFA y WPFA.

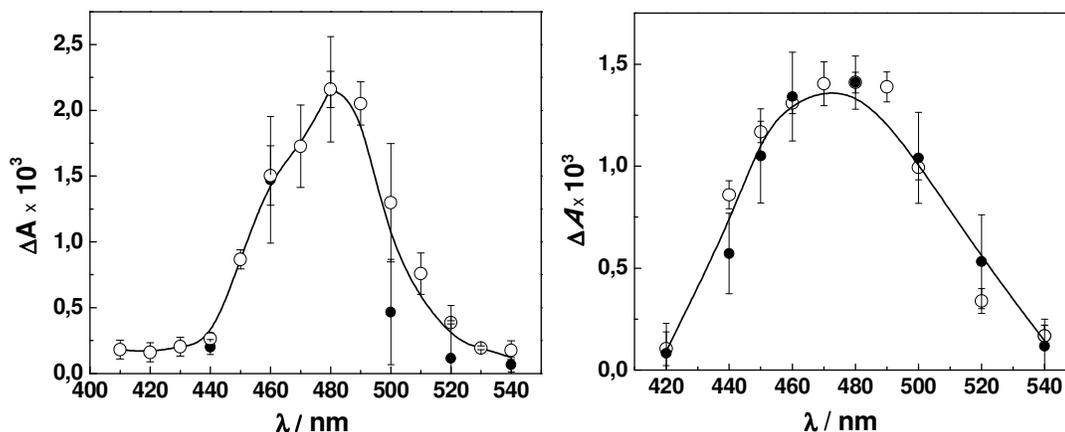
La independencia de las velocidades de decaimiento de las especies transitorias con la concentración de oxígeno molecular, indica que los

radicales cationes de los ácidos fúlvicos podrían ser las principales especies que contribuyen a la absorción de las trazas. Para apoyar esta asignación se realizaron cálculos teóricos de los espectros de absorción de los radicales cationes y estados triplete del modelo de Buffle.

Tabla 5.2 Tiempos de vida (τ_1) de las especies transitorias observadas para soluciones acuosas saturadas en Ar y O_2 de los ácidos fúlvicos PLFA y WPFA.

Ácido fúlvico	Pony Lake (ms)	Waskish Peat (ms)
Ar	$0,61 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,01$
O_2	$0,60 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,02$

Figura 5.5.- Espectros de absorción de los intermediarios generados por LFP a $\lambda_{exc} = 355$ nm, formados en soluciones acuosas saturadas Ar (○) y, O₂ (●) de: PLFA (9,8 mg L⁻¹, izquierda) y WPFA (18,8 mg L⁻¹, derecha) a pH = 1.83.



Cálculos teóricos para el catión radical y el estado triplete de AF.

La figura 5.6 muestra las conformaciones de menor energía encontradas para el radical catión y el estado triplete del modelo de Buffle de los AF estudiados en el presente capítulo.

La figura 5.7 muestra los espectros calculados para ambas especies. Se puede observar que los espectros exhiben características similares. Ambas especies presentan una banda ancha alrededor de 790 nm. Por otra parte, el espectro calculado para el radical catión del AF se caracteriza por tener dos bandas bien definidas alrededor de 330 y 410 nm, respectivamente. Mientras que el estado triplete del AF presenta un

espectro con una sola banda de absorción principal alrededor de 320 nm y un hombro a ~ 400 nm. La banda alrededor de 410 nm en el radical catión de AF se asigna a una transición entre los orbitales HOMO y LUMO + 1.

La figura 5.8 muestra que ambos orbitales moleculares se encuentran principalmente en el anillo del naftaleno y en los átomos de oxígeno de los sustituyentes hidroxilo y carboxilo, sin ninguna contribución apreciable de las cadenas alifáticas.

Por otro lado, la banda alrededor de 400 nm en el estado triplete de AF es asignada a transiciones entre los orbitales HOMO - 1 y LUMO + 1, ambos con simetría de espín α . En la figura 5.8 también se puede ver que el

Figura 5.6.- Geometrías optimizadas de los estados fundamentales del radical catión (**a**) y el estado triplete (**b**) del modelo de Buffle de AF. Los círculos grises, rojos y blancos representan átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno, respectivamente.

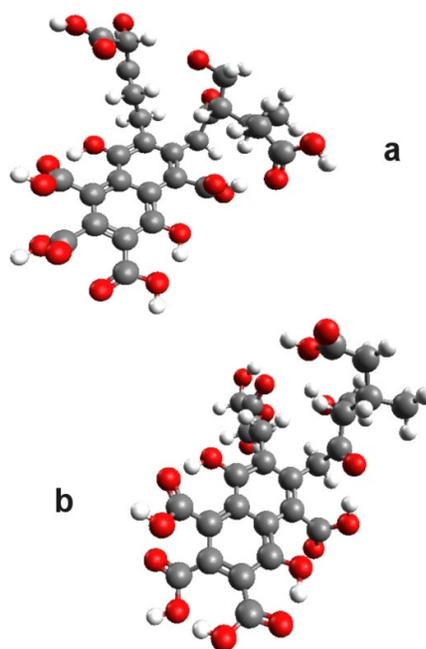
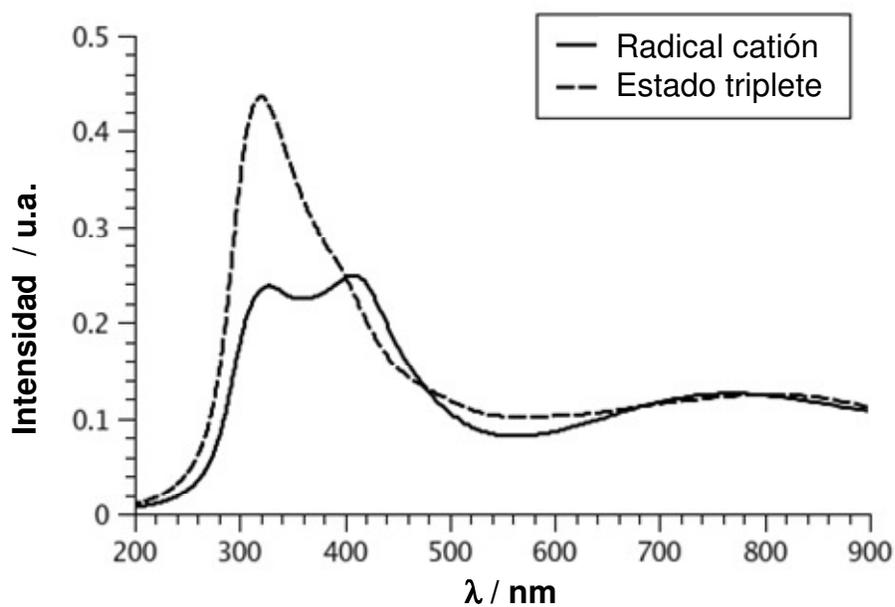


Figura 5.7.- Espectro electrónico calculado para el radical catión y el estado triplete de AF con el modelo de Buffle.



orbital HOMO - 1 se localiza en el anillo del naftaleno y los átomos de oxígeno de los sustituyentes hidroxilo y carboxilo, como en el radical catión del AF. Por el contrario, el LUMO + 1 se localiza, principalmente, en los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilo, carboxilo y carbonilo que se encuentran en las cadenas alifáticas. Como estos cálculos implican transiciones verticales solamente, se espera que la relajación de la geometría en los correspondientes estados excitados produzca un corrimiento hacia mayores longitudes de onda, lo que está en concordancia con la banda a ~ 480 nm observada en los espectros experimentales (ver figura 5.5). La tabla 5.3 muestra las longitudes de onda de las dos transiciones.

En la tabla 5.3 en comparación con la figura 5.7 se observa que la relajación

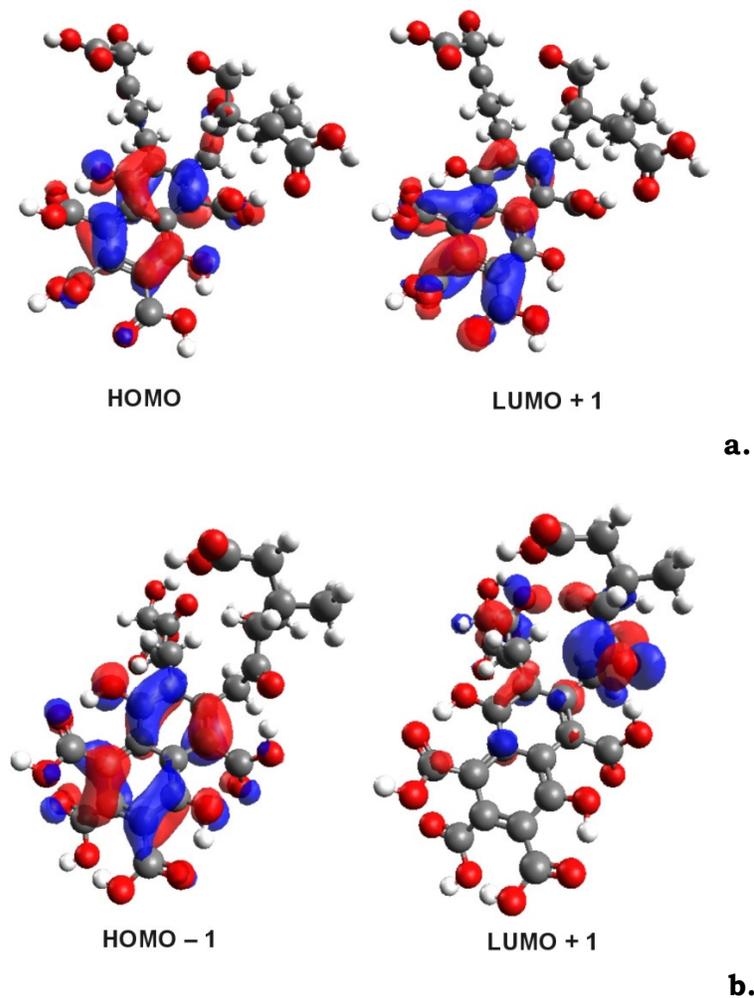
de la geometría de los estados excitados produce un notable desplazamiento al rojo de aproximadamente 70 nm, en la energía de transición para el radical catión del AF. Mientras que para el estado triplete del AF no se observa un cambio apreciable. Por otra parte, existe una buena concordancia entre la energía de transición calculada para el radical catión del AF y la banda experimental centrada a 480 nm. Estos resultados dan soporte a los resultados experimentales de que los radicales cationes de AF son los principales contribuyentes al espectro de absorción experimental.

El contenido de energía de estas especies fue obtenido de experimentos de optoacústica resuelta en el tiempo, desarrollados bajo idénticas condiciones.

Tabla 5.3: Longitudes de onda de las transiciones adiabáticas seleccionadas para el radical catión y el estado triplete de AF. La geometría de ambos estados, excitado y fundamental, fueron optimizados al mismo nivel de teoría.

	Transición	λ / nm
Radical catión	HOMO \rightarrow LUMO + 1	479
Estado triplete	HOMO - 1 \rightarrow LUMO + 1	385

Figura 5.8.- Orbitales moleculares fronteras que participan en las transiciones electrónicas calculadas para el radical catión (**a**) y el estado triplete (**b**) con el modelo de Buffle de AF.



5.2.3.- Espectroscopía optoacústica inducida por láser (LIOAS) ($\lambda^{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$).

Se observó que los espectros de absorción para las soluciones acuosas en buffer fosfato 5 mmol L^{-1} de las sustancias húmicas utilizadas en este trabajo y la referencia calorimétrica (dicromato de potasio) [6,7] son

independientes de la temperatura en el rango de $8 \text{ }^{\circ}\text{C} - 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

En experimentos preliminares también se observó que la amplitud de la señal optoacústica para sustancias húmicas solo tiene una dependencia lineal con la absorbancia a 355 nm en el rango de $0,1-0,3$ y con valores de energía del laser de $13-60 \text{ } \mu\text{J/pulso}$, ver figura 5.9. Por lo que la absorbancia para las

Figura 5.9.- Dependencia de la amplitud de la señal optoacústica (H) con la absorbancia a 355 nm para soluciones acuosas de PLFA.

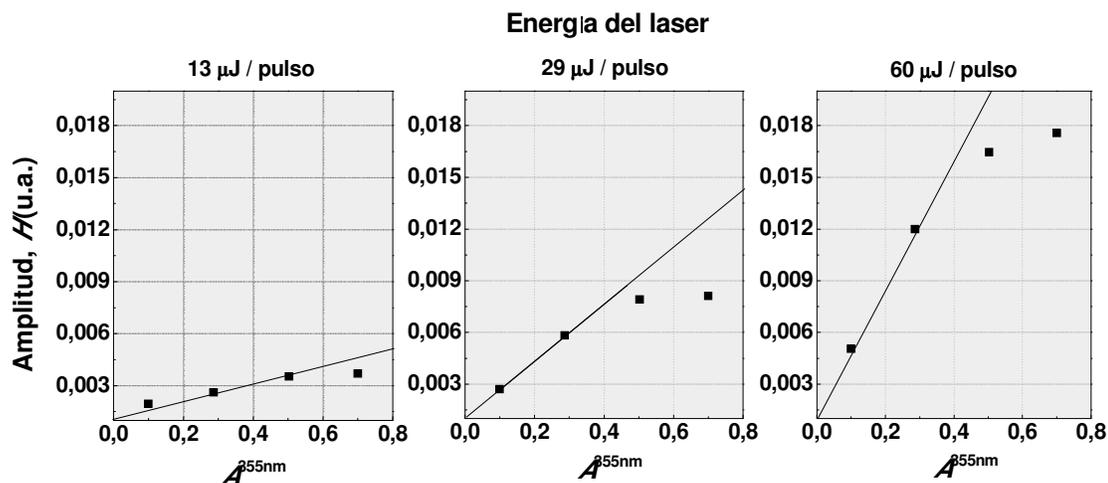
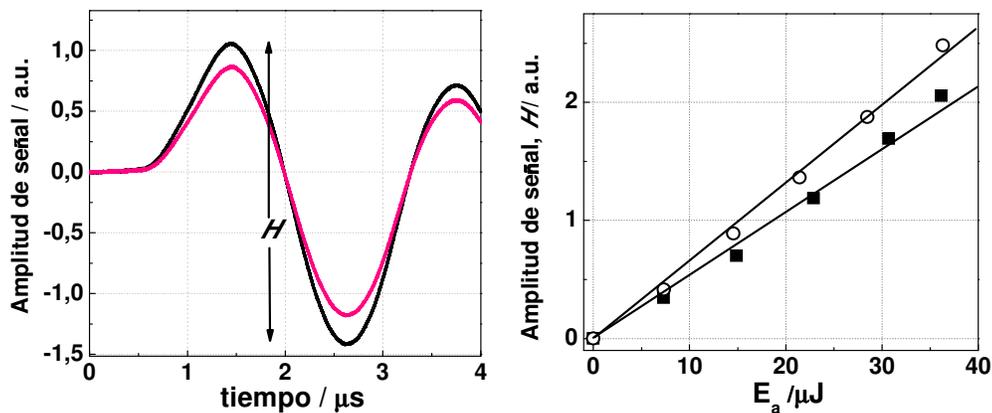


Figura 5.10.- Izquierda: señales optoacústicas para la referencia calorimétrica $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (línea negra) y muestra AHA 20 mgL^{-1} (línea rosa) a $19,3 \text{ }^\circ\text{C}$. Derecha: Amplitud de señal (H) vs energía absorbida (E_a) para la referencia calorimétrica $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (\circ) y muestra AHA 20 mgL^{-1} (\blacksquare) a $19,3 \text{ }^\circ\text{C}$.



soluciones de muestra y referencia se ajustaron a valores inferiores a 0,2 y de este modo se evitaron procesos bifotónicos [8].

Determinación de la fracción de energía liberada en forma rápida como calor.

La fracción de la energía absorbida por las SH que es liberada al medio como calor en forma rápida, α , se calculó como la ordenada al origen de la

Tabla 5.4: Parámetros derivados del balance de energía de los experimentos de LIOAS y fluorescencia.

Substancia Húmica	$E_{\lambda 355\text{nm}}$ 337,3 kJmol ⁻¹	$E_{\lambda} = \alpha E_{\lambda} + E_F \Phi_F + E_{st} \Phi_{st}$				
		α	$\alpha E_{\lambda 355\text{nm}}$ (kJ.mol ⁻¹)	$E_F \Phi_F$ (kJ.mol ⁻¹)	$E_{st} \Phi_{st}$ (kJ.mol ⁻¹)	Φ_{st}^a
AHA	pH 4,08	0,95	320,44	0,73	16,13	0,10
AHA	pH 10,97	0,95	320,44	4,15	12,71	0,08
PLFA	pH 2	0,94	317,06	3,30	16,94	0,11
WPFA	pH 2	0,92	310,32	1,43	25,55	0,16

^a Contenido de energía calculado para el radical catión. Φ_{st} fue calculado tomando $E_{st} = 159,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ y los valores de $(E_{st} \Phi_{st})$ obtenidos de los experimentos de optoacústica.

ecuación 2.3 (ver página 32) al graficar H_S/H_R vs $(\beta/c_p \rho)$ y se presenta en la tabla 5.4.

En la figura 5.10 se muestra el tipo de señales obtenidas en los experimentos de LIOAS (izquierda) y la amplitud de la señal acústica, H , en función de la energía de excitación absorbida, E_a , (derecha).

De este modo se puede conocer la energía promedio liberada como calor al medio en forma rápida y corresponde al término: $\alpha E_{\lambda 355\text{nm}}$ en la tabla 5.4.

Determinación del rendimiento cuántico y la energía de fluorescencia de SH

El término $E_F \Phi_F$ en la tabla 5.4, como se explicó en el capítulo 2, es la

energía promedio liberada como fluorescencia. Para determinar el valor del mismo, se midieron por un lado, los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de las SH, de acuerdo al método de las pendientes, ecuación 5.3.

$$\Phi_F^M = \Phi^R (\text{Grad}^M / \text{Grad}^R) (\eta_M^2 / \eta_R^2) \quad \mathbf{5.3}$$

donde, η_R y η_M son los índices de refracción del medio de la muestra y la referencia, respectivamente. Φ^R corresponde al rendimiento cuántico de fluorescencia para el actinómetro y según la literatura es 0,546 [9]. Φ_F^M es el rendimiento cuántico de fluorescencia para la muestra.

Grad^M y Grad^R son las pendientes para la muestra y referencia,

respectivamente, que se obtienen al graficar el área vs absorbancia (ver figura 5.11).

El valor de E_F se calculó con la ecuación 5.4.

$$Energía = \frac{h \cdot c}{\lambda_{E_F}} \quad 5.4$$

donde: h es la constante de Planck, c velocidad de la luz y $\lambda(E_F)$ es el valor de la longitud de onda de intersección de los espectros de excitación y emisión, obteniéndose un gráfico como el que se muestra en la figura 5.12.

Determinación de la fracción de energía almacenada por especies transitorias de larga vida.

Los valores de $E_{st}\Phi_{st}$ que corresponden a la energía almacenada por especies transitorias de larga vida, se determinaron utilizando la ecuación 2.4 (ver página 33 de esta tesis) y serán discutidos en términos de los datos obtenidos de los experimentos de LFP realizados con las mismas muestras.

5.3.- DISCUSIÓN

En los experimentos a $\lambda^{exc} = 266$ nm una importante cantidad de estados tripletes de AH son desactivados por oxígeno molecular, comúnmente mediante la transferencia de energía

Figura 5.11.- Espectro de emisión de fluorescencia para el sulfato de quinina en 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄ (izquierda) y AHA en 5 mmol L⁻¹ buffer fosfato (derecha).

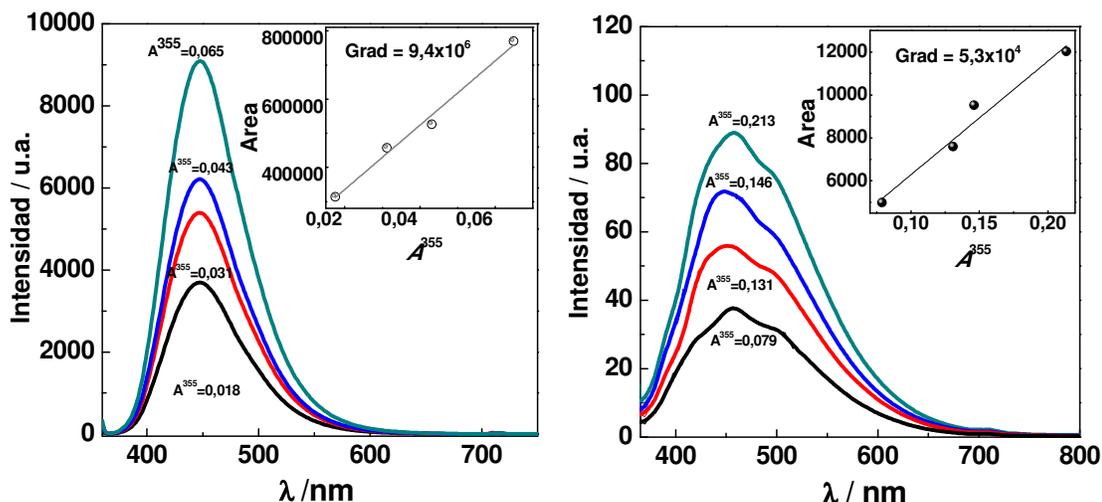
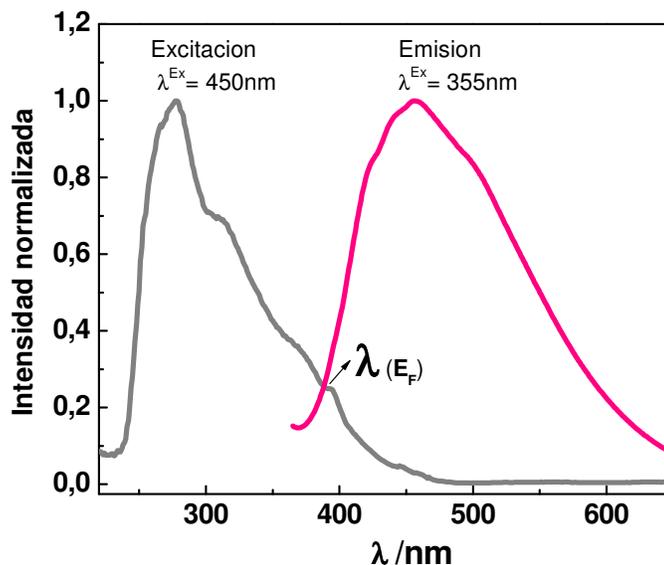


Figura 5.12.- Espectros de emisión y excitación de fluorescencia para el AHA (pH = 7).



para formar oxígeno molecular singlete. De acuerdo a los datos publicados, el rendimiento cuántico de $^1\text{O}_2$ por la fotólisis de diferentes SH tiene un valor que está en el rango de 0,05 al 5% [10,11,3,12].

Al mismo tiempo, cabe señalar que los valores de constantes de desactivación de estados tripletes de quinonas, compuestos carbonílicos y colorantes por el oxígeno molecular en solución acuosa es $\sim 1 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [13,14]. Es decir, dos órdenes de magnitud mayor que las determinadas en los experimentos realizados en este trabajo (ver tabla 5.1). Esto tiene su origen, probablemente, en la presencia de un entorno diferente en las estructuras del AHA, por lo cual los

estados triplete pueden ser de difícil acceso por el oxígeno disuelto en agua. Los espectros de absorción de tripletes de las estructuras orgánicas características presentes en las SH, tales como aldehídos aromáticos, cetonas y quinonas, muestran intensas bandas de absorción en la región registrada en nuestros experimentos (ver tabla 5.5).

Sin embargo, sigue siendo difícil asignar las bandas de absorción a determinados grupos químicos debido a la gran cantidad de especies excitadas formadas por la alta energía utilizada en los experimentos con $\lambda^{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$. Por ello, a partir de la desactivación por oxígeno, solo se puede decir que los transitorios generados con $\lambda^{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$

Tabla 5.5: Máximos de absorción T-T de cetonas aromáticas.

Cetona aromática	Solvente	λ / nm
1,4-benzoquinona	Agua	410 ^(a)
2,3-dimetoxi-1,4-benzoquinona	Ciclohexano	430 ^(a)
2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona	Ciclohexano	490 ^(a)
Naftilmetilcetona	Agua/terbutanol (2-metil-2-propanol)	510 ^(a)
Acetilacetona	3:1 Etanol:Metanol	480 ^(a)
3-aminobenzofenona	Propilenglicol	561, 455 ^(a)
1-amino-4-hidroxiantraquinona	Benceno	500 ^(a)
9,10-antraquinona	Benceno o Tolueno	370 ^(a)
1-amino-4-(N-metilamino)antraquinona	Benceno	575 ^(a)
1-amino-4-anilinoantraquinona	Benceno	550 ^(a)
4-carboxibenzofenona	Agua, pH = 7	535 ^(a)
Tetracloro-1,4-benzoquinona	Acetonitrilo	310, 510 ^(b)
Clorobenzoquinona	Acetonitrilo	290, 360, 440 ^(b)
2,5-diclorobenzoquinona	Acetonitrilo	300, 460 ^(b)
2,6- diclorobenzoquinona	Acetonitrilo	300, 380, 460 ^(b)

(a) Ian Carmichael and Gordon L. Hug. Triplet-Triplet Absorption Spectra of Organic Molecules in Condensed Phases *J. Phys. Chem. Reference Data* **15** 1-250 (1986).

(b) Helmut Görner and Clemens von Sonntag, Photoprocesses of Chloro-Substituted *p*-Benzoquinones, *J. Phys. Chem. A*, Vol. 112, No. 41, 2008 10259.

presentan carácter triplete. Para ensayos con $\lambda^{\text{exc}} = 355$ nm (con menor simplificar el sistema se realizaron energía).

La tabla 5.4 muestra que: (i) aproximadamente el 94-95 % de la energía es liberada en forma rápida como calor, (ii) una pequeña fracción (< 0.3 %) se emite como fluorescencia, (iii) alrededor de un 4 % de la energía absorbida es almacenada por especies transitorias de larga vida.

Las especies que almacenan la energía en los experimentos LIOAS podrían ser estados tripletes o radicales cationes, formados a partir de los estados triplete de las sustancias húmicas. El contenido de energía calculado para el menor estado excitado triplete del modelo Buffle es $159,2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Este valor es muy cercano al reportado por Bruccolerri y col. [15, 16] para los ácidos fúlvicos ($171,8\text{-}180,1 \text{ kJ mol}^{-1}$) y, este puede ser tomado como un límite superior del valor de E_{st} .

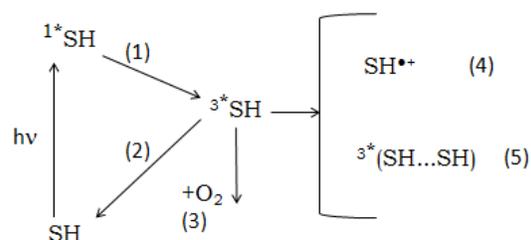
Los valores de Φ_{st} se calcularon tomando $E_{st} = 159,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ y los valores de E_{st} Φ_{st} obtenidos de los experimentos de LIOAS (ver tabla 5.4). Los valores de Φ_{st} son del orden de los reportados para la formación de los electrones solvatados [15,16], lo que apoya la asignación de las especies de almacenamiento de energía para el radical catión.

Los resultados obtenidos con irradiación a 266 y 355 nm pueden parecer contradictorios.

Si bien sería de esperar que la

fotoionización (esquema 5.2) esté más favorecida cuando se excita a 266 nm, debemos tener en cuenta que: (i) en las condiciones de pH de los experimentos realizados a 355 nm los radicales cationes están estabilizados (cita cap. 4), por lo que su detección se ve favorecida, (ii) las muestras utilizadas en las dos condiciones de irradiación son diferentes.

Esquema 5.2.



5.4.- CONCLUSIONES

Los resultados de laser flash-fotólisis de AHA con excitación a 266 nm muestran la formación de 2 ó 3 especies transitorias (dependiendo del pH) cuyos decaimientos dependen de la concentración de oxígeno disuelto, por lo que se asignaron a estados triplete. Sus cinéticas están de acuerdo con la existencia de procesos de transferencia de energía.

La excitación a 355 nm de soluciones de WPFA y PLFA en condiciones de pH

= 2 mostraron la formación de radicales cationes, cuyos rendimientos de formación fueron coincidentes con valores de literatura para otros ácidos fúlvicos según se determinó por la técnica de LIOAS.



Referencias

1. Canonica, S., Jans, U., Stemmler, K. y Hoigne. Transformation Kinetics of Phenols in Water: Photosensitization by Dissolved Natural Organic Material and Aromatic Ketones. *J. Environ. Sci. Technol.* **29** (1995) 1822
2. Lang, K., Wagnerova, D. M., Klementova, S. y Kubat, P. Humic Substances - Excited States, Quenching by Metal Ions, and Photosensitized Degradation of Chlorophenols. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **62** (1997) 1159-1168
3. Zepp, R. G., Schlotzhauer, P. F. y Sink, R. M. Photosensitized transformations involving electronic energy transfer in natural waters: role of humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **19** (1985) 74-81
4. Saparpakorn, P., Kim, J.H., Hannongbua, S. Investigation on the Binding of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Soil Organic Matter: A Theoretical Approach. *Molecules.* **12** (2007) 703-715
5. David Gara, P., Bosio, G., Gonzalez, M., Russo, N., Michelini, M., Pis Diez, R. and Mártire, D. A combined theoretical and experimental study on the oxidation of fulvic acid by the sulfate radical anion. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8** (2009) 992-997
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. Abbruzzetti, S.; Viappiani, C.; Murgida, D.; Erra-Balsells, E. and Bilmes, G. Non-toxic, water-soluble photocalorimetric reference compounds for UV and visible excitation. *Chemical Physics Letters* **304**(3-4) (1999) 167-172
8. Borsarelli, C.D.; Bertolotti, S.G.; Previtali, C.M. Thermodynamic changes in the photoinduced proton-transfer reaction of the triplet state of safranine-T. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1** (2002) 574-580
9. Melhuish, W. H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J. Phys. Chem.* **65** (2) (1961) 229-235
10. Chaikovskaya, O. N., Levin, N. B., Sultimova I. V. Sokolova y Kuzmin, 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
11. Sandvik, S. L. H., Bilski, P., Pakulski, J. D., Chignell, C. F. y Coffin, R. B. Photogeneration of singlet oxygen and free radicals in dissolved organic matter isolated from the Mississippi and Atchafalaya River plumes. *Marine Chemistry.* **69** (2000) 139-152
12. Aguer, J. P., Richard, C. y Andreux, F. Comparison of the photoinductive properties of commercial, synthetic and soil-extracted humic substances. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* **103** (1997) 163-168
13. Rietveld, I. B., Kim, E. y Vinogradov, S. A. Dendrimers with tetrabenzoporphyrin cores: near infrared phosphors for in vivo oxygen imaging. *Tetrahedron.* **59** (2003) 3821-3831
14. Loeff, I., Rabani, J., Treinin, A., Linschitz, H. Charge transfer and reactivity of n.pi.* and .pi.pi.* organic triplets, including anthraquinonesulfonates, in interactions with inorganic anions: a comparative study based on classical Marcus theory. *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 8933-8942

15. Bruccoleri, A., Langford C.H., Arbour, C.. *Environ. Technol. Lett.* **11**, Issue 2, (1990)169-172

16. Bruccoleri, A., Bhuvan C. Pant, Devendra K. Sharma y Cooper H. Langford. Evaluation of primary photoproduct quantum yields in fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* **27** (1993) 889-894



Capítulo

6

Influencia de SH en

el crecimiento de Diatomeas.

6.1.- INTRODUCCIÓN

Bentos.

Diatomeas.

Características generales.

Los bentos (biota que vive en o cerca del fondo de un cuerpo de agua) en las zonas eufóticas abarcan no sólo hábitats con vegetación de dimensiones macroscópicas, sino también, grandes áreas que se encuentran colonizadas predominantemente por microorganismos fotosintéticos activos.

Esto es así especialmente en superficies de sedimento que a simple vista parecen no tener ningún tipo de vida vegetal evidente. En una inspección más detallada, sin embargo, la coloración pardusca o verdosa de la superficie es debida a los ensambles de microorganismos, los llamados microfitobentos. Este término se refiere a algas eucarióticas

microscópicas unicelulares (Baccilariophyceae, Chlorophyceae y Dinophyceae) y a las cianobacterias procarióticas que viven en superficies del sedimento. Crecen en hábitats que se extienden desde la arena de zonas entre mareas y los planos del fango, hasta pantanos de sal y camas de vegetación acuática sumergida. Aunque menos visible que las macroalgas o las plantas vasculares, los microfitobentos pueden contribuir perceptiblemente a la producción primaria en las zonas litorales [1, 2]. En muchos sistemas acuáticos bajos la biomasa de microalgas bénticas excede la del fitoplancton en las aguas que baña los sedimentos. Los principales factores limitantes del crecimiento de microfitobentos son la disponibilidad de nutrientes y luz. Así, los ensambles de microfitobentos se encuentran en las capas superficiales más elevadas de los sedimentos, justo

en la interfaz sedimento-agua [3, 4]. Las SH son naturalmente irradiadas en la misma capa por lo que resulta interesante el estudio del efecto de la irradiación de las SH sobre el crecimiento de microfitobentos.

Baccillariophyceae: Diatomeas

Las diatomeas son abundantes en casi todos los ambientes acuáticos. Morfológicamente son organismos sencillos, sin flagelos, unicelulares o en forma de pequeñas agrupaciones de células. Sin embargo presentan gran diversidad (10000 a 12000 especies descritas) y son probablemente los eucariotas más abundantes en el medio acuático. En términos de su contribución a la productividad global, las diatomeas son los organismos fotosintéticos acuáticos más importantes, dominando en el fitoplancton de las aguas frías, ricas en nutrientes, especialmente en zonas de surgencias en los océanos. Son especialmente importantes en las aguas antárticas, donde son consumidas directamente por el krill (un pequeño crustáceo), que a su vez constituye la base de la dieta de ballenas, focas, pingüinos y peces. Algunas diatomeas producen toxinas (principalmente ácido domoico) y pueden formar *blooms* tóxicos semejantes a los producidos por los dinoflagelados y algunas cianofitas. La mayoría son

fotosintéticas y presentan clorofila *a*, clorofila *c*, y pigmentos accesorios como β -caroteno, fucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina. Presentan sustancias de reserva en gotas lipídicas y un hidrato de carbono soluble (crisolaminarina). Algunas diatomeas son capaces de vivir en medios donde llega poca luz, y donde hay altas concentraciones de materia orgánica, como es el caso de los fondos marinos. En esas condiciones las diatomeas presentan metabolismo heterótrofo.

El rasgo más distintivo de las diatomeas es su pared celular (teca = frústulo), compuesta de sílice (SiO_2) hidratada y pequeñas cantidades de materia orgánica. El frústulo está formado por dos mitades desiguales que encajan una en otra (*epiteca* = la parte externa; *hipoteca* = la parte encajada por dentro). La sílice es resistente a los ataques enzimáticos, por lo que las diatomeas son menos vulnerables al ataque de microorganismos que otras algas cuyas paredes están compuestas por polisacáridos. Las diatomeas son un buen ejemplo de organismos que alteran la multiplicación asexual (aumentando el número de individuos mediante divisiones mitóticas) y la reproducción sexual (división por meiosis, con recombinación genética). Cuando una diatomea se divide por

mitosis, cada una de las mitades de la teca pasa a una célula hija. La pared heredada funciona siempre como epiteca y cada célula genera una nueva hipoteca. El resultado es que la mitad de las células de cada generación van siendo cada vez más pequeñas. Llega un punto crítico en el que ya no es posible la división celular por este procedimiento y la diatomea pasa a reproducirse sexualmente, restaurando el tamaño original de las células, ver figura 6.1.

La composición y dureza de la pared celular confiere a las diatomeas un gran valor industrial. Grandes depósitos fósiles de diatomeas se extraen para su uso como filtros, abrasivos, aislantes térmicos, en pinturas para aumentar la visibilidad de señales, etc. También se usan como indicadores bioestratigráficos para

datar rocas sedimentarias en exploración de yacimientos petrolíferos y de gas, y como indicadores de cambios ambientales [5].

En la diatomea marina *Thalassiosira pseudonana* se ha secuenciado el genoma nuclear completo (34 millones de pares de bases), el genoma plastidial (129000 pares de bases) y el genoma mitocondrial, otros organismos muestran que las diatomeas tienen numerosos rasgos distintivos. Se han identificado genes particulares para el transporte de ácido silícico (H_4SiO_4) y la formación de las paredes celulares de sílice, para enzimas biosintéticas de varios tipos de ácidos grasos poli-insaturados, para un ciclo completo de la urea y el uso de diversos compuestos nitrogenados. Todos estos

Figura 6.1.- Diagrama esquemático de la multiplicación y reproducción sexual en diatomeas.

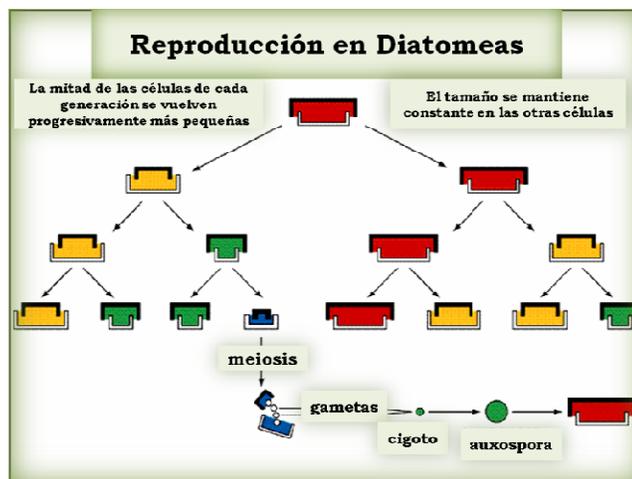
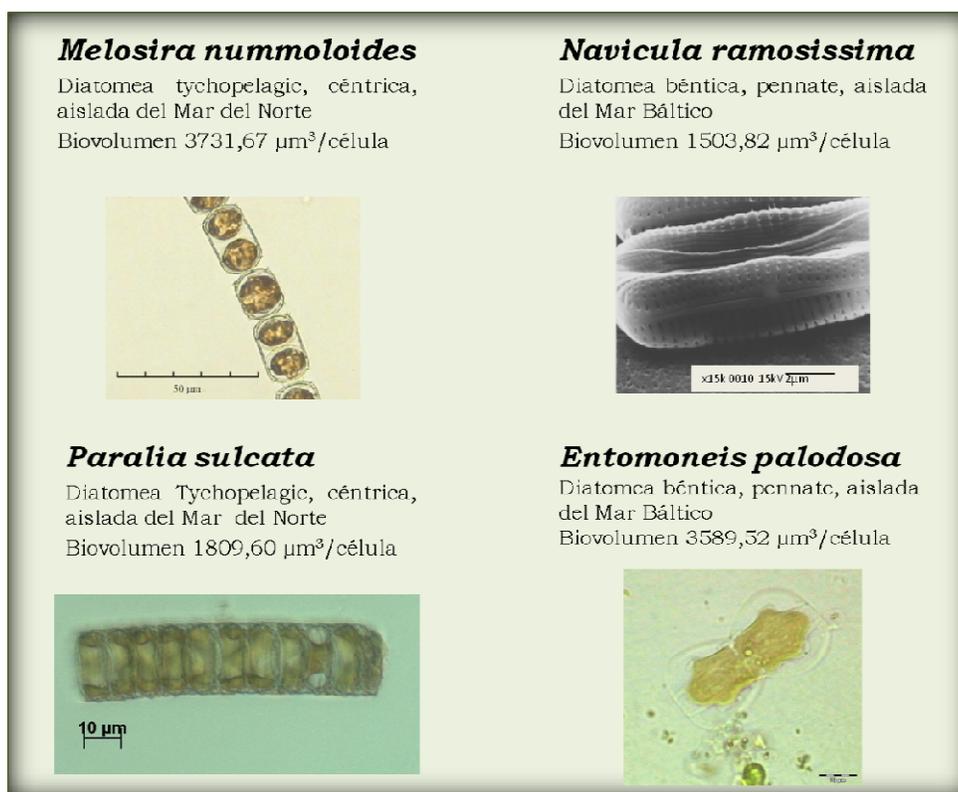


Figura 6.2.- Esquema descriptivo de las diatomeas utilizadas en este capítulo.

genes permiten que las diatomeas prosperen en ambientes acuáticos [6]. Debido a que las diatomeas, con las que se trabajó en los experimentos de este capítulo, figura 6.2, habitan en zonas bénticas, se investigó la influencia de las SH en su crecimiento. De acuerdo a lo presentado en los antecedentes de esta tesis, nuestra hipótesis es que las SH pueden influir positivamente en el crecimiento de diatomeas debido a la mayor disponibilidad de nutrientes en los sedimentos, así como también debido a la protección contra el aumento de la intensidad de la luz.

Por tanto, la presencia de SH en los medios de cultivo permite describir mejor el nicho fundamental de las diatomeas (con la temperatura, los nutrientes y las condiciones de luz) en su medio natural.

6.2.- RESULTADOS

Análisis comparativo de los ensayos de crecimiento con diferentes algas.

6.2.1.- Recuento de células

Las tasas de crecimiento y el número de células $\times \text{mL}^{-1}$ exhibidas por las diatomeas pennates *N. ramosissima*. y

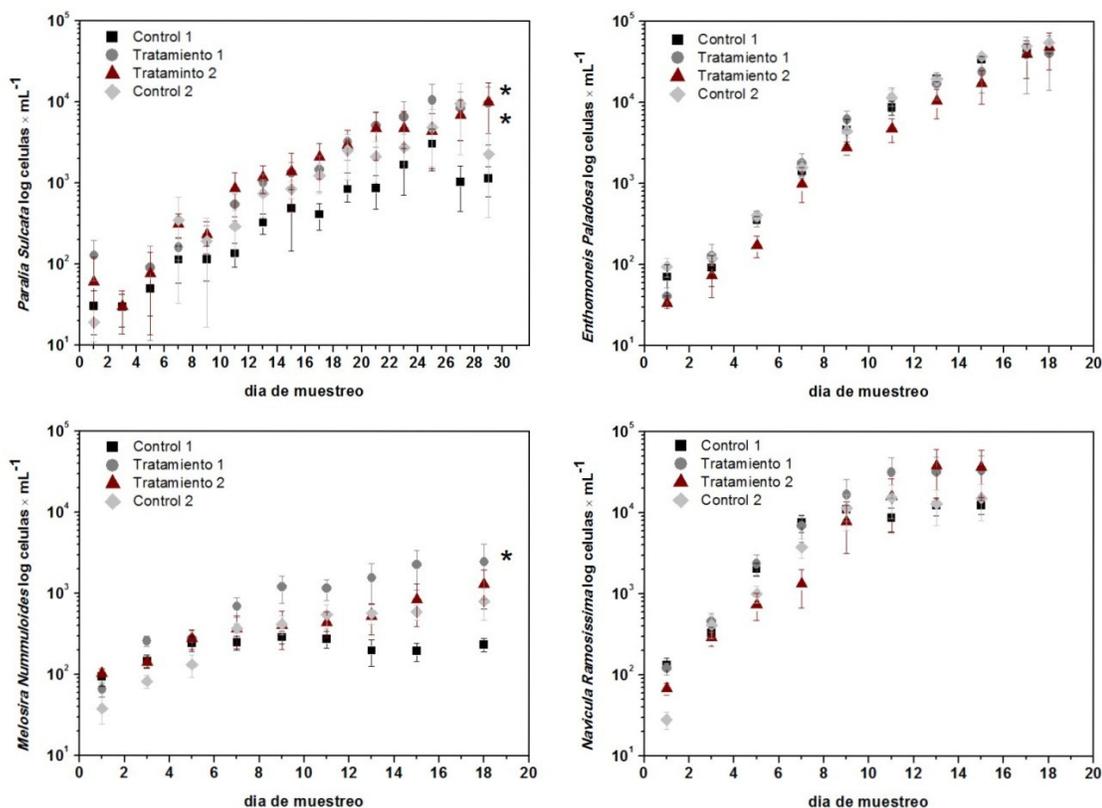
E. palodosa fueron mayores en comparación con los valores registrados para diatomeas céntricas, *P. sulcata* y *M. nummuloides* (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,05$) (figura 6.3). Para el recuento de individuos no se determinaron diferencias significativas entre tratamientos en el crecimiento de *N. ramosissima* y *E. palodosa*.

El crecimiento más lento fue para *P. sulcata* el cual tomó 27 días para entrar en la fase estacionaria, mientras que para todas las otras

algas comenzó entre los días 11 y 17 (figura 6.3).

El crecimiento de *Paralia sulcata* con diferentes concentraciones de SH (sustancias del tipo ácido húmico extraídas del sedimento marino) necesitó 29 días para llegar a la fase estacionaria y este tiempo fue mucho más corto en ausencia de SH. A partir del recuento celular se observó una abundancia (células \times mL⁻¹) significativamente mayor, en los tratamientos con SH (tratamiento 1 y 2) (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,03$) (figura 6.3).

Figura 6.3.- Monitoreo del crecimiento expresado como abundancia (células \times mL⁻¹) en escala logarítmica en función del tiempo de muestreo. * Indica diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,03$).



El crecimiento de *Melosira nummolooides* con diferentes concentraciones de SH necesitó 18 días para llegar a la fase estacionaria. La fase de crecimiento exponencial se inició el día 3 y terminó el día 15. A partir del recuento celular se observó una abundancia (células \times mL⁻¹), significativamente mayor, en los tratamientos con SH (tratamientos 1 y 2) (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,03$) (figura 6.3).

Además, para *M. Nummolooides* se observó la menor velocidad de crecimiento (en comparación con las otras tres algas), figura 6.4., pero se determinaron diferencias significativas entre tratamientos y la mayor velocidad de crecimiento se observó para el tratamiento 1 (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,003$).

6.2.2.- Medidas de fluorescencia *in situ* (BBE)

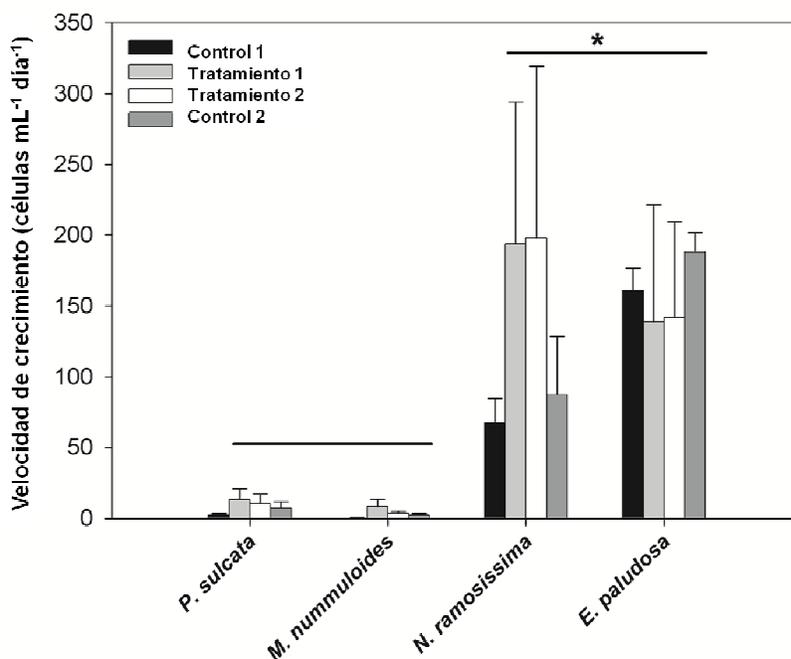
La clorofila *a* es el principal pigmento de la fotosíntesis y se encuentra en altas concentraciones en todas las diatomeas. De los valores de concentración de clorofila *a* determinados por fluorescencia se observaron diferencias significativas entre tratamientos para las cuatro diatomeas. Los valores bajos de

concentración de clorofila *a* registrados para *P. sulcata* y *M. nummolooides* pueden ser explicados a través de las limitaciones de la técnica debido a que ambas diatomeas forman cadenas causando mayor pérdida de intensidad de fluorescencia por efecto de filtro interno. Sin embargo, se observa una correlación significativa entre el número de células \times mL⁻¹ y la concentración de clorofila *a*, lo cual indica que las medidas de fluorescencia siguen siendo un buen método comparativo, *in vivo*, incluso para diatomeas que forman cadenas.

La mayor concentración de clorofila *a* para *P. sulcata* fue detectada para los tratamientos 1 y 2 (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,02$) y para *M. nummolooides* (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,04$) y *N. ramosissima* (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,02$) solo en el tratamiento 1.

Las altas correlaciones de la fluorescencia *in situ* y los datos de abundancia en ambos tratamientos con SH mostraron una buena adaptación de *P. sulcata* y *M. nummolooides* a condiciones de baja intensidad luminosa (por efecto de filtro interno de las SH). La correlación baja pero significativa en los tratamientos de control podría explicarse por el bajo número de células y los bajos valores de

Figura 6.4.- Velocidad media de crecimiento (células mL⁻¹ día⁻¹) (± Desviación Estándar) de las diatomeas para cada tratamiento. El asterisco * indica diferencias significativas de *N. ramosissima* y *E. paludosa* en comparación con *P. sulcata* y *M. nummuloides* (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,001$).



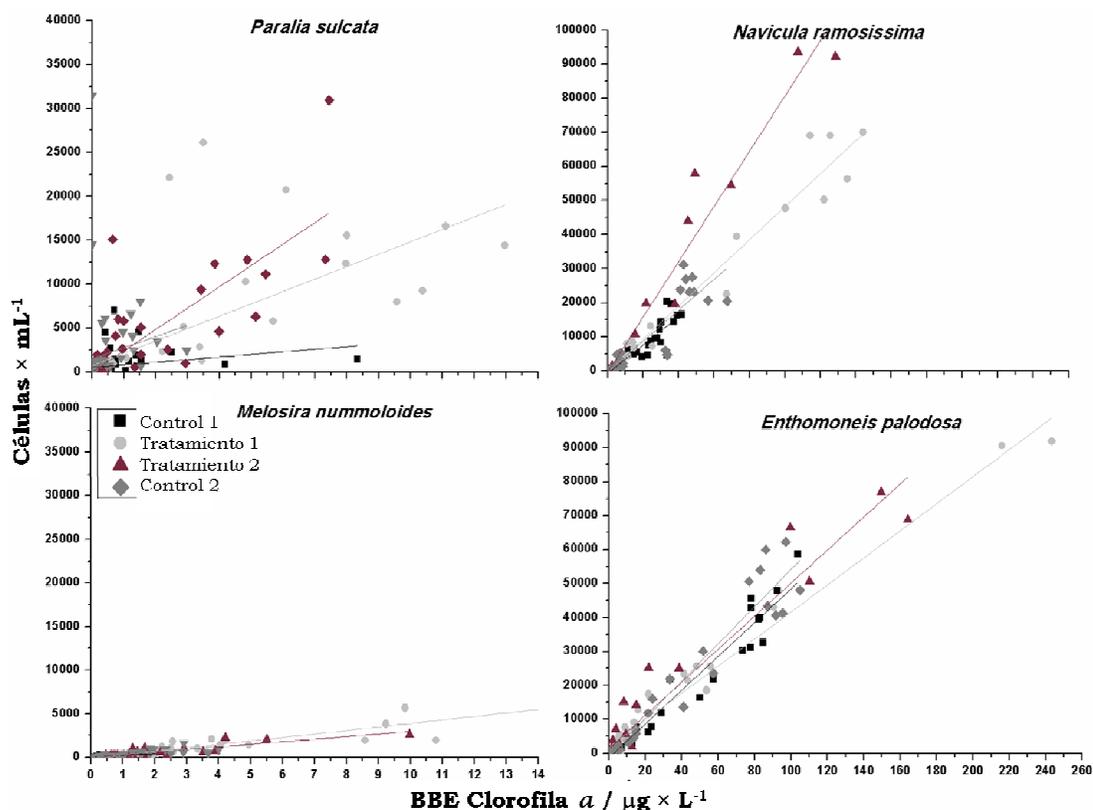
fluorescencia *in situ* (en su mayoría en torno a cero) lo que implica un alto error en ambos tipos de medidas.

6.2.3.- Cuantificación de pigmentos por HPLC.

En concordancia con los resultados de fluorescencia, las mayores concentraciones de clorofila *a* (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,05$) determinadas por HPLC durante la fase estacionaria para las cuatro diatomeas también se alcanzaron en

el tratamiento 1 (tabla 6.1). Al igual que para la clorofila *a* los mayores valores de concentración del resto de pigmentos (fucoxantina, diadionoxantina y β -caroteno) determinados por HPLC se obtuvieron para el tratamiento 1. Curiosamente, para *P. sulcata* la concentración de clorofila *a* en el tratamiento 2 fue menor que la esperada, a pesar de que la tasa de crecimiento dentro de este tratamiento fue significativamente más alta que en los controles 1 y 2. Del mismo modo para *E. paludosa* la

Figura 6.5.- Rango de correlación de Spearman entre la concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$) y células $\times \text{mL}^{-1}$. Los coeficientes para la correlación de Spearman para *P. Sulcata*: $R = 0,63$ (Control 1, Tratamiento 2), $R = 0,69$ (Tratamiento 1) y $R = 0,67$ (Control 2); para *M. nummoloides*: $R = 0,79$ (Control 1), $R = 0,89$ (Tratamiento 1), $R = 0,67$ (Tratamiento 2) y $R = 0,93$ (Control 2); para *N. ramosissima*: $R = 0,94$ (Control 1), $R = 0,97$ (Tratamiento 1, 2) y $R = 0,91$ (Control 2) y para *E. palodosa*: $R = 0,98$ (Control 1, Tratamiento 1), $R = 0,93$ (Tratamiento 2) y $R = 0,96$ (Control 2).



concentración de clorofila *a* detectada en el tratamiento 2 tuvo un valor significativamente bajo (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,04$).

Otro pigmento que se encuentra en altas concentraciones en las diatomeas es la fucoxantina, un pigmento secundario que a menudo es

utilizado como marcador de algas. Para *P. sulcata* y *M. nummoloides* la concentración de fucoxantina en todos los tratamientos fue significativamente mayor que todos los otros pigmentos (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,04$). Para *N. ramosissima* y *E. palodosa* la concentración de clorofila *a* fue en

Tabla 6.1: Concentraciones de los principales pigmentos ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$) de las diatomeas determinados al final de los experimentos de crecimiento.

Pigmentos	Control 1	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Control 2
<i>Paralia sulcata</i>				
Fucoxantina	29 ± 4	61 ± 16	34 ± 4	24 ± 11
Diadinoxantina	2 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
Clorofila <i>a</i>	23 ± 7	55 ± 23	6 ± 5	19 ± 12
β - Caroteno	3 ± 1	a	2.25 ± 0.01	a
<i>Melosira nummoloidea</i>				
Fucoxantina	4 ± 1	42 ± 39	a	5 ± 1
Diadinoxantina	2 ± 1	a	a	2 ± 1
Clorofila <i>a</i>	1 ± 1	30 ± 30	10 ± 9	3 ± 1
β - Caroteno	a	a	a	a
<i>Navicula ramosissima</i>				
Fucoxantina	93 ± 14	188 ± 99	149 ± 82	70 ± 35
Diadinoxantina	9 ± 2	16 ± 7	18 ± 8	6 ± 2
Clorofila <i>a</i>	122 ± 36	303 ± 161	209 ± 121	112 ± 59
β - Caroteno	7 ± 1	15 ± 7	20 ± 1	4 ± 1
<i>Enthomoneis palodosa</i>				
Fucoxantina	203 ± 20	268 ± 120	192 ± 68	217 ± 24
Diadinoxantina	35 ± 4	31 ± 13	18 ± 6	43 ± 3
Clorofila <i>a</i>	341 ± 34	448 ± 208	255 ± 92	414 ± 32
β - Caroteno	13 ± 2	24 ± 9	14 ± 5	15 ± 1

a. Menor al límite de detección

general significativamente más alta que los otros pigmentos (ANOVA, LSD post- hoc test, $p < 0,05$) (tabla 6.1).

Los pigmentos determinados en concentraciones más bajas fueron diadinoxantina y β-caroteno.

Tal como sería de esperar por las elevadas velocidades de crecimiento

para *N. ramosissima* y *E. palodosa*, las concentraciones de pigmentos (fucoxantina, diadinoxantina, clorofila *a* y β-caroteno) fueron mayores que para *P. sulcata* y *M. nummoloidea* (ANOVA, LSD post- hoc test, $p < 0,001$).

- Nutrientes

Además, las concentraciones de nutrientes presentan diferencias significativas entre los distintos tratamientos (figura 6.6). Un resultado interesante se detecta al tener en cuenta que los medios de cultivo enriquecidos con las diferentes concentraciones de SH (tratamiento 1 y 2) contienen una menor concentración de nutrientes en comparación con el control 2. Sin embargo, la concentración de silicato fue significativamente mayor en el tratamiento 2 (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,05$), mientras que las concentraciones de fosfato fueron significativamente mayores para el tratamiento 2 y el control 2 (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,02$) en comparación a los otros tratamientos. Por otra parte, el nitrógeno inorgánico total disuelto (**NID**) fue significativamente mayor para los controles 1 y 2 (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,05$) (figura 6.6).

6.3.- DISCUSIÓN

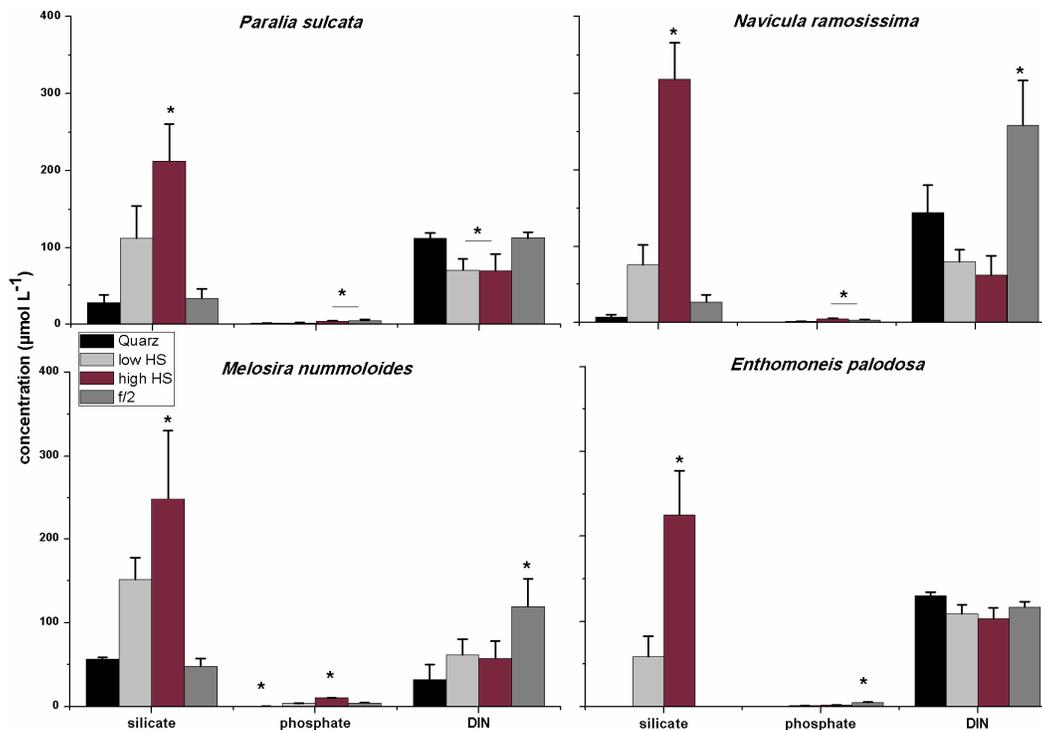
Se conoce muy poco acerca de la influencia de las SH sobre organismos que se encuentran en columnas de agua y en sedimentos. Se sabe que las SH influyen en el régimen de luz en la columna de agua lo cual tiene un efecto en los organismos fotosintéticos

que se encuentran en la misma, especialmente en aquellos que viven en el sedimento. Además, las SH afectan las condiciones biogeoquímicas del entorno debido a su capacidad para formar complejos con compuestos de alto peso molecular y cationes inorgánicos [7].

Los resultados mostraron que para las diatomeas *P. sulcata*, *M. nummolooides*, *Entomoneis palodosa* y *N. ramosissima* el crecimiento fue ligeramente superior en los tratamientos en los que se adicionaron las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos en comparación con los controles.

Las tasas de crecimiento son uno de los parámetros más importantes para determinar si el estado de las diatomeas es el óptimo. Una característica común en las curvas de crecimiento obtenidas para *P. sulcata* y *M. nummolooides* es que la fase exponencial se prolonga por la adición de pequeñas cantidades de SH. Esta extensión se observa más claramente en la densidad de población alcanzada al final de la fase exponencial (figura 6.3). Con solo una pequeña extensión de la fase exponencial se logra un aumento considerable en la densidad celular final. Esta mayor abundancia de células indica la adaptación a condiciones de poca luz, lo que puede

Figura 6.6.- Concentración de nutrientes en el medio de cultivo utilizado para las cuatro diatomeas en los diferentes tratamientos determinada al final de los experimentos de crecimiento.* Indica diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$).



ser confirmado para el caso de *P. sulcata* del análisis de datos de campo realizados en el Mar del Norte, Helgoland, Alemania. Dicha base de datos se mantiene diariamente, a partir de 1962, desde un programa de monitoreo donde la abundancia mostró tener una correlación negativa con altas intensidades de luz durante los últimos 40 años [8,9,10].

P. sulcata es una especie de diatomeas cosmopolita, salobre y marina que se encuentra en zonas litorales y sublitorales de los sedimentos, como

así también en columnas de agua. Se describe a esta especie como una tychopelagic [11,12,13]. A menudo se asocia a hábitats de arena y de sedimentos de grano fino, ricos en materia orgánica [11,14]. También *M. nummuloides* se describe como una especie bentónica que se encuentra principalmente en aguas salobres con contaminación orgánica [15]. Hellebost y Guillaro [16] mostraron que *M. nummuloides* puede tomar y acumular aminoácidos en condiciones de luz, como así también de oscuridad. Por lo

tanto, *P. sulcata* y *M. nummuloides* como especies bentónicas son capaces de vivir en estrecho contacto con el sedimento y se encuentran en aguas turbias. Están adaptadas a medios ricos en materia orgánica y de baja intensidad de luz lo que es una ventaja para la producción ecológica en estos medios [14,17]. En estas condiciones, ambas algas pueden presentar un metabolismo heterótrofo [5]. Este comportamiento explica porqué el crecimiento es bueno en nuestros experimentos para aquellos tratamientos enriquecidos con las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos. El favorecimiento del crecimiento mediante la adición de SH del mismo origen natural que las algas puede ser explicado por el aumento de la biodisponibilidad de metales traza y otros nutrientes [18]. Adicionalmente, *N. ramosissima*, como especie bentónica, desempeña un rol importante en la estructura de los sedimentos. Esta alga mostró mayores tasas de crecimiento en todos los tratamientos respecto al resto de las diatomeas, especialmente en aquellos en los que se adicionaron las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos. Por el contrario, *E. paludosa* presentó una tasa de crecimiento ligeramente mayor en el control 2.

Prakash y col. [19] presentaron resultados contrastantes a los nuestros para el crecimiento de diatomeas en presencia de diferentes concentraciones de SH. Los autores utilizaron especies de diatomeas pelágica (*Skeletonema costatum*, *Thalassiosira nordenskiöldii* y *Phaeodactylum tricornutum*) y obtuvieron el mejor crecimiento a la concentración de $0,03 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ de SH. Esta concentración fue de alrededor de 10 veces menor en comparación a las utilizadas en nuestros ensayos. Sin embargo, Prakash y col. [19] obtuvieron resultados similares a los nuestros, para ensayos a diferentes concentraciones de SH donde monitorearon el crecimiento de *S. costatum* y observaron un aumento en el crecimiento al incrementar las concentraciones, en el rango de $(0,003-0,018) \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ en comparación con el medio de cultivo f/2. El valor de concentración de las SH en el cual comienzan a ejercer un efecto de inhibición del crecimiento parece depender de la naturaleza de las SH y de las especies utilizadas en los ensayos.

La razón por la cual en general en nuestros experimentos el tratamiento 1 ejerce un mayor efecto estimulante del crecimiento que el tratamiento 2 (con mayor concentración de SH) 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 [20]. Por otro lado, la inhibición del crecimiento por la adición de húmicos en altas concentraciones se puede explicar también por un efecto de quelación, ya que el exceso de quelante puede hacer que los iones esenciales para las algas no estén disponibles [21].

Otros estudios mostraron que principalmente las cianobacterias son más sensibles a la adición de SH, las que reducen su crecimiento debido a la formación de compuestos complejos entre las SH acuáticas con hierro [18] y a la reducción de la disponibilidad del Fe y el desarrollo de H_2O_2 intracelular [7]. Imai y col. [22] mostraron un crecimiento significativamente menor para *Microcystis aeruginosa* cuando una concentración (2 mg de peso seco $\times L^{-1}$) de AF extraídos de una laguna se añadió al medio de cultivo. Esta concentración es similar a la concentración de sustancias del tipo ácido húmico de sedimentos marinos empleada en nuestros experimentos (tratamiento 1). Los autores propusieron que la inhibición del crecimiento se debió a la formación de complejos de hierro con los AF. En tanto, concluyeron que las SH, en general, juegan un papel importante

en la formación de poblaciones de *M. aeruginosa* en lagos.

En contraste con estos resultados, el crecimiento de las diatomeas bentónicas utilizadas en nuestros experimentos no se vio afectado negativamente por la adición de SH. Además, nuestros resultados podrían indicar que especialmente las especies bentónicas, se adaptan mejor a altos contenidos de materia orgánica (por ejemplo, SH) en el sedimento. Mientras que, las especies pelágicas no se adaptan fácilmente al aumento de concentración de SH en la columna de agua.

Las concentraciones más altas de fucoxantina y clorofila *a* se alcanzaron para las cuatro diatomeas en ambos tratamientos con SH. La fucoxantina es un pigmento antena que tiene un rol importante en condiciones de poca luz. Esto concuerda con las altas concentraciones detectadas en este trabajo para las diatomeas bentónicas, especialmente en los tratamientos con SH.

Otro efecto en la estimulación del crecimiento de las diatomeas puede deberse al aumento en la producción de bacterias en los tratamientos con SH. Es posible que las bacterias descompongan a las moléculas de SH [23] conduciendo a una liberación de nutrientes en el medio de cultivo. Por lo tanto, los nutrientes se encuentran

más disponibles para los productores primarios, lo que en nuestros experimentos se ve reflejado en un aumento en las concentraciones de nutrientes en los tratamientos con SH. Especialmente para el caso de *P. sulcata* se esperaba que al final del experimento de crecimiento se encontraran concentraciones más bajas de silicatos debido a la alta demanda de Si para la formación de la valva de esta diatomea. Esto no se correlaciona bien con nuestras expectativas debido a que el mayor crecimiento se muestra en los tratamientos con SH. También sería posible que el Si se encuentre como contaminante en las muestras de las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos. Una caracterización detallada de las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos de Helgoland se presentó en el capítulo 3, donde se discutió que estas muestras estaban formadas principalmente por moléculas de bajo peso molecular. El grado relativamente alto de estimulación del crecimiento de diatomeas por SH de bajo peso molecular puede estar asociado a una respuesta de sensibilización directa de las células, a una respuesta de quelación indirecta, o a ambos factores. Las SH pueden penetrar en la célula vegetal y el grado de

penetración depende del tamaño molecular de las distintas entidades [24]. 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 [25], la fracción de menor peso molecular tiene una capacidad de formación de complejos metálicos de 2 a 6 veces mayor que cualquier otra y la capacidad quelante disminuye con el aumento del peso molecular.

Chen y Wang [26] determinaron la absorción de Fe por la diatomea costera *Thalassiosira pseudonana* y las cianobacterias *Synechococcus sp.*, utilizando entre otros los HA como ligandos modelo. Ellos demostraron que una alta biodisponibilidad de HA-ligados al Fe (III) implica que las SH no sólo son importantes para controlar el comportamiento geoquímico del Fe, sino que también pueden proporcionar Fe al fitoplancton marino, especialmente en los estuarios y aguas costeras. Por otro lado, de los medios de absorción del fitoplancton, se demostró que el Fe enlazado a compuestos orgánicos fue absorbido primero en la superficie celular y luego se dio lugar al intercambio de Fe en los sitios específicos de la superficie antes de la internalización Fe. El alto contenido de grupos carboxílicos

determinados en nuestro trabajo para las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos apoya la posibilidad de este tipo de mecanismo, proporcionando una buena explicación de la abundancia de las diatomeas en nuestros experimentos y a su vez en los sedimentos de Helgoland.

6.4.- CONCLUSIONES

En resumen, a partir de nuestros resultados podemos decir que; la adición de las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos al medio de cultivo promueve ligeramente el crecimiento de *Navicula ramosissima*, *Entomoneis palodosa*, *Melosira nummoloides* y *Paralia sulcata*, como

quedó demostrado principalmente por el aumento de la concentración de clorofila *a* y fucoxantina.

Por otro lado, la razón por la cual en general en nuestros experimentos el tratamiento 1 ejerce un mayor efecto estimulante del crecimiento que el tratamiento 2 (con mayor concentración de sustancias húmicas) se ha atribuido a: (i) la absorción selectiva de la luz, que al impartirle un mayor color amarillento a la solución resulta en la reducción de la fotosíntesis [27]; (ii) un efecto de quelación, ya que el exceso de quelante (sustancias húmicas) puede hacer que los iones esenciales para las algas no estén disponibles [28].



Referencias

1. Daehnick, A.E., Sullivan, M.J., Moncreiff, C.A. Primary production of the sand microflora in seagrass beds of Mississippi Sound. *Botanica Marina* **35** (1992) 131–139
2. Pinckney JL, Zingmark RG (1993) Modelling the annual production of intertidal benthic microalgae in estuarine ecosystems. *Journal of Phycology* **29**, 396–407
3. Wolff, W.J. (1979). 'Flora and vegetation of the Wadden Sea'. Report 3 (Final Report of the Section Marine Biology of the Wadden Sea; published by A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands), pp. 206
4. MacIntyre HL, Geider RJ, Miller DC Microphytobenthos: The ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats. 1. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries* **19** (1996) 186–201
5. Graham, L. E. & L. W. Wilcox. 2000. Algae. Capítulo 12. Ochrophytes. Part 2. Diatoms.
6. Armbrust, E.V. et al. The genome of the diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* **306** (2004) 79–86
7. Bährs, H. & Steinberg, C.E.W. (2011). Impact of two different humic substances on selected coccal green algae and Cyanobacteria—changes in growth and photosynthetic performance. *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-011-0564-7
8. Wiltshire, K.H., Manly, B.F.J. The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. *Helgoland Marine Research* **58** (2004) 269–273
9. Franke, H-D, Bucholz, F., Wiltshire, K.H. Ecological long-term research at Helgoland (German Bight, North Sea): retrospect and prospect—an introduction. *Helgoland Marine Research* **58** (2004) 223–229
10. Gebühr, C., Wiltshire, K.H., Aberle, N., van Beusekom, J.E.E., Gerdtz, G. Influence of nutrients, temperature, light and salinity on the occurrence of *Paralia sulcata* at Helgoland Roads, North Sea. *Aquatic Biology* **7** (2009) 185–197
11. Roelofs, A.K. Distributional patterns and variation of valve diameter of *Paralia sulcata* in surface sediments of Southern British Columbia Inlets. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **18** (1984) 165–176
12. Zong, Y. Implications of *Paralia sulcata* abundance in Scottish isolation basins. *Diatom Research* **12** (1997) 125–150
13. McQuoid, M.R., Nordberg, K. The diatom *Paralia sulcata* as an environmental indicator species in coastal sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. **56** (2003) 339–354
14. McQuoid MR, Hobson LA Assessment of palaeoenvironmental conditions on Southern Vancouver Island, British Columbia, Canada, using the marine tychopankter *Paralia sulcata*. *Diatom Research* **13** (1998) 311–321
15. Wilkinson, M., Henderson, A. R. & Wilkinson, C. Distribution of attached algae in estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* **7** (1976) 183
16. Hellebost, J. A. & Guillard, R. R. L. Uptake specificity for organic substrates by the marine diatom *Melosira nummuloides*. *Journal of Phycology*. **3** (1967) 132–136

-
- 17.** McLean, Roger O. , Corrigan, John and Webster, Joan 'Heterotrophic nutrition in *Melosira nummuloides*, a possible role in affecting distribution in the Clyde Estuary', *European Journal of Phycology* **16** (1981) 95–106
- 18.** Prokhotskaya VYu, Steinberg CEW: Differential Sensitivity of a Coccal Green Algal and a Cyanobacterial Species to Dissolved Natural Organic Matter (NOM). *Env Sci Pollut Res* 14, Special Issue **1** (2007) 11–18
- 19.** Prakash A, Rashid MA, Jensen A, Subbarao DV. Influence of Humic Substances on Growth of Marine Phytoplankton - Diatoms. *Limnology and Oceanography* **18** (1973) 516–524
- 20.** Prakash, A., Rashid, M.A. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: dinoflagellates. *Limnology and Oceanography*. **13** (1968) 598–606
- 21.** Siegel, A. 1971. 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.
- 22.** Imai, A., Fukushima, T. & Matsushige, K. Effects of iron limitation and aquatic humic substances on the growth of *Microcystis. aeruginosa*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56** (1999) 1929–1937
- 23.** Bosio, G. N., Gara, P. D., García Einschlag, F. S., Gonzalez, M.C., del Panno, M. T. and Mártire, D. O. Photodegradation of Soil Organic Matter and its Effect on Gram (-) Bacterial Growth. *Photochemistry & Photobiology* **84** (2008) 1126–1132
- 24.** Aso, S., and 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** (3) (1963) 1
- 25.** 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
- 26.** Chen, M., Wang, W-X. Accelerated uptake by phytoplankton of iron bound to humic acids. *Aquat Biol* **3** (2008) 155–166
- 27.** Prakash, A., Rashid, M.A. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: dinoflagellates. *Limnology and Oceanography*. **13** (1968) 598–606
- 28.** Siegel, A. 1971. 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.

Conclusiones Generales



Capítulo 7

Conclusiones Generales.

7.1.- CONCLUSIONES GENERALES

✓ Se avanzó respecto de la información de literatura en la aplicación de técnicas espectroscópicas para la caracterización de SH de diferentes orígenes.

✓ A partir de experimentos de láser flash fotólisis y de radiólisis de pulso fue posible obtener información mecanística útil para la evaluación del efecto de la materia orgánica disuelta en los tratamientos oxidativos en matrices que contienen sales inorgánicas.

Los resultados obtenidos con ácido húmico Aldrich indican que el empleo de tratamientos oxidativos que involucren la participación del radical HO• para la degradación de materia orgánica disuelta serán menos eficientes en presencia de iones inorgánicos tales como Br⁻ y N₃⁻.

✓ Mediante el empleo de las técnicas resueltas en el tiempo de láser flash fotólisis y espectroscopía optoacústica inducida por láser se registraron con excitación a 266 nm estados tripletes de sustancias húmicas y con excitación a 355 nm radicales cationes. La diferencia observada se asigna principalmente a las condiciones de pH de los experimentos en concordancia con observaciones realizadas por Bruccoleri y col. [1,2].

✓ El efecto estimulante sobre el crecimiento de las diatomeas *Navicula ramosissima*, *Entomoneis palodosa*, *Melosira nummolooides* y *Paralia sulcata* en

presencia del extracto de ácidos húmicos puede estar asociado a: (i) una respuesta indirecta de quelación, (ii) una respuesta directa de sensibilización de las células y, (iii) un aumento de la producción de bacterias.



Referencias

1. 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
2. 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

