



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Programa de Doctorado en Ciencias mención Química

Evaluación del efecto del ligando sobre la generación de especies reactivas del oxígeno en sistemas tipo Fenton conducidos por 1,2-Dihidroxibencenos



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Química

GABRIEL IVAN PÉREZ GONZÁLEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2020

Profesor Guía: David Rodrigo Contreras Pérez
Dpto. de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción

Evaluación del efecto del ligando sobre la generación de especies reactivas del oxígeno en sistemas tipo Fenton conducidos por 1,2-Dihidroxibencenos

Comisión Evaluadora:

David Contreras Pérez

Bioquímico, Dr. en Ciencias Químicas

Claudio Jiménez Águila

Bioquímico, Dr. en Ciencias Químicas

Cesar Soto Salazar

Químico, Dr. en Ciencias Químicas

Camilo López Alarcón

Dr. en Química



Directora de Postgrado:

Sandra Saldivia Borquez

Psicóloga, Dra. En Psicología

Decano Facultad de Ciencias Químicas:

Eduardo Pereira Ulloa

Químico, Dr. en Química



A Libnny, mi amada esposa, que le da sentido a mi vida.

A mis padres, Rodrigo y Verónica, por su infinito cariño y sacrificios.

A mis hermanos y familia, que sus sueños se cumplan.

“Todo lo que tenemos que decidir, es que hacer con el tiempo que se nos ha dado”

J. R. R. Tolkien

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía Dr. David Contreras, por su buena disposición, paciencia y dedicación no solo a lo largo de la presente tesis doctoral, sino también en mi formación como estudiante de pregrado, que la fuerza nunca lo abandone.

A los profesores Dr. Claudio Jiménez, Dr. César Soto y Dr. Camilo Lopez, por aceptar ser parte de esta comisión y por sus comentarios y sugerencias constructivas que permitieron completar y mejorar el presente trabajo doctoral.

A mis amigos, que ayudaron a equilibrar el trabajo con distracciones, en especial a mis socios Eduardo y Ricardo para que nunca falte hidromiel. Y, que en conjunto con Astrid y Carolina siempre me recibieron con los brazos abiertos y un café.

A los integrantes del *Team Fenton*, por su humor y apoyo que permitieron obtener la mejor experiencia durante mi estadía Adolfo Henríquez, Katherine Márquez, Romina Romero, Francisca Benítez, Mónica Sepulveda, Natalie Moreno, Juan Diaz, Eduardo Troncoso y en especial a Camila Mendez y Victoria Melin por el increíble apoyo otorgado en la realización y discusión del presente trabajo.

Al equipo del Laboratorio de Recursos Renovables (LRR) del Centro de Biotecnología por hacer el apoyo prestado y hacer el día a día más ameno. Al equipo de la Facultad de Ciencias de Químicas de la Universidad de Concepción, por el apoyo y la buena disposición prestada.

A la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por el apoyo de la beca doctoral que me permitió desarrollar esta tesis. Al proyecto FONDECYT N° 1160100 y FONDAP 15110019. Al *Solar Energy Research Center* SERC-Chile y al Núcleo Milenio en Procesos Catalíticos hacia la Química Sustentable por el apoyo tanto en el desarrollo de la tesis como la comunicación de sus resultados. Al apoyo de término de tesis otorgado por la Dirección de Postgrado.

RESUMEN

El ciclo redox de Fenton es uno de los principales sistemas utilizados para la generación de radicales libres; hidroxilo, perhidroxilo, oxígeno singlete. La reactividad de este sistema es dependiente del pH y puede ser promovido con el uso de ligandos de hierro del tipo 1,2-dihidroxibencenos, los cuales aumentan la cantidad de especies radicalarias generadas por su capacidad de reciclaje de Fe(II). El índice de Hammett del sustituyente del 1,2-DHB influye directamente en el mecanismo de reacción por el cual el Fe(III) es reducido. Sin embargo, se desconoce el efecto del índice de Hammett del sustituyente del 1,2-DHB y el pH en la generación preferencial de las especies radicalarias. En este trabajo se evaluó sistemáticamente la variación de las especies radicalarias generadas en el ciclo de Fenton en función de la característica electrónica del ligando y el pH.

Los resultados muestran que tanto el radical hidroxilo como perhidroxilo son producidos en el ciclo redox de Fenton, sin embargo, la generación de radical hidroxilo es más sensible a la estabilidad de la semiquinona. Por otro lado, el radical perhidroxilo, se encuentra involucrado en un mecanismo secundario de amplificación del ciclo redox de Fenton mediante la reducción de la semiquinona, permitiendo el reciclaje de Fe(II) de forma indirecta. Se detectó oxígeno singlete a valores de pH sobre 7,00, donde la reacción de Fenton está desfavorecida por la precipitación de hidróxidos y óxidos de Fe(III).

La estabilidad de la semiquinona de 1,2-dihidroxibencenos con sustituciones donadoras de densidad electrónica en conjunto con valores de pH bajo 5,00 permite la generación preferente de radical hidroxilo. Contrariamente, el radical perhidroxilo presenta una generación preferente en sistemas tipo-Fenton en ausencia de 1,2-dihidroxibencenos a valores de pH bajo 5,00. En el mismo rango de pH el uso de catecol y 1,2-dihidroxibencenos con sustituciones sustractoras de densidad electrónica, muestran una producción similar de ambas especies radicalarias, donde el radical hidroxilo está ligeramente favorecido.

SUMMARY

The Fenton redox cycle is one of the most used systems for free radical generation, such as hydroxyl, hydroperoxyl and singlet oxygen. The reactivity of this system is pH-dependent and is enhanced by the addition of 1,2-dihydroxybenzene-like iron-ligands, which increase the amount of radical species due their Fe(II) recycling ability. The mechanism by which Fe(III) is reduced depends on the Hammett value of substitution of each 1,2-dihydroxybenzene. However, the effect on the generation of radical species by the difference in the mechanism of Fe(III) reduction and pH is not known. In this work, the variation in the radical species that are generated within the Fenton redox cycle and their dependence on the electronic characteristics of the ligand and pH was systematically evaluated.

The results indicate that hydroxyl and hydroperoxyl radicals were produced within the Fenton redox cycle, however, compared to the hydroperoxyl radical, the generation of hydroxyl radical appeared to be more sensitive to the stability of semiquinone. The Hydroperoxyl radicals were found to be involved in a secondary mechanism of Fenton cycle amplification through the reduction of the semiquinone, leading to an indirect recycling of Fe(II). Singlet oxygen was detected at pH values above 7.00 where Fenton reaction is not favorable, due precipitation of iron hydroxides and oxides.

The stability of electron donor-substituted semiquinone derived from 1,2-dihydroxybenzene below pH 5.0 allowed for the preferential generation of hydroxyl radicals. In contrast, hydroperoxyl radicals lead to the preferential generation of 1,2-dihydroxybenzene-free Fenton-like systems at pH values below 5.00. In this pH range, the use of catechol and electron withdrawing-substituted 1,2-dihydroxybenzenes demonstrated a similar generation of both types of radical species, though the generation of hydroxyl radicals was slightly more favored.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	i
SUMMARY	ii
TABLA DE CONTENIDOS	iii
LISTADO DE FIGURAS.....	v
LISTADO DE TABLAS	vii
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Especies reactivas de oxígeno.....	1
1.2. Ciclo redox de Fenton.....	3
1.3. Modificaciones a la reacción tipo-Fenton	4
1.4. <i>Chelator-Mediated Fenton reaction</i>.....	7
1.5. Efecto del pH en el ciclo redox de Fenton.....	9
1.6. Propuesta de investigación.....	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
CAPITULO 2. METODOLOGÍA.....	14
2.1. Reactivos y procedimientos generales.....	14
2.2. Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS) por EPR.....	16
2.2.1. Detección de $\cdot\text{OH}$	17
2.2.2. Detección de $\cdot\text{O}_2\text{H}$	17
2.2.3. Detección de $^1\text{O}_2$	17
2.3. Detección de $^1\text{O}_2$ por degradación de alcohol furfurilico (FFA).....	18
2.4. Detección de $^1\text{O}_2$ por decoloración de p-nitrosoanilina (RNO).....	18
2.5. Detección de semiquinonas por EPR	19
2.6. Reducción de Fe(III) por método ferrozina	19
2.7. Determinación de la concentración de 1,2-DHB en sistemas CMF.....	20
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1. Perfiles de producción de ROS en sistemas Fenton y CMF.....	21
3.2. Perfiles de producción de $\cdot\text{OH}$.....	23
3.3. Perfiles de producción de $\cdot\text{O}_2\text{H}$	26
3.4. Relación $\cdot\text{OH} / \cdot\text{O}_2\text{H}$.....	30

3.5. Detección y producción de $^1\text{O}_2$	33
3.5.1. Detección por RNO	34
3.5.2. Detección por degradación de alcohol furfurílico	34
3.5.3. Detección por EPR	36
3.6. Reducción de Fe(III) en sistemas CMF	39
3.7. Participación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en la reducción de Fe(III)	41
CONCLUSIÓN	49
PROYECCIONES	50
LITERATURA CITADA.....	51
ANEXOS	62



LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Generación de ROS a partir de oxígeno triplete por reducción secuencial con un electrón. Adaptado de [3].	1
Figura 2. Ciclo redox postulado para la reacción de Fenton [22].	4
Figura 3. Mecanismo propuesto para los sistemas CMF con ligandos (A) donadores de densidad electrónica (EDG) y (B) sustractores de densidad electrónica (EWG) [51].	8
Figura 4. Especiación de (A) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0,15 mmol L ⁻¹ , (B) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 1,5 mmol L ⁻¹ y catecol 1,5 mmol L ⁻¹ .	10
Figura 5. Dependencia del pH en el índice de coordinación de complejos de Fe(III) con 1,2-DHB [48].	10
Figura 6. Espectros de EPR de los aductos (A) DMPO/OH, (B) POBN/O ₂ H y (C) TEMPD/ ¹ O ₂ . La flecha indica el pico considerado para construir perfiles de producción (construcción propia).	22
Figura 7. Perfiles de producción de ·OH en función del tiempo y pH en sistemas (A) Fenton, (B) Tipo Fenton, (C) CMF- NO ₂ -CAT, (D) CMF – COOH-CAT, (E) CMF - CAT, (F) CMF – CH ₃ -CAT, (G) CMF- t-But-CAT. Para una mejor visualización, los gráficos A al E se encuentran en la misma escala de intensidad (a la derecha) y los gráficos F y G tienen una escala propia.	23
Figura 8. Especiación de Fe(SO ₄) 0,15 mmol L ⁻¹ . Inserto; se observa la presencia de Fe(OH) ⁺ desde pH 4.00.	25
Figura 9. Espectros de EPR teóricos para los aductos (A) POBN-O ₂ H, (B) POBN/O ₂ H y experimental para el aducto (C) POBN-O ₂ H. (A) a ^N =15,1, a ^H _β =1,66, a ^H _γ =0,34; (B) a ^N =14,1, a ^H _β =1,72; (C) a ^N =14,0, a ^H _β =1,69.	27
Figura 10. Perfiles de producción de ·O ₂ H en función del tiempo y pH en sistemas (A) Fenton, (B) Tipo Fenton, (C) CMF- NO ₂ -CAT, (D) CMF – COOH-CAT, (E) CMF - CAT, (F) CMF – CH ₃ -CAT, (G) CMF- t-But-CAT.	28
Figura 11. Perfiles de producción de ·OH (rojo) y ·O ₂ H (verde) con dependencia de tiempo y pH en los sistemas (A) Fenton, (B) Tipo-Fenton, (C) CMF-t-But-CAT, (D) CMF- CH ₃ -CAT, (E) CMF-CAT, (F) CMF-COOH-CAT, (G) CMF- NO ₂ -CAT. Para una mejor visualización, los gráficos A al E poseen una escala de intensidad diferente a los gráficos F y G.	31
Figura 12. Cromatograma e identificación de productos de oxidación de FFA por UHPLC-MS	35
Figura 13. (A) %de degradación de FFA en los diferentes sistemas a los pH estudiados. (B) % de producción de cada uno de los productos de oxidación de FFA a pH 3.00, en rojo, verde y azul los productos (a), (b) y (c) de la figura 12 respectivamente	36
Figura 14. Perfiles de producción de ¹ O ₂ en sistemas Fenton (●-rojo), tipo-Fenton (■-negro) y CMF-CAT (▲-azul)	39

Figura 15. Perfiles de reducción de Fe(III) por método de ferrozina para los sistemas CMF a pH (A) 3, (B) 4, (C) 5 y (D) 6. (●-rojo) t-But-CAT, (▲-azul) CH ₃ -CAT, (▼-rosado) CAT, (◆-verde) COOH-CAT, (◄-naranja) NO ₂ -CAT, (■-negro) Tipo-Fenton.	41
Figura 16. Reducción de Fe(III) a pH 3 en sistemas (A) CMF-t-But-CAT, (B) CMF- CH ₃ -CAT, (C) CMF-CAT, (D) CMF-COOH-CAT, (E) CMF- NO ₂ -CAT. (●-rojo) CMF, (▲-azul) DHB/Fe(III), (■-negro) CMF-POBN(+). Límite de detección de la técnica (0.02 mmol L ⁻¹).	42
Figura 17. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de ·O ₂ H en sistemas CMF, en verde 1,2-DHB; rojo semiquinona; azul quinona y amarillo Fe(II)	45
Figura 18. Comparación de la producción de ·O ₂ H (●-azul), con la concentración de 1,2-DHB (▲-roja) y la reducción de Fe(III) por mecanismos dependientes de ·O ₂ H (■-negros); para los sistemas (A) CMF-t-But-CAT, (B) CMF- CH ₃ -CAT, (C) CMF-CAT, (D) CMF-COOH-CAT, (E) CMF- NO ₂ -CAT. Los ejes coinciden con el color de cada parámetro	48
Figura A- 1. Espectros de EPR del aducto DMPO/OH entre pH 3.00 y 6.00 para los sistemas (a) Fenton, (b) Tipo Fenton; y los 1,2-DHB (c) CMF- t-But-CAT, (d) CMF – CH ₃ -CAT, (e) CMF – CAT, (f) CMF – COOH-CAT, (g) CMF- NO ₂ -CAT	62
Figura A- 2. Espectros de EPR del aducto POBN/O ₂ H entre pH 3.00 y 6.00 para los sistemas (a) Fenton, (b) Tipo Fenton; y los 1,2-DHB (c) CMF- t-But-CAT, (d) CMF – CH ₃ -CAT, (e) CMF – CAT, (f) CMF – COOH-CAT, (g) CMF- NO ₂ -CAT.	63
Figura A- 3. Espectros de EPR del aducto TEMPD/ ¹ O ₂ entre pH 6.00 y 11.00 para los sistemas (a) Fenton, (b) Tipo Fenton; y (c) CMF – CAT, (d) CMF – CAT en presencia de NaN ₃ 120 mmol L ⁻¹ . Auto oxidación de DHB	64
Figura A- 4. Espectros de EPR de las semiquinonas generadas por auto oxidación en buffer a pH 11, se utilizaron los mismos parámetros instrumentales utilizados para aductos radicalarios (A) Bencilamina, (B) Acido hidrocafeico, (C) Acido cafeico, (D) Etilcatecol, (E) Clorocatecol, (F) Acido-2,3-Dihidroxibenzoico, (G) Catecol, (H) Metilcatecol, (I) t-Butilcatecol.....	66

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Potenciales estándar (V) de oxidación para algunas de las especies más oxidantes reportadas. Adaptado de [4].	2
Tabla 2. Principales estrategias metodológicas que involucran el uso de fuentes energéticas externas para aumentar la eficiencia del ciclo redox de Fenton.	5
Tabla 3. 1,2-DHB utilizados en el presente trabajo.....	15
Tabla 4. Composición de los sistemas ensayados.	16
Tabla 5. Intensidad relativa máxima de $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2\text{H}$ y $r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}}$ para todos los sistemas a los pH estudiados. * Solo detección de $\cdot\text{OH}$. N.D. No detectado.....	30
Tabla 6. Concentración de $\cdot\text{OH}$ por método "spincount".....	33
Tabla 7. Principales mecanismos de generación de $^1\text{O}_2$ que involucran reacciones posibles en sistemas Fenton	38
Tabla 8. Porcentaje del Fe(III) total reducido en cada uno de los sistemas ensayados. a $p < 0,01$, b $p < 0,05$ y c $p < 0,1$	43



CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son especies químicas que se caracterizan por contener oxígeno en su estructura y un elevado potencial de oxidación. Los ROS se pueden clasificar como especies radicalarias y no radicalarias. Dentro del primer grupo encontramos al (a) Radical Hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), (b) Anión Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), (c) Perhidroxilo ($\cdot\text{O}_2\text{H}$) y (d) Peroxilo ($\cdot\text{O}_2\text{R}$); siendo $\cdot\text{O}_2\text{H}$ el ácido conjugado de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (ec. 1). En el presente trabajo se utilizara radical perhidroxilo para nombrar a ambos radicales indistintamente ya que en general se utilizan valores de pH inferiores a 4.00. En el segundo grupo encontramos al (a) Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) y (b) Oxígeno Singlete ($^1\text{O}_2$) [1,2]. Todas las especies mencionadas pueden ser generadas por transferencia electrónica entre ellas, pudiendo comenzar desde oxígeno triplete (Figura 1).

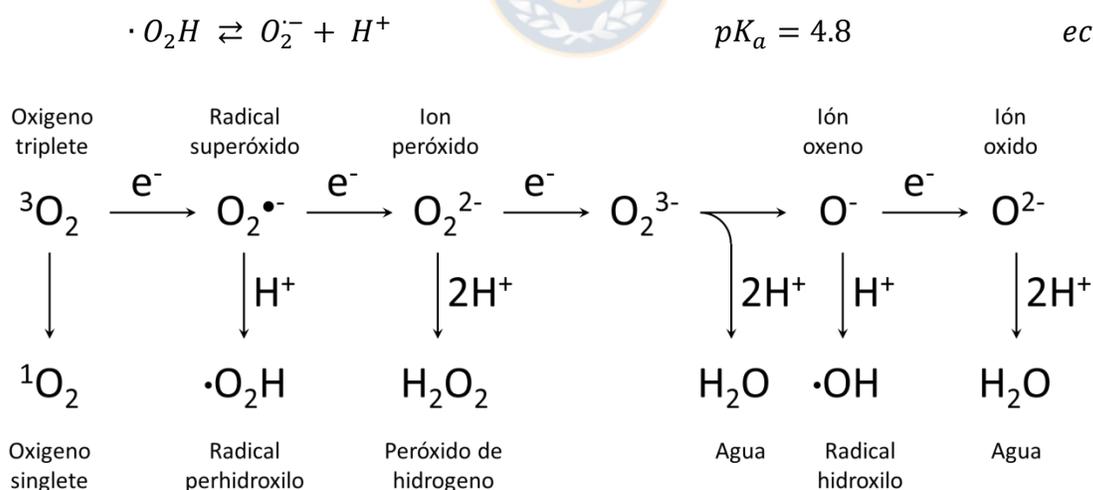


Figura 1. Generación de ROS a partir de oxígeno triplete por reducción secuencial con un electrón. Adaptado de [3].

Entre los ROS, uno de los más estudiado es el $\cdot\text{OH}$ debido a que su potencial de oxidación es uno de los mayores conocidos (tabla 1) [4], y se ha reportado como principal

participante en una gran cantidad de reacciones en sistemas tanto químicos como biológicos, donde puede ser generado por mecanismos enzimáticos o no enzimáticos[5]. Su participación ha sido registrada en mecanismos de degradación de madera por hongos [6,7], procesos fisiológicos de detoxificación celular en el sistema inmunológico o envejecimiento [8,9] y en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer [8,10]. En otro ámbito, los sistemas químicos que producen $\cdot\text{OH}$, se denominan en conjunto, procesos de oxidación avanzada y han sido utilizados principalmente para la degradación de contaminantes recalcitrantes en aguas y otros fines tecnológicos [4,11].

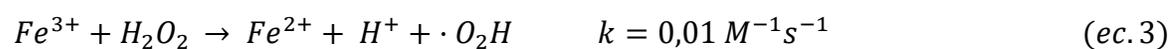
Los procesos avanzados de oxidación (AOP por su sigla en inglés *Advanced Oxidation Processes*) son un conjunto de sistemas que tienen involucran la generación y uso de especies transitorias de gran poder oxidante, principalmente $\cdot\text{OH}$ [12]. Los AOP se pueden clasificar en procesos fotoquímicos y no fotoquímicos. En el primer grupo se encuentran procesos como fotólisis de agua, H_2O_2 y ozono (O_3), también procesos de fotocatalisis heterogénea o foto-Fenton. Por otro lado procesos no fotoquímicos incluyen ozonización en medio alcalino o con H_2O_2 , oxidación electroquímica y procesos Fenton y derivados [13].

Tabla 1. Potenciales estándar (V) de oxidación para algunas de las especies más oxidantes reportadas. Adaptado de [4].

Reacción	E° (V)
$F_2 + 2e^- \rightarrow 2F^-$	+ 2.87
$\cdot\text{OH} + H^+ + e^- \rightarrow H_2O$	+ 2.70
$O_3 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O + O_2$	+ 2.07
$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$	+ 1.77
$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$	+ 1.23

1.2. Ciclo redox de Fenton

La reacción de Fenton, fue descrita por primera vez por H.H Fenton en 1894, quien describió la oxidación de ácido tartárico por una solución de Fe(II) y H₂O₂ [14]. Casi 40 años más tarde, Haber y Weiss postularon el mecanismo de esta reacción sugiriendo que la principal especie oxidante es ·OH generado in-situ [15]. Actualmente se reconoce la reacción de Fe(II) y H₂O₂ como la “reacción de Fenton” (ec. 2) y sus variantes como la “reacción tipo-Fenton” (ec. 3), donde se ha cambiado el Fe(II) por otra especie como Fe(III) u otro ion metálico de transición[16,17].



En general, la reacción de Fenton consiste en la oxidación de un sustrato por H₂O₂ que se reduce hasta H₂O. Esta reacción es catalizada por Fe(II), generando intermediarios oxidantes como ·OH, ·O₂H, ¹O₂ y especies de alta valencia como ion ferril [Fe(IV)=O]²⁺ (figura 2). En la reacción de Fenton, se establece un ciclo redox por la reducción consecutiva de Fe(III) (ec. 3) a Fe(II) el que a su vez cataliza la generación de ·OH (ec. 2, figura 2) [18–22]. Este ciclo es descrito por Salgado et al 2013 [22]. La reducción de Fe(III) a Fe(II) es la etapa limitante al ser tres órdenes de magnitud más lenta, por lo tanto variados estudios se centran en estrategias para aumentar el reciclaje de Fe(II) [22–26].

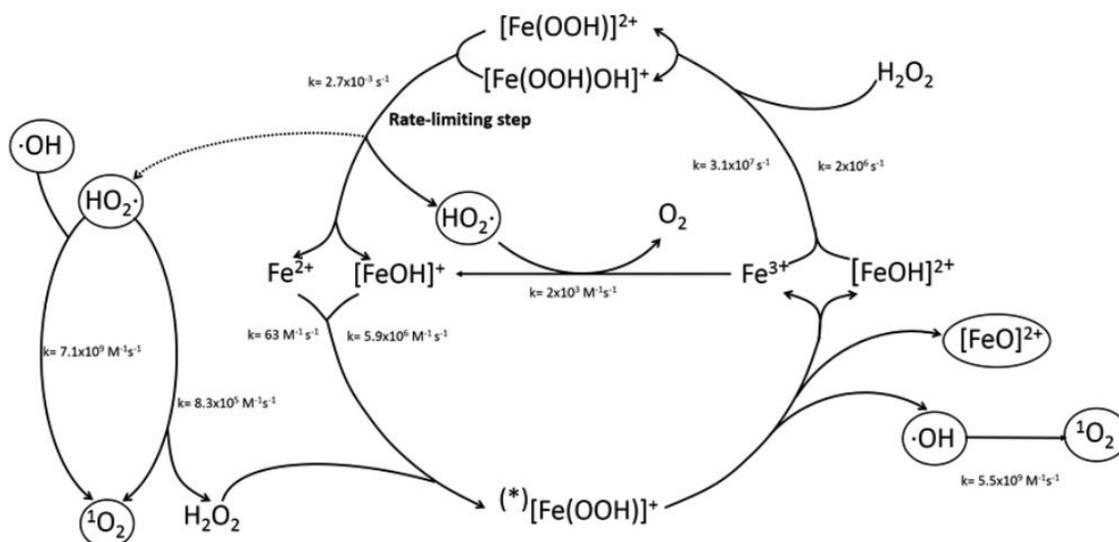


Figura 2. Ciclo redox postulado para la reacción de Fenton [22].

1.3. Modificaciones a la reacción tipo-Fenton

Las estrategias para aumentar el reciclaje de Fe(II) en el ciclo redox de Fenton se centran en modificar la etapa limitante de la velocidad de reacción, aumentando la eficiencia del sistema, medida como la cantidad de especies oxidantes generadas. Desde este punto de vista, dos principales estrategias se han utilizado, la primera introduce el uso de una fuente energética externa, la cual aumenta la producción de $\cdot\text{OH}$ en forma directa o por aumento de la reducción de Fe(III)), las cuales se encuentran resumidas en la tabla 2.

Tabla 2. Principales estrategias metodológicas que involucran el uso de fuentes energéticas externas para aumentar la eficiencia del ciclo redox de Fenton.

Nombre	Principio	Referencia
Sono-Fenton	Uso de ultrasonido para generar cavitaciones en la solución, el colapso de las burbujas formadas genera condiciones extremas de presión y temperatura (5.000 K, 50 atm aproximadamente) a estas condiciones ocurre la ruptura homolítica del H_2O_2 formando 2 $\cdot\text{OH}$. se ha reportado una mejora en la degradación de algunos compuestos utilizando este método	[27–29]
Foto-Fenton	El uso de luz UV o solar (foto-Fenton solar) aumenta la eficiencia en la generación de $\cdot\text{OH}$ por 2 vías, permite la ruptura homolítica del H_2O_2 generando 2 $\cdot\text{OH}$ y la regeneración del Fe(II) promoviendo la reacción de Fenton	[30–32]
Electro-Fenton	El uso de electricidad promueve la formación de $\cdot\text{OH}$ directamente desde agua en el ánodo, además la formación de H_2O_2 en el cátodo, además la reducción de Fe(III) a Fe(II) en el cátodo promueve la reacción de Fenton	[33,34]

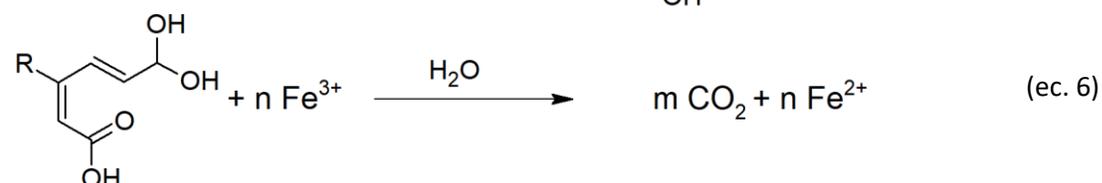
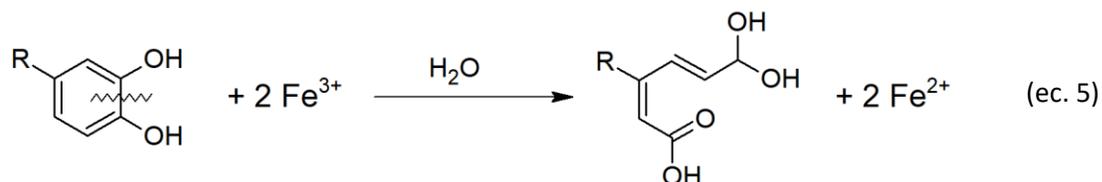
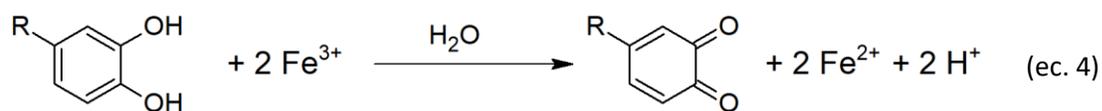
Las metodologías mencionadas también se han utilizado en combinaciones, llegando a procesos de sono-electro-Fenton, foto-electro-Fenton, sono-foto-Fenton, etc. [24,26,35].

La segunda estrategia que ha sido utilizada es la adición de ligandos que solubilicen el Fe(III) y favorezcan su reducción para promover la reacción de Fenton mediante el reciclaje directo de Fe(II). Entre los disponibles, algunos como EDTA, ácido oxálico o bipyridina se han utilizado para mantener el Fe(III) en soluciones cercanas a pH neutro promoviendo así la reacción de Fenton únicamente al mantener el Fe(III) solubilizado, sin estos ligandos el Fe(III) comienza a precipitar sobre pH 5.00[36]. Sin embargo, estos ligandos carecen de actividad

reductora de hierro que poseen, por ejemplo, los ligandos derivados del 1,2-dihidroxibenceno o catecol (1,2-DHB) [37,38].

Los sistemas Fenton conducidos por ligandos (CMF por su sigla en inglés *Chelator-Mediated Fenton reaction*) utilizan ligandos de Fe(III) que tienen como característica principal el reciclaje de Fe(II) por la reducción de Fe(III). Este ciclo catalítico le permite mantener una producción sostenida de ROS, siempre que exista H₂O₂ en el medio de reacción. Estos sistemas han sido particularmente estudiados con 1,2-DHB ya que estos se encuentran presentes en diferentes sistemas biológicos, en seres humanos como catecolaminas (epinefrina, norepinefrina, dopamina), en plantas como lignina, en bacterias como enterobactinas, en suelo como ácidos húmicos etc., además todos estos organismos se encuentran en contacto con Fe(III) como parte de su metabolismo. Por esta razón, se han utilizado 1,2-DHB como modelos de vías de oxidación en sistemas biológicos [19,39–42].

Mentasti *et al.* [43] determinó que los 1,2-DHB se oxidan a quinona en una reacción de 2 etapas, primero la oxidación de la 1,2-DHB con la reducción Fe(III) a Fe(II), seguido de la oxidación de la semiquinona a quinona con la reducción de un segundo Fe(III) (ec. 4) [25,44]. Sumado a lo anterior, Deiana *et al.* en 1992 [45], Pracht *et al.* En 2001 [46], Xu *et al.* en 2001 [7] y Tamaru *et al.* en 2019 [47] han demostrado que la reducción de Fe(III) puede continuar con la posterior oxidación de derivados de catecol como guaiacol, ácido cafeico y ácido-2,3-dihidroxibenzoico hasta CO₂, reportándose relaciones estequiométricas de hasta 12 moles de Fe(III) reducidos por cada mol de los compuestos mencionados. Estas reducciones no estequiométricas son atribuidas a las oxidaciones sucesivas durante la mineralización del mismo 1,2-DHB (ec. 5 y 6), potenciando de esta manera la producción de ·OH a través de la reacción de Fenton [46].



1.4. Chelator-Mediated Fenton reaction

Salgado et al [48] estudio el efecto de un sustituyente en los 1,2-DHB según el índice de Hammet [49,50], de la sustitución en posición 4 en el anillo, considerando sustituyentes donadores de densidad electrónica (EDG – Electron Donating Group) y sustituyentes sustractores de densidad electrónica (EWG – Electron Withdrawing Group). En este trabajo se demostró que la capacidad del sistema para generar $\cdot\text{OH}$ responde a la característica electrónica del ligando, lo que además involucraría una diferencia el mecanismo de reducción de Fe(III) [51]. Así se ha postulado que los ligandos EDG liberan la semiquinona y el Fe(II) reducido al medio de la reacción (reaccionando más tarde con H_2O_2), por su parte los ligandos EWG retendrían el Fe(II) en la esfera de coordinación y el H_2O_2 debe reaccionar con el monocomplejo de Fe(II) (figura 3). Sumado a lo anterior, la capacidad de reducir Fe(III) y generar especies de alta valencia de hierro también se reportaron que respondían a la característica electrónica del ligando [48]. Sin embargo, estos mecanismos aún se encuentran en estudio, ya que solo se pudo detectar $\cdot\text{OH}$ e ion ferril.

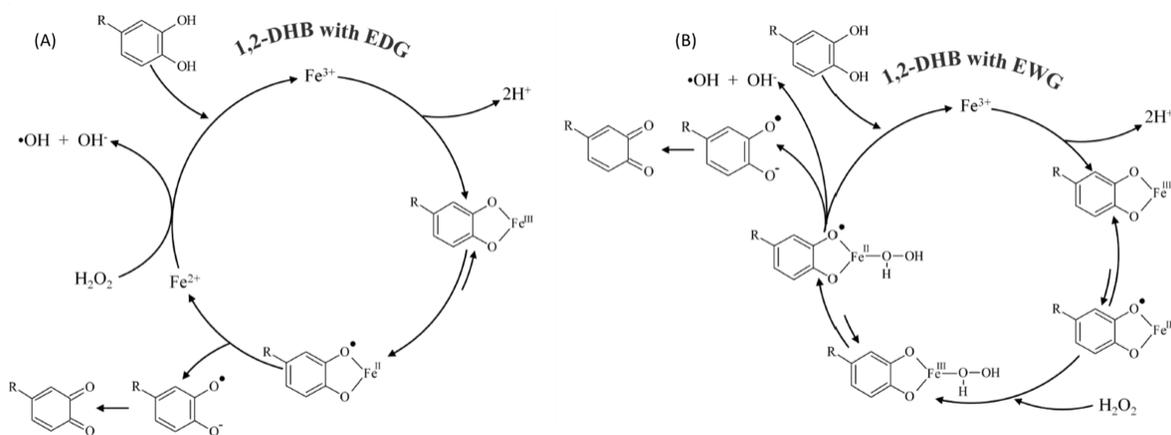


Figura 3. Mecanismo propuesto para los sistemas CMF con ligandos (A) donadores de densidad electrónica (EDG) y (B) sustractores de densidad electrónica (EWG) [51].

El $\cdot\text{OH}$ generado durante el ciclo redox de Fenton ha sido extensamente estudiado ya que debido a su alto poder oxidante su principal aplicación es en el campo del tratamiento de aguas residuales en la remoción de compuestos químicos recalcitrantes y micro contaminantes [4,52–55]. El efecto que tiene el $\cdot\text{OH}$ sobre el ciclo redox en los sistemas estudiados en la presente investigación es, no obstante, limitado, ya que por su alta reactividad se desactiva en reacciones de condensación con otros radicales ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2\text{H}$, semiquinona), con H_2O_2 (generando $\cdot\text{O}_2\text{H}$) o mineralizando las quinonas procedentes de los 1,2-DHB [25,56]. Por otro lado, en tratamiento de aguas por ejemplo, el $\cdot\text{OH}$ lleva a cabo reacciones de oxidación y mineralización de los compuestos presentes en la. La oxidación de compuestos que den origen a reductores de Fe(III), se ha propuesto como un mecanismo secundario en el aumento del rendimiento de la reacción de la Fenton, ya que se han reportado reducciones no estequiométricas de hasta 12:1 Fe(III):2,3-DHBA en donde se propone a los intermediarios de la oxidación como los responsables de continuar con reducción de Fe(III) manteniendo así el Fe(II) y consecuentemente la reacción de Fenton activa mientras el sistema tenga H_2O_2 disponible [7,46].

Por otro lado, Barb y colaboradores [57], postulo por primera vez la participación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en la reducción de Fe(III), esta hipótesis fue estudiada más tarde por otros autores sugiriendo este mecanismo como la potencial fuente de Fe(II) en agua de mar.

Sin embargo, para estudiar la participación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en el ciclo de Fenton, este es generado por métodos externos (xantina/xantina oxidasa o radiólisis) [58,59]. En estos sistemas llamados “sistemas generadores de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ” es estudiada la reducción de Fe(III) en presencia de atrapadores de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ (superóxido dismutasa/catalasa), demostrando la participación activa de este radical en la reducción de Fe(III). El uso de enzimas obliga a usar pH cercanos al neutro, estabilizando el Fe(III) con ligandos no reductores como EDTA [38,60,61].

La participación del $\cdot\text{O}_2\text{H}$ generado en el ciclo redox de Fenton, no ha sido determinada directamente [48]. A pesar de que existe evidencia cinética y termodinámica de su generación [22,62], existe poca evidencia espectroscópica de la participación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ [48]. Uno de los principales inconvenientes es la utilización de H_2O_2 en exceso que puede reaccionar con el $\cdot\text{O}_2\text{H}$ e interferir con la detección [30]. Por lo tanto, la participación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en sistemas CMF se aborda en el presente trabajo de investigación utilizando concentraciones de H_2O_2 menores.

1.5. Efecto del pH en el ciclo redox de Fenton

El pH es uno de los factores más importantes a considerar al llevar a cabo estudios sobre la capacidad del ciclo redox de Fenton de generar ROS [63–65].

La disponibilidad y estabilidad de las diferentes especies Fe(III) en una solución acuosa varía según el pH, y con ello la capacidad del sistema para generar ROS. A pH 3.00, se registra el máximo de la reacción de Fenton el cual coincide con el monohidroxocomplejo de Fe(III) (figura 4-(A)) y con el monoperoxocomplejo de Fe(III) [22], de la misma forma, el índice de coordinación de los complejos de 1,2-DHB con Fe(III) dependen estrechamente del pH (figura 4-(B)), de manera general encontramos los monocomplejos bajo pH 5.00; biscomplejos entre pH 5.00 y 8.00 y triscomplejos sobre pH 8.00 (figura 5) [48].

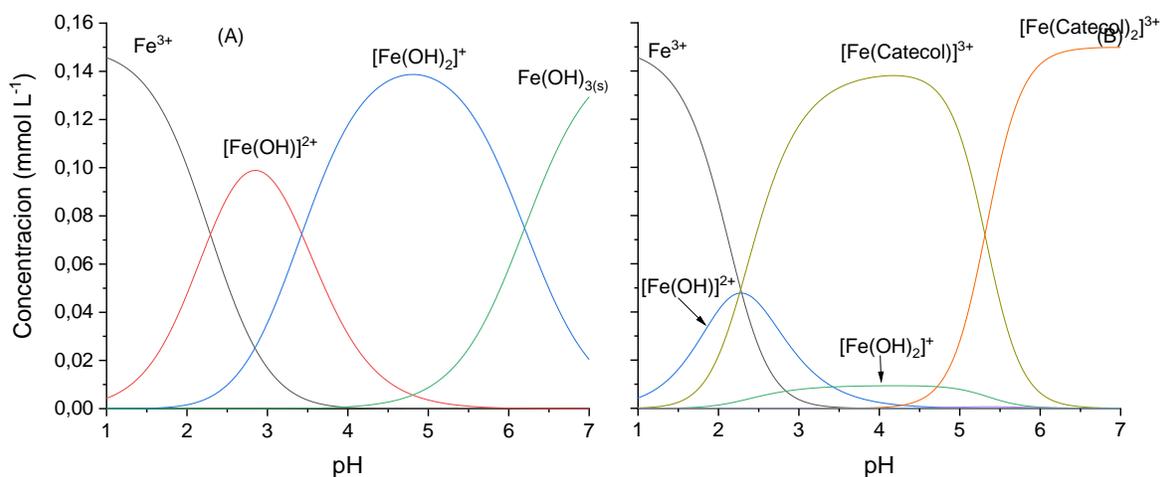


Figura 4. Especiación de (A) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$, (B) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ y catecol $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$

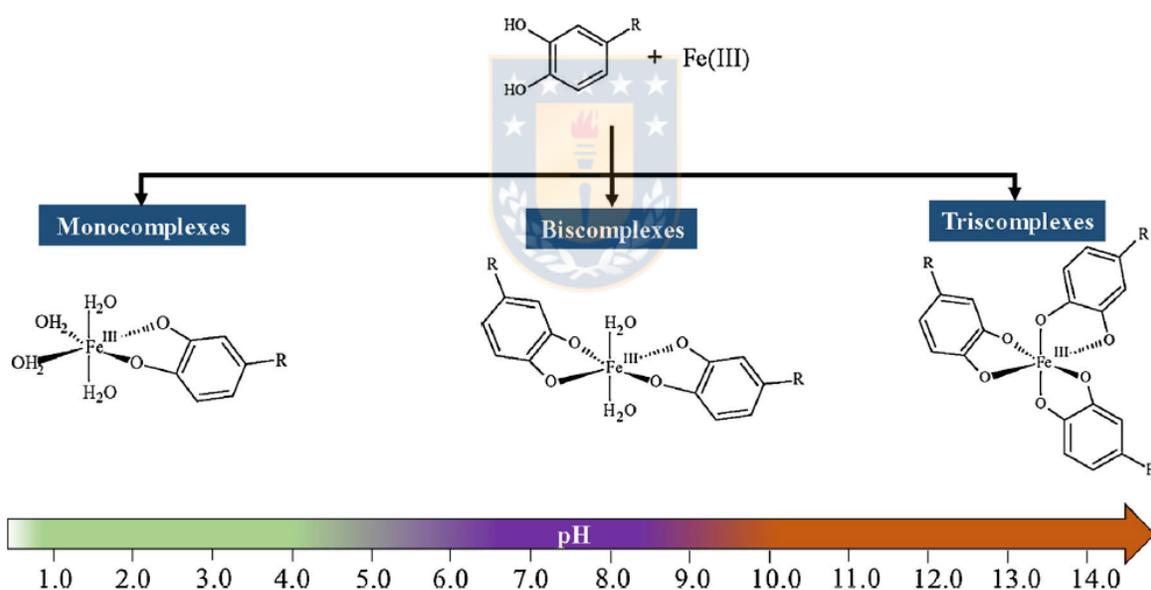


Figura 5. Dependencia del pH en el índice de coordinación de complejos de Fe(III) con 1,2-DHB [48]

Los efectos directos en el cambio del índice de coordinación se observan, como fue mencionado, en la capacidad del sistema para generar radicales; de esta forma, con monocomplejos se ve favorecido el $\cdot\text{OH}$ y en los biscomplejos posiblemente la formación de

especies hipervalentes de hierro (Fe(IV)) ya que los 2 ligandos aportarían estabilidad extra al metal central, este efecto estabilizador se ha reportado con la utilización de otros ligandos y en presencia de triscomplejos no se han detectado de ROS [48,66]. Otro efecto directo es la pérdida en la reducción de Fe(III) con el pH donde no observa reducción sobre pH 7.00 [48].

1.6. Propuesta de investigación

A pesar de la evidencia que existe de la producción de $\cdot\text{OH}$ y su relación con el pH en los sistemas CMF, no existen estudios que profundicen en la generación de otros productos radicalarios, la relación entre ellos, ni el impacto que pueden tener ellos sobre el ciclo redox de Fenton, considerando que podrían potencialmente tener una participación activa en el reciclaje de hierro. La sistematización de esta información utilizando 1,2-Dihidroxibencenos aporta las condiciones en las cuales son generados los distintos ROS en los sistemas Fenton mediados por ligandos y de esta manera a la construcción de sistemas predictivos para la construcción de sistemas Fenton optimizados en la producción de ROS selectivamente.



HIPÓTESIS

Debido a la diferencia de mecanismo involucrada en la reducción de Fe(III) por parte de los 1,2-DHB sustractores y dadores de densidad electrónica, existirán condiciones óptimas que permitan la generación selectiva de cada una de las especies reactivas del oxígeno.

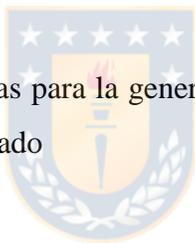


OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones de reacción del sistema tipo-Fenton ferroso conducido por ligandos tipo 1,2-DHB para la generación selectiva de especies reactivas de oxígeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los perfiles de producción de $\cdot\text{OH}$ en sistemas tipo-Fenton ferroso conducido por 1,2-DHB
2. Determinar los perfiles de producción de radical perhidroxilo en sistemas tipo-Fenton ferroso conducido por 1,2-DHB
3. Determinar los perfiles de producción de oxígeno singlete en sistemas tipo-Fenton ferroso conducido por 1,2-DHB
4. Identificar las condiciones óptimas para la generación selectiva de las diferentes especies reactivas según el 1,2-DHB utilizado



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

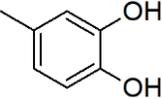
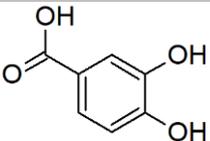
2.1. Reactivos y procedimientos generales

Nitrato ferroso ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$), ferrozina, fluoruro de potasio (KF), 1,2-dihiroxibenceno, 4-t-Butil-1,2-dihidroxi-beno, 4-metil-1,2-dihidroxi-benceno, ácido-2,3-dihiroxi-benzoico, 4-nitro-1,2-dihiroxi-benceno y p-nitrosodimetilanilina (RNO) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Estados Unidos); sulfato férrico ($\text{Fe}(\text{SO}_4)$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2 , 30% w/w), nitrato de potasio (KNO_3), ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), azida sódica (NaN_3), EDTA, bisulfito de sodio fueron adquiridos en Merck. Los spin-trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO), α -4-pyridyl-1-oxide-N-t-butyl nitrona (POBN) y 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone hydrochloride (TEMPD) fueron adquiridos en Enzo LifeScience (Estados Unidos).

Los sistemas analizados serán entre pH 3,00 y 11,00 cada una unidad; entre pH 3,00 y 5,00 se ajustó agua utilizando HCl y NaOH en un pH-metro 3 Start Thermo Orion previo a cada experimento. Para los pH 6,00 a 11,00, la acidez se ajustó con soluciones amortiguadores no coordinantes de aminas terciarias tales como ácido 4-morfolin-etanosulfónico (MES, $\text{pK}_a=6,1$), ácido 1,4-piperazinadi-etanosulfónico (PIPES, $\text{pK}_a= 6,8$), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanosulfónico (EPPS, $\text{pK}_a= 8,0$), ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico (CHES, $\text{pK}_a= 9,3$) y ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico (CAPS, $\text{pK}_a= 10,4$), las sales de las soluciones amortiguadoras fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Todos los compuestos fueron utilizados sin purificación adicional.

Todas las soluciones fueron preparadas el día del experimento en agua calidad nanopura (conductividad de $0.055 \mu\text{S cm}^{-1}$) previamente hervida y burbujeada con Ar para eliminar dióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2) disuelto respectivamente. La tabla 3 muestra la lista y abreviación de los 1,2-DHB utilizados.

Tabla 3. 1,2-DHB utilizados en el presente trabajo

Nombre	Formula	Abreviación	Característica electrónica
4-t-Butil-1,2-dihidroxi-beno		t-B-CAT	Dador de densidad electrónica
4-metil-1,2-dihidroxi-benceno		CH3-CAT	Dador de densidad electrónica
1,2-dihidroxi-benceno		CAT	
ácido-2,3-dihidroxi-benzoico		COOH-CAT	Sustractor de densidad electrónica
4-nitro-1,2-dihidroxi-benceno		NO2-CAT	Sustractor de densidad electrónica

Las concentraciones finales utilizadas (a menos que se indique otro valor) son H_2O_2 0.15 mmol L^{-1} , 1,2-DHB 1.5 mmol L^{-1} y Fe(III) o Fe(II) 0.15 mmol L^{-1} . Para los experimentos en EPR, se utilizó una concentración de spin-trap de 40 mmol L^{-1} . El Fe(III) o Fe(II) siempre fue agregado al último para iniciar la reacción. La tabla 4 resume la composición de los sistemas utilizados

Tabla 4. Composición de los sistemas ensayados.

Sistema	H ₂ O ₂	Hierro	1,2-DHB
Fenton	✓	Fe(II)	×
Tipo-Fenton	✓	Fe(III)	×
CMF-t-But-CAT	✓	Fe(III)	t-But-CAT
CMF-CH ₃ -CAT	✓	Fe(III)	CH ₃ -CAT
CMF-CAT	✓	Fe(III)	CAT
CMF-COOH-CAT	✓	Fe(III)	COOH-CAT
CMF-NO ₂ -CAT	✓	Fe(III)	NO ₂ -CAT

2.2. Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS) por EPR

A fin de verificar la presencia de los diferentes ROS generados por los sistemas de la tabla 4, la detección de estos se realizó mediante espectroscopia paramagnética de spin (EPR) en un espectrómetro EMX micro con una cavidad ER 4119HS y una celda de flujo de cuarzo de 4 capilares (AquaX4) (Bruker).

Los parámetros fueron fijados a una potencia de microondas de 2,000 mW, modulación de frecuencia de 100kHz, atenuación de señal de 20 dB (previo “tuning” a 33 dB para activación de “Q-value” (parámetro de cuantificación)). Con un campo central a 3515 G se realizó un barrido de 80 G con velocidad de lectura de 10 s y 100 ms entre lecturas, de esta forma fueron tomados los espectros durante 10 minutos.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el algoritmo de “spin count” incluido en el software “Xenon” del proveedor (Bruker). El algoritmo convierte el área de la doble integral de la señal obtenida a cantidad absoluta de spin (ec. 7) [67], relacionándolo luego con el volumen de la celda. Para el cálculo de volumen se utilizó 18 $\mu\text{L cm}^{-1}$ y una longitud de 4 cm.

$$N_S = \frac{DIV}{P_{1/2} B_m Q c S(S+1) n_B f(B_1, B_m)} \quad (\text{ec. 7})$$

N_S : Cantidad de spin en la muestra; DI: doble integral; V: volumen; P: potencia de microondas; B_m : modulación de amplitud; Q: “Q-value”; c: factor de calibración del resonador; S; spin electrónico; n_B : Factor de Boltzmann; $f(B_1, B_m)$: perfil de campo del resonador

2.2.1. Detección de $\cdot\text{OH}$

Reactores de 5 mL de los sistemas de la tabla 4 fueron preparados utilizando DMPO como spin-trap. La alícuota de Hierro fue añadida al último para iniciar la reacción, inmediatamente fue aspirado en una jeringa e inyectada a la celda de flujo del equipo para comenzar la medición.

Para la construcción de los perfiles de producción de $\cdot\text{OH}$ en función del tiempo y pH, se consideró el máximo de intensidad del espectro obtenido del pico central izquierdo de la señal del aducto DMPO-OH (figura 6-(A))



2.2.2. Detección de $\cdot\text{O}_2\text{H}$

Reactores de 5 mL de los sistemas de la tabla 4 fueron preparados utilizando POBN como “spin-trap”. La alícuota de Hierro fue añadida al último para iniciar la reacción, inmediatamente fue aspirado en una jeringa e inyectada a la celda de flujo del equipo para comenzar la medición.

Para la construcción de los perfiles de producción de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en función del tiempo y pH, se consideró el máximo de intensidad del espectro obtenido del pico izquierdo del doblete central del aducto DMPO- O_2H (figura 6-(B))

2.2.3. Detección de $^1\text{O}_2$

Reactores de 5 mL de los sistemas de la tabla 4 fueron preparados utilizando TEMPD como “spin-trap”. La alícuota de Hierro fue añadida al último para iniciar la reacción,

inmediatamente fue aspirado en una jeringa e inyectada a la celda de flujo del equipo para comenzar la medición.

Se utilizaron concentraciones finales 10 veces mayores que los otros ROS para lograr la detección del aducto TEMPD- $^1\text{O}_2$. Debido a la alta relación señal/ruido, se realizaron 30 lecturas para la obtención de cada espectro durante 45 minutos.

El análisis de $^1\text{O}_2$ en función del pH se realizó con el área integrada del último espectro obtenido.

2.3. Detección de $^1\text{O}_2$ por degradación de alcohol furfurilico (FFA)

Un cromatografo Waters compuesto por un desgasificador (Waters 1500), bomba binaria (Waters 1525), autosampler (Waters 2707), horno (Waters 1500) y detector PDA (Waters 2998) fue utilizado para analizar todas las muestras. Se utilizó una columna Supelcogel 8H de intercambio catiónico (Sigma-Aldrich) fue utilizada con una fase móvil H_2SO_4 0.005 mol L^{-1} con un flujo isocrático de 0.5 ml min^{-1} .

Reactores de 50 mL fueron preparados y mantenidos en agitación constante durante 1 hora, alícuotas de 0.500 mL fueron tomadas a los 0, 10, 20,30, 60 s, luego cada 5 minutos hasta los 30 minutos de reacción y cada 10 minutos hasta completar la hora. La alícuota fue colocada en un tubo eppendorf que contenía 1.5 mL de EDTA o bisulfito de sodio. Las muestras fueron filtradas con filtro de jeringa de $0.22 \mu\text{m}$ e inyectadas al HPLC.

2.4. Detección de $^1\text{O}_2$ por decoloración de p-nitrosoanilina (RNO)

Se utilizó un protocolo previamente reportado sin cambios [68,69], donde se sigue espectrofotométricamente (Agilent DAD 8453) a 440 nm la decoloración de RNO. El oxígeno singlete producido reacciona con L-histidina para formar un peroxocomplejo transanular y este reacciona más tarde con RNO, la estequiometría de la reacción es 1:1 y por lo tanto puede ser cuantificado según la decoloración de RNO.

2.5. Detección de semiquinonas por EPR

La obtención del espectro de EPR de las semiquinonas fue realizado con los mismos parámetros utilizados en la detección de los ROS. Sin embargo, para las semiquinonas no necesario el uso de “spin trap” debido a que el decaimiento de la señal fue más lento, permitiendo una detección directa. 5 mL de buffer CAPS a pH 11,00 con 0,200 mL de 1,2-DHB fueron mezclados e inyectados inmediatamente a la celda de flujo de EPR, se registró el decaimiento de la señal por 10 min.

2.6. Reducción de Fe(III) por método ferrozina

La reducción de Fe(III) conducida por los diferentes 1,2-DHB por si solos, sistemas tipo-Fenton y CMF fue realizado mediante el método de ferrozina.

Reactores de 50 mL fueron preparados y mantenidos en agitación constante, alícuotas de 0,500 mL fueron tomadas a 0,5, 1, 2, 5 y 10 minutos y colocadas en tubos eppendorf que contenían 1.5 mL de una mezcla de ferrozina/KF ($3 \text{ mmol L}^{-1} / 1 \text{ mol L}^{-1}$) en buffer acetato $0,050 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 4,00. La reacción entre el Fe(II) (reducido desde Fe(III) por los diferentes sistemas) y la ferrozina forma un complejo coloreado el cual fue seguido espectrofotométricamente a 562 nm. Para la cuantificación de Fe(II) reducido por lo sistemas, se realizó una curva de calibración del complejo de ferrozina con Fe(II) en buffer acetato $0,050 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 4,00.

Para verificar la reducción de Fe(III) en ausencia de $\cdot\text{O}_2\text{H}$, se utilizó el mismo procedimiento descrito, pero a los sistemas se añadió POBN 40 mmol L^{-1} previo a la adición de Fe(III)

2.7. Determinación de la concentración de 1,2-DHB en sistemas CMF

A fin de determinar la variación en la concentración de 1,2-DHB en los sistemas CMF, se realizó un seguimiento cinético de cada 1,2-DHB en el máximo de absorción de la 1,2-DHB; t-But-CAT ($\lambda_{\text{max}}= 281 \text{ nm}$), CH₃-CAT ($\lambda_{\text{max}}= 283 \text{ nm}$), CAT ($\lambda_{\text{max}}= 278 \text{ nm}$), COOH-CAT ($\lambda_{\text{max}}= 284 \text{ nm}$) y NO₂-CAT ($\lambda_{\text{max}}= 345 \text{ nm}$). Para la cuantificación de la 1,2-DHB, se realizaron curvas de calibración para todos los 1,2-DHB a pH 3,00



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Perfiles de producción de ROS en sistemas Fenton y CMF

Las principales especies radicalarias producidas en la reacción de Fenton y los sistemas relacionados son, $\cdot\text{OH}$; $\cdot\text{O}_2\text{H}$ y $^1\text{O}_2$ [2]. Para comprender los mecanismos que dirigen el ciclo redox de Fenton es importante conocer la variación en la producción de estas especies tanto en función del pH, como en función de la adición de 1,2-DHB reductores de Fe(III). Otra especie radicalaria originada en los sistemas CMF son las semiquinonas de los respectivos DHB, a pesar que estas quedan fuera del objetivo del presente trabajo de investigación, su detección será revisada en esta sección.

La detección de $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2\text{H}$ y $^1\text{O}_2$ fue realizada con atrapadores de spin (spin-trap) DMPO, POBN y TEMPD respectivamente. Los aductos formados de la reacción de cada spin-trap con su radical (DMPO/OH, POBN/O₂H, TEMPD/¹O₂) son paramagnéticos y es posible detectarlo utilizando EPR, cada uno posee una señal única para cada radical (figura 6) [70–72].

El rango de pH estudiado fue de 3,00 a 11,00 para todos los ROS, para el caso de $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2\text{H}$ no se detectó señal sobre pH 6,00. Para $^1\text{O}_2$ se detectó la señal del aducto sobre pH 7,00, sin embargo, para la detección de este radical se debió aumentar 10 veces las concentraciones finales de Fe(III), catecol y H₂O₂.

Es importante mencionar, que los aductos formados (spin-trap/radical) son reactivos y pueden reaccionar con Fe(III) y H₂O₂ en reacciones de desactivación que derivan en compuestos diamagnéticos los cuales son inactivos en EPR [73,74]. A pesar de que en el presente trabajo se utilizan concentraciones de Fe(III) y H₂O₂ que minimizan este efecto, no se puede descartar la desactivación de los aductos por estos mecanismos. Además se asume que la velocidad de desactivación es la misma para todos los sistemas.

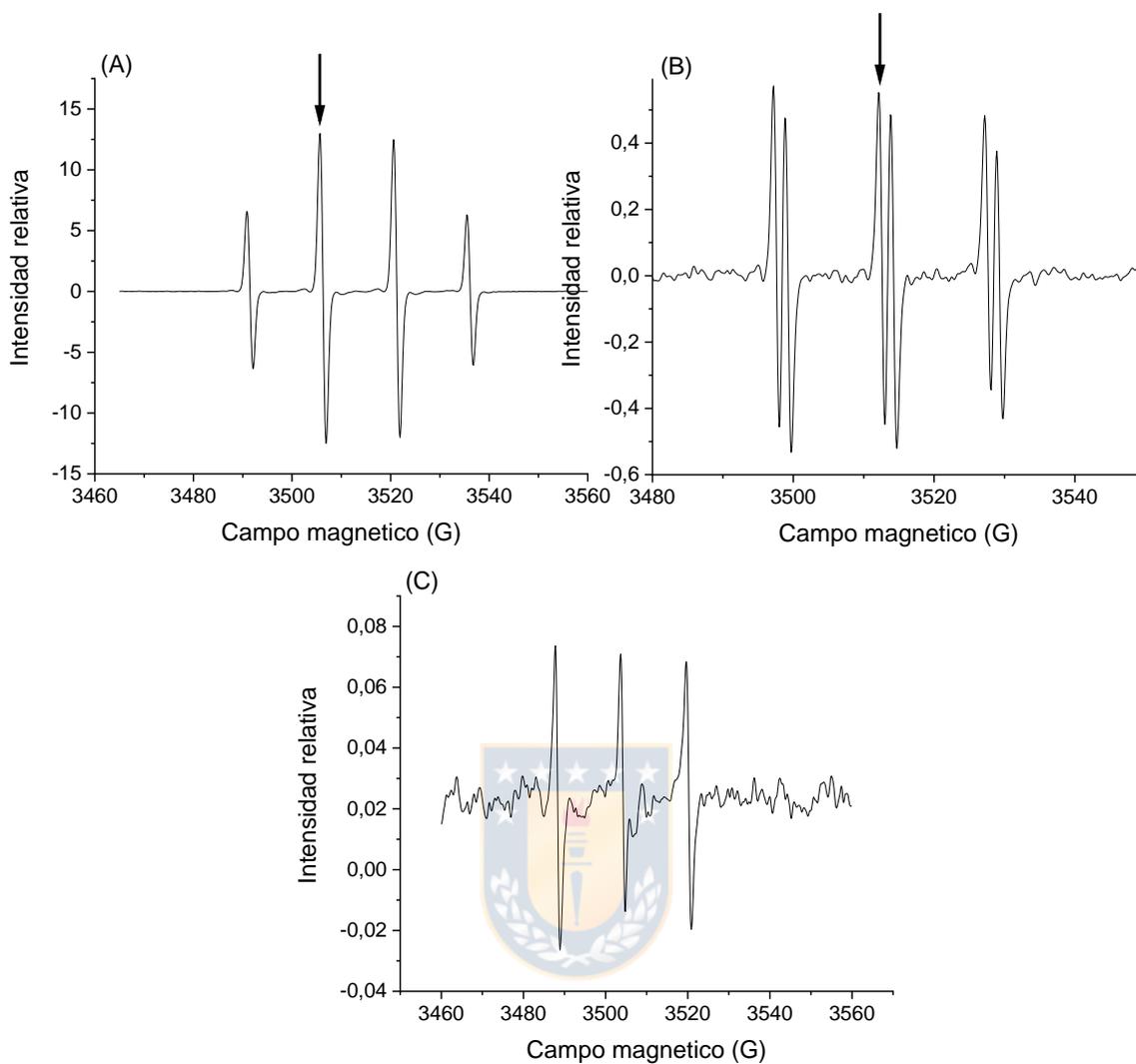


Figura 6. Espectros de EPR de los aductos (A) DMPO/OH, (B) POBN/O₂H y (C) TEMPD/¹O₂. La flecha indica el pico considerado para construir perfiles de producción (construcción propia).

3.2. Perfiles de producción de $\cdot\text{OH}$

Los perfiles de $\cdot\text{OH}$ (figura 7) se expresan como la variación en el tiempo de la intensidad relativa del respectivo espectro EPR del pico central izquierdo del aducto DMPO/OH (figura 6-(A)). La señal fue confirmada comparando las constantes de acoplamiento a^{N} y a^{H} con bases de datos [75]. En la mayoría de los sistemas estudiados, se detectó la señal del aducto DMPO/OH, sin embargo, en los sistemas tipo-Fenton, CMF-CAT, CMF-COOH-CAT y CMF-NO₂-CAT a pH 6,00, no se detectó señal del aducto en las condiciones utilizadas (Anexo 1).

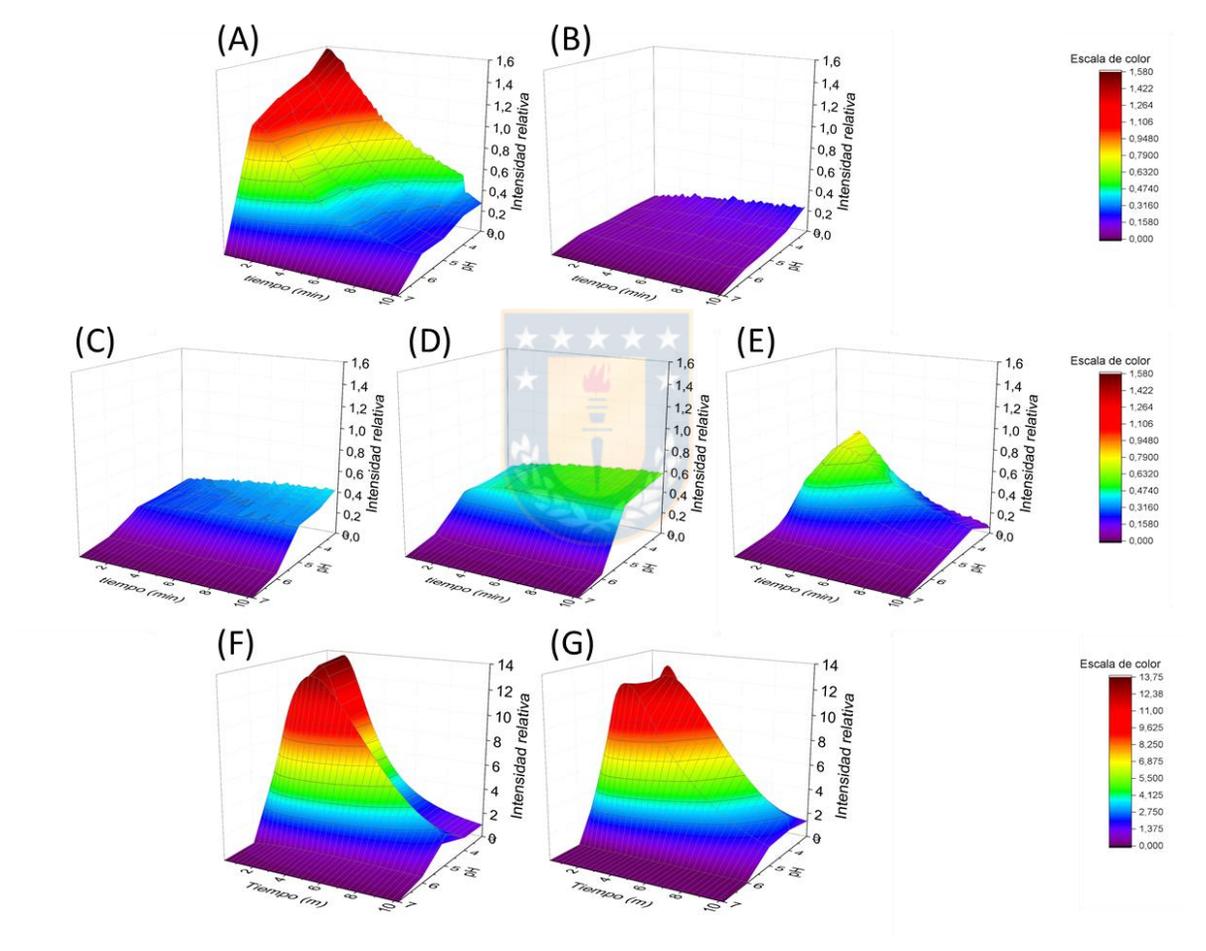


Figura 7. Perfiles de producción de $\cdot\text{OH}$ en función del tiempo y pH en sistemas (A) Fenton, (B) Tipo Fenton, (C) CMF- NO₂-CAT, (D) CMF – COOH-CAT, (E) CMF - CAT, (F) CMF – CH₃-CAT, (G) CMF- t-But-CAT. Para una mejor visualización, los gráficos A al E se encuentran en la misma escala de intensidad (a la derecha) y los gráficos F y G tienen una escala propia.

Los perfiles de producción de $\cdot\text{OH}$ para todos los sistemas se resume en la figura 7. Debido a que los sistemas CMF- $\text{CH}_3\text{-CAT}$ y CMF- t-But-CAT presentan intensidades relativas 10 veces mayor que el resto de los sistemas y a fin de mejorar la visualización de los resultados, esta figura se encuentra dividida en 2 grupos, el primero consiste en los gráficos del (A) al (E) y el segundo corresponde a los gráficos (F) y (G), cada grupo con su propia escala de intensidad.

Para el sistema Fenton entre pH 3,00 y 6,00 (figura 7-(A)), desde la primera medición (realizada a los 10 segundos) se observa la señal del aducto disminuyendo, sugiriendo que el máximo es previo al primer punto de medición, lo cual es consistente con el mecanismo descrito, ya que el producto principal de la reacción de Fenton es el $\cdot\text{OH}$ y el pH óptimo se encuentran entre 3,00-4,00 [17,76]. Al aumentar el pH, la generación de radical disminuye progresivamente hasta pH 6,00.

A pH 7,00 ya no es detectable el aducto a pesar que según la especiación de Fe(II) (figura 8) las especies que participan en la reacción de Fenton (Fe(II) y el hidroxocomplejo $[\text{Fe}(\text{OH})]^+$) se encuentran disponibles hasta pH 9,00, más aun la constante de velocidad de $[\text{Fe}(\text{OH})]^+$ en la reacción de Fenton es 9.2×10^4 veces mayor que el Fe(II), pero su concentración 2.8×10^6 menor (figura 8-inserto). Lo anterior ha sido explicado anteriormente por varios autores, donde la disponibilidad de estas especies se ve afectada sobre pH 6,00. Según el diagrama de Pourbaix, sobre pH 4,00 el Fe(II) se encuentra en equilibrio con Fe_2O_3 , sin embargo este equilibrio se encuentra desplazado hacia el Fe(II) hasta pH 6,00. A pH 7,00, el potencial entre ambos es 0 y el equilibrio se desplaza hacia el Fe_2O_3 , el óxido precipita y no ocurre reacción de Fenton. En consecuencia la reacción de Fenton no es posible sobre pH 7,00 [22,77,78].

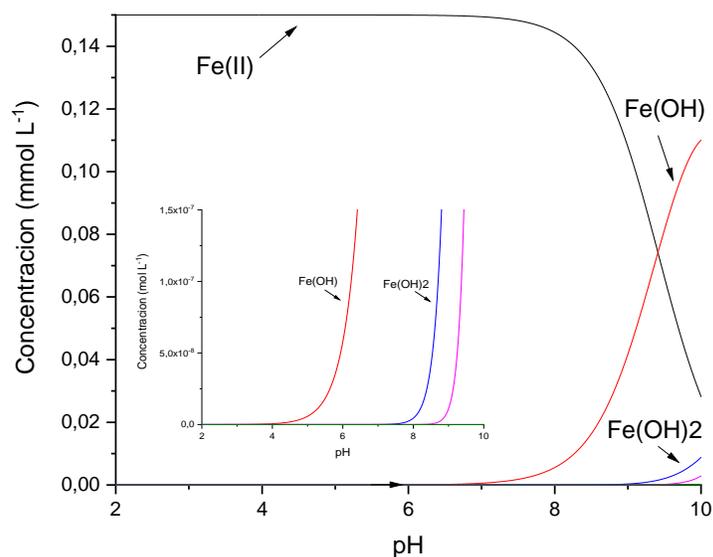


Figura 8. Especiación de $\text{Fe}(\text{SO}_4)$ $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$. Inserto; se observa la presencia de $\text{Fe}(\text{OH})^+$ desde pH 4,00



Contrariamente a lo anterior, en el sistema tipo-Fenton (figura 7-(B)) se observa un aumento progresivo de la señal del aducto durante los 10 minutos de seguimiento de la reacción en el rango de pH de 3,00 a 5,00, sin un máximo observado. El $\text{Fe}(\text{II})$ generado como producto de la reacción tipo-Fenton debería reaccionar con H_2O_2 para producir $\cdot\text{OH}$, sin embargo, los sistemas contenían una relación 1:1 con H_2O_2 , el cual a luego de los dos minutos se encuentra bajo el límite de detección de la técnica utilizada (20 nmol L^{-1}) y es utilizado en la reacción tipo-Fenton (generando $\cdot\text{O}_2\text{H}$, figura 10-(B)), por tanto la generación de $\cdot\text{OH}$ se ve disminuida

En los sistemas CMF, los ligandos de hierro intervienen en forma directa promoviendo la reducción de $\text{Fe}(\text{III})$, permitiendo que el $\text{Fe}(\text{II})$ generado reacciones con H_2O_2 para llevar a cabo la reacción de Fenton, a continuación se discute el uso de ligandos tipo DHB y su efecto en la producción de $\cdot\text{OH}$

La figura 7 (C-G) muestra el efecto del ligando sobre la producción de $\cdot\text{OH}$ en el rango de pH de 3,00 a 7,00. Es posible observar que al utilizar ligandos EWG (Nitrocatecol y Acido-2,3-

dihroxibenzoico) la señal aumenta progresivamente similar a lo observado en el sistema tipo-Fenton. El uso de catecol en sistemas CMF muestra un máximo de cercano a los 2 minutos de reacción, seguido de una disminución de la señal. Finalmente los ligandos EDG (Metilcatecol y t-Butilcatecol) (figura 7 (F) y (G)) muestran un rápido aumento en la generación de $\cdot\text{OH}$ con un máximo cercano a los 2 minutos, al igual que el catecol, es seguido de una disminución de la señal, el máximo de estos sistemas, sin embargo, corresponde a aumento entre 15 y 30 veces mayor comparado con los otros DHB y 60 veces mayor comparado con el sistema tipo-Fenton (ver escala).

En 2017 fue propuesto un mecanismo de la reducción de Fe(III) por ligandos EWG y EDG, en los primeros, el Fe(III) es reducido en una reacción no favorecida, y es mantenido en la esfera de coordinación hasta que reacciona con H_2O_2 , liberando el $\cdot\text{OH}$, el Fe(III) y la semiquinona. En contraste, los ligandos EDG liberan a la solución el Fe(II) reducido para reaccionar con H_2O_2 [51]. Esta diferencia en el mecanismo podría explicar la diferencia que se observa en la generación del $\cdot\text{OH}$. En ligandos EWG, la reducción no favorecida y el hecho que el ligando se mantenga en la esfera de coordinación de Fe(II) entorpeciendo la entrada de H_2O_2 , estaría ralentizando la generación del radical lo cual se evidencia en el aumento progresivo durante los 10 minutos de reacción. En contraste los ligandos EDG al liberar el Fe(II) a la solución permite una reacción más rápida con el H_2O_2 y en consecuencia se observa la rápida generación del $\cdot\text{OH}$.

3.3. Perfiles de producción de $\cdot\text{O}_2\text{H}$

El spin trap utilizado para la detección de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ (POBN) puede reaccionar en menor proporción con $\cdot\text{OH}$, mostrando un espectro característico para cada especie radicalaria. La confirmación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en los sistemas se realizó por la comparación de constantes de acoplamiento obtenidas con las de literatura, el aducto POBN-OH (figura 9-(A)) tiene una constante de acoplamiento con nitrógeno ligeramente más grande y una constante de acoplamiento con un segundo hidrogeno. Por otro lado el aducto POBN- O_2H solo posee un acoplamiento con nitrógeno y un hidrogeno (figura 9-(B)) [71,79]. Por otro lado, se puede observar que la producción de radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en sistema tipo-Fenton (figura 7 (B) y 10

(B)) es diferente sugiriendo que la cantidad de $\cdot\text{OH}$ atrapada por el POBN es mínima. Finalmente las constantes de acoplamiento del aducto obtenido experimentalmente se coinciden con el POBN- O_2H (figura 9-(C)). A pesar de todo, no se pudo descartar la posible captura de $\cdot\text{OH}$ por POBN. Para evitar este efecto totalmente, se puede utilizar BMPO en lugar de POBN, el cual reacciona selectivamente con $\cdot\text{O}_2\text{H}$, sin embargo el costo hizo prohibitivo su uso.

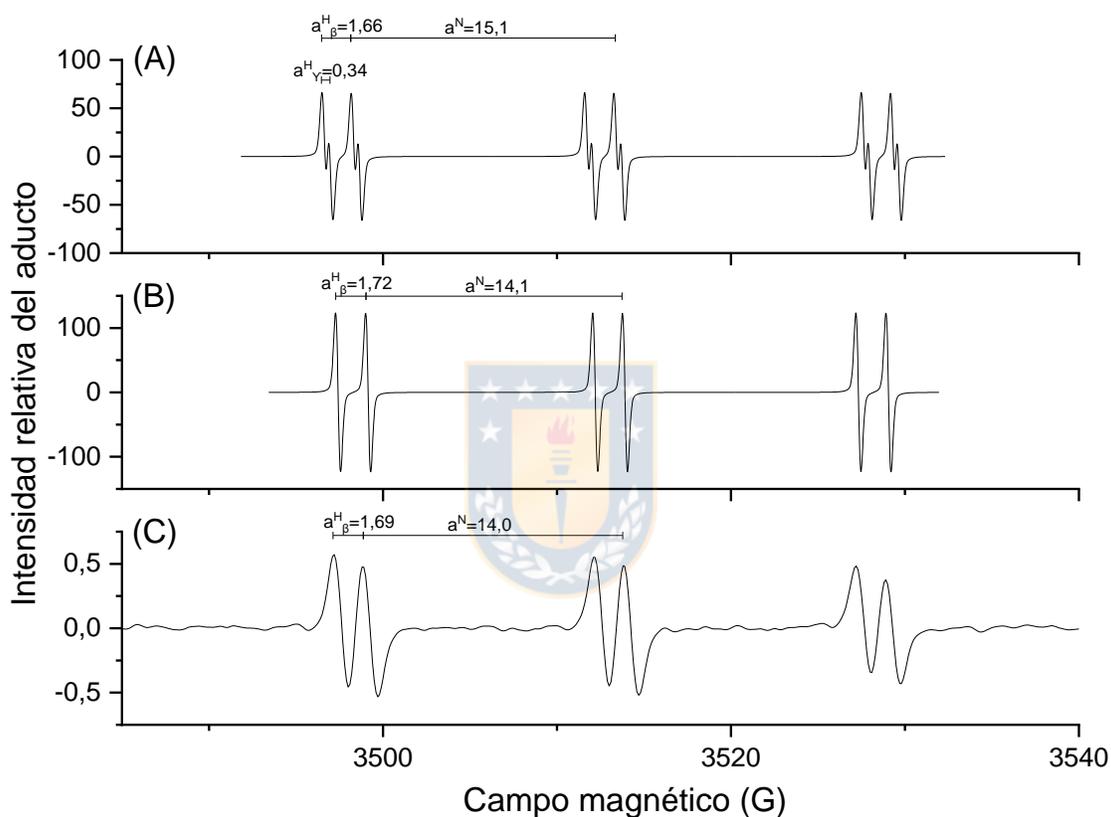


Figura 9. Espectros de EPR teóricos para los aductos (A) POBN- O_2H , (B) POBN/ O_2H y experimental para el aducto (C) POBN- O_2H . (A) $a^{\text{N}}=15,1$, $a_{\beta}^{\text{H}}=1,66$, $a_{\gamma}^{\text{H}}=0,34$; (B) $a^{\text{N}}=14,1$, $a_{\beta}^{\text{H}}=1,72$; (C) $a^{\text{N}}=14,0$, $a_{\beta}^{\text{H}}=1,69$.

Los perfiles de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ se expresan como la variación en el tiempo de la intensidad relativa del pico central izquierdo del aducto POBN- O_2H (figura 6-(B)). En ninguno de los sistemas fue detectada la señal del aducto a pH 6,00, a todos los otros pH la señal fue detectada excepto a pH 5,00 para tipo-Fenton y CMF- NO_2 -CAT (anexo 2).

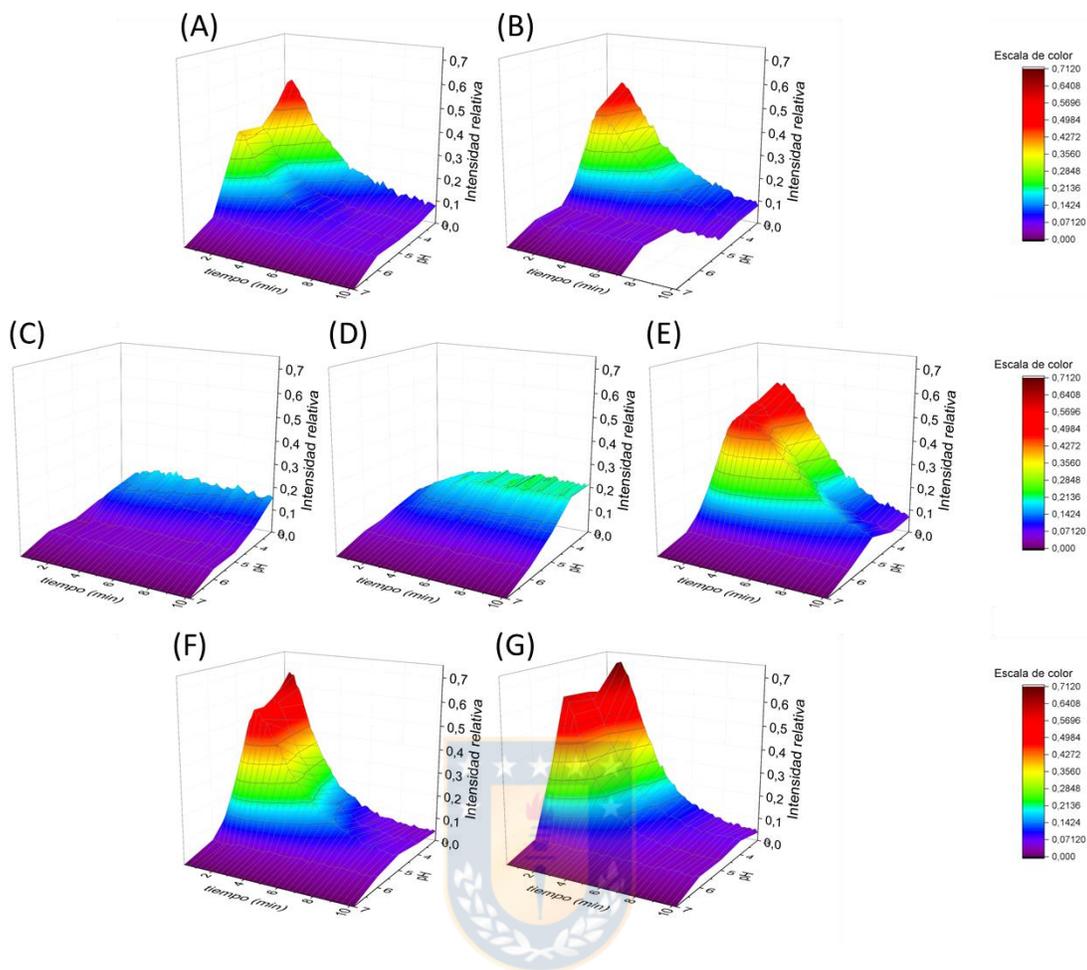


Figura 10. Perfiles de producción de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en función del tiempo y pH en sistemas (A) Fenton, (B) Tipo Fenton, (CCMF- NO_2 -CAT, (D) CMF – COOH -CAT, (E) CMF - CAT, (F) CMF – CH_3 -CAT, (G) CMF- t-But-CAT.

Los perfiles de producción del $\cdot\text{O}_2\text{H}$ para todos los sistemas se resume en la figura 10. A diferencia de los perfiles de $\cdot\text{OH}$, los de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ se presentan todos en la misma escala de intensidad ya que no se observaron diferencias importantes en su intensidad.

En la figura 10-(A), se puede observar al sistema Fenton con un máximo a pH 3,00 en la intensidad del aducto entre los 2 y 3 minutos de reacción, el cual se mantiene hasta pH 5,00, siendo la reacción de $\cdot\text{OH}$ con H_2O_2 (ec. 8) la principal fuente de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en este sistema, el radical es luego detectado con POBN. La reacción del $\cdot\text{OH}$ con H_2O_2 (ec. 8) produce $\cdot\text{O}_2\text{H}$ rápidamente, esta reacción es una de las fuentes de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en la reacción de Fenton entre pH

3,00 y 5,00, el $\cdot O_2H$ es luego detectado con POBN [80]. A pH 6,00, sin embargo, no se observa la señal del aducto POBN- O_2H a pesar de detectarse $\cdot OH$ sugiriendo mecanismos más rápidos de desactivación del radical.

En los sistemas tipo-Fenton ($Fe(III) / H_2O_2$), es reconocida la producción de $\cdot O_2H$ y $Fe(II)$ directamente (ec. 3) [16], y por tanto es esperado un máximo en la intensidad del $\cdot O_2H$ (figura 10-(B)) sin una producción de $\cdot OH$ (figura 7-(B)), ya que el H_2O_2 es utilizado por $Fe(III)$ principalmente (figura 2). Por otro lado, el máximo de intensidad a los 2 minutos es observado únicamente a pH 3,00 y 4,00, lo cual coincide, según la especiación, a los máximos del monohidroxocomplejo $[Fe(OH)]^{2+}$ y monoperhidroxocomplejo $[Fe(OOH)]^{2+}$, ambos con una alta reactividad en esta reacción. A pH 5,00 la concentración de ambos es mínima y la especie principal encontrada a este valor es el dihidroxocomplejo $[Fe(OH)_2]^+$, cuya reactividad en la reacción de Fenton es baja (figura 4) [22,81,82].

El efecto del ligando en los sistemas CMF (figura 10-(C-G)) es similar a lo obtenido con $\cdot OH$. Los máximos de intensidad se observan solo hasta pH 5,00. Además, no se observa una diferencia tan aguda entre los ligandos EDG, EWG y catecol, sugiriendo que la formación de $\cdot O_2H$ no tiene una relación directa con la formación de $\cdot OH$. Las potenciales fuentes de $\cdot O_2H$ en los sistemas CMF son:



La ec. 3 es lenta y al tener 1,2-DHB en el sistema, no se verá favorecida, por otro lado el H_2O_2 se consumirá principalmente en la reacción con el $Fe(II)$ reducido por los 1,2-DHB; por lo tanto, la principal fuente de $\cdot O_2H$ provendrá de la reacción de la SQ con oxígeno. Desde este

punto de vista la producción de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ no dependería de $\cdot\text{OH}$ como ocurre en la reacción de Fenton.

3.4. Relación $\cdot\text{OH} / \cdot\text{O}_2\text{H}$

A fin de conocer la capacidad de los sistemas estudiados para generar selectivamente un radical sobre otro, se calculó la relación en la producción de $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ($r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}}$), sin embargo, los tiempos en los cuales se alcanza el máximo para cada radical no coinciden totalmente, por lo tanto se presentan a continuación los resultados de dos análisis realizados, por un lado la relación entre $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2\text{H}$ de todos los sistemas dependiendo del pH (tabla 3), donde los sistemas fueron clasificados en 3 grupos según la $r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}}$, y a continuación los máximos según el pH y tiempo que son detectados (figura 11).

Tabla 5. Intensidad relativa máxima de $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2\text{H}$ y $r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}}$ para todos los sistemas a los pH estudiados. * Solo detección de $\cdot\text{OH}$. N.D. No detectado.

pH	Fenton			Tipo-Fenton			CMF-t-Butilcatecol			CMF-Metilcatecol		
	OH	OOH	OH/OOH	OH	OOH	OH/OOH	OH	OOH	OH/OOH	OH	OOH	OH/OOH
3	1,58	0,55	2,89	0,25	0,54	0,46	12,84	0,71	18,07	13,73	0,66	20,76
4	1,39	0,37	3,77	0,15	0,44	0,34	12,70	0,60	21,10	13,41	0,57	23,40
5	1,27	0,39	3,27	0,11	N.D	*	12,49	0,61	20,40	13,12	0,56	23,25
6	1,10	N.D	*	N.D	N.D	--	0,08	N.D	*	0,55	N.D	*

pH	CMF-Catecol			CMF-Acido-2,3-dihidroxibenzoico			CMF-Nitrocatecol		
	OH	OOH	OH/OOH	OH	OOH	OH/OOH	OH	OOH	OH/OOH
3	0,81	0,58	1,39	0,59	0,22	2,62	0,45	0,20	2,25
4	0,75	0,53	1,43	0,56	0,23	2,37	0,37	0,15	2,51
5	0,58	0,52	1,12	0,52	0,14	3,83	0,33	N.D	*
6	N.D	N.D	--	N.D	N.D	--	N.D	N.D	--

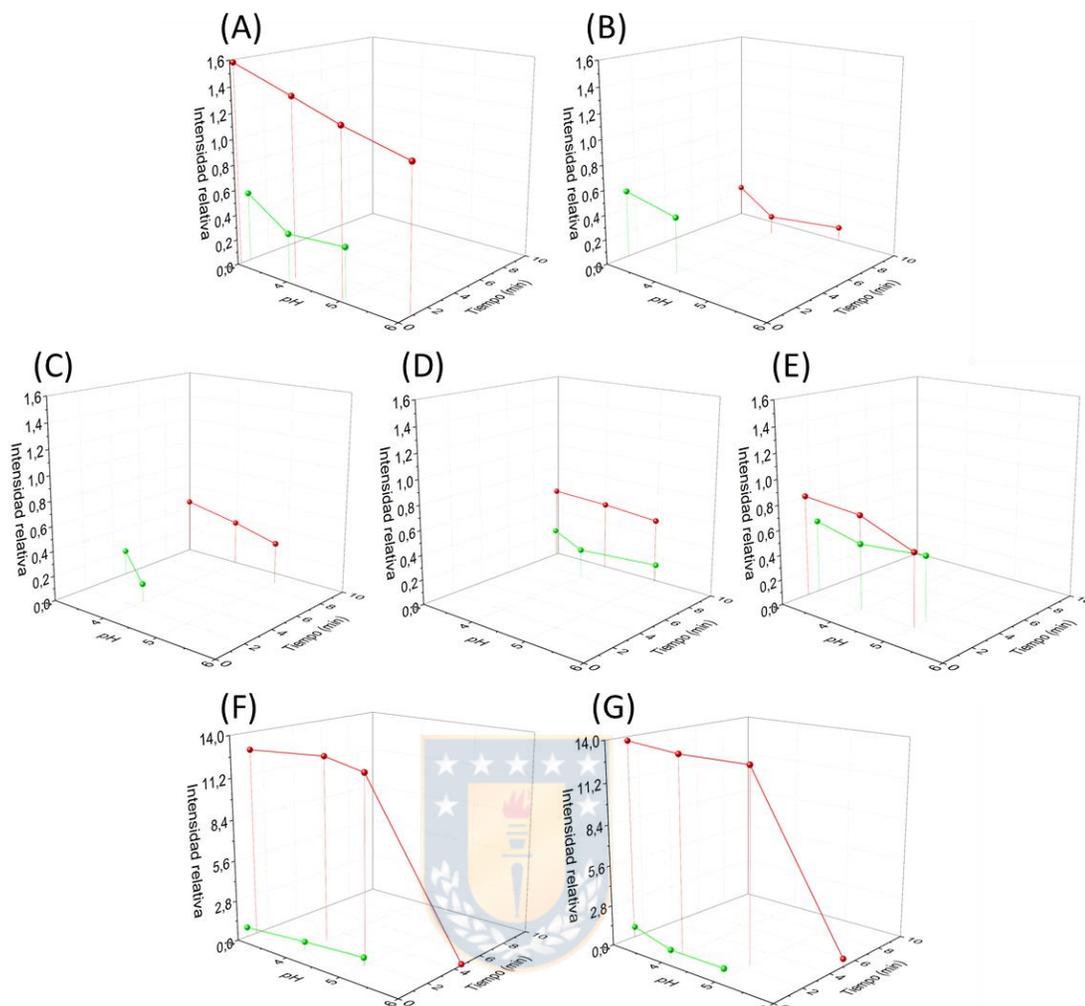


Figura 11. Perfiles de producción de $\cdot\text{OH}$ (rojo) y $\cdot\text{O}_2\text{H}$ (verde) con dependencia de tiempo y pH en los sistemas (A) Fenton, (B) Tipo-Fenton, (C) CMF-t-But-CAT, (D) CMF- CH_3 -CAT, (E) CMF-CAT, (F) CMF-COOH-CAT, (G) CMF- NO_2 -CAT. Para una mejor visualización, los gráficos A al E poseen una escala de intensidad diferente a los gráficos F y G.

De la tabla 3 se desprende que en la mayoría los sistemas estudiados se la producción de $\cdot\text{OH}$ es mayor que el $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ($r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}} > 1$) excepto la reacción tipo-Fenton (verde), más aun, el máximo de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ se encuentra al inicio de la reacción (figura 11), lo cual se esperaba de acuerdo al mecanismo de esta reacción genera $\cdot\text{O}_2\text{H}$ directamente (ec. 3) [16].

El siguiente grupo (tabla 3 (azul)) corresponde a los sistemas que muestran una leve preferencia por $\cdot\text{OH}$ sobre $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ($1.1 < r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}} > 3.77$) en rangos de tiempo cercanos, entre los cuales destaca la reacción de Fenton ya que esta reacción es conocida por la generación de grandes cantidad de $\cdot\text{OH}$ (ec. 2) [62], sin embargo, debido a la alta velocidad de la reacción ($k=76 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) no fue posible observar el máximo real [17]. En la primera medición realizada a los 10 segundos, la señal del aducto se encontraba disminuyendo, sugiriendo que el máximo real de la reacción ocurre previo a los 10 segundos y por limitaciones de la técnica no fue posible obtener mediciones en este rango de tiempos. Por lo tanto se espera que la $r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}}$ real de la reacción de Fenton sea mayor.

Como fue comentado, el uso de ligandos EWG muestran un aumento progresivo en la señal de ambos aductos durante los 10 minutos de reacción, con tal motivo es que las mayores intensidades para los aductos de los productos radicalarios de ambos ligandos de este grupo se observan pasado los 5 minutos de reacción, mostrando una ligera preferencia por $\cdot\text{OH}$ $r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}} \approx 2$.

El último grupo (rojo) en sistemas CMF con ligandos EDG muestran una $r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}} > 20$, con una cantidad de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ similar a los otros sistemas, lo cual da cuenta de una amplificación preferente de la generación de $\cdot\text{OH}$. Al comparar la $r_{\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2\text{H}}$ de ligandos EDG y EWG, sumado a la reducción de Fe(III), sugiere que la diferencia el mecanismo donde el Fe(II) es liberado (figura 3) [51] tiene un impacto directo sobre la generación de $\cdot\text{OH}$, no así en la de $\cdot\text{O}_2\text{H}$, apoyando la hipótesis que este último es producido en una etapa independiente del ciclo redox de hierro, por ejemplo en la oxidación de la semiquinona una vez que sale de la esfera de coordinación (ec. 9), esta idea ha sido considerada previamente en literatura [44,83,84].

Se realizó también la cuantificación de las especies radicalarias utilizando el software de Bruker, únicamente se obtuvieron valores para $\cdot\text{OH}$ debido a que la relación señal/ruido de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ era muy alta y afectaba el cálculo de la doble integral, por lo tanto la cuantificación de spin no era replicable. La tabla 6 muestra la concentración de $\cdot\text{OH}$ a pH 3,00, donde se obtuvo la mayor generación.

Tabla 6. Concentración de $\cdot\text{OH}$ por método "spincount"

Sistema	Concentración de $\cdot\text{OH}$ a pH 3,00 (mmol L^{-1}) (promedio \pm SD)
Fenton	0.22 \pm 0.02
Tipo-Fenton	0.07 \pm 0.01
CMF-t-But-CAT	0,62 \pm 0,01
CMF-CH ₃ -CAT	0,59 \pm 0,02
CMF-CAT	0,16 \pm 0,06
CMF-COOH-CAT	0,05 \pm 0,01
CMF-NO ₂ -CAT	No cuantificable

A lo anterior, se suma que en determinadas condiciones se detecta selectivamente la generación de $\cdot\text{OH}$ debido a que la señal del $\cdot\text{O}_2\text{H}$ queda fuera de los límites de detección (tabla 3 (*)), sin embargo la cantidad de $\cdot\text{OH}$ es baja.

3.5. Detección y producción de $^1\text{O}_2$

El $^1\text{O}_2$ es una especie activa de corta vida media (3.5 μs) y existen varias formas de detectarlo entre las que destacan métodos radiactivos, no radioactivos, espectrofotométricos y EPR [85,86]. En nuestros sistemas, la generación de oxígeno singlete fue estudiado por medio de tres metodologías distintas, degradación de alcohol furfurilico (FFA) por HPLC, detección de sonda coloreada RNO y detección por spin trapping a través de la formación de un aducto activo en EPR. En este trabajo, se implementaron las tres técnicas mencionadas, sin embargo las dos primeras presentaron problemas de reproducibilidad y validación por lo tanto la detección de oxígeno singlete en los sistemas estudiados fue realizada por EPR.

3.5.1. Detección por RNO

Esta técnica de detección de oxígeno singlete se basa en la reacción de este con p-nitrosodimetilanilina (RNO), el cual actúa como atrapador selectivo de $^1\text{O}_2$. La reacción entre ambos se puede seguir espectrofotométricamente a 440 nm en la decoloración del RNO [68,69].

Con esta técnica no fue posible detectar $^1\text{O}_2$ en ninguno de los sistemas estudiados. Esto fue atribuido a los límites de detección de los métodos fotométricos y la baja concentración de oxígeno singlete.

3.5.2. Detección por degradación de alcohol furfurilico

El alcohol furfurilico (FFA) se ha reportado por ser un atrapador de oxígeno singlete y ha sido utilizado para confirmar la presencia de este ROS [87]. Sin embargo, también se ha reportado la reacción del FFA con $\cdot\text{OH}$ dando origen a diferentes productos según el mecanismo de reacción [88]. El objetivo de utilizar FFA en nuestros sistemas era conocer si existía preferencia en la generación de un radical sobre otro al realizando un seguimiento de los productos de degradación del FFA, utilizando ligandos de diferente espectro EDG o EWG.

Se desarrolló el método de separación de productos de reacción y se utilizó UHPLC-MS para la identificación de los productos de oxidación. Se identificaron los productos de la oxidación por el mecanismo de endoperoxido propio de oxígeno singlete según el mecanismo de Haag (figura 12) [89], pero con discrepancia entre los productos reportados por Richard [88]. A pesar de lo anterior se buscó una relación entre los productos de degradación de FFA y los sistemas utilizados.

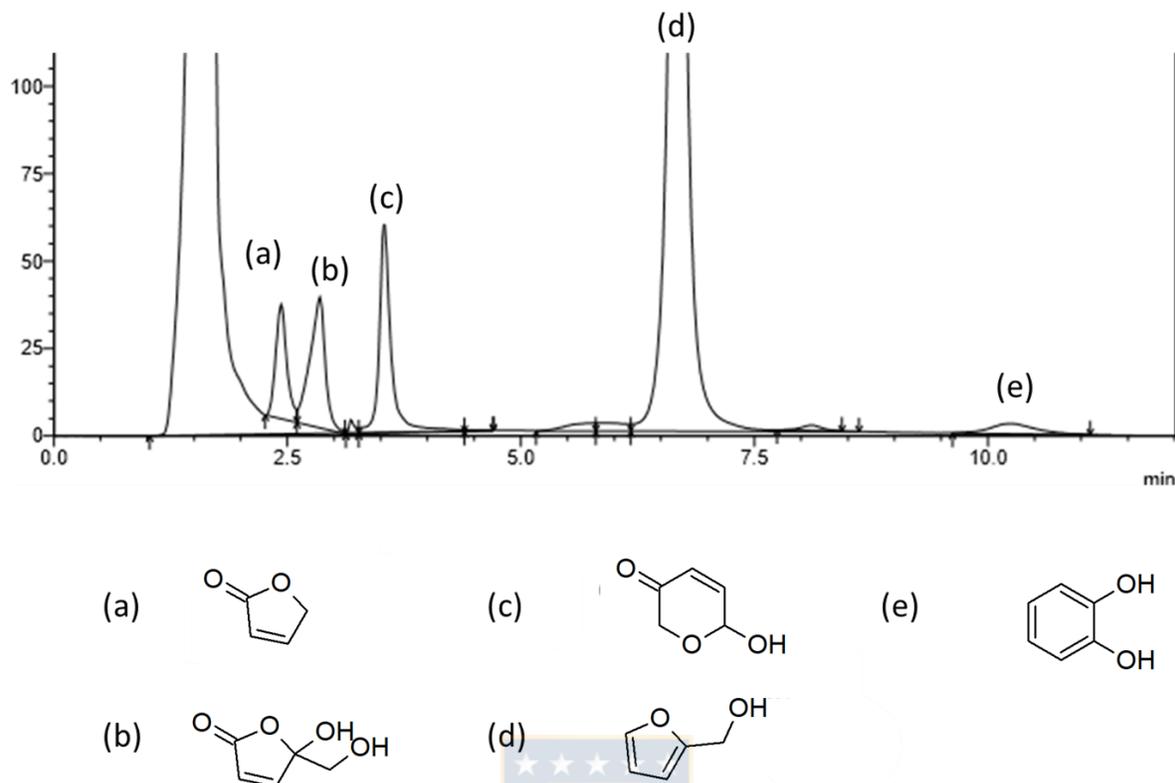


Figura 12. Cromatograma e identificación de productos de oxidación de FFA por UHPLC-MS

Se realizaron cinéticas de oxidación del FFA y se observaron diferencia del porcentaje de FFA degradado en función del pH, sin embargo la relación de los productos de oxidación era similar en todos los sistemas (figura 13). Más aun, debido al tiempo de inyección en HPLC entre muestras, la reacción debía ser detenida para evitar la oxidación de mas FFA en el vial, para lo anterior se agregó EDTA para secuestrar el Fe(III) y detener la reacción, sin embargo el tiempo de elución de EDTA evitaba la visualización de los productos de oxidación. Se eliminó el EDTA para visualizar todos los productos, pero el pico cromatografico de uno de los productos de oxidación eluia junto con el H_2O_2 remanente, nuevamente se evaluó el uso de dos estrategias para eliminar el H_2O_2 remanente y detener la reacción; catalasa y bisulfito de sodio, la primera no era viable debido a que en el rango de pH ensayado la enzima se desactiva, y por otro lado el bisulfito genera un problema similar al EDTA, el tiempo de elución evitaba visualizar otros productos de oxidación

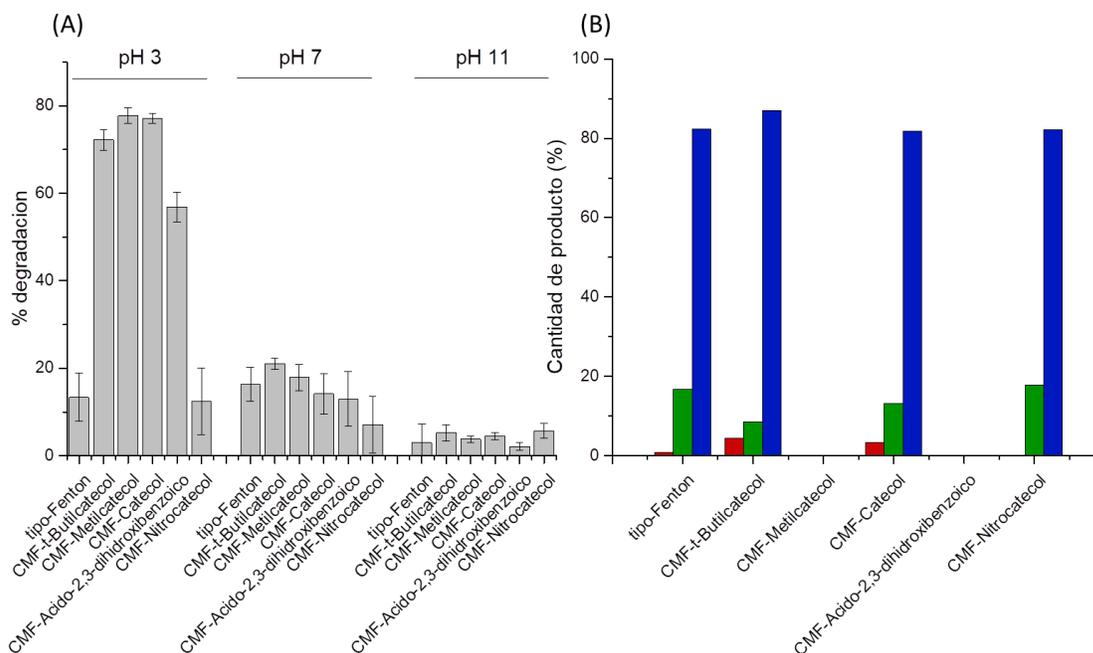


Figura 13. (A) %de degradación de FFA en los diferentes sistemas a los pH estudiados. (B) % de producción de cada uno de los productos de oxidación de FFA a pH 3,00, en rojo, verde y azul los productos (a), (b) y (c) de la figura 12 respectivamente

Considerando la poca estabilidad de los productos y las dificultades analíticas en su determinación, se evaluaron los mismos sistemas mediante la técnica de spin trapping y medición con EPR como técnica patrón para la determinación de $^1\text{O}_2$. En estas condiciones, la señal del oxígeno singlete no fue visible en las condiciones donde sí se observaba degradación de FFA. Por lo tanto y, se optó por no continuar la determinación de oxígeno singlete por métodos cromatográficos.

3.5.3. Detección por EPR

La producción de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) en los sistemas estudiados fue expresada en función del área de las 3 señales obtenidas en el espectro de EPR para el aducto $\text{TEMPD}/^1\text{O}_2$ (figura 6-(C)). A diferencia de los otros radicales, la señal del aducto fue detectada sobre pH 7,00 para sistemas CMF-CAT, sobre pH 9,00 para Fenton y solo a pH 11,00 para tipo-Fenton (anexo 3).

El oxígeno singlete ha es una especie reactiva del oxígeno no radicalaria que ha sido determinada en diversos sistemas s oxidantes [22,48,70]. Sin embargo, en las condiciones experimentales utilizadas en los sistemas oxidantes ensayados en el presente trabajo de tesis y en las condiciones de reacción para la generación de $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2\text{H}$, no se detectó la señal del aducto $\text{TEMPD}/^1\text{O}_2$. Cabe mencionar que Lin et al, reporto la producción de $^1\text{O}_2$ en sistemas Fenton por un método basado en quimioluminescencia y por la formación del aducto $\text{TEMPD}/^1\text{O}_2$, determinado por EPR [70]. Sin embargo, utilizaron condiciones de reacción distintas a las utilizadas en los experimentos descritos en el presente trabajo de tesis. Con el objetivo de verificar la correcta implementación de la técnica de cuantificación por EPR del aducto $\text{TEMPD}/^1\text{O}_2$, se realizaron experimentos adaptando las condiciones de reacción de este trabajo a las condiciones descritas por Lin et al [70]. Esto consistió en mantener la relación esteoquímica de los reactivos pero a concentraciones finales 10 veces mayores. En estas condiciones de reacción se determinó la presencia del aducto $\text{TEMPD}/^1\text{O}_2$ por su señal característica en EPR. Esta señal, solo fue detectada a valores de pH sobre 7,00. Sin embargo, las altas concentraciones de hierro, DHB y sus productos de oxidación contaminan la celda de flujo (AQUA CELL X) y generan acumulación de precipitados de difícil remoción. Estos problemas prácticos dificultan la reproducibilidad del método. Junto con lo anterior, cabe mencionar que para la obtención de del aducto $\text{TEMPD}/^1\text{O}_2$ cuantificable por EPR, se utilizaron concentraciones de reactivos que no son comparables con los resultados anteriores correspondientes a la determinación de $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2\text{H}$. Por esta razón, se descartó determinar la producción de $^1\text{O}_2$ en los demás sistemas ensayados (con los otros 1,2-DHBs ensayados).

Utilizando las concentraciones de reactivos semejantes a las descritas por Lin et al [70], para los sistemas Fenton, tipo-Fenton y CMF-CAT se observa la señal del oxígeno singlete, detectable desde pH 9,00, 11,00 y 7,00 respectivamente, la señal fue confirmada comparando las constantes de acoplamiento a^{N} y a^{H} utilizando hipoclorito/ H_2O_2 como control positivo y con la adición de NaN_3 (atrapador de $^1\text{O}_2$) verificando la desaparición de la señal (anexo 3) [90]. El $^1\text{O}_2$ es uno de los ROS menos estudiados en los sistemas Fenton por su baja vida media y dificultad de determinar por medio espectroscópicos. En la tabla 4 se resumen los principales mecanismos propuestos para la formación de $^1\text{O}_2$ en sistemas oxidantes semejantes a los estudiados en este trabajo de tesis. También se ha postulado la participación de especies hipervalentes de hierro ($\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}$) en etapas previas a la formación de $^1\text{O}_2$ [91].

Tabla 7. Principales mecanismos de generación de $^1\text{O}_2$ que involucran reacciones posibles en sistemas Fenton

Reacción	k	Referencia
$\text{O}_2^{\cdot-} + \cdot\text{OH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + ^1\text{O}_2$	1×10^{10}	[22,77]
$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}_2 + \frac{1}{2}^1\text{O}_2$	1×10^{10}	[77]
$\cdot\text{O}_2\text{H} + \cdot\text{O}_2\text{H} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + ^1\text{O}_2$	8.3×10^5	[22,77]
$\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}^1\text{O}_2$	5.5×10^9	[22]
$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + ^1\text{O}_2$	N.R.	[91]

Los resultados obtenidos (figura 14), muestran la producción de $^1\text{O}_2$ a valores de pH superiores a 7, esto ha sido reportado anteriormente en el rango de pH de 6 a 8 [70,91,92]. En contraste, en nuestro conocimiento no se ha reportado en literatura la producción de $^1\text{O}_2$ en todo el rango de pH (1 a 11) [48]. Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación discrepan con los mecanismos propuestos en la tabla 4, ya que no fueron detectados $\cdot\text{O}_2\text{H}$ u $\cdot\text{OH}$ a los valores de pH donde se obtuvo señal del aducto TEMPD/ $^1\text{O}_2$. Si bien estos resultados muestran que los sistemas CMF son capaces de aumentar la generación de $^1\text{O}_2$, el estudio de esta vía de reacción escapa del alcance de esta tesis. De esta forma, se puede concluir que en las condiciones de reacción ensayadas para la determinación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ y $\cdot\text{OH}$, no se detecta $^1\text{O}_2$, sin embargo este podría ser generado en concentraciones inferiores al límite de detección del método basado en EPR.

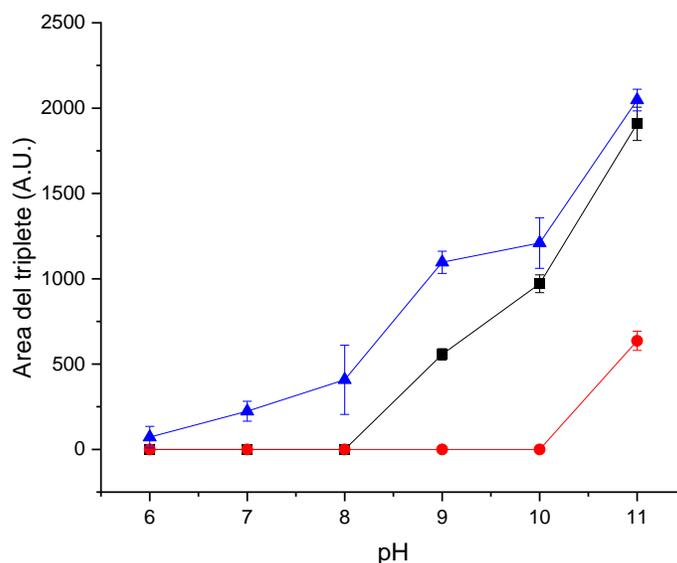
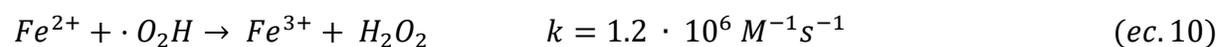


Figura 14. Perfiles de producción de $^1\text{O}_2$ en sistemas Fenton (●-rojo), tipo-Fenton (■-negro) y CMF-CAT (▲-azul)



3.6. Reducción de Fe(III) en sistemas CMF

Se evaluó la reducción de Fe(III) en sistemas tipo Fenton y CMF (figura 15). En los sistemas tipo-Fenton no se observó la producción de Fe(II) por reducción de Fe(III) a Fe(II) según ec. 3, sin embargo se observó $\cdot\text{O}_2\text{H}$ por la oxidación del H_2O_2 . La no detección de Fe(II) se puede explicar, en menor proporción, por su oxidación a través de la ración de Fenton (ec. 2) y principalmente por su oxidación a por $\cdot\text{O}_2\text{H}$ a través de la ec. 10 que es 10^6 veces más rápida que la reacción de Fenton[30].



En todos los sistemas CMF con DHB, se observó reducción de Fe(III). La cantidad y velocidad de reducción de Fe(III) no vario significativamente entre los ensayos realizados a valores de pH=3.00, 4.00 ,5.00 para los DHB t-But-CAT y CH_3 -CAT, mientras que CAT, COOH-CAT y NO_2 -CAT disminuyen la capacidad reductora de Fe(III) al aumentar el pH

entre 3,00, 4,00 y 5,00. Este efecto, está relacionado con el índice de coordinación de los DHB. Se ha descrito que solo los monocomplejos tienen actividad reductora de Fe(III) [42,48]. El rango de pH en los cuales el monocomplejo predominan para para t-But-CAT y CH₃-CAT es de 1,0-5,19; 1,0-5,08, para CAT y 1,0-4,19 para COOH-CAT y NO₂-CAT [48]. Por lo tanto para estos últimos sobre pH 4 el biscomplejo se encuentra en mayor proporción y por lo tanto la reducción de Fe(III) se observa disminuida.

La cantidad de Fe(III) reducido también presenta variaciones entre los ligandos EDG y EWG, donde los primeros muestran la mayor reducción de Fe(III) A pH 3 se presenta la mayor reducción de Fe(III) para todos los 1,2-DHB ensayados, lo cual es consistente con el pH de formación de monocomplejos [48] y con los resultados de generación de ·OH y ·O₂H. A pH 6,00 la cuantificación de Fe(II) se encuentra bajo el límite de detección de la técnica para todos los 1,2-DHB. Cabe mencionar que los complejos de Fe(III) con 1,2- DHB EDG son menos estables y más lábiles que los 1,2-DHB EWG[48,51]. Esto ha sido relacionado con las diferencias de mecanismos reportados por [51].



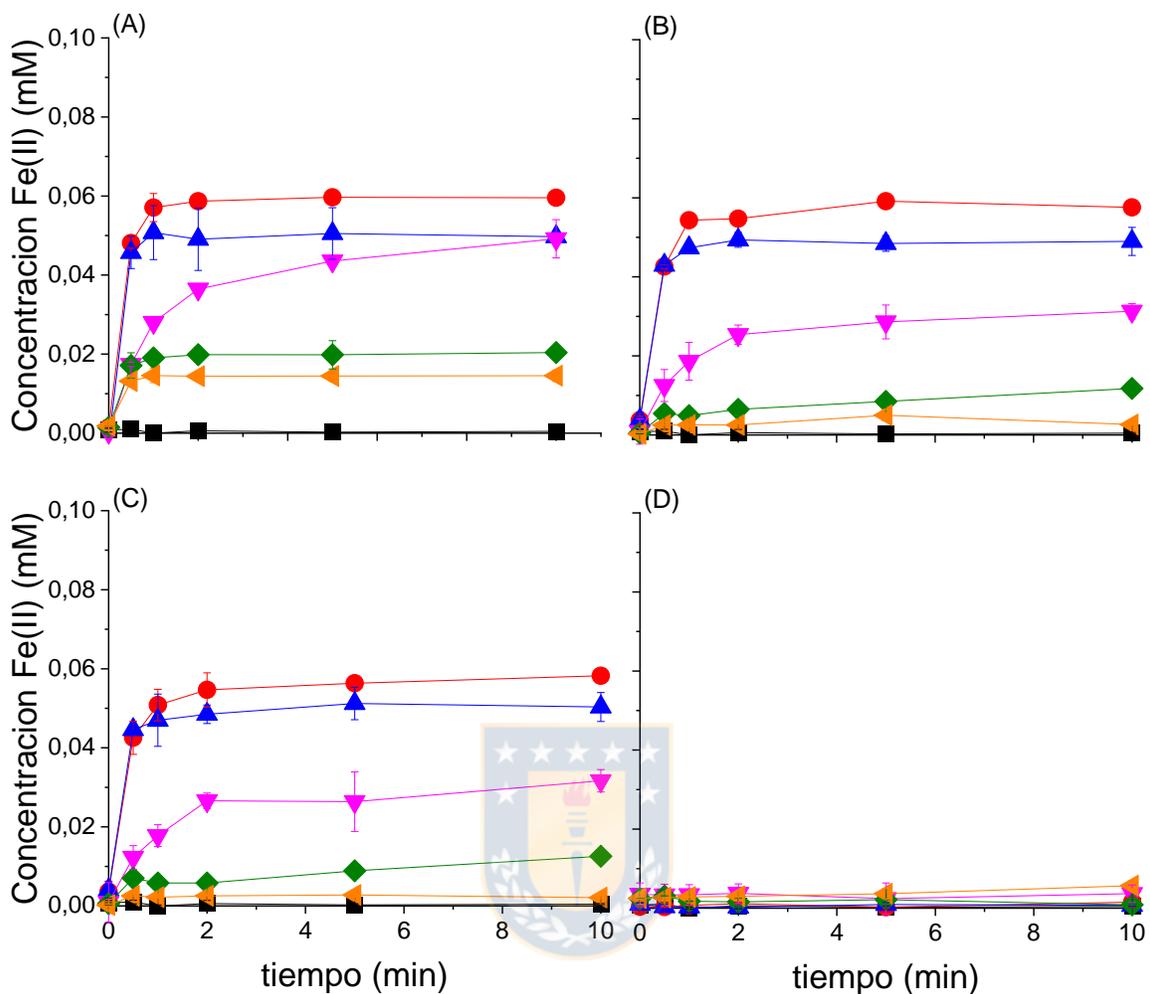


Figura 15. Perfiles de reducción de Fe(III) por método de ferrozina para los sistemas CMF a pH (A) 3,00, (B) 4,00, (C) 5,00 y (D) 6,00. (●-rojo) t-But-CAT, (▲-azul) CH₃-CAT, (▼-rosado) CAT, (◆-verde) COOH-CAT, (◄-naranja) NO₂-CAT, (■-negro) Tipo-Fenton.

3.7. Participación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en la reducción de Fe(III)

Para evaluar el efecto del $\cdot\text{O}_2\text{H}$ como reductor de Fe(III) [57–59], se utilizó POBN como atrapador de $\cdot\text{O}_2\text{H}$. La elección de POBN sobre otros atrapadores comúnmente utilizados se fundamentó en que la SOD no es activa en el rango de pH estudiado y la benzoquinona es parte de la familia de los DHB lo cual podría interferir en la , el medición de los sistemas [93,94].

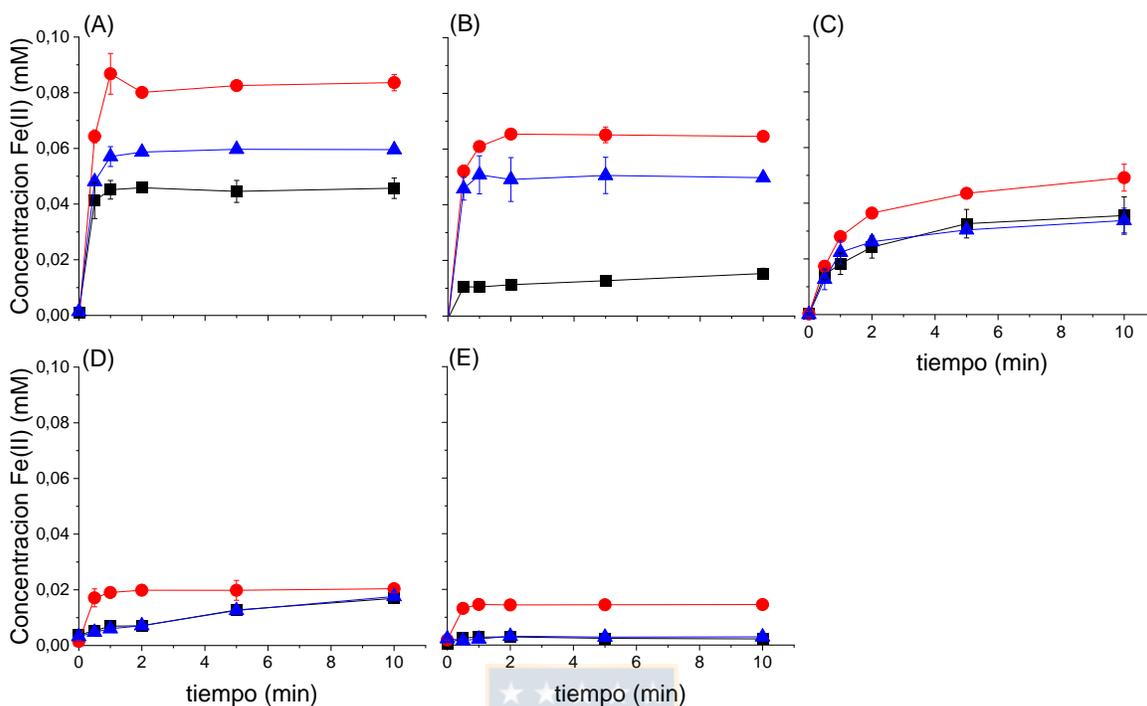


Figura 16. Reducción de Fe(III) a pH 3,00 en sistemas (A) CMF-t-But-CAT, (B) CMF- CH₃-CAT, (C) CMF-CAT, (D) CMF-COOH-CAT, (E) CMF- NO₂-CAT. (●-rojo) CMF, (▲-azul) DHB/Fe(III), (■-negro) CMF-POBN(+). Límite de detección de la técnica (0.02 mmol L⁻¹)

Se ensayó el efecto del POBN a pH 3,00 ya que se los sistemas muestran máxima reducción de Fe(III) y máxima producción de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ a este pH. La figura 16 muestra las curvas de reducción de Fe(III) en los 10 minutos de reacción para los sistemas; Fe(III) / 1,2-DHB (▲), Fe(III), 1-2-DHB y H₂O₂ (CMF) (●), luego al sistema anterior se hizo reaccionar en presencia de POBN (CMF-POBN(+)) (■) atrapando el $\cdot\text{O}_2\text{H}$ generado.

Tabla 8. Porcentaje del Fe(III) total reducido en cada uno de los sistemas ensayados. ^a p<0,01, ^b p<0,05 y ^c p<0,1

1,2-DHB	% Fe(III) reducido por el 1,2-DHB	% Fe(III) reducido por sistema CMF	% aumento en el Fe(III) reducido al agregar H ₂ O ₂	% Fe(III) reducido por sistema CMF-POBN (+)	% disminución en el Fe(III) reducido al agregar POBN en el sistema CMF
t-But-CAT	39,7	55,8	16,0 ^a	30,5	25,3 ^a
CH ₃ -CAT	33,1	43,0	9,9 ^b	10,2	32,8 ^a
CAT	22,5	32,8	10,3 ^b	23,7	9,1 ^b
COOH-CAT	11,7	13,6	1,9 ^c	11,3	2,3 ^c
NO ₂ -CAT	2,0	9,7	7,7 ^a	1,5	8,2 ^b

Todos los sistemas CMF reducen significativamente más Fe(III) que los sistemas donde solo participa el 1,2-DHB como reductor de Fe(III) (sin H₂O₂) (tabla 8) observándose un aumento en el Fe(III) reducido entre un 7 y 16%. En todos los casos, los sistemas CMF en presencia de POBN como atrapador de HOO reducen significativamente menos Fe(III) que los sistemas sin POBN (tabla 8), demostrando el rol del ·O₂H en la reducción de Fe(III) en los sistemas CMF. El rol del ·O₂H En la reducción de Fe(III) varía en función del tipo de ligando en el caso de los 1,2-DHB con sustituyentes EDG la disminución en la reducción de Fe(III) es 2 a 3 veces mayor que el aumento registrado al agregar H₂O₂ a los sistemas Fe(III)/1,2-DHB (tabla 8). Por otro lado, la reducción de Fe(III) en CMF-POBN(+) para ligandos CAT y COOH-CAT fue equivalente al aumento registrado al agregar H₂O₂ a los sistemas Fe(III)/1,2-DHB. Finalmente, con NO₂-CAT, solo la medición del sistema CMF-POBN(+) se encuentra sobre el límite de

detección de la técnica, sin embargo tiene la misma tendencia que CAT y COOH-CAT (figura 16).

Estos resultados sugieren la participación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en la reducción de Fe(III). Según las principales reacciones en los sistemas CMF reportadas en bibliografía, se propone el mecanismo de la figura 17 [30,56,80,95–97]. Las constantes reportadas corresponden a CAT, por lo tanto, se espera que las constantes para los otros 1,2-DHB de las reacciones 2, 3, 4 y 6 cambien ligeramente, disminuyendo para los ligandos EDG (por la estabilidad de la semiquinona) y aumentando para los ligandos EWG (por la inestabilidad de la semiquinona) (anexo 4). Los valores numéricos de las constantes de velocidad para estos ligandos no se encuentran reportados.

La reacción 2 y 3 de la figura 17, corresponde a la principal fuente de Fe(II) en sistemas sin de H_2O_2 (Fe(III)/1,2-DHB). Al agregar H_2O_2 , el oxígeno generado in-situ por la descomposición catalítica normal del H_2O_2 del ciclo redox Fe(III)/Fe(II) de Fenton (en menor cantidad en presencia de sustratos oxidables) [30], puede ser reducido por la semiquinona para producir $\cdot\text{O}_2\text{H}$ (reacción 9), esta reacción proporciona otra fuente de Fe(II), explicando el aumento en la reducción en sistemas CMF. Sin embargo, esta reacción se encuentra compitiendo con reducción de semiquinona a 1,2-DHB (reacción 7) y la regeneración de H_2O_2 (reacción 8).

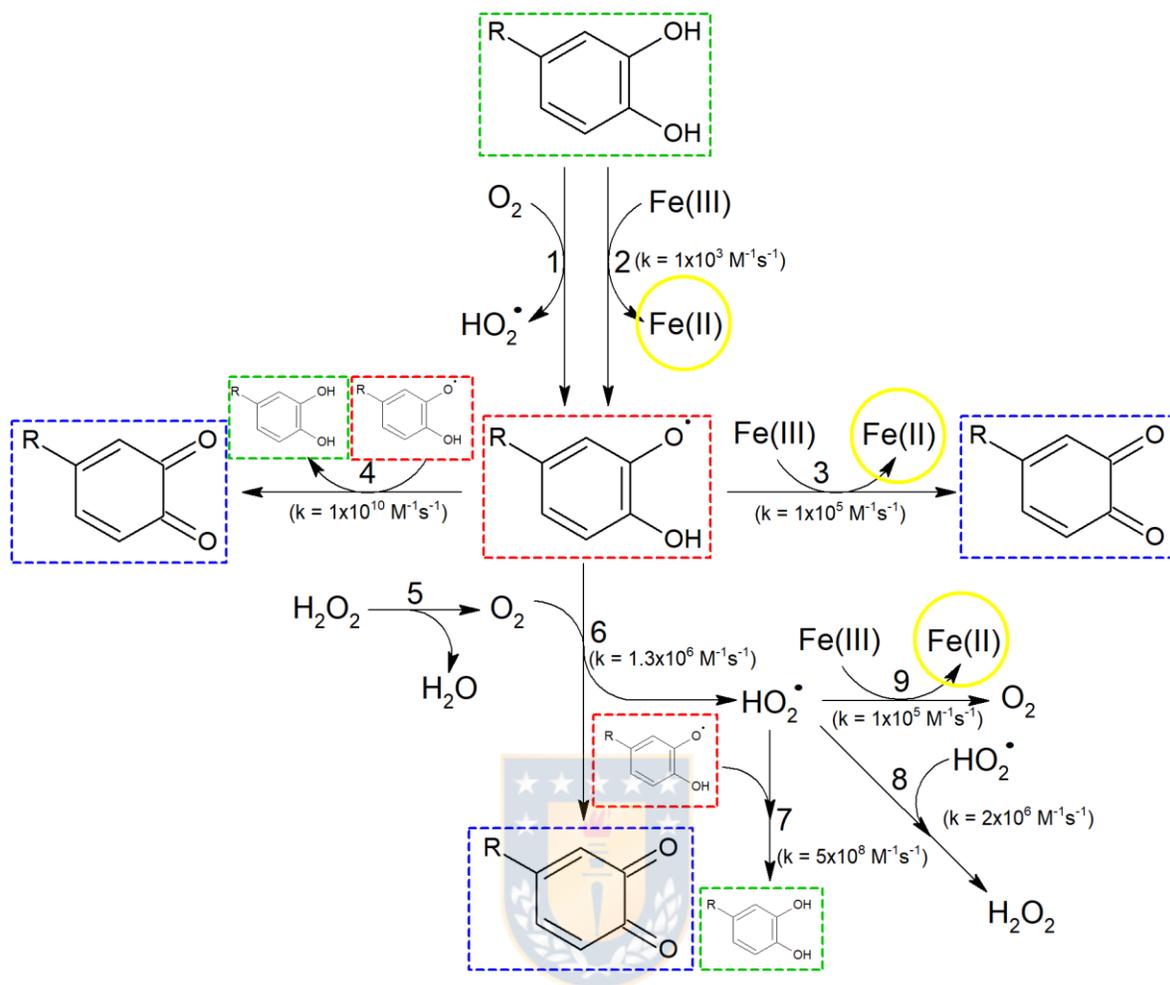


Figura 17. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en sistemas CMF, en verde 1,2-DHB; rojo semiquinona; azul quinona y amarillo Fe(II)

Con el objetivo de estudiar la recuperación del 1,2-DHB por parte de la oxidación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ (reacción 7), se siguió espectrofotométricamente la banda de absorción de cada uno de los 1,2-DHB utilizados (figura 18). La figura compara el cambio en la concentración del 1,2-DHB (línea roja), con la generación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ a pH 3,00 (línea azul) y la reducción de Fe(III) dependientes de $\cdot\text{O}_2\text{H}$. Para poder estimar la cantidad de Fe(III) que es reducido solamente por $\cdot\text{O}_2\text{H}$, a un tiempo determinado, se utilizó el residuo entre la concentración de Fe(II) reducido en sistema CMF y la concentración de Fe(II) proveniente de la reducción por DHB ($\text{Fe(II)}_{[\text{CMF}-\{\text{CMF-POBN(+)}\}]}$) (figura 16). Este último valor se obtienen en los sistemas CMF a los cuales se les adiciona POBN como atrapador de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ (figura 18-■).

Los sistemas CMF-t-But-CAT, CMF- CH₃-CAT y CMF-CAT (figura 18 (A), (B) y (C)) comparten similares características. La primera fase se distingue un aumento en la producción de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ hasta alcanzar el máximo (●). Simultáneamente, se registra la disminución en la concentración del 1,2-DHB (▲), consistente con utilización de este en la reducción de Fe(III) observado (reacciones 2 y 3 de la figura 17). El aumento inicial de $\text{Fe(II)}_{\{\text{[CMF-[CMF-POBN(+)]}\}}$, en el inicio de la reacción, correspondería a la reacción 9 (figura 17) debido a que la semiquinona se encuentra aún en bajas concentraciones en la primera etapa de la reacción. Una vez agotado el H₂O₂ (bajo los límites de detección de la técnica) a los 2 minutos de reacción, la concentración de semiquinona aumenta y por tanto la reacción 7 (figura 17) compite por el $\cdot\text{O}_2\text{H}$ con la reacción 9, observándose el aumento en la concentración del 1,2-DHB (▲) y que no se continua reduciendo Fe(III) por mecanismos dependientes de $\cdot\text{O}_2\text{H}$. Al agregar POBN, la reacción 9 es inhibida por la eliminación de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ del medio. La dependencia de la reacción 2 y 3 en ausencia de $\cdot\text{O}_2\text{H}$, explica el retorno de los valores de reducción de Fe(III) en los sistemas CMF-CAT, CMF-COOH-CAT y CMF-NO₂- (figura 18).

En los sistemas CMF-t-But-CAT y CMF- CH₃-CAT, la reducción de Fe(III) al añadir POBN es mayor que la obtenida con el 1,2-DHB solo (figura 16- A y B). La hipótesis para esta diferencia con el resto de los 1,2-DHB y entre ambos 1,2-DHB del grupo EDG se basa en la estabilidad de la semiquinona generada. Esta especie deficiente de electrones se estabiliza con los grupos donadores de densidad electrónica t-Butilo y metilo, y ambas están siendo liberadas al medio de reacción según los mecanismos propuestos [51]. Estos resultados sugieren una fuente de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ en ausencia de H₂O₂ por la reacción 1 o 6 ya que al capturar $\cdot\text{O}_2\text{H}$, con la adición de POBN, la reducción de Fe(III) es menor a la del 1,2-DHB (figura 16). Más aun, se puede observar en la figura 18 (A y B) la recuperación de la 1,2-DHB por parte de t-But-CAT y CH₃-CAT después del primer minuto de reacción y coincidiendo con el decaimiento de la señal de $\cdot\text{O}_2\text{H}$. El CH₃-CAT presenta una mayor regeneración del 1,2-DHB sugiriendo que la reacción 7 (figura 17) está promovida en este 1,2-DHB. Por otro lado, la regeneración de t-But-CAT es menor sugiriendo que el $\cdot\text{O}_2\text{H}$ es utilizado en las reacciones 8 y 9 (figura 17) preferentemente.

Por otro, en los ligandos del grupo EWG (figura 18 (D) y (E)) la producción de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ es baja y no presenta un máximo dentro de los 10 minutos como fue mencionado anteriormente (figura 10). Para el caso de COOH-CAT se obtuvo una cinética ruidosa y sin una tendencia clara. Finalmente, el Fe(III) reducido por mecanismos dependientes de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ se omitió para el sistema CMF- NO₂-CAT ya que las mediciones de Fe(II) en sistemas CMF-POBN(+) se encuentran fuera del límite de detección del método (figura 17 (E)).



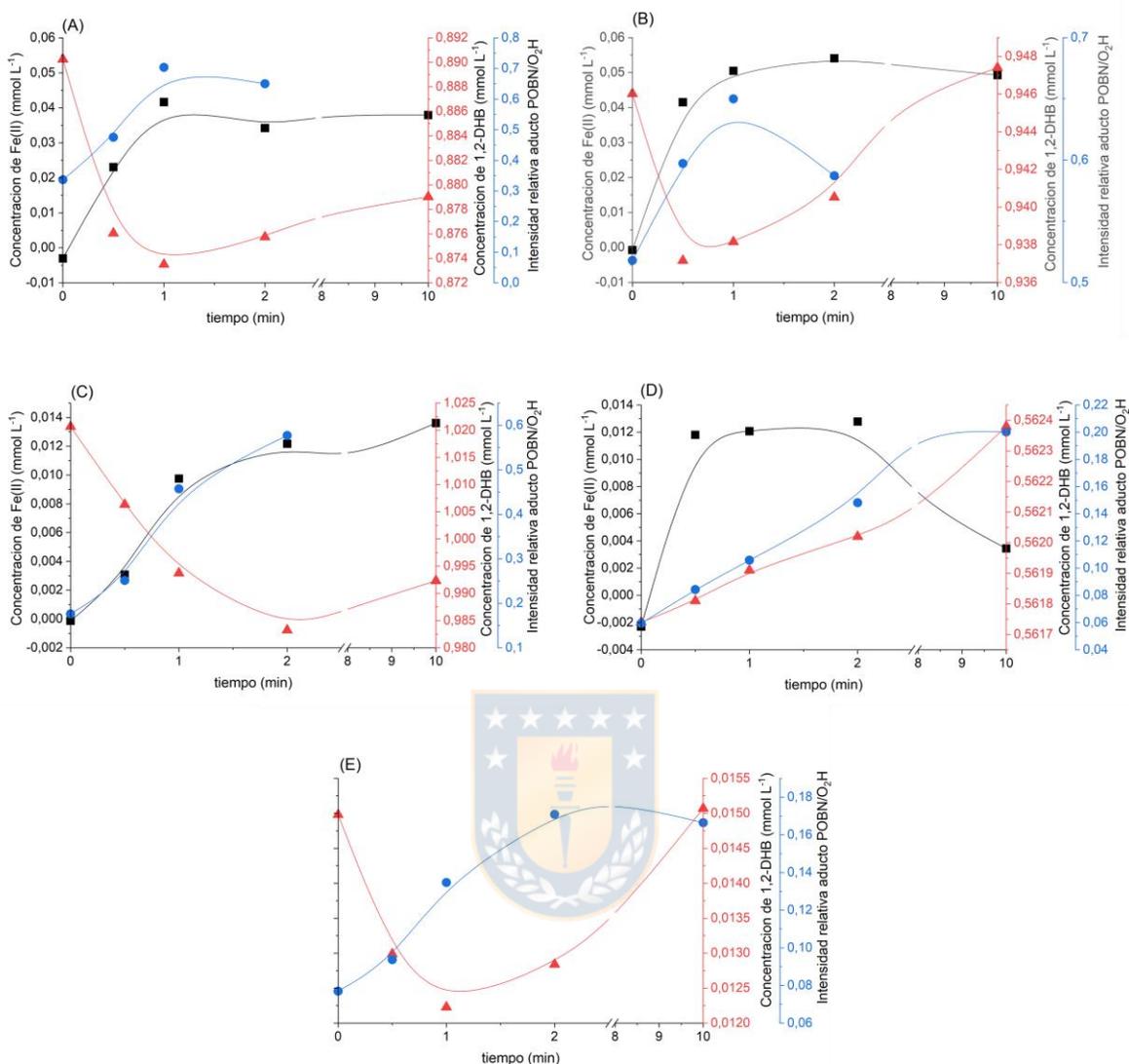


Figura 18. Comparación de la producción de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ (●-azul), con la concentración de 1,2-DHB (▲-roja) y la reducción de Fe(III) por mecanismos dependientes de $\cdot\text{O}_2\text{H}$ (■-negros); para los sistemas (A) CMF-t-But-CAT, (B) CMF-CH₃-CAT, (C) CMF-CAT, (D) CMF-COOH-CAT, (E) CMF-NO₂-CAT. Los ejes coinciden con el color de cada parámetro

CONCLUSIÓN

La diferencia del mecanismo involucrada en la reducción de Fe(III) por parte de los 1,2-DHB sustractores y dadores de densidad electrónica muestran diferencias significativas en los perfiles de producción de especies reactivas del oxígeno tales como $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2\text{H}$ y $^1\text{O}_2$. De acuerdo con los resultados obtenidos si existen condiciones que permitan la generación selectiva de $\cdot\text{OH}$ por sobre $\cdot\text{O}_2\text{H}$, sin embargo la concentración de este será pequeña, sin embargo, el uso de 1,2-DHB con sustituyentes EDG permite la generación preferente de $\cdot\text{OH}$ a pH inferiores a 5<.,00. Se determinó la generación selectiva de $^1\text{O}_2$ a pH sobre 7, estos mecanismos deben ser estudiados en detalle.



PROYECCIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación surgen nuevas interrogantes que se podrían abordar en futuras líneas de investigación para la validación de los resultados obtenidos.

Debido a la importancia de la reacción de Fenton en la degradación de contaminantes emergente en sistemas acuosos, muchos de los cuales contienen ligandos de hierro tipo 1,2-dihidroxibencenos, sería relevante confirmar el rol del radical perhidroxilo como potenciador del ciclo de Fenton por mecanismos secundarios, en la degradación de contaminantes modelos.

El ciclo redox de Fenton también se encuentra integrado en mecanismos fisiopatológicos, oxidaciones de lípidos, neurodegeneración, etc., sin embargo siempre se ha relacionado este daño a los tejidos únicamente con el radical hidroxilo. En este ámbito, sería de utilidad al campo clínico investigar los perfiles de especies reactivas de oxígeno en el desarrollo de enfermedades, conocimiento que puede aportar al desarrollo de nuevos tratamientos.

El oxígeno singlete es una especie reactiva del oxígeno que tiene un nicho en fotoquímica y fotobiología, el estudio de los mecanismo de generación de esta especie en pH básicos podría aportar nuevos mecanismos de reacción a estas áreas.

LITERATURA CITADA

- [1] M. Hayyan, M.A. Hashim, I.M. Alnashef, Superoxide Ion : Generation and Chemical Implications, (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>.
- [2] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- [3] K. Apel, H. Hirt, Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (2004) 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>.
- [4] S. Parsons, *Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment*, IWA Publishing, 2004. <https://doi.org/10.2166/9781780403076>.
- [5] J.E. Repine, J.W. Eaton, M.W. Anders, J.R. Hoidal, R.B. Fox, Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals, and human phagocytes in vitro. Detection with the anti-inflammatory agent, dimethyl sulfoxide, *J. Clin. Invest.* 64 (1979) 1642–1651. <https://doi.org/10.1172/JCI109626>.
- [6] B. Goodell, G. Daniel, J. Jellison, Y. Qian, Iron-reducing capacity of low-molecular-weight compounds produced in wood by fungi, *Holzforschung.* 60 (2006) 630–636. <https://doi.org/10.1515/HF.2006.106>.
- [7] G. Xu, B. Goodell, Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi : chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose, *J. Biotechnol.* 87 (2001) 43–57.
- [8] W. Huang, X. Zhang, W. Chen, Role of oxidative stress in Alzheimer ' s disease (Review), *Biomed. Reports.* 4 (2016) 519–522. <https://doi.org/10.3892/br.2016.630>.
- [9] J.A. Knight, Review : Free Radicals , Antioxidants , and the Immune System, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30 (2000) 145–158.
- [10] R. Paul, B. Chetia, A. Justin, Melatonin protects against behavioral deficits , dopamine

- loss and oxidative stress in homocysteine model of Parkinson ' s disease, *Life Sci.* 192 (2018) 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.016>.
- [11] R. Munter, Advanced Oxidation Processes - Current Status and Prospect, *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.* 50 (2001) 59–80. <https://doi.org/10.1002/9780470561331.ch18>.
- [12] W.H. Glaze, J.W. Kang, D.H. Chapin, The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation, *Ozone Sci. Eng. J. Int. Ozone Assoc.* 9 (1987) 335–352. <https://doi.org/10.1080/01919518708552148>.
- [13] X. Domènech, W.F. Jardim, Procesos Avanzados de Oxidacion para la Eliminacion de COntaminantes, En Blesa, M. A.; Sánchez, B., Eds. “Eliminación Contam. Por Fotocatálisis Heterogénea”. Madrid CIEMAT. (2012) 7–34.
- [14] H.J.H. Fenton, Oxidation of Tartaric Acid in presence of Iron, *J. Am. Chem. Soc.* 65 (1894) 899–910.
- [15] F. Haber, J. Weiss, The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts, *Proc. R. Soc. A.* 147 (1934). <https://doi.org/10.1098/rspa.1983.0054>.
- [16] J. De Laat, H. Gallard, Catalytic decomposition of hydrogen peroxide by Fe(III) in homogeneous aqueous solution: Mechanism and kinetic modeling, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2726–2732. <https://doi.org/10.1021/es981171v>.
- [17] H. Gallard, J. De Laat, B. Legube, Influence du pH sur la vitesse d'oxydation de composés organiques par FeII/H₂O₂. Mécanismes réactionnels et modélisation, *New J. Chem.* 22 (1998) 263–268. <https://doi.org/10.1039/a708335a>.
- [18] O. Aruoma, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 199–212. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0032-9>.
- [19] V. Melin, A. Henríquez, J. Freer, D. Contreras, Reactivity of catecholamine-driven Fenton reaction and its relationships with iron(III) speciation., *Redox Rep.* 20 (2015) 89–96. <https://doi.org/10.1179/1351000214Y.0000000119>.

- [20] T.B. Karpishin, M.S. Gebhard, E.I. Solomon, K.N. Raymond, Spectroscopic Studies of the Electronic Structure of Iron(III) Tris(catecholates), *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 2977–2984.
- [21] R. Chen, J.J. Pignatello, Role of Quinone Intermediates as Electron Shuttles in Fenton and Photoassisted Fenton Oxidations of Aromatic Compounds, *Environmental Sci. Technol.* 31 (1997) 2399–2406.
- [22] P. Salgado, V. Melin, D. Contreras, Y. Moreno, H. Mansilla, Fenton Reaction Driven By Iron Ligands, *J. Chil. Chem. Soc.* 58 (2013) 2096–2101. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072013000400043>.
- [23] G. Ruppert, G. Heisler, R. Bauer, The photo-Fenton reaction - wastewater treatment process an effective photochemical, 73 (1993).
- [24] A. Babuponnusami, K. Muthukumar, Advanced oxidation of phenol: A comparison between Fenton, electro-Fenton, sono-electro-Fenton and photo-electro-Fenton processes, *Chem. Eng. J.* 183 (2012) 1–9.
- [25] J. Rodriguez, C. Parra, D. Contreras, J. Freer, Dihydroxybenzenes: Driven Fenton reactions, *Water Sci. Technol.* (2001) 1–7. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-56777-3>.
- [26] E. GilPavas, I. Dobrosz-Gomez, M.A. Gomez-Garcia, Optimization of solar-driven photo-electro-Fenton process for the treatment of textile industrial wastewater, *J. Water Process Eng.* 24 (2018) 49–55.
- [27] S. Chakma, V. Moholkar, Physical Mechanism of Sono-Fenton Process, *Am. Inst. Chem. Eng.* 7 (2009) 405–410. <https://doi.org/10.1002/aic>.
- [28] A. Babuponnusami, K. Muthukumar, Degradation of Phenol in Aqueous Solution by Fenton , Sono-Fenton and Sono-photo-Fenton Methods, (2011) 142–147. <https://doi.org/10.1002/clen.201000072>.
- [29] K.E. Barrera-salgado, G. Ramírez-robledo, A. Álvarez-gallegos, C.A. Pineda-arellano, F.Z. Sierra-espinosa, J.A. Hernández-pérez, S. Silva-martínez, Fenton Process Coupled to Ultrasound and UV Light Irradiation for the Oxidation of a Model Pollutant, 2016

(2016) 16–18.

- [30] J.J. Pignatello, E. Oliveros, A. MacKay, *Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry*, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 36 (2006) 1–84. <https://doi.org/10.1080/10643380500326564>.
- [31] R. Cavalcante, L. da Rocha Sandim, D. Bogo, A. Barbosa, M. Osugi, M. Blanco, S. de Oliveira, M. de Fatima Cepa Matos, A. Machulek, V. Ferreira, Application of Fenton, photo-Fenton, solar photo-Fenton, and UV/H₂O₂ to degradation of the antineoplastic agent mitoxantrone and toxicological evaluation, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 2352–2361. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1110-y>.
- [32] R.S. Karale, B. Manu, S. Shrihari, Fenton and Photo-fenton Oxidation Processes for Degradation of 3-Aminopyridine from Water, *APCBEE Procedia*. 9 (2014) 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.01.005>.
- [33] P. V Nidheesh, R. Gandhimathi, Trends in electro-Fenton process for water and wastewater treatment: An overview, *DES*. 299 (2012) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2012.05.011>.
- [34] E. Brillas, I. Sirés, M.A. Oturan, Electro-Fenton process and related electrochemical technologies based on Fenton's reaction chemistry., *Chem. Rev.* 109 (2009) 6570–631. <https://doi.org/10.1021/cr900136g>.
- [35] A. Shokri, Application of Sono – photo - Fenton process for degradation of phenol derivatives in petrochemical wastewater using full factorial design of experiment, *Int. J. Ind. Chem.* 9 (2018) 295–303. <https://doi.org/10.1007/s40090-018-0159-y>.
- [36] I.A. Reyes, F. Patiño, M.U. Flores, J. Narayanan, H. Calderón, T. Pandiyan, Use of ligand-based iron complexes for phenol degradation by fenton modified process, *J. Mex. Chem. Soc.* 57 (2013) 96–104.
- [37] S.A. Messele, C. Bengoa, F.E. Stüber, J. Giralt, A. Fortuny, A. Fabregat, J. Font, Enhanced degradation of phenol by a fenton-like system (Fe/EDTA/h₂ o₂) at

- circumneutral pH, *Catalysts*. 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/catal9050474>.
- [38] J.M.C. Gutteridge, L. Maitt, L. Poyer, Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II), *Biochem. J.* 269 (1990) 169–174. <https://doi.org/10.1042/bj2690169>.
- [39] L.D. Loomis, K.N. Raymond, Solution Equilibria of Enterobactin and Metal-Enterobactin Complexes, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 906–911.
- [40] D.R. Peralta, C. Adler, N.S. Corbalán, E.C. Paz García, M.F. Pomares, P.A. Vincent, Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire, *PLoS One*. 11 (2016) 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157799>.
- [41] E. Di Iorio, C. Colombo, R. Angelico, R. Terzano, C. Porfido, F. Valentinuzzi, Y. Pii, T. Mimmo, S. Cesco, Iron oxide-humic acid coprecipitates as iron source for cucumber plants, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 182 (2019) 921–933. <https://doi.org/10.1002/jpln.201800207>.
- [42] V. Melin, A. Henríquez, C. Radojkovic, B. Schwederski, W. Kaim, J. Freer, D. Contreras, Reduction reactivity of catecholamines and their ability to promote a Fenton reaction, *Inorganica Chim. Acta.* (2016).
- [43] E. Mentasti, E. Pelizzetti, C. Baiocchi, INTERACTIONS OF Fe (III) WITH ADRENALINE , L-DOPA AND OTHER CATECHOL DERIVATIVES, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 38 (1976) 2017–2021.
- [44] D. Contreras, J. Rodriguez, J. Freer, B. Schwederski, W. Kaim, Enhanced hydroxyl radical production by dihydroxybenzene- driven Fenton reactions : implications for wood biodegradation, *J. Biol. Inorganical Chem.* 12 (2007) 1055–1061. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0274-2>.
- [45] S. Deiana, C. Gessa, B. Manunza, M. Marchetti, M. Usai, Mechanism and stoichiometry of the redox reaction between iron(III) and caffeic acid, *Plant Soil.* 145 (1992) 287–294.

- [46] J. Pracht, J. Boenigk, F. Isenbeck-Schröter, F. Keppler, H.F. Schöler, Abiotic Fe (III) induced mineralization of phenolic substances, *Chemosphere*. 44 (2001) 613–619.
- [47] Y. Tamaru, M. Yoshida, L.D. Eltis, B. Goodell, Multiple iron reduction by methoxylated phenolic lignin structures and the generation of reactive oxygen species by lignocellulose surfaces, *Int. J. Biol. Macromol.* 128 (2019) 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.149>.
- [48] P. Salgado, V. Melin, M. Albornoz, H. Mansilla, G. Vidal, D. Contreras, Effects of pH and substituted 1,2-dihydroxybenzenes on the reaction pathway of Fenton-like systems, *Appl. Catal. B Environ.* 226 (2018) 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.12.035>.
- [49] L.P. Hammett, The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds . Benzene Derivatives Reactivity, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (1936) 96–103.
- [50] L.P. Hammett, Some Relation Between Reaction Rates and Equilibrium Constants, *Chem. Rev.* 17 (1935) 125–136.
- [51] P. Salgado, V. Melin, Y. Durán, H. Mansilla, D. Contreras, The Reactivity and Reaction Pathway of Fenton Reactions Driven by Substituted 1,2-Dihydroxybenzenes, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 3687–3693. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05388>.
- [52] S. Atalay, G. Ersöz, Novel Catalysts in Advanced Oxidation of Organic Pollutants, 2016.
- [53] P. Anastas, N. Eghbali, Green Chemistry: Principles and Practice, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2009) 301. <https://doi.org/10.1039/b918763b>.
- [54] E.C. Catalkaya, F. Kargi, Color, TOC and AOX removals from pulp mill effluent by advanced oxidation processes: A comparative study, *J. Hazard. Mater.* 139 (2007) 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.023>.
- [55] B. Bianco, I. De Michelis, F. Vegliò, Fenton treatment of complex industrial wastewater: Optimization of process conditions by surface response method, *J. Hazard. Mater.* 186 (2011) 1733–1738. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.054>.

- [56] C. Jiang, S. Garg, T.D. Waite, Hydroquinone-Mediated Redox Cycling of Iron and Concomitant Oxidation of Hydroquinone in Oxidic Waters under Acidic Conditions: Comparison with Iron – Natural Organic Matter Interactions, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 14076–14084. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03189>.
- [57] W.G. Barb, J.H. Baxendale, P. George, K.R. Hargrave, Reactions of Ferrous and Ferric Ions with Hydrogen Peroxide, *Nature*. 163 (1950) 692–694.
- [58] B.M. Voelker, D.L. Sedlak, Iron reduction by photoproduced superoxide in seawater, *Mar. Chem.* 50 (1995) 93–102.
- [59] A.L. Rose, T.D. Waite, Reduction of organically complexed ferric iron by superoxide in a simulated natural water, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 2645–2650. <https://doi.org/10.1021/es048765k>.
- [60] J.M.C. Gutteridge, Superoxide dismutase inhibits the superoxide-driven Fenton reaction at two different levels. Implications for a wider protective role, *FEBS Lett.* 185 (1985) 19–23. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80732-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80732-8).
- [61] J.B. Smith, J.C. Cusumano, C.F. Babbs, Quantitative effects of iron chelators on hydroxyl radical production by the superoxide-driven fenton reaction, *Free Radic. Res.* 8 (1990) 101–106. <https://doi.org/10.3109/10715769009087980>.
- [62] J.J. Pignatello, E. Oliveros, A. Mackay, Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 3389 (2007). <https://doi.org/10.1080/10643380500326564>.
- [63] F. Shi, M.K. Tse, Z. Li, M. Beller, Controlling iron-catalyzed oxidation reactions: From non-selective radical to selective non-radical reactions, *Chem. - A Eur. J.* 14 (2008) 8793–8797. <https://doi.org/10.1002/chem.200801432>.
- [64] H. Lee, H.J. Lee, D.L. Sedlak, C. Lee, PH-Dependent reactivity of oxidants formed by iron and copper-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide, *Chemosphere.* 92

- (2013) 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.073>.
- [65] H. Bataineh, O. Pestovsky, A. Bakac, PH-induced mechanistic changeover from hydroxyl radicals to iron(IV) in the Fenton reaction, *Chem. Sci.* 3 (2012) 1594–1599. <https://doi.org/10.1039/c2sc20099f>.
- [66] H. Kwon, J. Basran, C.M. Casadei, A.J. Fielding, T.E. Schrader, A. Ostermann, J.M. Devos, P. Aller, M.P. Blakeley, P.C.E. Moody, E.L. Raven, Direct visualization of a Fe(IV)-OH intermediate in a heme enzyme, *Nat. Commun.* 7 (2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms13445>.
- [67] Bruker GmbH, Number of Spins Calculation Usage Notes, (2019).
- [68] S. Luqman, K. Fatima, N. Masood, A high throughput spectrophotometric method for singlet oxygen quenching, *Nat. Protoc.* (2018) 1–7.
- [69] I. Kraljic, E. Mohsni, A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions, *Photochem. Photobiol.* 28 (1978) 577–581.
- [70] Z. Lin, H. Chen, Y. Zhou, N. Ogawa, J.-M. Lin, Self-catalytic degradation of ortho-chlorophenol with Fenton's reagent studied by chemiluminescence, *J. Environ. Sci.* 23 (2011) 601–606. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62314-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62314-1).
- [71] C. Mottley, H.D. Connor, R.P. Mason, Received September 26, 1986, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141 (1986) 622–628.
- [72] T. Takayanagi, H. Kimiya, T. Ohyama, Formation of artifactual DMPO-OH spin adduct in acid solutions containing nitrite ions, *Free Radic. Res.* 5762 (2017) 739–748. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1369536>.
- [73] J.M. Fontmorin, R.C.B. Castillo, W.Z. Tang, M. Sillanpää, Stability of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide as a spin-trap for quantification of hydroxyl radicals in processes based on Fenton reaction Stability of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide as a spin-trap for quantification of hydroxyl radicals in proc, *Water Res.* 99 (2016) 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.053>.

- [74] A.J. Carmichael, K. Makino, P. Riesz, Quantitative Aspects of ESR and Spin Trapping of Hydroxyl Radicals and Hydrogen Atoms in Gamma-Irradiated Aqueous Solutions
Author (s): Alasdair J . Carmichael , Keisuke Makino and Peter Riesz Published by :
Radiation Research Society Stable URL : <https://doi.org/10.1016/j.radres.1984.02.001>, Radiat. Res. 100 (1984) 222–234.
- [75] N. National Institute of Environmental Health Science, Spin Trap Database, (2020).
tools.niehs.nih.gov/stdb/index.cfm.
- [76] C. Wells, M.A. Salam, The Effect of pH on the Kinetics of the Reaction of Iron(II) with Hydrogen Peroxide in Perchlorate Media, J. Chem. Soc. A (1968) 24–29.
- [77] B. Beverskog, REVISED DIAGRAMS FOR IRON AT 25-300 ° C, 38 (1996) 2121–2135.
- [78] B. Morgan, O. Lahav, The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe (II) oxidation by O₂ in aqueous solution – basic principles and a simple heuristic description, 68 (2007) 2080–2084. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.015>.
- [79] E. Janzen, Y. Wang, R. Shetty, Spin Trapping with alpha-Pyridyl 1-Oxide N-ter-Butyl Nitrones in Aqueous Solutions. A Unique Electron Spin Resonance Spectrum for the Hydroxyl Radical Adduct, J. Am. Chem. Soc. 100 (1978) 2923–2925. <https://doi.org/10.1021/ja00477a075>.
- [80] P. Ulanski, C. Von Sonntag, The OH radical-induced chain reactions of methanol with hydrogen peroxide and with peroxydisulfate, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. 2 (1999) 165–168. <https://doi.org/10.1039/a808543i>.
- [81] B. Ensing, F. Buda, E.J. Baerends, Fenton-like chemistry in water: Oxidation catalysis by Fe(III) and H₂O₂, J. Phys. Chem. A. 107 (2003) 5722–5731. <https://doi.org/10.1021/jp0267149>.
- [82] D. Contreras, J. Freer, J. Rodríguez, Veratryl alcohol degradation by a catechol-driven Fenton reaction as lignin oxidation by brown-rot fungi model, Int. Biodeterior. Biodegrad. 57 (2006) 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.11.003>.
- [83] J. Rodríguez, D. Contreras, C. Oviedo, J. Freer, J. Baeza, Degradation of recalcitrant

- compounds by catechol-driven Fenton reaction, *Water Sci. Technol.* 49 (2004) 81–84.
- [84] G. Kanimozhi, N.R. Prasad, Anticancer Effect on Caffeic Acid on Human Cervical Cancer Cells, in: V. Preedy (Ed.), *Coffee Heal. Dis. Prev.*, Elsevier Inc., 2015: pp. 655–661. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00073-5>.
- [85] S.P. Glaeser, B.A. Berghoff, V. Stratmann, H. Grossart, J. Glaeser, Contrasting Effects of Singlet Oxygen and Hydrogen Peroxide on Bacterial Community Composition in a Humic Lake, 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092518>.
- [86] M. Rác, M. Sedláková, P. Pospíšil, The formation of electronically excited species in the human multiple myeloma cell suspension, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep08882>.
- [87] P. Salgado, *Especies oxidantes producidas por sistemas Fenton y tipo Fenton conducido por 1,2-dihidroxibencenos*, Universidad de Concepcion, 2017.
- [88] C. Richard, J. Lemaire, R. March, Analytical and kinetic study of the phototransformation of furfuryl alcohol in aqueous ZnO suspensions, 55 (1990) 127–134.
- [89] W.R. Haag, Singlet oxygen in surface waters - Part I: Furfuryl alcohol as a trapping agent, *Chemosphere.* 13 (1984) 631–640.
- [90] R. Cui, L. Deng, W. Shi, H. Yang, G. Sha, C. Zhang, Liquid-liquid reaction of hydrogen peroxide and sodium hypochlorite for the production of singlet oxygen in a centrifugal flow singlet oxygen generator Liquid-liquid reaction of hydrogen peroxide and sodium hypochlorite for the production of singlet oxygen, *Quantum Electron.* 41 (2011) 139. <https://doi.org/10.1070/QE2011v041n02ABEH014286>.
- [91] A. Carrier, S. Hamid, D. Oakley, K. Oakes, X. Zhang, Singlet Oxygen Generation in Classical Fenton Chemistry, (2019) 0–11. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.7730654.v1>.
- [92] I.P. Ivanova, S.V. Trofimova, I.M. Piskarev, N.A. Aristova, O.E. Burhina, O.O. Soshnikova, Mechanism of chemiluminescence in Fenton reaction, 3 (2012) 88–100.

- [93] M.-Q. Yang, Y. Zhang, N. Zhang, Z.-R. Tang, Y.-J. Xu, Visible-Light-Driven Oxidation of Primary C – H Bonds over CdS with Dual Co-catalyst Graphene and TiO₂, *Nat. Sci. Reports*. 3 (2013) 3314. <https://doi.org/10.1038/srep03314>.
- [94] O. Palluy, C. Bonne, G. Modat, Hypoxia/Reoxygenation alters endothelial prostacyclin synthesis-protection by superoxide dismutase, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 269–275.
- [95] L. Valgimigli, R. Amorati, M.G. Fumo, G.A. Dilabio, G.F. Pedulli, K.U. Ingold, D.A. Pratt, The Unusual Reaction of Semiquinone Radicals with Molecular Oxygen, *J. Org. Chem.* (2008) 1830–1841. <https://doi.org/10.1021/jo7024543>.
- [96] A. Kwiram, H. Christensen, Reactions of Hydroxyl Radicals with Hydrogen Peroxide at Ambient and Elevated Temperatures, 1590 (1982) 1588–1590. <https://doi.org/10.1021/j100206a023>.
- [97] D.A. Armstrong, R.E. Huie, S. Lymar, W.H. Koppenol, G. Merényi, P. Neta, D.M. Stanbury, S. Steenken, P. Wardman, Standard electrode potentials involving radicals in aqueous solution: inorganic radicals, *Bioinorg. React. Mech.* 9 (2013) 59–61. <https://doi.org/10.1515/irm-2013-0005>.
- [98] E. Herlinger, R.F. Jameson, W. Linert, Spontaneous Autoxidation of Dopamine, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* (1995) 259–263.
- [99] B. Kalyanaraman, C.C. Felix, R.C. Sealy, Semiquinone Anion Radicals of Catechol (amine) s , Catechol Estrogens , and Their Metal Ion Complexes, *Environ. Health Perspect.* 64 (1985) 185–198.

ANEXOS

Anexo 1. Espectros de EPR del aducto DMPO/OH para todos los sistemas ensayados en el rango de pH entre 3.00 y 6.00

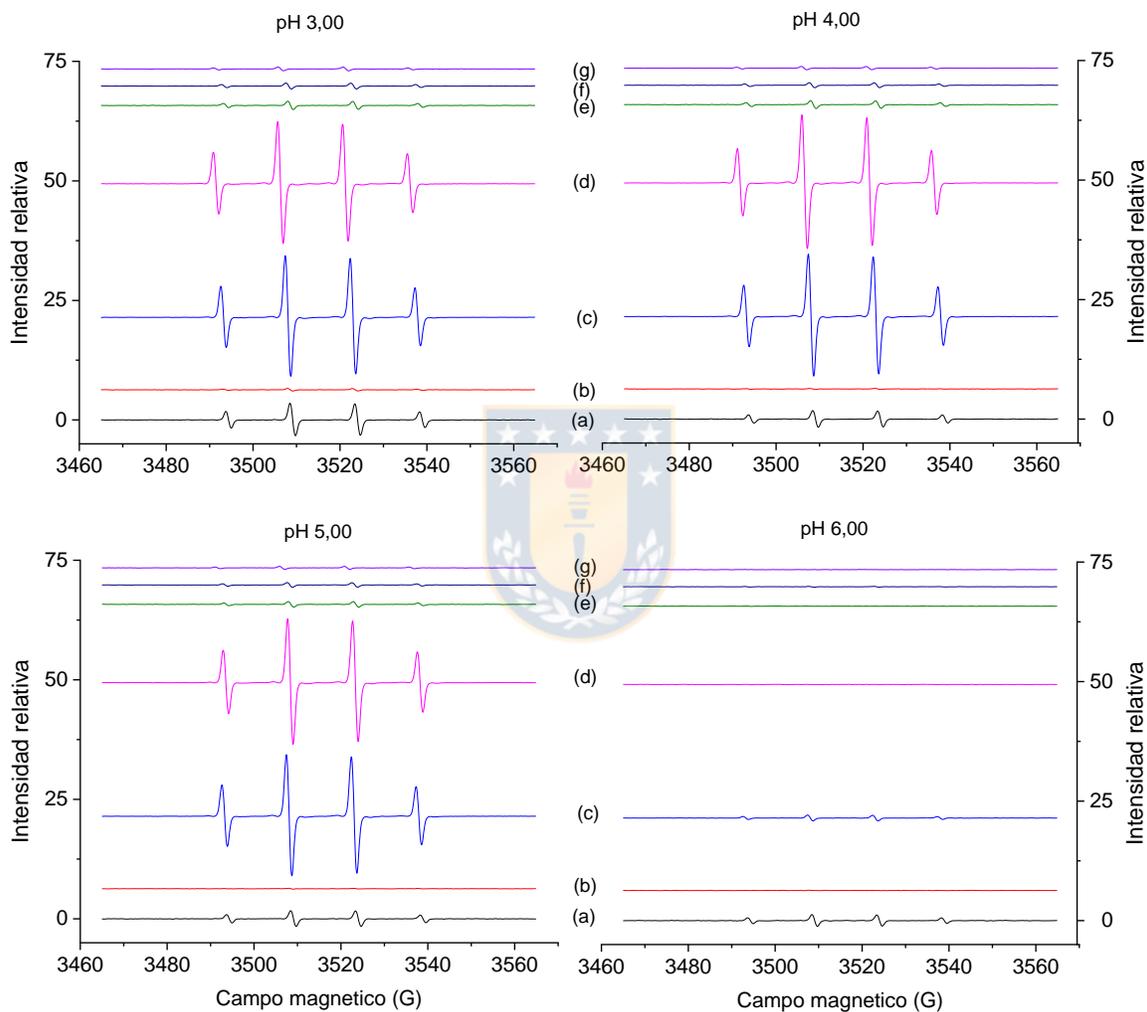


Figura A- 1. Espectros de EPR del aducto DMPO/OH entre pH 3,00 y 6,00 para los sistemas (a) Fenton, (b) Tipo Fenton; y los 1,2-DHB (c) CMF- t-But-CAT, (d) CMF – CH3-CAT , (e) CMF – CAT, (f) CMF – COOH-CAT, (g) CMF- NO2-CAT

Anexo 2. Espectros de EPR del aducto DMPO/O₂H para todos los sistemas ensayados en el rango de pH entre 3,00 y 6,00

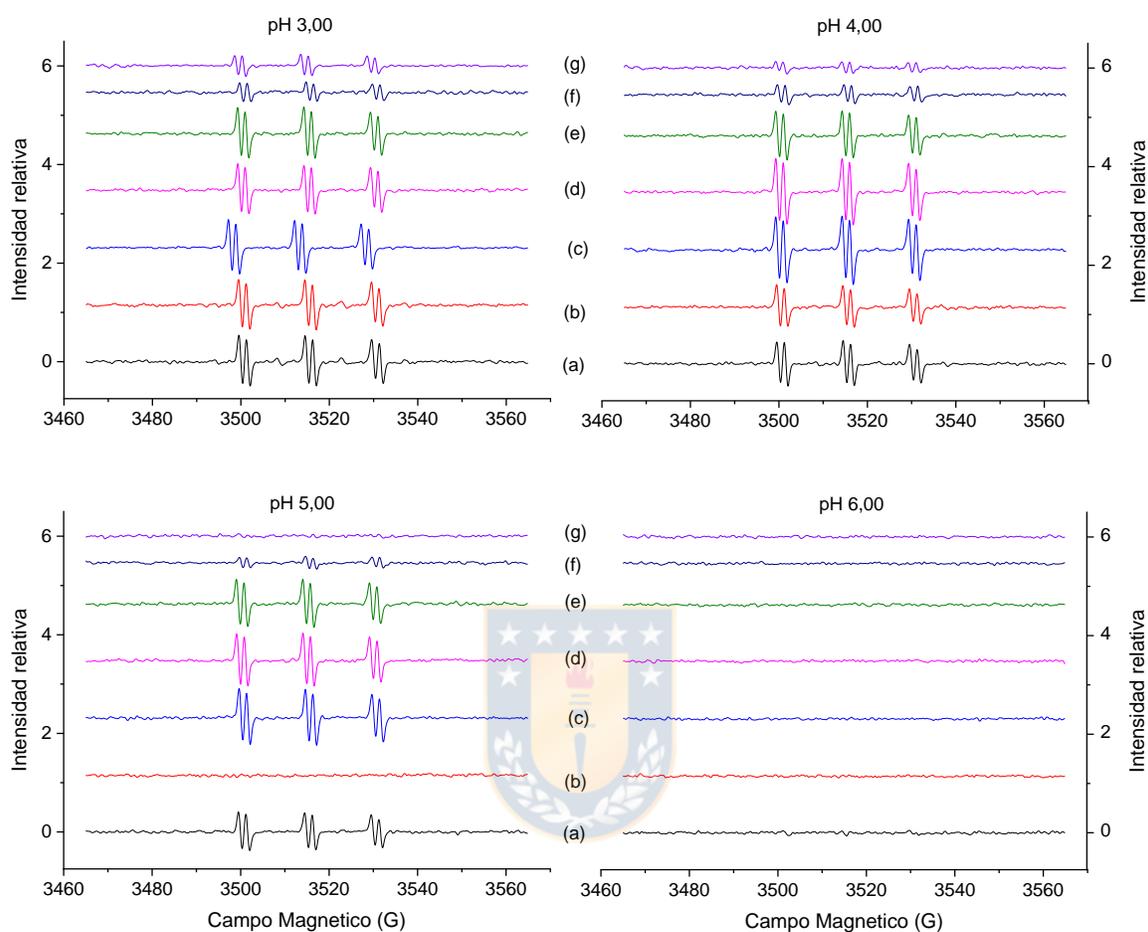


Figura A- 2. Espectros de EPR del aducto POBN/O₂H entre pH 3,00 y 6,00 para los sistemas (a) Fenton, (b) Tipo Fenton; y los 1,2-DHB (c) CMF- t-But-CAT, (d) CMF – CH₃-CAT, (e) CMF – CAT, (f) CMF – COOH-CAT, (g) CMF- NO₂-CAT.

Anexo 3. Espectros de EPR del aducto $\text{TEMPD}/^1\text{O}_2$ para todos los sistemas ensayados en el rango de pH entre 3,00 y 6,00

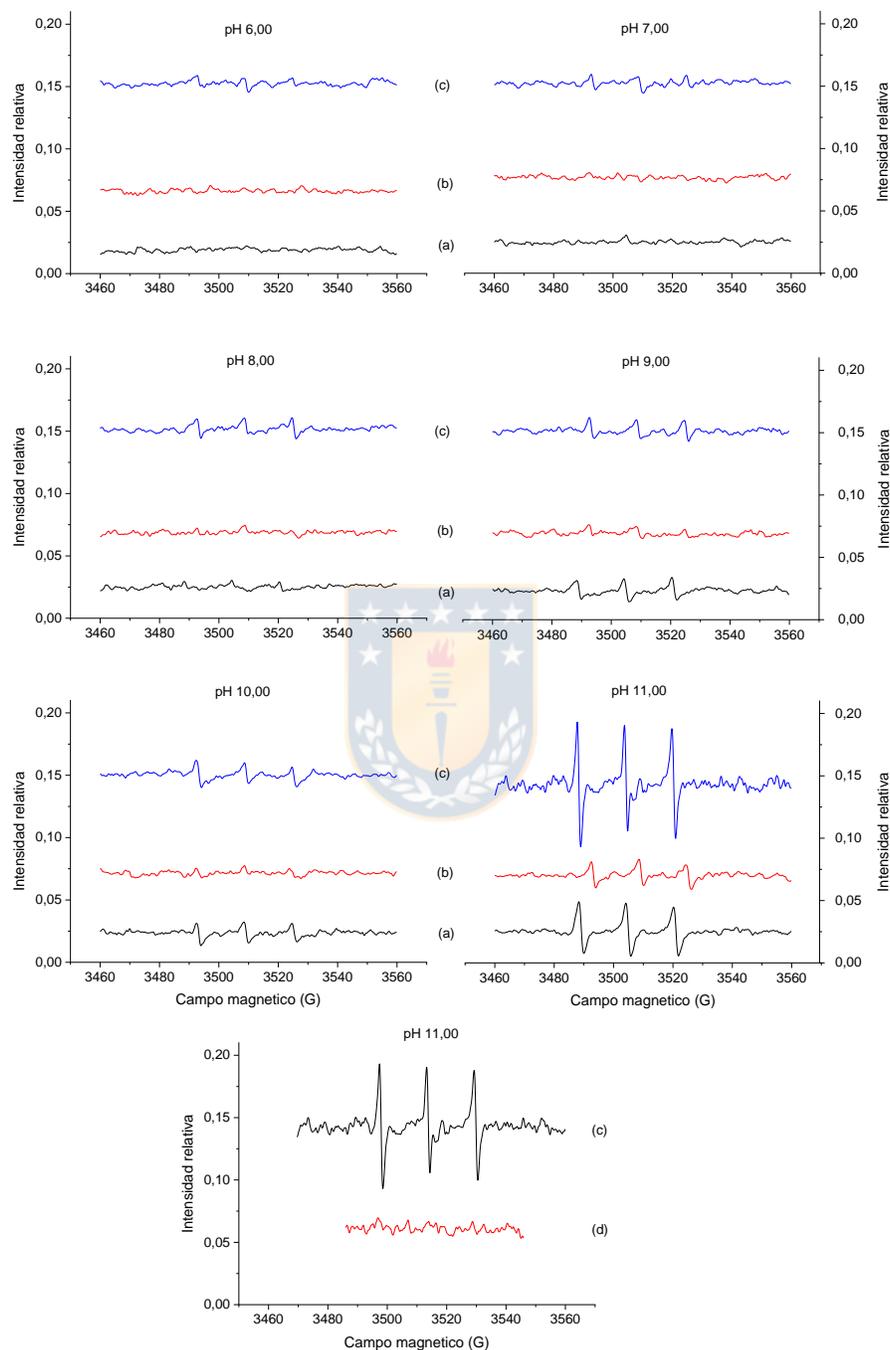


Figura A- 3. Espectros de EPR del aducto $\text{TEMPD}/^1\text{O}_2$ entre pH 6,00 y 11,00 para los sistemas (a) Fenton, (b) Tipo Fenton; y (c) CMF – CAT, (d) CMF – CAT en presencia de NaN_3 120 mmol L^{-1} .

Anexo 4. Auto oxidación de DHB

La señal de EPR se las semquinonas fue obtenida de manera directa, sin la utilización de spin-trap a pH 11.

La figura A-4 muestra los espectros obtenidos para los DHB estudiados con excepción del nitrocatecol, el cual no fue posible detectarlo, la hipótesis, es que la auto oxidación de nitrocatecol a quinona (no activa en EPR) ocurre antes de los 10 segundos, tiempo en el cual se tomó la primera medición, más aun, al agregar el nitrocatecol al buffer pH 11 el cambio de color era instantáneo. Para el resto, cada uno posee un espectro característico. Para todos los 1,2-DHB la señal disminuye rápidamente en un promedio de 3 minutos.

Este proceso ha sido reportado previamente a pH básicos, y no se encontraría relacionado con la formación de oxígeno singlete debido a lo inestable de la semiquinona [98,99].



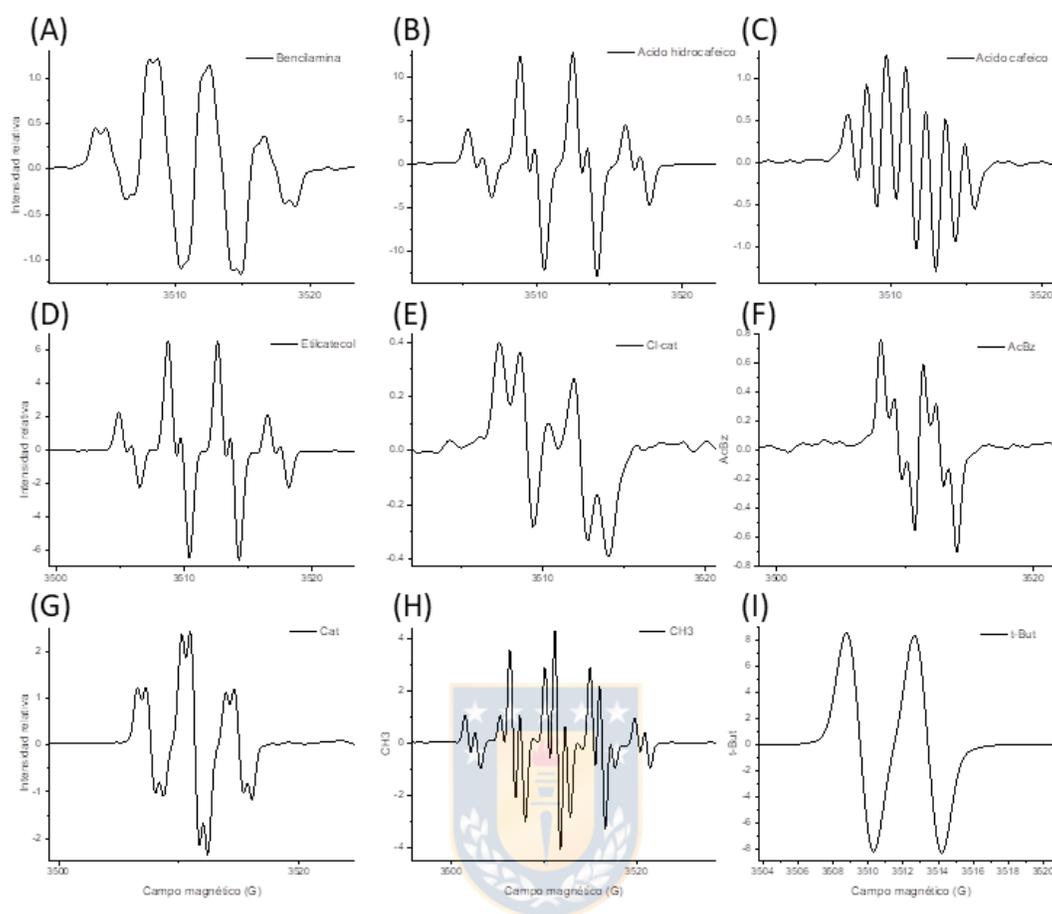


Figura A- 4. Espectros de EPR de las semiquinonas generadas por auto oxidación en buffer a pH 11, se utilizaron los mismos parámetros instrumentales utilizados para aductos radicalarios (A) Bencilamina, (B) Acido hidrocafeico, (C) Acido cafeico, (D) Etilcatecol, (E) Clorocatecol, (F) Acido-2,3-Dihydroxibenzoico, (G) Catecol, (H) Metilcatecol, (I) t-Butilcatecol