



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE FÍSICA Y MATEMÁTICAS

***ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE FENTON MEDIANTE
LAS ESPECTROSCOPIAS DE ULTRAVIOLETA-VISIBLE
Y RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN FÍSICA Y MATEMÁTICAS

P R E S E N T A

MARÍA DEL ROCÍO RAMÍREZ LEÓN



MÉXICO D.F.

OCTUBRE, 2007

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN	1
---------------------	-------	---

ANTECEDENTES

1.1 Reacción de Fenton	4
1.2 Reacción Haber-Weiss	7
1.3 Radical hidroxilo en la reacción de Fenton	8
1.4 Uso de diferentes agentes oxidantes y metales en la reacción de Fenton	11
1.5 Hierro como reactivo Fenton	12

CAPÍTULO 2

2.1 Objetivos	15
2.2 Justificación	16

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Reactivos Fenton	17
3.2 Registro de los espectros UV-Vis de los reactivos Fenton	18
3.3 Registro de los espectros UV-Vis durante la reacción de Fenton	..	18
3.4 Obtención de los espectros EPR durante la reacción de Fenton	...	19

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Espectros UV-Vis de los reactivos Fenton	20
4.1.1 Iones Fe^{3+} en $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20
4.1.2 Iones Fe^{2+} en $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	21
4.1.3 H_2O_2	22
4.2 Espectros UV-Vis durante la reacción de Fenton empleando Fe^{3+}	23
4.3 Espectros UV-Vis durante la reacción de Fenton empleando Fe^{2+}	28
4.4 Espectros EPR durante la reacción de Fenton empleando Fe^{3+}	32
4.5 Espectros EPR durante la reacción de Fenton empleando Fe^{2+}	37

CONCLUSIONES	41
---------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	42
---------------------------	----

APÉNDICE A

A.1 Teoría EPR	45
A.2 Teoría UV-Vis	55

APÉNDICE B

B.1 Espectros UV-Vis	58
----------------------------	----

APÉNDICE C

C.1 Espectros EPR	61
-------------------------	----

JURADO

PRESIDENTE: DR. RAFAEL ZAMORANO ULLOA
SECRETARIO: DR. SALVADOR TIRADO GUERRA
VOCAL: DR. DANIEL RAMÍREZ ROSALES
VOCAL: DRA. MARTHA CECILIA ROSALES HERNÁNDEZ
VOCAL: DR. JOSÉ CORREA BASURTO

DIRECTOR DE TESIS: DR. DANIEL RAMÍREZ ROSALES
CODIRECTOR: DRA. MARTHA CECILIA ROSALES HERNÁNDEZ
SUSTENTANTE: MARÍA DEL ROCIO RAMÍREZ LEÓN

AGRADECIMIENTOS

Quiero en primer lugar agradecer al Doctor Rafael Zamorano Ulloa, quien me tendió la mano como profesor. De él aprendí lo que significa el amor hacia la investigación y la disciplina para alcanzar cada uno de mis objetivos. Profesor gracias por brindarme su amistad.

A el Doctor Daniel Ramírez Rosales quien acepto ser mi tutor y de quien he recibido amistad, confianza, conocimiento y toda su ayuda para lograr el término de esta tesis.

A la Doctora Martha Cecilia Rosales Hernández por la codirección de esta tesis al recibirme en el Laboratorio de Bioquímica Médica, gracias Martha por compartir conmigo tu conocimiento científico y por estar pendiente revisando cada uno de los pasos que dí para culminar esta tesis.

A Ignacio, Rogelio, Natasha y Armando quienes me apoyaron en el laboratorio. . A mis compañeros que estuvieron junto a mí durante varios años brindándome su amistad Tania, Juan, Jorge, Arturo, Javier, Verónica, Lupita y Mayrú.

A mis sinodales y a todas las personas que contribuyeron a la realización de este sueño.

DEDICATORIAS

A mi hijo
Jorge Emilio
Esperando que siempre
se sienta orgulloso de mí

A mi esposo

Jorge Alberto
Por tu amor,
quiero ser
siempre la
compañera en
tu vida

A mi padre
Eloy
Ramírez
Villanueva
Por creer en
mí, bajo
cualquier
circunstancia
me brindaste
todo el apoyo
posible,
gracias padre
por tu amor

A mi madre
María Patricia
León Hernández
De quien aprendí
la fortaleza
necesaria para
enfrentar a la
vida

A mis hermanas Sandra, Anabel,
Lupita quienes son mis leales amigas y
que siempre estaré a su lado.

A Antonia Vazquez por cuidar de mí y de mis hermanas.

A mis suegros Micaela Flores y Filiberto Espinoza por abrir las puertas de su hogar y recibirme como a una hija. A mis cuñados Cesar, Marco, Nerida, Pablo, Julio, Karen por brindarme su amistad y hacer posible esta tesis.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

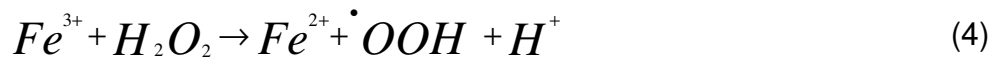
Las enzimas tipo oxidasas generan especies de oxígeno reducidas de forma incompleta como el superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual se forma a partir de la reducción de un electrón del O_2 , el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se forma a partir de la reducción de dos electrones (ec.1) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) que resulta de la reducción de tres electrones, lo anterior debido a que las interacciones de los transportadores de un electrón con los transportadores de dos electrones no suelen tener una eficacia del 100%, durante la respiración. Además algunas enzimas, como la xantina oxidasa y las aminoácido oxidasas, generan H_2O_2 como producto de su acción catalítica. El superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son todos más reactivos que el O_2 y se denominan de forma colectiva especies reactivas de oxígeno (ERO). El radical hidroxilo es particularmente reactivo y es responsable del daño a biomoléculas como las proteínas, y a membranas lipídicas, en donde inicia la oxidación de los ácidos grasos en un proceso denominado peroxidación lipídica, el cual es una reacción en cadena, ya que cada resto de ácido graso que sufre peroxidación genera otro radical que puede iniciar otra reacción. El radical hidroxilo también daña a los ácidos nucleicos, produciendo la ruptura de la cadena de polinucleótidos. La producción a gran escala de ERO tienen la capacidad de producir un daño considerable a los tejidos en los que se originan produciendo estrés oxidativo.

El radical hidroxilo se produce en el organismo mediante la reacción de Fenton a partir del H_2O_2 , esta reacción involucra la conversión de superóxido a hidroxilo (ec. 1-3).



La reacción (3) es conocida como la reacción de Fenton y fue descrita después que H.J.H. Fenton publicó un artículo en 1894 sobre la oxidación del ácido tartárico por

peróxido de hidrógeno y sulfato ferroso [1]. Algunos años después en una serie de artículos publicados entre 1931 y 1935 por Haber Willstätter y Weiss en “Fenton’s reagent” [2] y junto al trabajo de Baxendale [3] involucraron el radical •OH en la reacción y postularon la eventual formulación de las reacciones (1-3), las cuales son conocidas colectivamente como el ciclo Haber-Weiss donde el catalizador es el hierro, desde entonces muchos artículos argumentan el caso de la generación de otras especies de •OH, incluyendo intermediarios oxo-ferril. Por otro lado la reacción de Fenton también puede efectuarse al emplear iones Fe^{3+} (ec. 4), en donde se obtiene la oxidación del Fe^{3+} a Fe^{2+} , así como la generación del radical peroxil, el cual también interviene en la oxidación de lípidos de forma semejante a como lo hace el hidroxilo.



Durante mucho tiempo la reacción de Fenton fue considerada como el único mecanismo plausible causante de oxidación endógena del DNA, hasta hace poco cuando se descubrió la participación del óxido nítrico ($NO\cdot$), (un agente biológico de señalización que se produce en muchos tejidos animales), el cual, puede combinarse con el superóxido y producir el peroxinitrito ($ONOO^-$). Éste último producto puede participar en las mismas reacciones químicas como el radical hidroxilo, causando los mismos daños como la peroxidación lipídica. Por esta razón, Koppenol *et al.* [4] argumentaron que la reacción de Fenton no era de relevancia biológica, debido a que la reacción entre el superóxido y el óxido nítrico es mucho más rápida que la reacción entre el superóxido y el hierro (reacción 2). Sin embargo, aunque está en boga la importancia del óxido nítrico y sus especies reactivas en sistemas biológicos, el radical hidroxilo producto de la reacción de Fenton no ha dejado de ser importante, ya que los argumentos cinéticos en contra de la reacción de Fenton no han sido completamente estudiados.

Por otro lado, tal vez el factor crucial al decidir si la reacción de Fenton podría o no proceder bajo condiciones biológicas es la disponibilidad de hierro (tal vez como complejos de bajo peso molecular, tal como el Fe-citrato). Aunque de acuerdo a los niveles de hierro libre, es posible que el metal pueda estar disponible para la reacción de Fenton, solo temporalmente (*vide infra*). Por otra parte, recientes estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) muestran que el hierro se puede liberar desde la proteína aconitasa la cual contiene centros hierro-azufre por acción del superóxido, ya que esta enzima está presente en la matriz mitocondrial, donde ocurre la generación de la mayor parte de esta especie reactiva de oxígeno ($O_2^{\cdot -}$) [5]. El hierro también se encuentra disponible para la reacción de Fenton en individuos con exceso de hierro (hemocromatosis hereditaria) [6], en donde es bien conocido el daño de tejido vía esta reacción.

Todo lo anterior, como el hecho de que el óxido nítrico desplazara a la reacción de Fenton, aunado a la discusión de que si existen las condiciones convenientes o no en sistemas biológicos para que ocurra la reacción, así como la controversia sobre el mecanismo y los productos de dicha reacción, hacen que el significado biológico completo de la reacción de Fenton no sea comprendido aún. Sin embargo, se considera que la reacción de Fenton sigue teniendo relevancia para el estudio de la generación de radicales

libres (RL) en sistemas biológicos, pero exigir un solo modelo experimental representativo de las diversas condiciones en las cuales la química de Fenton podría ocurrir en dichos sistemas puede ser un fracaso. Por esta razón en este trabajo se propone realizar un estudio espectroscópico EPR y Ultravioleta Visible (UV-Vis), bajo el cual se estudian varias condiciones en las que se nos permitan observar la presencia de RL aunque nuestro principal objetivo es el de observar el comportamiento del hierro durante la reacción, esto es como se oxida o se reduce, así como las especies de hierro presentes durante la reacción. Ya que a pesar de que la reacción de Fenton fue establecida con base en la hipótesis de Haber-Weiss en 1930, en donde la presencia de radicales hidroxilo era de gran importancia, al día de hoy existe aún gran controversia en cuanto a su significado químico, biológico y médico. Por lo tanto, establecer condiciones en las cuales se generan los RL y sobre todo de las especies de hierro permitirá estudiar la formación de los primeros a partir de proteínas *in vitro* y ver si estos RL se pueden formar en condiciones de estrés oxidativo [7].

ANTECEDENTES

1.1 Reacción de Fenton

Durante la respiración, los seres vivos obtienen energía de moléculas orgánicas, como la glucosa a través del metabolismo, en donde el carbono es oxidado y el oxígeno procedente del aire actúa como oxidante [8]. En este proceso se añaden cuatro electrones a través de una reducción controlada por el sistema de transporte de electrones de las mitocondrias, en la reducción univalente, el oxígeno forma cuatro sucesivas reducciones con un electrón, catalizadas por el citocromo oxidasa. Aproximadamente un 98% del oxígeno captado por las células entra en las mitocondrias donde es reducido hasta formar agua. Sin embargo, se sabe que algunas “fugas” en el sistema de transporte de electrones permiten que el oxígeno acepte menos de cuatro electrones y es entonces cuando se generan los intermediarios reactivos siguientes: el primero es el *radical superóxido* ($O_2^{\cdot-}$), resultante de la reducción del oxígeno molecular con un electrón; el segundo es la especie activa *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2), resultante de la adición de un segundo electrón y dos protones; el tercero es el *radical hidroxilo* ($\cdot OH$). Éste resultante de la incorporación de un tercer electrón y un protón, posee una elevada reactividad. El cuarto electrón y otro protón generan la molécula de agua (fig. 1).

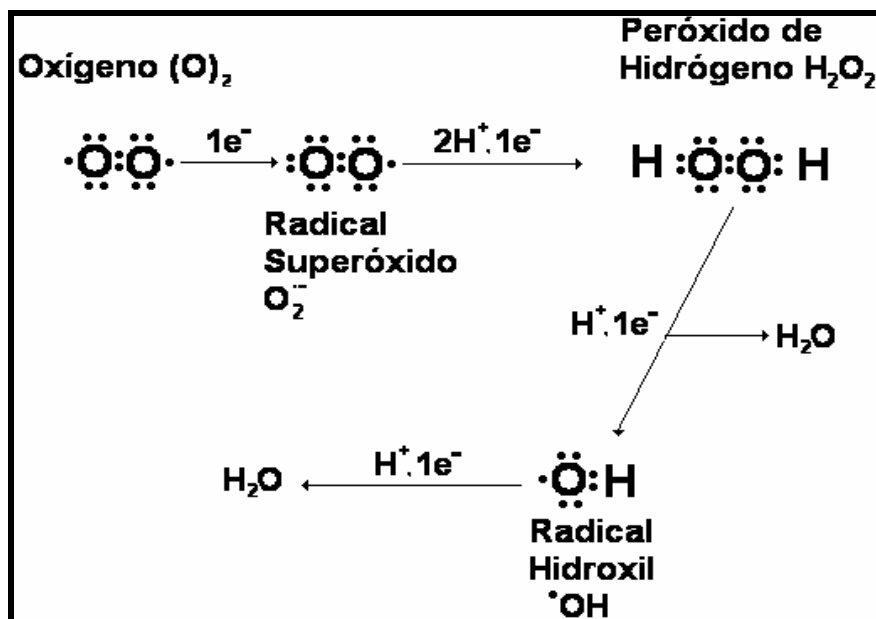


Figura 1 Radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo: los tres subproductos de las “fugas” en el sistema de transporte de oxígeno por la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial.

La reducción incompleta del oxígeno (H_2O_2), puede provocar la producción de ERO y éstas reaccionar con el ion Fe^{2+} que se encuentran en la célula principalmente como cofactor o unido a proteínas. Éste ion es capaz de transferir un tercer electrón al H_2O_2 (fig. 2) causando rompimiento del enlace O-O para formar un anión y un radical hidroxilo. Esta reacción es conocida como la reacción de Fenton que es muy importante en sistemas biológicos ya que el radical hidroxilo es muy reactivo y puede iniciar la lipoperoxidación, el rompimiento de las hebras del ADN o dañar sus bases, y oxidar cualquier molécula orgánica. A diferencia del H_2O_2 que puede circular libremente a través de las membranas, el $\bullet OH$ sólo actúa en el lugar donde se genera.

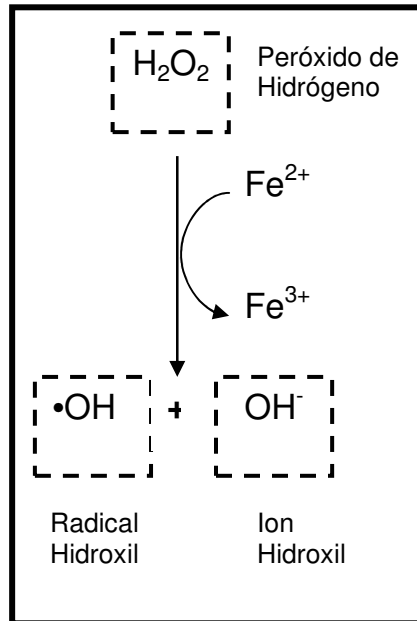


Figura 2 Reacción de Fenton

La historia de la reacción de Fenton comienza en 1876, cuando Fenton escribió una carta al editor de Chemical News [1], reportando una reacción entre el sulfato ferroso, peróxido de hidrógeno y ácido tartárico. El propósito de la carta fue la descripción del ensayo de esta reacción:

“Le tengo noticias de la siguiente reacción, la cual presenta una o dos muy interesantes peculiaridades... Para una solución muy diluida de sulfato de hierro... ácido tartárico es agregado... y unas pocas gotas de agua clorada o peróxido de hidrógeno... y un fino color violeta es obtenido... Si una sal férrica es usada en vez de sales ferrosas, el color no se obtiene...”

Ahora sabemos que el color violeta surge de un complejo entre el hierro y el producto de la oxidación del ácido tartárico, ácido dihidroximaleico; Fenton estableció la fórmula molecular del producto en 1894 y dedujo su estructura dos años después. La figura (3) muestra la estructura del ácido tartárico y el producto de esta oxidación, así como un posible mecanismo de reacción el cual involucra radicales libres. El primer

reporte y el trabajo completo de Fenton [9] demostraron tres características principales para esta reacción:

1. El oxidante puede ser no solo peróxido de hidrógeno sino agua clorada (el cual en solución básica es hipoclorito, ClO^-), ácido ascórbico entre otros.
2. Se requiere de un metal pesado (en este caso hierro) en bajas concentraciones.
3. Durante la reacción podría estar involucrado el hierro en un estado de oxidación alto como un intermediario, sin embargo, Fenton descartó ésta posibilidad en 1881.

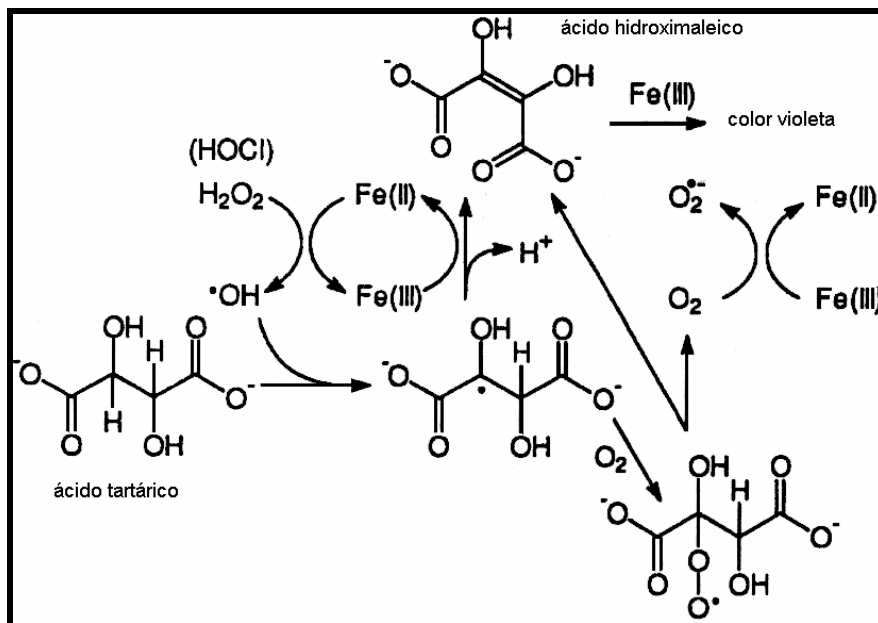


Figura 3 Intermediarios en la reacción de oxidación de ácido tartárico a ácido hidroximaleico por Fe^{2+} y H_2O_2 ó HOCl .

En la figura (3) se muestra la oxidación (abstracción de un H^\bullet del ácido tartárico) iniciada por el radical hidroxilo generado en la reacción entre Fe^{2+} y H_2O_2 .

El radical carbono resultante durante la abstracción del H^\bullet del ácido tartárico puede ser sometido a una competencia entre dos reacciones, ambas probablemente muy rápidas: la adición de oxígeno para formar un radical peroxil, o la reacción con el Fe^{3+} . Ambos pasos sirven para mantener al hierro en estado reducido, puesto que el radical peroxil puede rápidamente eliminar superóxido en solución básica [10], y el superóxido puede reducir al Fe^{3+} . La oxidación del radical carbono por Fe^{3+} , o eliminación de superóxido por el radical peroxil, podrían implicar un periodo de vida muy corto para el intermediario radical-catión el cual produce ácido dihidroximaleico mediante la eliminación de un protón.

El mecanismo de reacción mostrado en la figura (3) no fue, por supuesto, propuesto por Fenton ya que él no postuló un radical libre intermediario, este fue propuesto unas décadas después. De hecho, si la reacción entre Fe^{2+} y H_2O_2 produce directamente radicales libres hidroxilo (ec. 3), es todavía cuestión de debate.

1.2 Reacción Haber-Weiss

Pocos años después de la muerte de Fenton (1929), Haber, Willstätter y Weiss [11], sostuvieron que en presencia de H_2O_2 , el $\bullet OH$ forma $O_2^{\bullet -}$ y que este anión superóxido, ante un exceso de H_2O_2 , da lugar a una cantidad adicional de radical hidroxilo. Sin embargo, ahora sabemos que al considerar la situación hipotética de que los niveles de H_2O_2 sean excepcionalmente altos (10 mmol dm^{-3}) son muchos ordenes de magnitud más alto de los que probablemente hay en la presencia de catalasa y/o glutatión, bajo esta contradicción es entonces cuando se considera la estimulación de la reacción de Fenton con el $O_2^{\bullet -}$ (la suma de la reacción (2) y (3)) como el mecanismo mediante el cual se obtiene la ecuación (5) conocida como la reacción de Haber-Weiss. De aquí el término “hierro-catalizador reacción de Haber-Weiss” [12] (fig.4). Además, estas expresiones han sido utilizadas para describir la producción de $\bullet OH$ por superóxido.

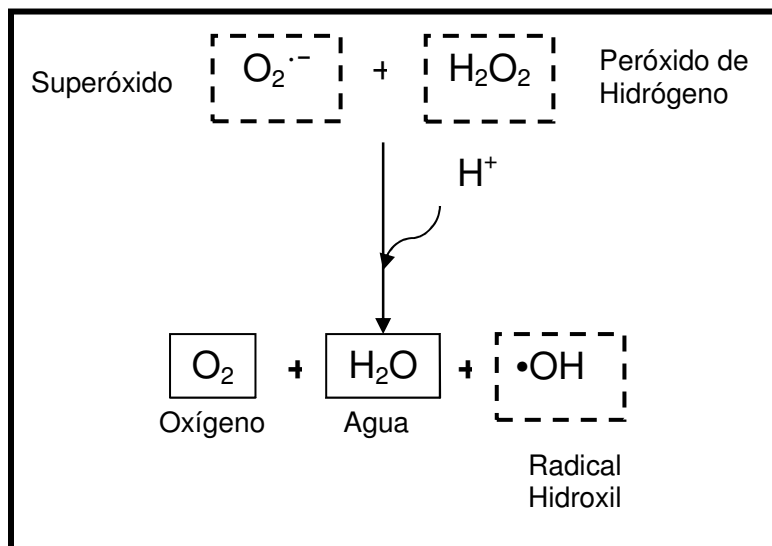
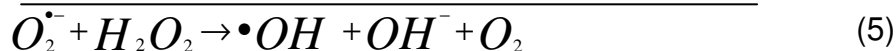


Figura 4 Reacción Haber-Weiss

Más importante, que el nombre de las reacciones Fenton o Haber-Weiss son los siguientes puntos relevantes:

1. El hierro como el metal catalizador de la reacción.
2. El peróxido de hidrógeno como oxidante.

El término de “los reactivos de Fenton” se usa frecuentemente para describir la Fe^{2+}/H_2O_2 [13], y éstos son comúnmente elegidos como la pareja metal/oxidante

estudiados por Fenton. Sin embargo, es fundamental no abandonar la importancia de otros metales y oxidantes los cuales participan en reacciones análogas.

1.3 Radical hidroxilo en la reacción de Fenton

Dado que el radical hidroxilo es la especie de oxígeno más reactiva producida en la reacción de Fenton su detección es de gran importancia. Sin embargo estos no pueden ser detectados directamente por EPR en solución, su espectro de absorción en el ultravioleta es un pico no característico [14] y su alta reactividad hacia la mayoría de los compuestos orgánicos resulta en una vida media extremadamente corta 1×10^{-9} s.

Hay dos aproximaciones generales para detectar la presencia de radicales hidroxilo en las reacciones o en sistemas biológicos:

1. Calculando las constantes relativas de velocidad basados en cálculos cinéticos [15].
2. El uso de atrapadores de espín en EPR especialmente para el radical hidroxilo, formando aductos con interacción hiperfina característicos [16].

Mientras que el método de atrapadores de $\bullet\text{OH}$ parece más directo y positivo, no está exento de problemas. Muchas aproximaciones para atrapar al $\bullet\text{OH}$ han sido usadas: los ejemplos incluyen la hidroxilación de compuestos aromáticos, como los de benzoato a salicato; formación de dímeros fluorescentes de tirosina; observaciones de EPR usando atrapadores de espín tales como el DMPO, los cuales forman el radical aducto estable de $\bullet\text{OH}$, etc.

La hidroxilación aromática es atractiva ya que simples derivados del benceno forman una mezcla isomérica, los cuales pueden ser identificados y la relación de los tres productos forman una huella digital de los reactivos intermediarios. Estos pueden ser comparados con los radicales hidroxilos generados por radiación iónica, los cuales son realmente libres. El ácido benzoico también reacciona con los $\bullet\text{OH}$ para formar tres isómeros, ácido hidroxibenzoico, usualmente en la razón aproximada 2:1:1 para los isómeros ortho, meta y para [15], pero varía la relación con la presencia o ausencia de oxidantes tales como el oxígeno o metales.

Por otro lado el radical hidroxilo podría ser detectado utilizando atrapadores de espín como el DMPO que es usado extensivamente en sistemas biológicos para superóxido y radicales hidroxilo [16,17]. Aunque, es bien conocido que el aducto DMPO-OOH (superóxido) decae rápidamente a el DMPO-OH aducto en presencia de iones metálicos [18], también es importante notar que el DMPO-OH aducto podría ser formado espontáneamente, es decir, donde no hay la posibilidad de la generación de radicales hidroxilo [19]. Otro estudio arroja un resultado importante, y es que con la incorporación de ^{17}O a H_2O_2 dentro de DMPO/ $\bullet\text{OH}$ en el sistema Fenton, descrito por Burkitt [20] como “quizá la evidencia más directa de que el aducto DMPO/ $\bullet\text{OH}$ se forma en el sistema Fenton por la adición de radicales libres hidroxilo a DMPO...”. Sin embargo, no tomaron

este experimento como prueba de que el radical libre $\bullet\text{OH}$ está involucrado, ya que un complejo $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$ reaccionando con DMPO podría producir las mismas especies.

Es posible que el Fe^{2+} u otro metal reductor forme un complejo con H_2O_2 (fig.5), debido a las diferencias en la estructura electrónica entre el hierro y el cobre, se esperan diferencias fundamentales en la habilidad de estos dos metales para formar especies oxo/metal [21], y para que este complejo se rompa en radicales libres hidroxilo. Dependiendo de la concentración de atrapadores y de la constante de velocidad de competencia de las reacciones, un atrapador podría producir una distribución característica de radicales hidroxilo o alguna mezcla de productos resultado de la oxidación de los atrapadores intermediarios, seguida por la ruptura del radical atrapador o su hidrólisis, este problema ha sido discutido extensivamente por Goldstein *et al.* [13]. Sin embargo, el uso de atrapadores de radicales hidroxilo en un entorno biológico involucra complicaciones adicionales [22,23].

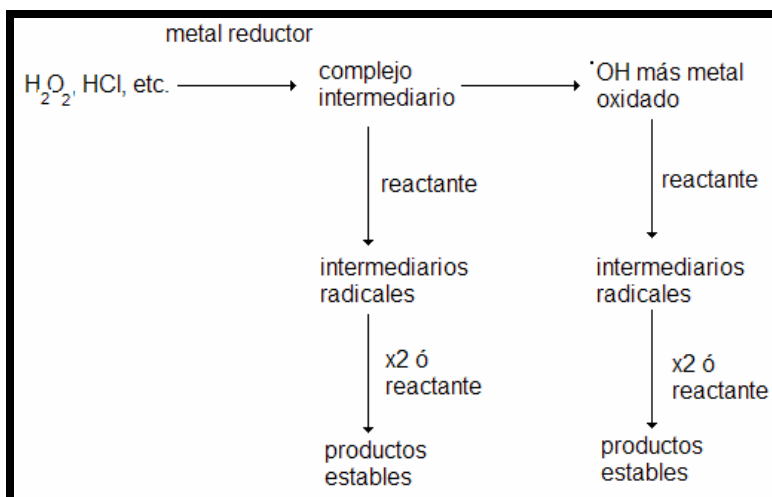


Figura 5 Esquema general de la reacción para reactivos e intermediarios involucrados en la química de Fenton.

La formación de aductos intermediarios en la transferencia de electrones en la reacción no es inusual, tales aductos son la regla en lugar de la excepción, en la reacción de $\text{OH}\bullet$ con compuestos aromáticos.

Wink *et al.* [24] observaron un intermediario transitorio en la oxidación de N-nitrosodimetilamina con los reactivos de Fenton sugiriendo al $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O}_2)^{2+}$ y FeO^{2+} como dichos intermediarios, con base en sus argumentos cinéticos. Aunque es muy difícil extrapolar estos experimentos bajo condiciones en las cuales podrían prevalecer en biología, debido a que en biología las condiciones de los reactivos podrían ser mucho más bajas que los comúnmente usados en experimentos químicos, y el metal podría estar presente en menor cantidad.

En contraste, otros estudios han concluido que los radicales libres hidroxilo son producto de un sistema Fenton bajo una variedad de condiciones en donde se estudio la hidroxilación de salicilato y se encontró la participación de dichos radicales. Además, estos han sido identificados por EPR producto de la oxidación de alcoholes [25], dimetilsulfoxido

[26] y en un modelo de fragmentación de DNA [27]. Por último Yamazaki *et al* [28] publicaron un diagrama en donde se muestran las especies oxidadas producto de la reacción de Fenton (fig.6): la especie 1, corresponde al radical hidroxilo libre; la especie 2 es de un radical libre coordinado y la especie 3 pertenece a especies de hierro en alto estado de valencia.

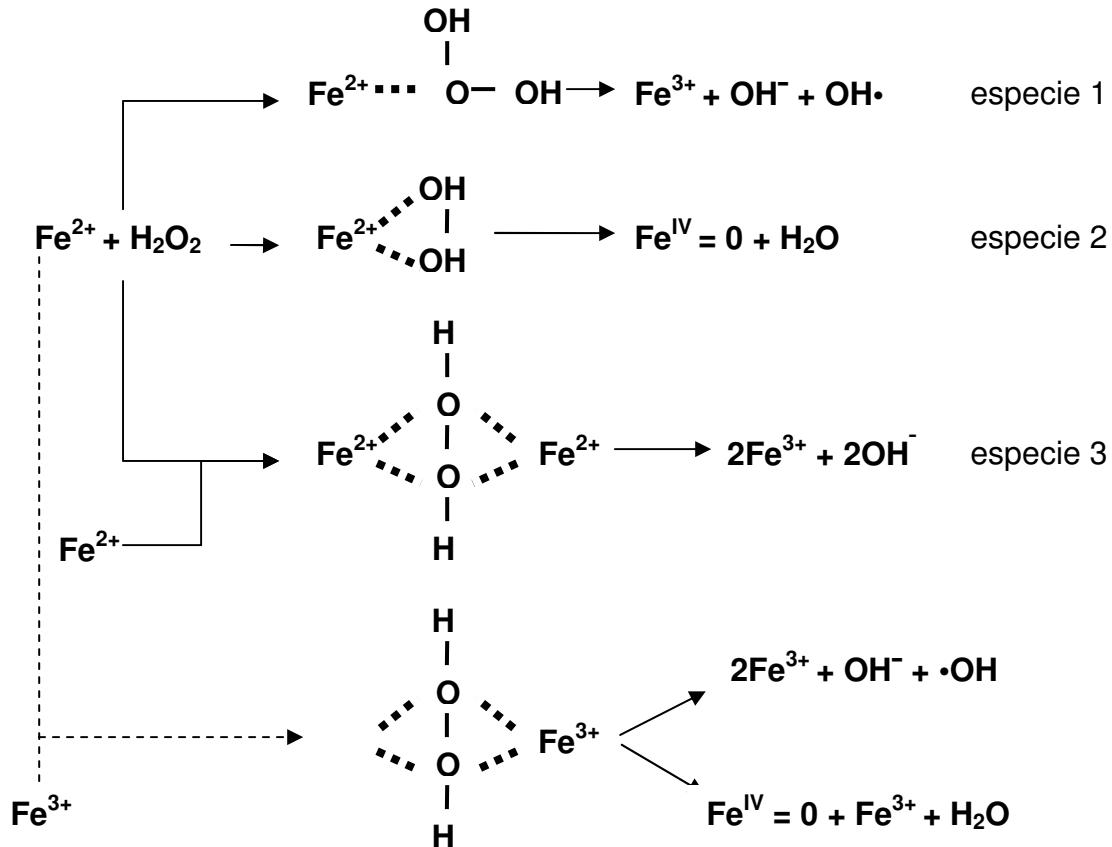
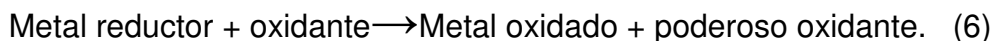


Figura 6. Diagrama de las especies oxidadas producto de la reacción de Fenton [28].

Estos estudios muestran una variedad de resultados que confunden la identificación de los productos de la reacción de Fenton, debido posiblemente a una inapropiada descripción acerca de una reacción general para dicha reacción. Ya que se ha descrito que el reactivo oxidante podrían ser los radicales libres hidroxilo, pero bajo algunas condiciones dependiendo del metal, ligantes, pH, atrapadores, concentración, y la formación de un complejo oxo/metal bajo otras. Exigir un solo modelo experimental representativo de las diversas condiciones en las cuales la química de Fenton podría ocurrir en sistemas biológicos podría ser un fracaso. Sin embargo, las conclusiones de Goldstein *et al.* [13] representan un desafío ya que él concluyó: “*Que identificar los intermediarios formados vía reacción de Fenton in vivo, es una labor irrealizable, y es casi imposible decidir si el radical $\cdot\text{OH}$ es formado o no*”.

1.4 Uso de diferentes agentes oxidantes y metales en la reacción de Fenton

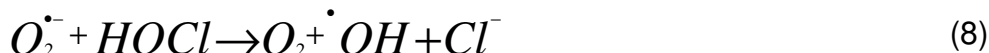
Retomando el hecho de que en la reacción de Fenton se pueden involucrar muchos metales alternativos y otros oxidantes como sustitutos del peróxido de hidrógeno, en esta sección se detallan algunas diferencias acerca del uso de algunos metales y oxidantes. Para llevar a cabo la reacción de Fenton se requiere de forma general un metal reductor y un oxidante como se muestra en la siguiente reacción:



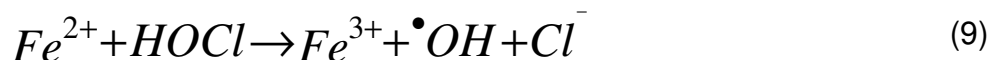
Dado que el hierro y el peróxido de hidrógeno son los comúnmente usados por simplicidad se escribe el caso específico de Fe^{2+} y H_2O_2 (ec. 3). Sin embargo, en el primer trabajo de Fenton citado anteriormente, él usó agua clorada como una alternativa al peróxido de hidrogeno; la primera es una solución de ácido hipocloroso (HOCl) o hipoclorito (OCl^-), dependiendo del pH (ec. 7):



Las observaciones de Fenton mostraron que el superóxido reacciona con el HOCl (pero probablemente no con el OCl^-) siete ordenes de magnitud más rápido que la reacción con el peróxido de hidrógeno (ec. 5).



el ácido hipocloroso equivalente a la reacción (3) es,

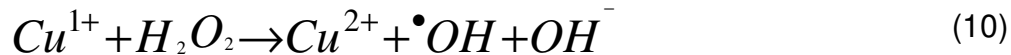


Esta reacción (9) es otra fuente potencial de radicales hidroxilo. Candeias *et al.* [29] mostraron que la reacción de un complejo de Fe^{2+} , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, con HOCl no hidroxila al benzoato, aunque la aparente producción de radicales hidroxilo no fue cuantitativa, entonces la reacción (9) podría no estar ocurriendo en la reacción, o bien podría ser que la velocidad de reacción entre $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ y HOCl fuera alrededor de tres ordenes de magnitud más rápida que con el H_2O_2 .

El ácido hipotiocianoso (HOSCN), es un “pseudo-halógeno” análogo a HOCl ; tiocianato (SCN^-) esta presente en concentraciones milimolares en la saliva, y la posible implicación de un tipo de química de Fenton, podría ser considerada en la acción antibacterial de ésta. Una bacteria la cual coloniza superficies dentales produce peróxido de hidrogeno el cual entonces, produce ácido hipotiocianoso vía peroxidasas orales. Las

lactoperoxidasas contenidas en las pastas dentales han sido evaluadas presumiblemente con miras a una química de Fenton [30].

Como ya vimos se puede reemplazar el H_2O_2 por otros agentes oxidantes, lo mismo ocurre con los agentes reductores. Por lo tanto el hierro también puede ser sustituido por Cu^{1+} . Aunque el Fe^{2+} y el H_2O_2 son propiamente descritos como los “reactivos de Fenton” muchos otros metales en bajos estados de oxidación pueden sustituirse por Fe^{2+} como ejemplo el cobre



Es muy difícil estudiar la cinética de reacción del Cu^{1+} ya que en solución dismuta (una reacción en la que dos moléculas de sustrato idénticas tienen destinos diferentes):



Otros metales reductores son frecuentemente usados en experimentos para generar radicales, siendo estudiados por EPR, por ejemplo el titanio (III), cromo (II), cobalto (II) y vanadio (II) [31]. Estos metales reducen H_2O_2 para producir radicales hidroxilo.

1.5 Hierro como reactivo Fenton.

En sistemas biológicos la mayor absorción fisiológica de Fe^{2+} respecto al Fe^{3+} , que al principio se atribuyó a mecanismos especiales de absorción, actualmente se considera como una consecuencia directa de las diferencias en solubilidad. Es por esto, que en la presente tesis se propone realizar la reacción de Fenton a dos pH (3 y 7.4). Entonces es necesario conocer las propiedades de este elemento en soluciones.

En solución el Fe^{2+} forma numerosos complejos, la mayor parte de los cuales son octaédricos, normalmente los complejos ferrosos pueden ser oxidados a férricos, por otro lado estos complejos dependen del pH y la temperatura. La figura 7 muestra el porcentaje de Fe^{2+} y las especies que aparecen junto con él, en relación al pH a 25° C y donde es posible ver que hasta un pH alrededor de 8, el Fe^{2+} existe en solución [32]. Entonces la reacción de Fenton iniciando con Fe^{2+} debería efectuarse, aunque la concentración de nuestro reactivo Fenton ($FeSO_4$) es muy pequeña, en este intervalo de pH.

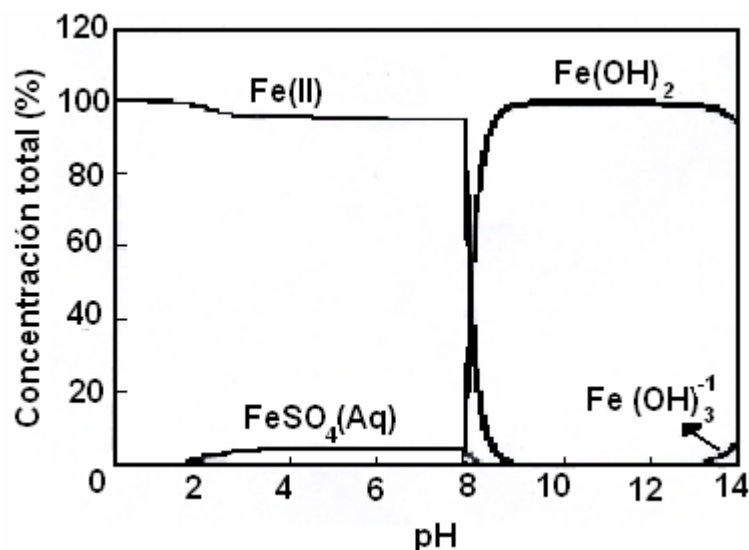


Figura 7 Proporción de Fe^{2+} y las especies en equilibrio con él a 25°C.

Por otro lado, en cuanto a la estructura electrónica de los complejos del Fe^{2+} , se requieren campos ligantes muy intensos para causar el apareamiento de los espines. Por eso prácticamente todos los complejos de Fe^{2+} son de alto espín, los espectros de los complejos de alto espín consisten solamente en la transición del tipo ${}^5t_{2g} \rightarrow {}^5e_g$, que en el ion $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ se encuentra alrededor de $\sim 1000 \text{ m}\mu$ o 10^4 nm . El extremo de la banda de absorción llega hasta el extremo rojo del visible, causando el color característico azul-verdoso muy pálido del $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Esta banda de absorción es en realidad un doblete esto se debe quizás aun efecto Jahn-Teller en el estado 2e_g [33]. En la figura 8 se presenta el espectro de absorción típico del $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.

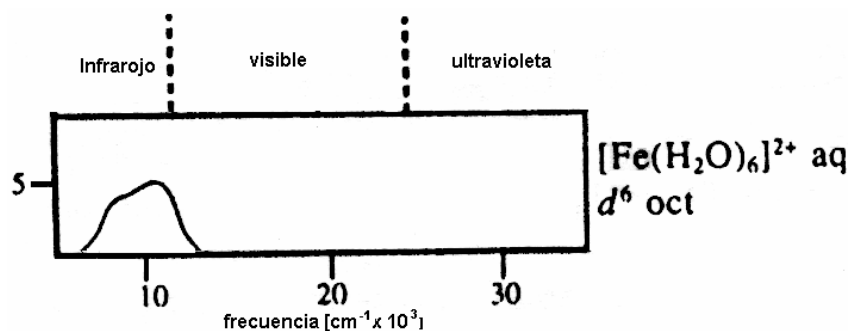


Figura 8 Espectro de absorción típico de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$

En cuanto al Fe^{3+} , una de sus características en solución acuosa es su tendencia a la hidrólisis y/o formación de complejos. Para medios bastante ácidos, a pH de 2 a 3, el grado de hidrólisis es muy grande, la figura 9 muestra la concentración de Fe^{3+} en solución en relación al pH a 25°C. Esta representación ha sido llevada de un pH de 2 a 3.2 porque este es su límite de solubilidad, podemos observar, que la solubilidad del Fe^{3+} es muy alta para un pH bajo alrededor de 2 y muy pequeña para pH alto alrededor de 3.2.

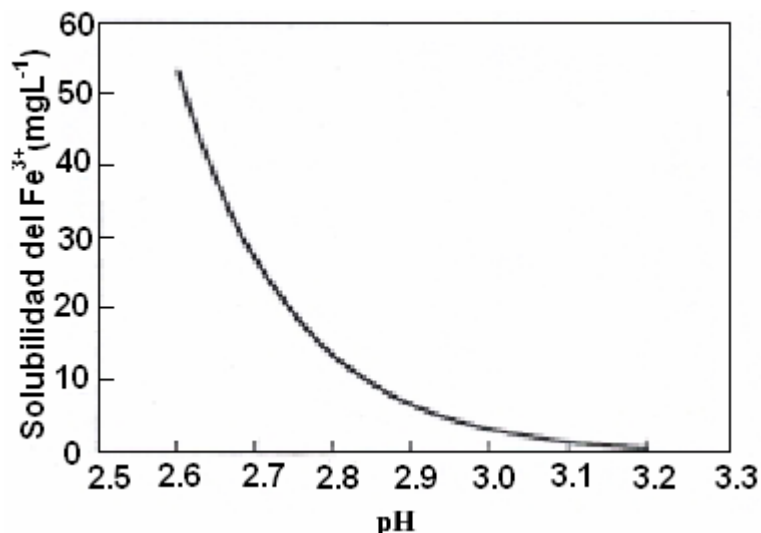


Figura 9 Concentración de Fe^{3+} en solución en relación al pH a 25° C

Para obtener soluciones que contengan fundamentalmente (digamos 99%) al Fe^{3+} como ion hexacu, el pH debe ser alrededor de cero, en la figura 10 se muestra la proporción de las especies de Fe^{3+} que están en equilibrio en relación al pH a 25°C. [32]

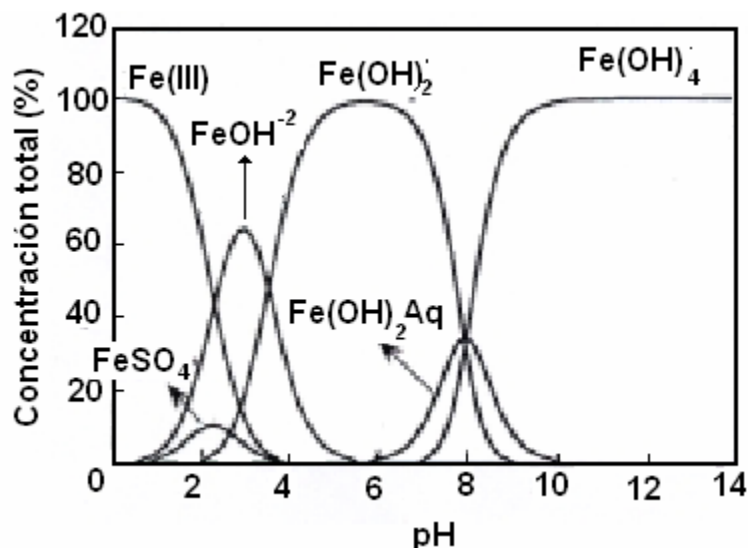


Figura 10 Proporción de Fe^{3+} y las especies existentes con él en equilibrio a 25°C

Las diversas especies hidroxio, como por ejemplo $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, son de color amarillo, debido a las bandas de transferencia de carga, que si bien están en el ultravioleta, alcanzan hasta el visible. Por eso las soluciones de las sales férricas son amarillas, aun cuando se trate de sales con aniones no complejantes. En cuanto a la estructura electrónica de los compuestos de Fe^{3+} , éstos tienen una tendencia a exhibir bandas de transferencia de carga en el ultravioleta cercano, cuyos extremos de baja energía son suficientemente intensos en la zona del visible como para oscurecer casi por completo las bandas $d-d$ muy débiles, prohibidas por espín. Finalmente el Fe^{3+} forma gran número de complejos, la mayoría de los mismos son octaédricos; el octaedro puede considerarse como su poliedro de coordinación característico [33].

CAPÍTULO 2

2.1 OBJETIVO GENERAL

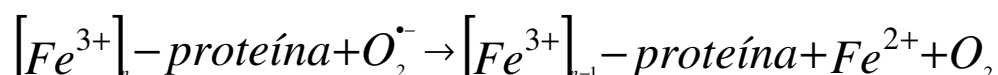
- Estudiar la reacción de Fenton mediante las espectroscopias Ultravioleta-Visible (UV-Vis) y Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Encontrar las relaciones $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]$ y $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ en la reacción de Fenton, en las cuales se observe la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , así como la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} mediante espectroscopia UV-Vis.
- Determinar los cambios en la reacción de Fenton efectuada a diferente pH (3 y 7.4) mediante espectroscopia UV-Vis.
- Identificar mediante espectroscopia EPR las especies de hierro observadas en la reacción de Fenton, bajo las condiciones de concentración de hierro propuestas en UV-Vis. Verificar la presencia de RL durante la reacción de Fenton mediante EPR.

2.3 JUSTIFICACIÓN

La reacción de Fenton es de gran importancia en sistemas biológicos en donde metaloproteínas tales como la ferritina y el transferrina sirven para transportar el hierro en una forma mucho menos reactiva hacia el peróxido de hidrógeno que los complejos de bajo peso molecular. Sin embargo, el superóxido [34] y otros agentes reductores [35] pueden liberar Fe^{2+} de éstas reservas biológicas:



Por lo tanto, si existen sitios biológicos donde el metal es ligado y de acuerdo a la química de Fenton es posible que tal tejido sea dañado, pues la especie oxidada producto de la reacción de Fenton es un reactivo que reacciona con biomoléculas de la célula tales como el DNA, lípidos, proteínas, por lo que el hierro pueden causar un daño muy serio. Importantes ejemplos incluyen a la bleomicina [36] y el VP-16 [37].

Por lo tanto, la reacción de Fenton podría estar involucrada en la producción de radicales libres en sistemas biológicos durante el estrés oxidativo (ruptura de membranas, oxidación de lipoproteínas plasmáticas, alteración de la estructura y función de proteínas, oxidación de ácidos nucleicos) producido en diferentes enfermedades como diabetes, cáncer, alzheimer, etc. Además, la reacción puede ser utilizada para estudiar reacciones *in vitro* simulando lo que ocurre en las reacciones biológicas ya que en la actualidad no existe un solo modelo experimental representativo de las diversas condiciones en las cuales la química de Fenton puede ocurrir en sistemas biológicos. Debido a una inapropiada descripción acerca de una ecuación general para dicha reacción. Se ha descrito que en ciertos casos de enfermedad se generan los radicales libres hidroxilo pero bajo algunas condiciones dependiendo del metal, ligantes, pH, atrapadores, concentración, y la formación de un complejo oxo/metal bajo otras. Exigir un solo modelo experimental representativo de las diversas condiciones en las cuales la química de Fenton podría ocurrir en sistemas biológicos podría ser un fracaso.

Por lo tanto en este trabajo se propuso estudiar la reacción de Fenton empleando diferentes relaciones de concentración H_2O_2/Fe y diferentes pH con la finalidad de verificar el estado de oxidación del hierro, así como su estado de espín durante la reacción de Fenton, pues como vimos los estudios de dicha reacción se han enfocado en la descripción de los RL, dejando a un lado el comportamiento del hierro. En cuanto a los RL sólo se verificó su presencia durante la reacción de Fenton efectuada a distinto pH.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Reactivos Fenton

Los reactivos empleados para efectuar la reacción de Fenton en este trabajo fueron: como metal reductor el sulfato ferroso granular ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de Baker Analysed'; cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) de tsq tecsiqim Anasol; y como agente oxidante al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%. Para cada reactivo de hierro, la concentración utilizada en este estudio fue calculada únicamente para los iones de hierro, según el reactivo en solución empleado. Por otro lado, la relación típica para efectuar la reacción de Fenton es de 1 de Fe por 5-25 porciones de H_2O_2 , esto es para la generación de RL, en este estudio el objetivo es observar el comportamiento del hierro durante la reacción de Fenton es por eso que iniciamos con las relaciones de concentración propuestas en la literatura [39] empleadas para identificar al RL: Sin embargo, el propósito es observar la oxidación o reducción del hierro. Por lo tanto, se eligieron las siguientes concentraciones en cada uno de los reactivos:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Se preparó una solución stock de 0.125 mM de iones Fe^{2+} . A partir de esta solución stock se obtuvieron soluciones con las siguientes concentraciones: 0.125 mM, 0.16 mM, 0.25 mM, 0.5 mM y 2.5 mM.

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Se preparó una solución stock de 0.125 mM de iones Fe^{3+} . A partir de esta solución stock se obtuvieron soluciones con las siguientes concentraciones: 0.125 mM, 0.16 mM, 0.25 mM, 0.5 mM y 2.5 mM.

H₂O₂

Se preparó una solución stock de 2.5 mM de H₂O₂, cantidad constante que se usó en todas las soluciones para iniciar la reacción de Fenton.

Se preparó una solución amortiguadora de fosfatos (buffer) a pH=3 a 0.04 M, así como también buffer a pH=7.4 (fisiológico) a 0.04 M, cada uno de los cuales fueron hervidos por 5 min y burbujeados con gas nitrógeno para obtener una solución libre de oxígeno, de lo contrario en solución ácida el oxígeno molecular puede convertir el ion ferroso a ion férrico [40]. Cada una de los espectros UV-Vis y EPR de la reacción de Fenton efectuada con iones Fe³⁺ y iones Fe²⁺ se hicieron a pH=3 y a pH=7.4.

3.2 Registro de los espectros UV-Vis de los reactivos Fenton

Se hicieron las mediciones UV-Vis de cada uno de los reactivos Fenton a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 25 UV-Vis, haciendo un barrido de cada una de las muestras de 190 nm a 900 nm de longitud de onda. Los espectros UV-Vis se realizaron en el laboratorio de Bioquímica Médica en la Escuela Superior de Medicina del IPN

Para las mediciones UV-Vis de iones Fe³⁺, así como de iones Fe²⁺ se colocaron en la celda del espectrofotómetro cada una de las concentraciones de Fe³⁺ y Fe²⁺ descritas en los reactivos Fenton (sección 3.1) y se obtuvieron los espectros.

Para las mediciones UV-Vis del H₂O₂ se colocó en la celda del espectrómetro la solución stock, obteniendo los espectros a una concentración de 2.5 mM.

3.3 Registro de los espectros UV-Vis durante la reacción de Fenton

Para hacer una comparación entre los diferentes espectros UV-Vis obtenidos nos referimos a las relaciones [H₂O₂]/[Fe³⁺] y [H₂O₂]/[Fe²⁺] durante todo el estudio. Entonces como la concentración de H₂O₂ se mantuvo fija (2.5 mM) y la concentración de hierro (Fe³⁺ y Fe²⁺) fue variando de acuerdo a las concentraciones descritas en los reactivos de Fenton (sección 3.1). Se obtuvieron las siguientes relaciones de concentración.

$$\frac{[H_2O_2]}{[Fe^{3+}]} = 20,15,10,5 \text{ y } 1 \quad (12)$$

$$\frac{[H_2O_2]}{[Fe^{2+}]} = 20,15,10,5 \text{ y } 1. \quad (13)$$

El procedimiento fue colocar 5 mL de buffer en la celda del espectrómetro, luego se agregó el Fe^{3+} , finalmente se adiciono H_2O_2 e inmediatamente se tomo el tiempo con un cronómetro, haciendo el primer barrido de la reacción a los 30 s, para luego realizar mediciones de la reacción a los 2, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min. Teniendo cuidado de agitar la celda para evitar que la precipitación del hierro. Se efectuó el mismo procedimiento para las concentraciones de iones Fe^{2+} .

3.4 Obtención de los espectros EPR durante la reacción de Fenton

Las mediciones EPR de la reacción de Fenton se tomaron a 77 K en el equipo EPR, que consta del espectrómetro JEOL JES-RE3X, una fuente de microondas en banda X (9.45 GHz), mientras que el equipo de computo utilizado fue una estación de trabajo HP-9000 Serie 400, el software es JEOL ES-PRIT el cual realiza operaciones de adquisición y procesamiento de información.

Se encontró que los parámetros para el registro de los espectros EPR en la reacción de Fenton fueron: campo magnético central de 250 mT, con una ventana de ± 250 mT en un barrido de 3 minutos, fase de 180° , ganancia de 1.25×0.1 mT, amplitud de 1×1000 , constante de tiempo 0.01 s y una frecuencia de 9.0512 GHz.

De acuerdo con los espectros UV-Vis obtenidos de la reacción de Fenton se encontró que las relaciones $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]$ y $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ de 10 y 20 cada una. De acuerdo al análisis de la reacción de Fenton mediante UV-Vis, estas relaciones de concentración fueron las condiciones en las que la reacción se efectúa de la mejor manera para obtener los mejores resultados como se mostrará en el siguiente capítulo.

El procedimiento fue en frasco ámbar colocamos 5 mL de buffer al cual agregamos la concentración correspondiente de Fe y H_2O_2 , tomando 250 μ L de la reacción y colocándola en un tubo eppendorf el cual fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido. Para ser medido en EPR a los siguientes tiempos 0, 0.5, 5 y 30 min, por lo que hay cuatro espectros correspondientes a estos tiempos de reacción en cada figura. Para poder visualizar los cambios de cada una de las señales presentes se hicieron tablas en las que se presentan el valor g, intensidad de línea (I), ancho de línea (Γ) y tiempo transcurrido de la reacción (t). Cabe mencionar que en el eje de las ordenadas se ha medido, la intensidad de línea (I) en unidades arbitrarias, mientras que el ancho (Γ) está en mT.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Espectros UV-Vis de los reactivos Fenton

4.1.1 Iones Fe^{3+} en $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

En la figura 4.1a se muestran los espectros UV-Vis de las distintas concentraciones de Fe^{3+} utilizadas, a $\text{pH}=3$, en donde el Fe^{3+} presenta dos bandas de absorción en $\lambda_{c33}=210$ nm y $\lambda_{d33}=274$ nm. Estas bandas de absorción surgen debido a que el Fe^{3+} , tiene una configuración electrónica $3d^5$, en un estado degenerado tiene ocupados los 5 orbitales d con un electrón cada uno. Sin embargo, según la teoría de campo cristalino (apéndice A), en donde se explica que las propiedades de los complejos resultan de la separación de las energías de los orbitales d debido a interacciones de tipo electrostáticas entre iones metálicos (Fe^{3+}) y los ligantes (agua y cloro). Para la mayoría de los complejos de Fe^{3+} el octaedro puede considerarse como su poliedro de coordinación característico, entonces cuando están coordinados los electrones de los orbitales d del Fe^{3+} , apuntan directamente hacia los ejes de coordenadas x , y , z (donde están los ligantes), esto es, los orbitales $d_{x^2-y^2}$ y d_z^2 son repelidos más intensamente por las cargas negativas de los ligantes que los electrones de los orbitales d_{xy} , d_{yz} y d_{zx} , dirigidos entre los ligantes (fig. A5). En consecuencia, la energía de los orbitales $d_{x^2-y^2}$ y d_z^2 aumentará (debido a la fuerte interacción con los ligantes) y la de los orbitales d_{xy} , d_{yz} y d_{zx} disminuirá respecto a la energía de los orbitales d . Es decir, en un campo de simetría octaédrica los cinco orbitales d del metal pierden parcialmente la degeneración originando dos series degeneradas: una de mayor energía, e_g , doblemente degenerada y otra de menor energía, t_{2g} , triplemente degenerada. Por lo tanto, en el estado activado el Fe^{3+} tiene un electrón desapareado, por lo que el espectro UV-Vis característico involucra transiciones electrónicas de éste electrón entre un orbital d de baja energía a uno de alta energía. En la sección 1.5, se discutió que los complejos férricos tienen un color amarillo, debido a que tienden a exhibir bandas de transferencia de carga que si bien están en el ultravioleta, alcanzan hasta el visible.

Por otro lado, a pH=7.4 (fig. 4.1b), empleando las mismas concentraciones de Fe^{3+} , las absorciones correspondientes a λ_{c33} y λ_{d33} , siguen apareciendo, aunque desplazándose a una longitud de onda de $\lambda_{c37}=213$ nm y $\lambda_{d37}=276$ nm. Además, a pesar de que es la misma cantidad de Fe^{3+} , la absorbancia a pH=3 es tres veces mayor que a pH=7.4.

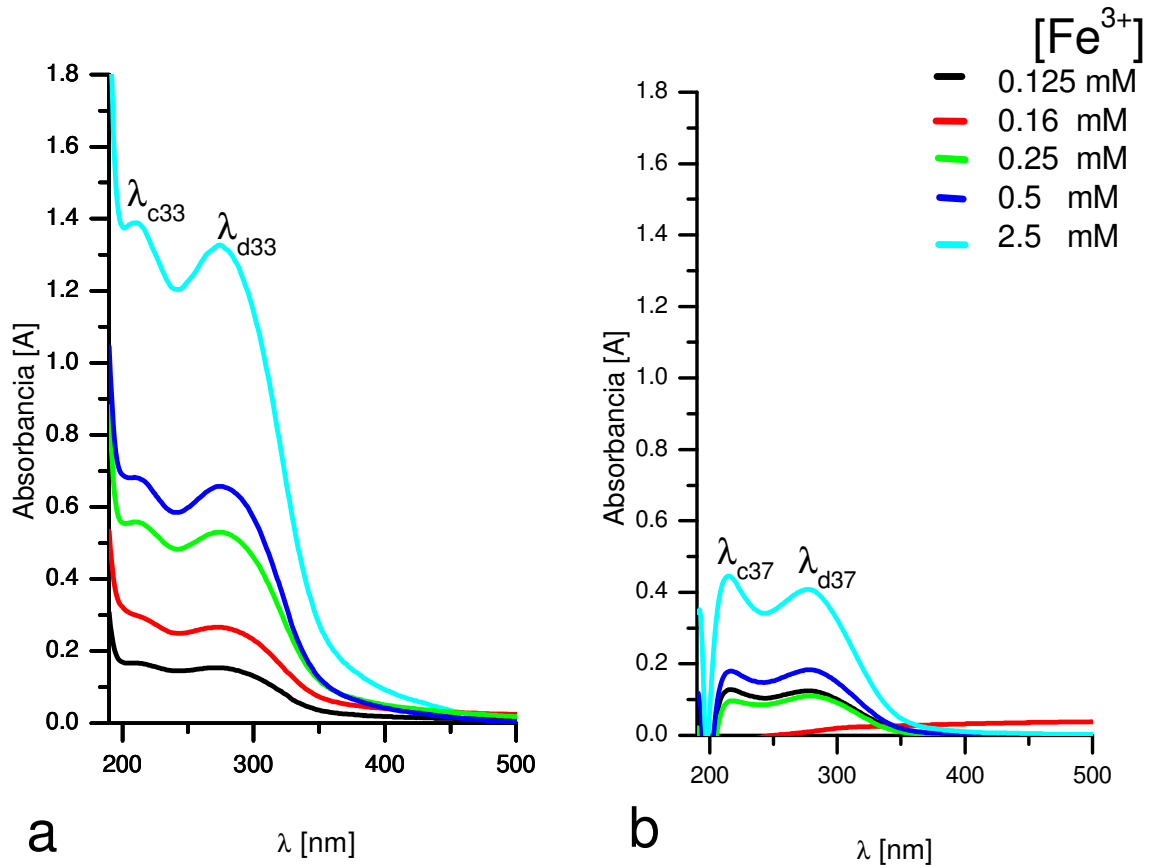


Figura 4.1 Comparación de las concentraciones empleadas de iones Fe^{3+} **a)** a pH=3 y **b)** a pH=7.4.

4.1.2 Iones Fe^{2+} en $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

En la figura 4.2a observamos que a concentraciones pequeñas de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.125 mM, 0.16 mM y 0.25 mM) no aparece señal en el UV-Vis. En la sección 1.5 se discutió como es que el complejo de Fe^{2+} no absorbe en el UV-Vis, puesto que tiene una configuración electrónica $3d^6$, sus electrones en estado fundamental tienen sus cinco orbitales d ocupados (un orbital con dos electrones apareados y el resto con un electrón), pero en estado activado, presenta tres orbitales ocupados con una pareja de electrones apareados, por lo que se requieren campos ligantes muy intensos para causar el apareamiento de los espines. Por eso prácticamente todos los complejos de Fe^{2+} son de alto espín, los espectros de los complejos de alto espín consisten solamente en la

transición del tipo ${}^5t_{2g} \rightarrow {}^5e_g$, que en solución se encuentra alrededor de $\sim 10^4$ nm. El extremo de la banda de absorción llega hasta el extremo rojo del visible, causando el color característico azul-verdoso muy pálido de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, que es la forma del ion Fe^{2+} en solución, entonces la absorción de este ion es en la región del infrarrojo y no en la de ultravioleta visible (fig.8). Sin embargo el reactivo usado contiene impurezas de 0.05% de hierro férrico, lo que explica que en las siguientes concentraciones (0.5 mM y 2.5 mM) se observen bandas de absorción, estas bandas son más evidentes a pH=7.4 (fig.4.2b), teniendo una absorción en: $\lambda_{c27}= 205$ nm y $\lambda_{d27}=280$ nm.

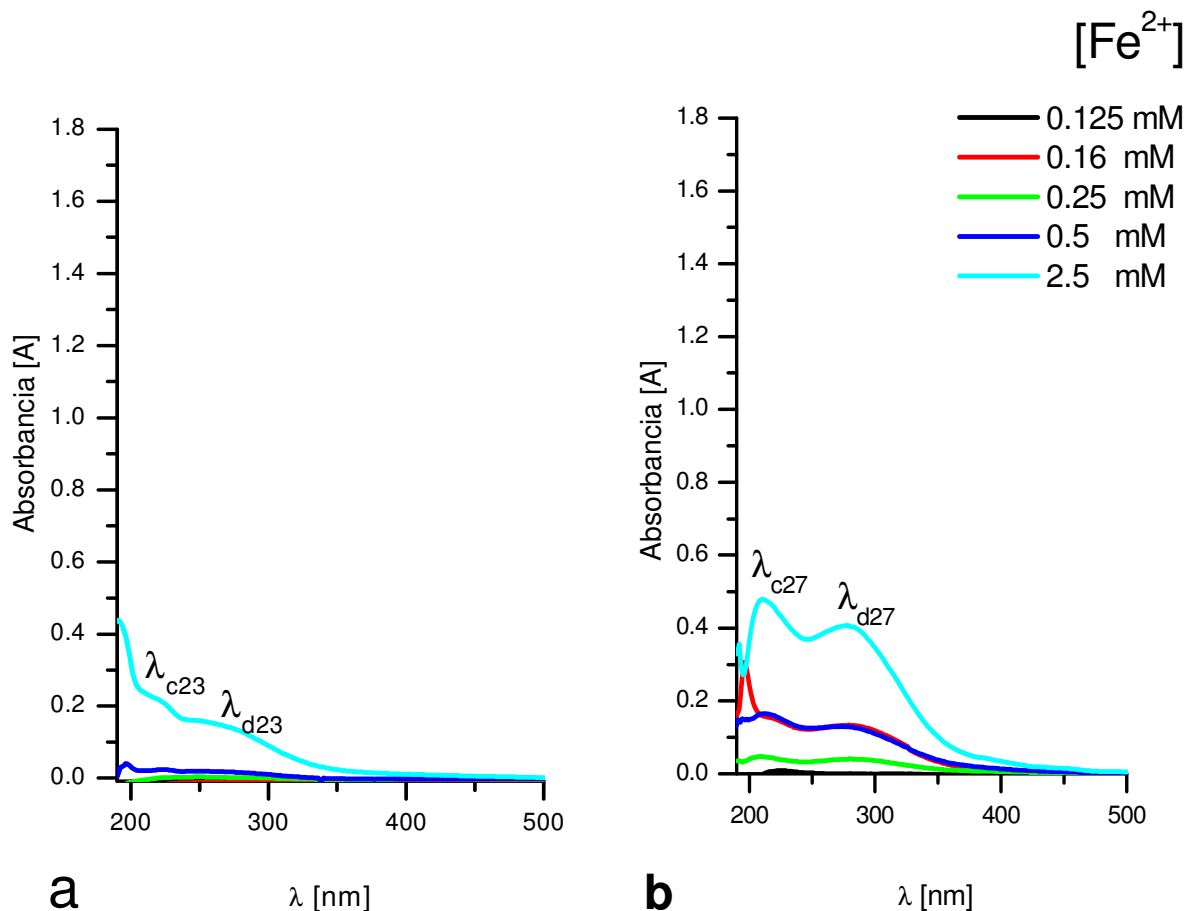


Figura 4.2 Comparación de las distintas concentraciones de iones Fe^{2+} en: **a)** a pH=3 **b)** a pH=7.4

4.1.3 H_2O_2

En la figura 4.3a se muestra el espectro UV-Vis del H_2O_2 a pH=3, donde es posible apreciar un pico en $\lambda_{ap3}=191$ nm. En la figura 4.3b se muestra el H_2O_2 a pH=7.4, en el espectro se observa absorción en $\lambda_{ap7}=202$ nm. De la teoría tenemos que el H_2O_2 en

solución tiene una banda de absorción en el UV-Vis de 190 nm [41]. Conocer estas bandas de absorción del H_2O_2 en UV-Vis nos permitirá más adelante realizar una comparación de las bandas de absorción que estén presentes durante la reacción de Fenton.

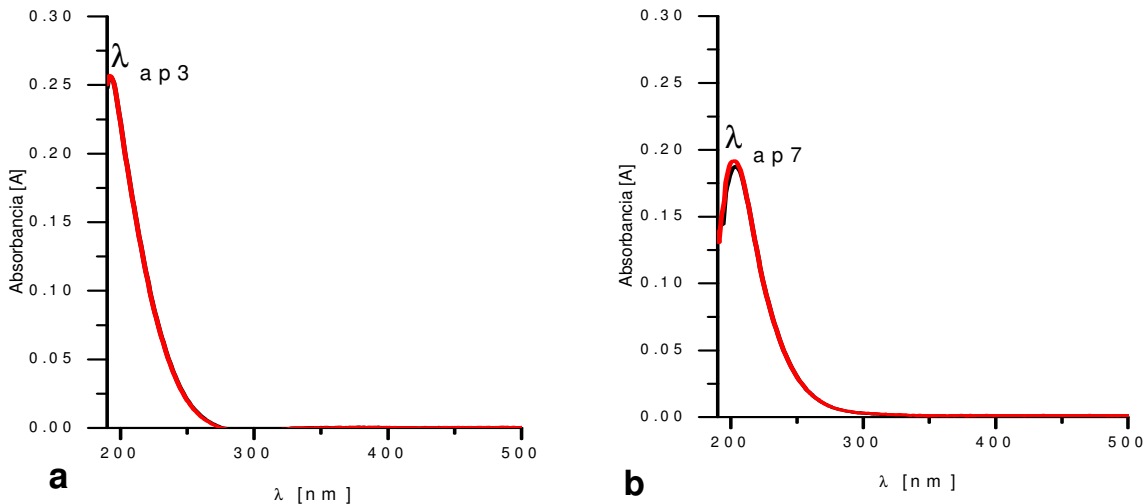


Figura 4.3 Espectro UV-Vis de H_2O_2 en: **a)** a pH=3, **b)** a pH=7.4.

4.2 Espectros UV-Vis durante la reacción de Fenton empleando Fe^{3+}

Se realizaron las mediciones UV-Vis de la reacción de Fenton, en esta sección se presentan los resultados correspondientes a las relaciones $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}]$ de 20 y 10, ya que estos representan las mejores condiciones para describir a la reacción de Fenton en términos de la absorbancia, longitud de onda y el tiempo de reacción.

A continuación describimos los espectros UV-Vis de $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}]=10$, a pH=3 (fig. 4.4a). Se presentan dos bandas de absorción en: $\lambda_{c33}=210$ nm y $\lambda_{d33}=274$ nm, estas longitudes de onda oscilan en un intervalo de 1 nm a 5 nm, según el tiempo de reacción, este desplazamiento en términos cualitativos es que la vibración de los ligantes por la agitación térmica produce variaciones de energía, y por tanto de la frecuencia de las radiaciones absorbidas. Estos picos de absorción, corresponden a iones Fe^{3+} , como ya se explicó en la sección 4.1.1, es por la configuración electrónica del Fe^{3+} el cual tiene un electrón desapareado que participa en transiciones electrónicas debido al desdoblamiento de los orbitales *d*.

La $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}]=10$, representa mejor la reacción de Fenton, ya que se observa claramente como es que los iones Fe^{3+} existentes, al reaccionar con el H_2O_2 se van reduciendo químicamente a iones Fe^{2+} según la reacción (4). Esta reducción química se observa cuantitativamente en los espectros cuando la banda de absorción en 210 nm disminuye su absorbancia, conforme se incrementa el tiempo de reacción hasta

desaparecer; mientras que la banda en 274 nm solo disminuye su absorbancia. En la sección 4.1.2 discutimos que los iones Fe^{2+} no absorben (fig. 4.2). Es por esto que esperamos que la señal de Fe^{3+} disminuya en absorbancia al reaccionar con el H_2O_2 . La descripción anterior sólo refleja la transferencia de electrones entre el H_2O_2 y el Fe^{3+} . De ahí la necesidad de estudiar la reacción de Fenton con Resonancia Paramagnética Electrónica para verificar la existencia del radical libre.

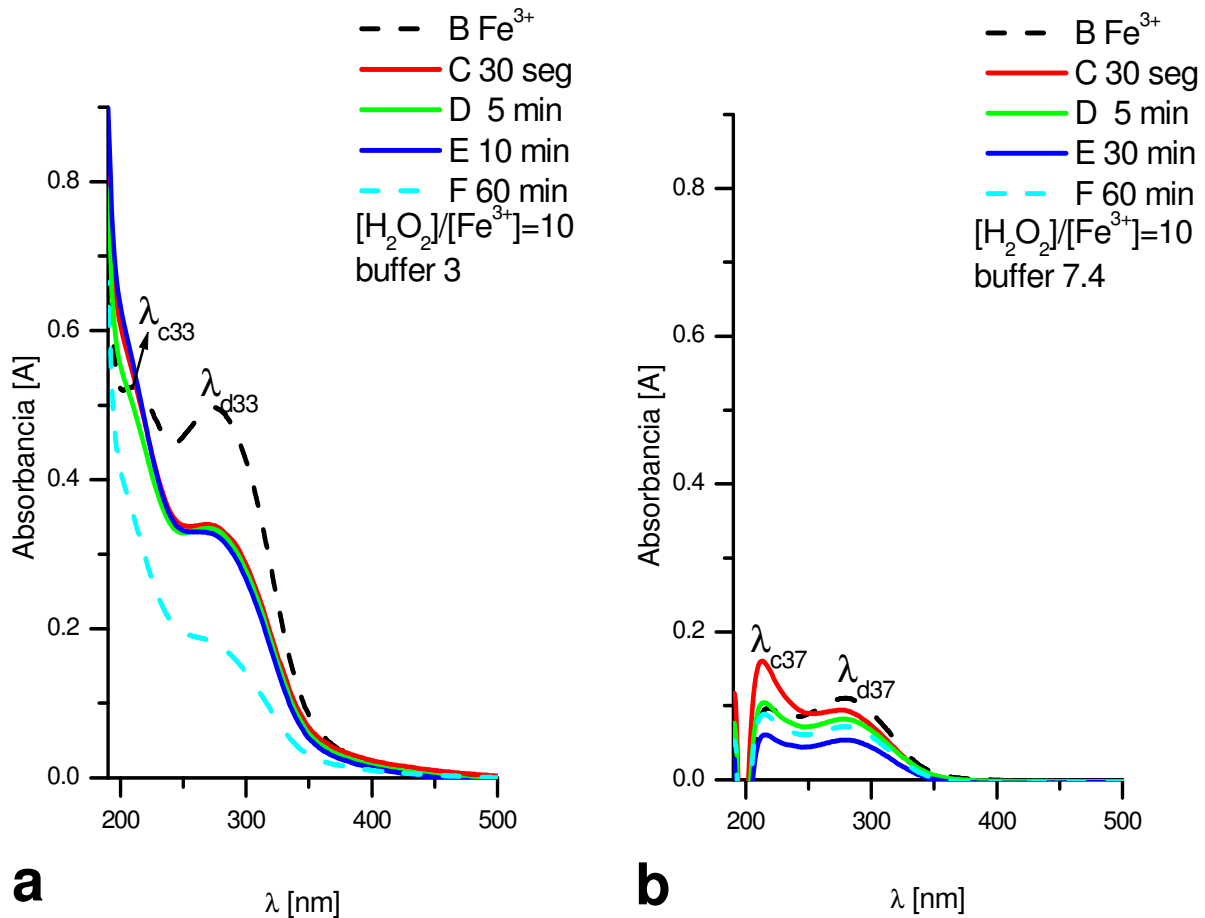


Figura 4.4 Reacción de Fenton en $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 10$, seguida desde los 0.5 min hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 al Fe^{3+} . En **a)** a $\text{pH} = 3$ el pico de absorción en $\lambda_{c33} = 210$ nm correspondientes al Fe^{3+} desaparece y el pico $\lambda_{d33} = 274$ nm todavía se observa. En **b)** a $\text{pH} = 7.4$, $\lambda_{c37} = 212$ nm y $\lambda_{d37} = 278$ nm.

Cuando se emplea la relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 20$ (fig. 4.5a), se observaron prácticamente las características anteriormente descritas durante la reacción, exceptuando que al transcurrir el tiempo de reacción hay un intervalo en donde el comportamiento de la señal de Fe^{3+} cambia, pues las bandas λ_{c33} y λ_{d33} que inicialmente decrecían, ahora aumentan en absorbancia, esto es debido a que los iones Fe^{3+} reducidos químicamente a iones Fe^{2+} vuelven a reaccionar con un remanente de H_2O_2 lo cual produce una oxidación de los iones Fe^{2+} a iones Fe^{3+} que aumentan la absorbancia de las bandas. Como la concentración empleada de Fe^{3+} es de 0.125 mM, permite que exista un remanente de H_2O_2 que ocasiona la reversibilidad de la reacción de Fenton entre los iones de hierro. Sin embargo, esta reversibilidad no se presentó en la relación de concentración de 10, ya que

el H_2O_2 existente se consume completamente al reaccionar sólo con los iones Fe^{3+} , lo cual se manifiesta en los espectros (fig.4.4a) al disminuir gradualmente la absorbancia de las señales características de Fe^{3+} .

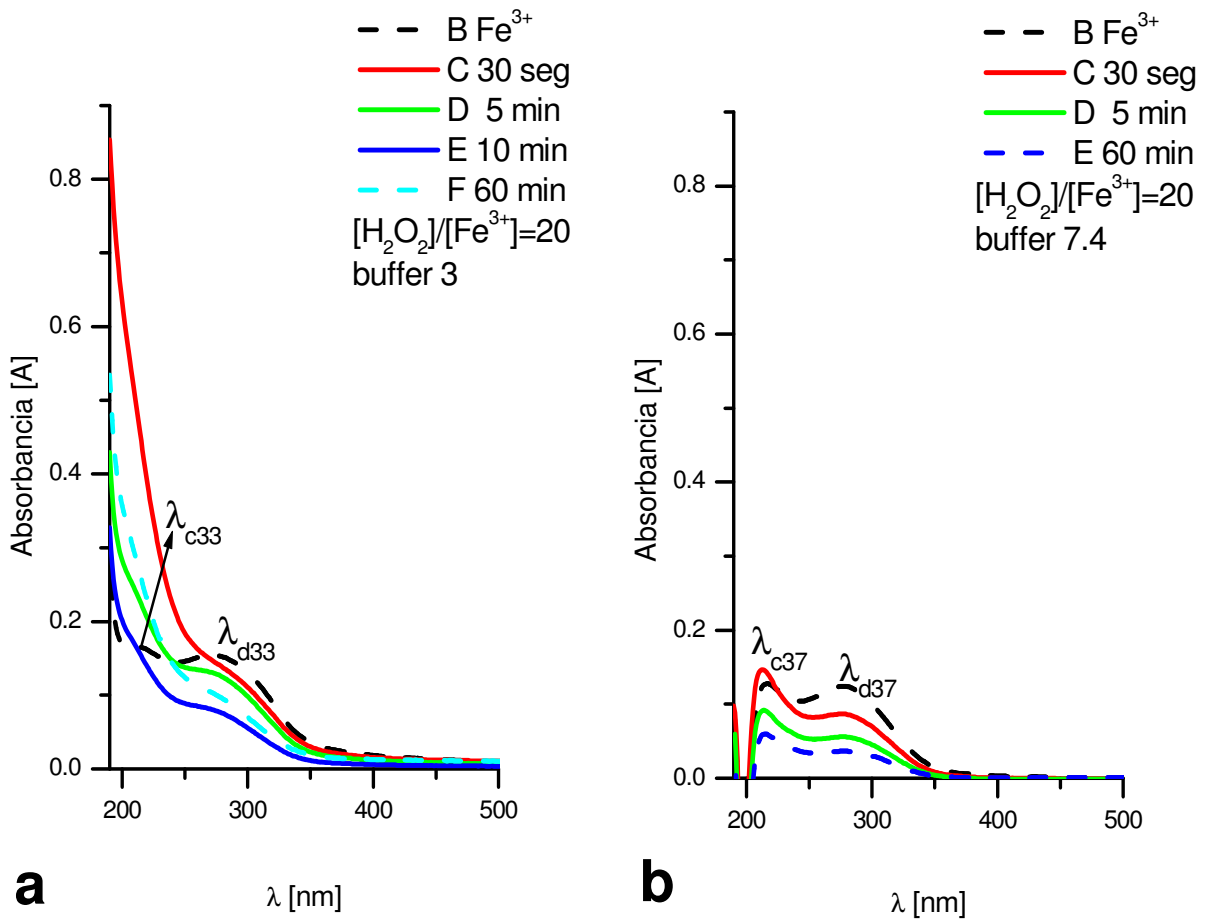


Figura 4.5. Reacción de Fenton en la relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 20$, seguida desde los 30 s hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 al Fe^{3+} . En **a)** a pH=3 el pico $\lambda_{c33} = 210$ nm desaparece inmediatamente de iniciada la reacción aunque $\lambda_{d33} = 274$ nm aún se observa. En **b)** a pH=7.4 se observa absorción en $\lambda_{c37} = 213$ nm y $\lambda_{d37} = 277$ nm.

En ambos casos, al agregar el H_2O_2 al Fe^{3+} , el principal cambio se obtiene en la banda de 210 nm, puesto que disminuye su absorbancia conforme aumenta el tiempo de reacción hasta desaparecer; mientras que la segunda banda de 274 nm también disminuye haciéndose más ancha pero durante la reacción se sigue observando. El hecho de que una banda de absorción presente mayores modificaciones en absorbancia que otra, tiene que ver con el coeficiente de absorción molar ϵ , en donde $\epsilon < 10^3$ son transiciones electrónicas de baja probabilidad. La especie absorbente de Fe^{3+} en 210 nm tiene un $\epsilon = 1776 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que en 274 nm, $\epsilon = 1591 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; por lo que al transcurrir la reacción de Fenton la probabilidad de una transición electrónica en 210 nm disminuye aún más hasta desaparecer.

En los espectros a pH=7.4 (fig. 4.4b y 4.5b), aparecen bandas de absorción $\lambda_{c37}=213$ nm y $\lambda_{d37}=277$ nm. Básicamente al adicionar el H_2O_2 a el Fe^{3+} e incrementar el tiempo de reacción, las señales de Fe^{3+} disminuyen en absorbancia, pero conservan la forma de cada pico, aunque la señal en 277 nm es la que sufre mayores modificaciones de absorbancia, haciéndose más ancha. La concentración más baja de Fe^{3+} (0.125 mM) es en donde se observa mejor que la absorbancia de las bandas asociadas a iones Fe^{3+} van disminuyendo, y la señal 277 nm decrece. Nuevamente aquí se presenta el proceso reversible, en el cual iones de Fe^{3+} son reducidos a iones Fe^{2+} que a su vez reaccionan con el H_2O_2 remanente ocasionando una oxidación de los iones Fe^{2+} a iones Fe^{3+} , esta situación se presenta en la relación de $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]=10$, no así con la relación de concentración de 20 (fig.4.4b).

Las principales diferencias entre la reacción de Fenton en los pH propuestos son: a pH=3 sólo aparecen bandas de absorción en 210 nm y 274 nm, mientras que para pH=7.4 existe un desplazamiento de éstas longitudes de onda a 213 nm y 277 nm. Luego a pH=3 la absorbancia de las señales antes descritas es tres veces mayor que la correspondiente en pH=7.4, además de que a pH=3 la absorbancia de la longitud de onda en 210 nm desaparece. Por el contrario a pH 7.4, la señal modificada es la de 277 nm. Por último en pH=3 la reacción de Fenton a los 0.5 min de iniciada provoca cambios en la absorbancia de cada longitud de onda identificada como Fe^{3+} . Sin embargo a pH=7.4 los mismos cambios se comienzan a observar hasta los 5 min, lo cual implica que la reacción de Fenton efectuada a pH=3 puede que se lleve a cabo con mayor rapidez que a pH=7.4. Más adelante se demostrará mediante EPR que a pH=7.4 la reacción de Fenton ocurre dentro de los primeros 0.5 min de iniciada la reacción.

El hecho de que en la reacción de Fenton se observe una absorbancia mayor a pH=3 que a pH=7.4, es debido a que cuanto más alto sea la $[H^+]$ en una disolución, menor será el pH y tendrá una concentración baja de iones hidroxilo OH^- , entonces como el $FeCl_3$ se disocia en Fe^{3+} y $(Cl)_3^{-1}$, la carga positiva de los H^+ repelerá a la carga también positiva del Fe^{3+} , así los H^+ se unen a el $(Cl)_3^{-1}$ formando ácido clorhídrico (HCl) mientras que iones Fe^{3+} se unen a el OH^- para formar hidróxido férrico $Fe(OH)_3$, pero como es menor la $[OH^-]$ entonces son pocos los iones de hidróxido férrico los que se forman dando lugar a la formación cuantiosa de iones Fe^{3+} . Por lo que la cantidad de iones Fe^{3+} serán más cuantiosos en pH=3. Ya que a pH=7.4 ocurre lo contrario, pues existe un gran $[OH^-]$, por lo que habrá mayor formación de hidróxido ferrico que de iones Fe^{3+} que puedan reaccionar con el H_2O_2 . En la figura 10 se representa la proporción de Fe^{3+} en donde para obtener soluciones que contengan fundamentalmente (digamos 99%) de Fe^{3+} en solución, el pH debe ser alrededor de cero.

Finalmente las figuras de los espectros UV-Vis de las relaciones restantes empleadas de $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]$ a pH=3 y pH=7.4 se localizan en el apéndice B. Sin embargo, en la tabla 4.1 se resumen algunas características ya descritas arriba de la reacción de Fenton en estas relaciones de concentración. Los resultados de las mediciones UV-Vis de la reacción de Fenton empleando Fe^{3+} son reproducibles.

Tabla 4.1 Descripción de la reacción de Fenton en distintas relaciones de $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]$.

$[H_2O_2]/[Fe^{3+}]$	pH	UV-Vis	Comportamiento durante la reacción de Fenton
20	3	210 nm 274 nm	La absorbancia de las longitudes de onda disminuye. Reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Desaparece absorción en 210 nm. Existe un proceso de reversibilidad de la reacción de Fe^{2+} a Fe^{3+} .
	7	213 nm 277 nm	La absorbancia de las longitudes de onda disminuye gradualmente. Reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Disminución significativa de absorbancia en 277 nm.
15	3	210 nm 274 nm	Comportamiento análogo al de la $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]=20$
	7	211 nm -	
10	3	210 nm 274 nm	La absorbancia de las longitudes de onda disminuye gradualmente. Reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Desaparece la absorción en 210 nm.
	7	212 nm 278 nm	La absorbancia de las longitudes de onda disminuye. Reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Desaparece absorción en 278 nm. Existe un proceso de reversibilidad Fe^{2+} a Fe^{3+} .
5	3	210 nm 274 nm	Comportamiento análogo al de la $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]=10$ aunque como la concentración de Fe^{3+} es mayor que en las relaciones anteriores, la disminución de la absorbancia de las bandas es entonces menor, ya que el H_2O_2 no alcanza a reducir todos los iones Fe^{3+} existentes.
	7	212 nm 278 nm	
1	3	207 nm 270 nm	
	7	210 nm 278 nm	

4.3 Espectros UV-Vis durante la reacción de Fenton empleando Fe^{2+}

Se efectuaron las mediciones UV-Vis de la reacción de Fenton en todas las relaciones de concentración $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}$. Sin embargo, en esta sección como en la anterior, sólo se presentan los resultados correspondientes a la relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ de 20 y 10, ya que estos representan las mejores condiciones, para describir la reacción de Fenton en términos de la absorbancia, longitud de onda y el tiempo de reacción.

Para el espectro UV-Vis de $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]=20$ a $\text{pH}=3$, (fig. 4.6a). Como se menciona en la sección 4.1, el Fe^{2+} no absorbe en UV-Vis debido a su estructura electrónica. Entonces al agregar el H_2O_2 advertimos que emergen dos bandas de absorción alrededor de 205 nm y 280 nm. La absorción de estas longitudes de onda se incrementa conforme

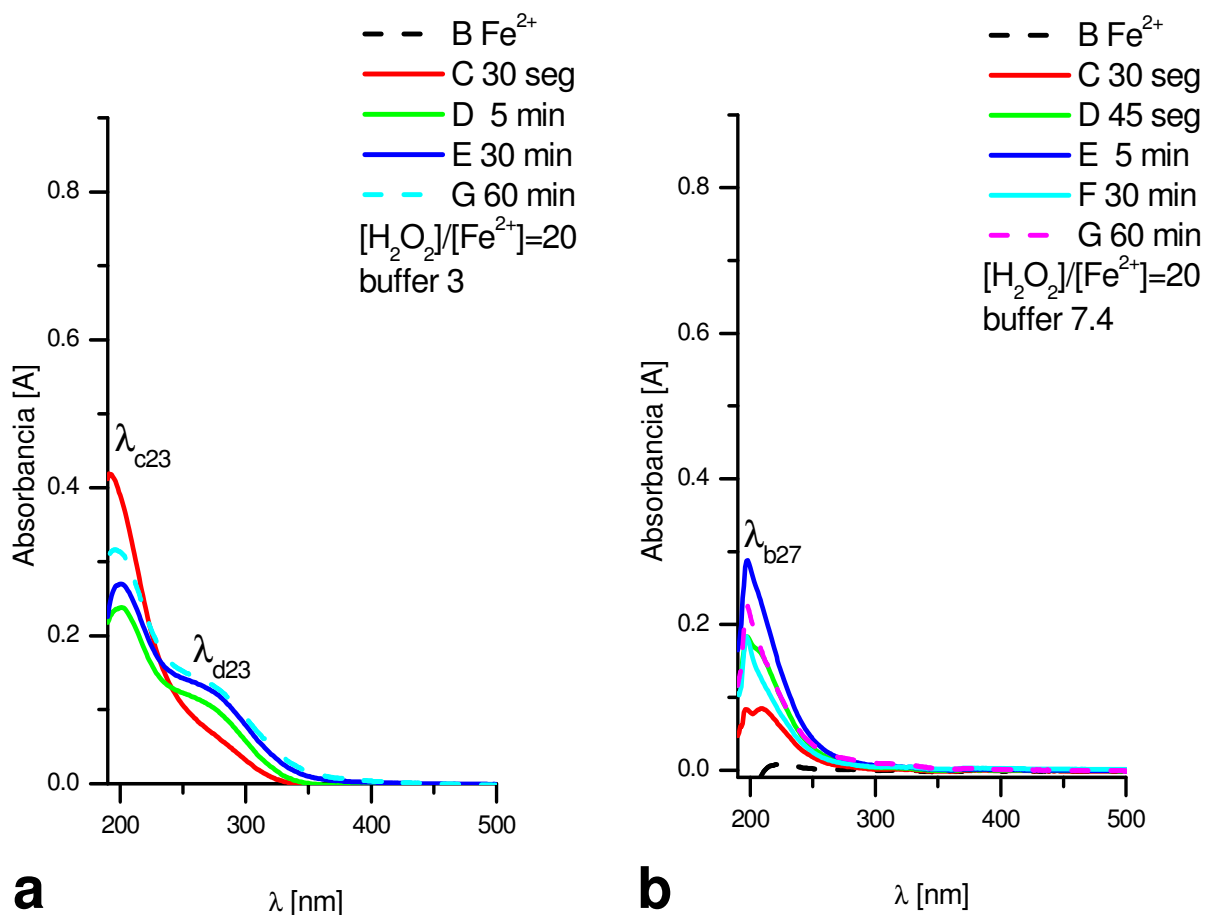


Figura 4.6 Reacción de Fenton, utilizando Fe^{2+} en $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]=20$, seguida desde los 30 s hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 . En **a)** a $\text{pH}=3$ tenemos bandas de absorción en $\lambda_{c23}=205$ nm y otra muy ancha en λ_{d23} . En **b)** a $\text{pH}=7.4$ sólo tenemos un pico en $\lambda_{b27} = 197$ nm.

transcurre el tiempo de reacción. Entonces las longitudes de onda asociadas a Fe^{3+} producto de la oxidación de iones Fe^{2+} en la reacción de Fenton son distintas a las bandas de absorción asociadas a iones Fe^{3+} de la sección anterior, esto es debido a que la longitud de onda a la cual absorben los compuestos de coordinación, varían al cambiar la naturaleza de estos, como los compuestos de hierro empleados para iniciar la reacción son distintos, el ambiente cristalino es diferente, por la presencia de distintos ligantes, por lo que esperamos que halla un desplazamiento de las bandas de absorción de los iones Fe^{3+} .

Las longitudes de onda de 205 nm y 280 nm se atribuyen a iones Fe^{3+} , puesto que los iones Fe^{2+} han sido oxidados por acción del H_2O_2 y comienzan a aparecer sus absorciones características. Por otro lado, según la reacción (3) tenemos un radical producto de la reacción de Fenton, sin embargo, de la literatura [14] el radical hidroxilo (que es el RL que proponemos como producto de la reacción, como se explicara más adelante en la sección 4.5) no tiene longitud de onda característica en UV-Vis

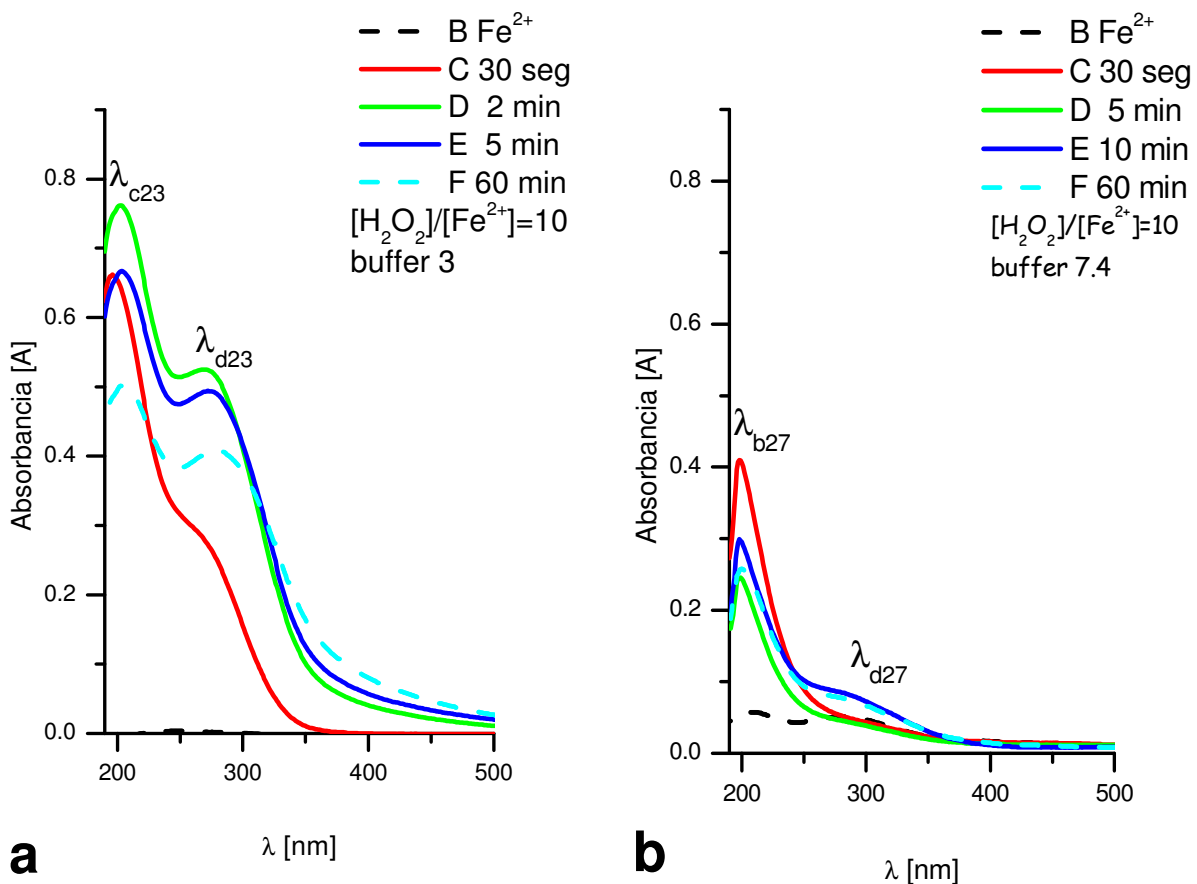


Figura 4.7 Reacción de Fenton, utilizando Fe^{2+} en $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]=10$, seguida desde los 30 s hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 al Fe^{2+} . En **a)** a $\text{pH}=3$ tenemos bandas de absorción $\lambda_{c23}=205$ nm y otra ancha en $\lambda_{d23}=280$ nm. En **b)** a $\text{pH}=7.4$ tenemos picos en $\lambda_{b27}=200$ nm y otra muy ancha en λ_{d27} .

En la relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]=10$ (fig. 4.7a), cuando el tiempo de reacción de Fenton esta entre los 5 y 10 min ocurre un decremento de la absorbancia en las señales, pues los iones Fe^{2+} que han sido oxidados a Fe^{3+} , ahora son reducidos, pero a diferencia de la relación anterior ($[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]=20$) en donde el aumento de la absorbancia es gradual, se pudiera pensar que al tener sólo el 0.125 mM de Fe^{2+} es más probable la existencia de un remanente de H_2O_2 que pudiera reducir al Fe^{3+} sin embargo esto no sucede, por lo que la reducción química en la $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]=10$ puede ser debida a la presencia de oxígeno durante la reacción de Fenton.

A $\text{pH}=7.4$ la relación de $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]=20$, así como la $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]=10$, (figs. 4.6b y 4.7b), la cantidad de iones Fe^{2+} es pequeña 0.125 mM y 0.25 mM respectivamente, entonces al agregar el H_2O_2 se tiene una señal en 197 nm, que según la figura 4.1b corresponde a H_2O_2 , no obstante al transcurrir el tiempo de reacción se insinúa otra banda de absorción alrededor de 280 nm, que es muy ancha que se identifica como Fe^{3+} , justificando su aparición como ya lo hicimos anteriormente por la oxidación de iones de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Al definirse únicamente la absorción correspondiente al H_2O_2 , entonces la reacción de Fenton se efectúa tan rápido que no se alcanza a observar modificaciones en las longitudes de onda, o bien, pudiera ser tan lenta que a los 60 min tampoco tenemos cambios. Mas adelante mediante EPR se explicará este punto.

La diferencia entre la reacción de Fenton iniciando con Fe^{2+} en los dos buffers empleados son: a $\text{pH}=3$ tenemos dos bandas de absorción en 205 nm y 280 nm, mientras que a $\text{pH}=7.4$ se observa una banda definida en 197 nm y otra muy ancha alrededor de 280 nm. Las señales tienen el doble de absorbancia a $\text{pH}=3$ que a $\text{pH}=7.4$ Esto es resultado del grado de solubilidad que tiene el compuesto empleado $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, según la figura 9 en el intervalo de $\text{pH}\sim 2$ y $\text{pH}\sim 3.2$ el Fe^{2+} existe en solución como FeSO_4 , por ello cuando empleamos el $\text{pH}=7.4$, las señales que aparecen durante la reacción de Fenton son la mitad de lo que aparecen a $\text{pH}=3$. Por otra parte, a $\text{pH}=3$ aparecen las dos longitudes de onda asociadas a el Fe^{3+} , que en este caso debido al compuesto utilizado son iones en FeSO_4 como se observa en la figura 10 la proporción de Fe^{3+} que participan en la reacción es mayor a $\text{pH}=3$; mientras que a $\text{pH}=7.4$ sólo se insinúa la de 280 nm, esto es por la baja solubilidad del Fe^{3+} a este pH .

Las figuras de los espectros UV-Vis de las relaciones restantes empleadas de $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ a $\text{pH}=3$ y a $\text{pH}=7.4$ se localizan en el apéndice B. Sin embargo, en la tabla 4.2 se resumen algunas características ya descritas arriba de la reacción de Fenton. Los resultados de las mediciones UV-Vis de la reacción de Fenton empleando Fe^{2+} son reproducibles.

Tabla 4.2 Descripción de la reacción de Fenton en distintas relaciones de $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$.

$[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$	pH	λ	Comportamiento durante la reacción de Fenton
20	3	205 nm 280 nm	La absorbancia de las longitudes de onda que aparecen aumenta gradualmente conforme transcurre el tiempo de reacción. Oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} .
	7	197 nm 280 nm	La absorbancia de las longitudes de onda que aparecen aumenta conforme transcurre el tiempo. Reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Proceso reversible.
15	3	198 nm -	Comportamiento análogo al de la $[H_2O_2]:[Fe^{2+}]=20$
	7	197 nm 278 nm	
10	3	205 nm 280 nm	La absorbancia de las longitudes de onda se incrementa con el tiempo de reacción. Oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Proceso reversible
	7	197 nm 280 nm	La absorbancia de las longitudes de onda aumenta. Oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Existe un proceso de reversibilidad Fe^{3+} a Fe^{2+} .
5	3	210 nm 274 nm	Aparecen señales de Fe^{3+} antes de iniciar la reacción, debido a impurezas de hierro férrico presentes en el compuesto. Entonces la reacción se efectúa en presencia de iones Fe^{3+} y Fe^{2+} según el diagrama de la figura 6.
	7	197 nm -	
1	3	-	La cantidad de los reactivos saturan el sistema ya que las señales de UV-Vis se distorsionan y no se puede determinar longitudes de onda.
	7	191 nm 211 nm 277 nm	

4.4 Espectros EPR durante la reacción de Fenton empleando Fe^{3+}

Los espectros EPR de la reacción de Fenton estudiada a diferentes tiempos en relación de $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}]=10$, a $\text{pH}=3$, se muestran en la figura 4.8; los tiempos fueron 0 min, 0.5 min, 5 min y 30 min. Los espectros EPR medidos durante la reacción de Fenton empleando Fe^{3+} son reproducibles.

Al tiempo 0 min se observaron tres señales las cuales fueron designadas como A, B y C. Dichas señales corresponden a especies de hierro en distintos estados de espín cuyas características son las siguientes: la señal A, experimentalmente presenta un rasgo de resonancia en $g=4.3272$, sin embargo según la teoría EPR (apéndice A) ésta señal también tiene rasgos en $g_a \cong 9$ y otra en $g_a \cong 2.02$, esta última no se observa, pues en ésta región se superponen partes de otras señales correspondientes a otras especies de hierro. Por lo tanto, la señal A es rómbica que se asigna a iones Fe^{3+} de alto espín ($S=5/2$). La señal B, experimentalmente tiene un rasgo de resonancia en $g_b=2.6079$, nuevamente de la teoría EPR esta señal también tiene rasgos en $g_b \cong 2$ y $g_b \cong 1.47$. La señal B es rómbica y es debida a iones de Fe^{3+} en bajo espín ($S=1/2$). La señal C, es un singulete muy ancho ($\Gamma=38.88$ mT) con $g_c \cong 2.01827$, lo cual implica que se trata de la respuesta magnética de iones férricos en bajo espín ($S=1/2$) con una interacción dipolar. Los iones que originan la señal C tienen diferente ambiente cristalino que los iones que originan la señal B. Por último observamos que a los 5 min de iniciada la reacción aparece una señal D, la cual es debida a un radical libre, pues tiene una $g \cong 2.07173$ y un ancho $\Gamma = 0.31$ mT.

Tabla 4.3 $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 10$, $\text{pH} = 3$

Señal	g	I(ua)	Γ (mT)	t(m)
A	4.492659	5.5	11.1	0
A	4.327235	5	11.1	0.5
A	-	-	-	5
A	-	-	-	30
B	2.630756	7	17.7	0
B	2.607932	5.5	18.8	0.5
B	2.585397	6.5	11.1	5
B	2.608644	6	13.3	30
C	2.018274	36	38.8	0
C	2.014629	31	20	0.5
C	2.010932	29.5	17.7	5
C	2.012105	31.5	36.66	30
D	2.07173	26	0.31	5

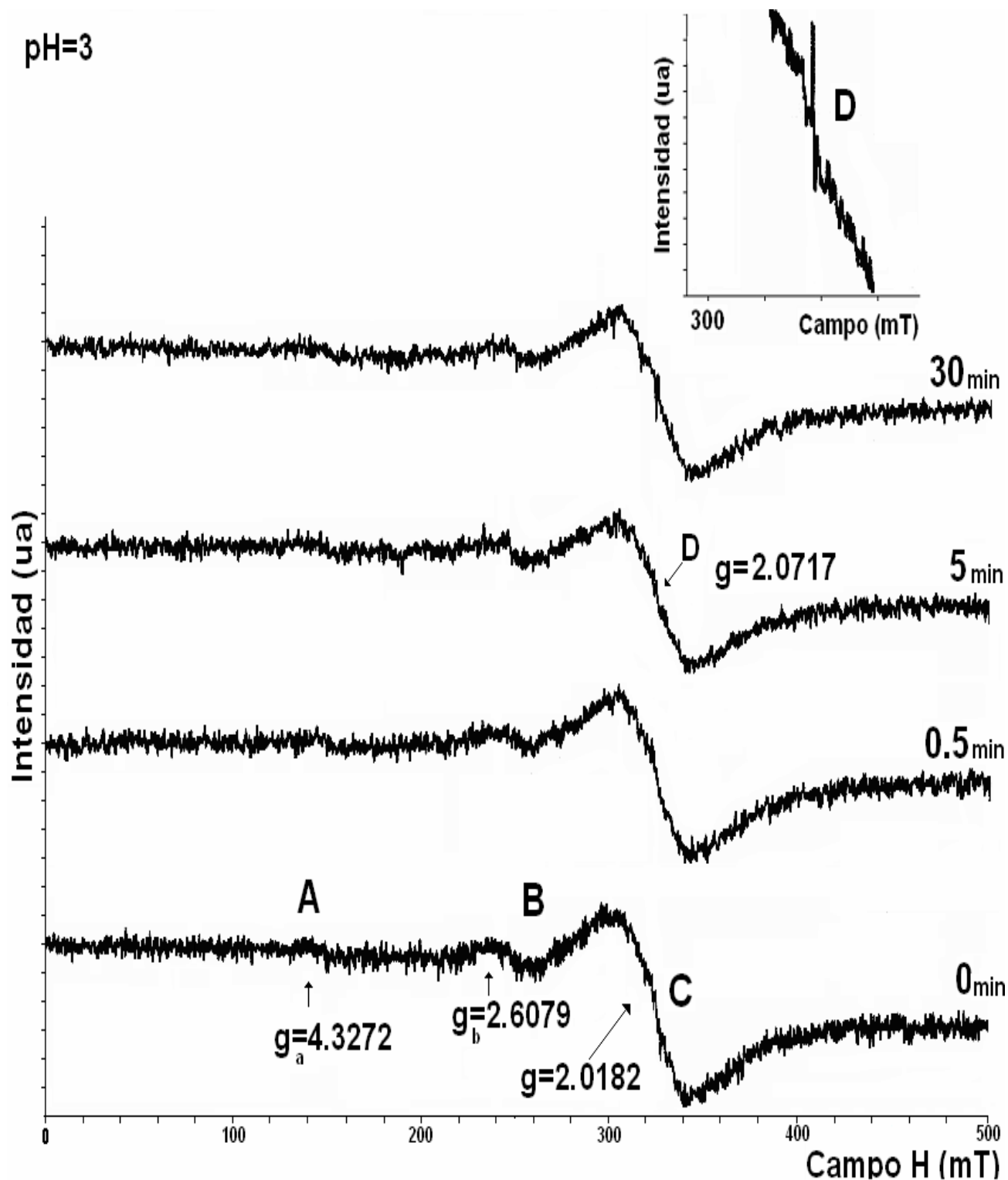


Figura 4.8 Espectros EPR de la reacción de Fenton, en la relación $[H_2O_2]/[Fe^{3+}] = 10$, seguida en el tiempo a los 0 min, 0.5 min, 5 min, 30 min, a pH=3. Al iniciar la reacción se tienen las señales A, B y C asignados al Fe^{3+} en distintos estados de espín, luego a los 5 min surge una señal D debida a un radical libre con $g = 2.07173$ y un $\Gamma = 0.31$ mT. Mientras que A desaparece a los 30 min. La reacción fue medida a 77 K, otros parámetros son $\nu = 9.05749$ GHz, $p = 5$ mW.

Observamos en la tabla 4.3 que conforme aumenta el tiempo de la reacción de Fenton, las señales A, B y C disminuyen en intensidad y ancho solo hasta los 5 min, después aumentan nuevamente en intensidad. Aunque la señal A desaparece, el cambio más significativo es en la región de g alrededor de 2. En esta región se observan los siguientes cambios: al transcurrir el tiempo de reacción las señales van disminuyendo en intensidad y ancho, esto es debido a que se lleva a cabo la reacción de Fenton y los iones de Fe^{3+} son reducidos químicamente por el H_2O_2 a iones Fe^{2+} , lo que disminuye la señal inicial. Sin embargo existe un remanente de H_2O_2 que nuevamente reacciona, pero ahora lo hace con los iones Fe^{2+} a los cuales oxida para transformarlos a iones Fe^{3+} , por lo que las señales vuelven a crecer en intensidad. Por otra parte, a los 5 min de iniciada la reacción observamos que surge la señal D, debida a un radical libre producto de la reacción. En ésta tesis se propone que el RL detectado en estas condiciones puede corresponder al radical peroxil, de acuerdo con la reacción.(4).

El espectro con una relación $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]=20$, a $pH=3$, es mostrado en el apéndice C, presenta un comportamiento semejante en cuanto al anteriormente descrito, ya que aparecen las mismas señales de hierro, así como el radical, aunque la señal D aparece a los 30 s de iniciada la reacción, por lo que es mucho más rápida la reacción de Fenton, efectuada en la $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]=20$ que en la de $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]=10$ ambas a $pH=3$, esto implica que conforme disminuimos la concentración 0.125 mM de Fe^{3+} el radical libre aparece 4.5 min antes que en la concentración de 0.25 mM de Fe^{3+} .

Para tener una visualización más clara de las señales obtenidas de estos espectros presentamos la figura 4.9 en la que se dibujan los rasgos de las señales descritas anteriormente, de acuerdo a la teoría EPR.

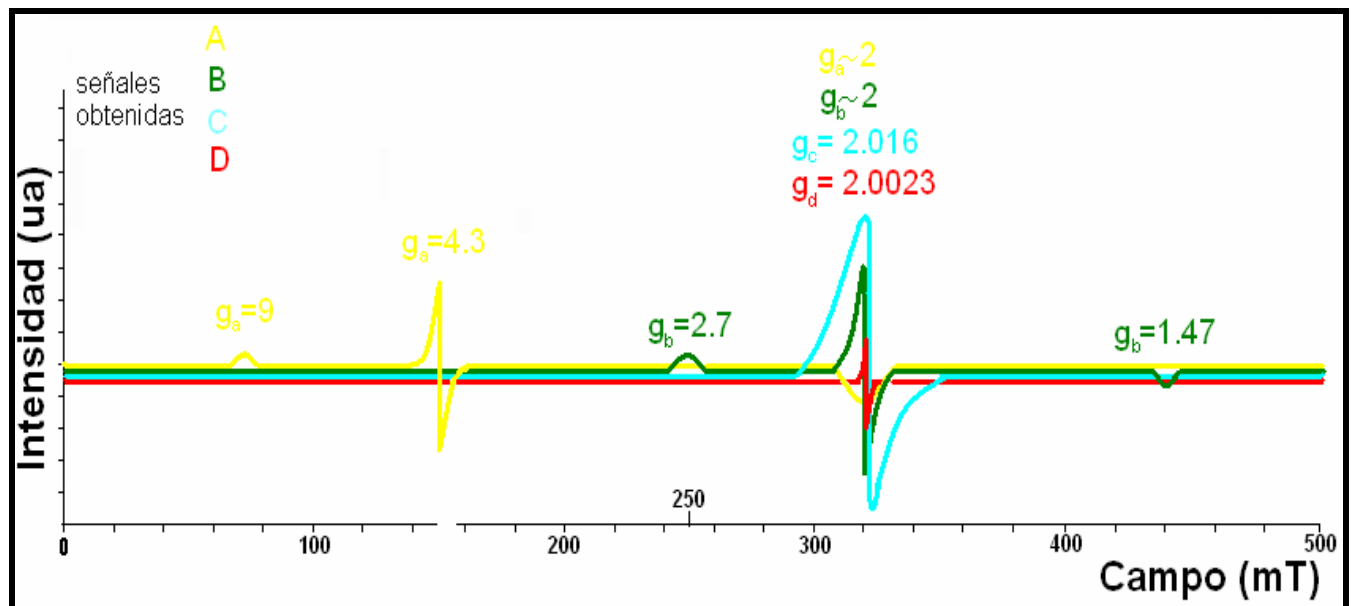


Figura 4.9 Se ilustran las señales EPR obtenidas: A, B y C correspondientes a hierro en distintos estados de espín y la señal D debida a un radical libre.

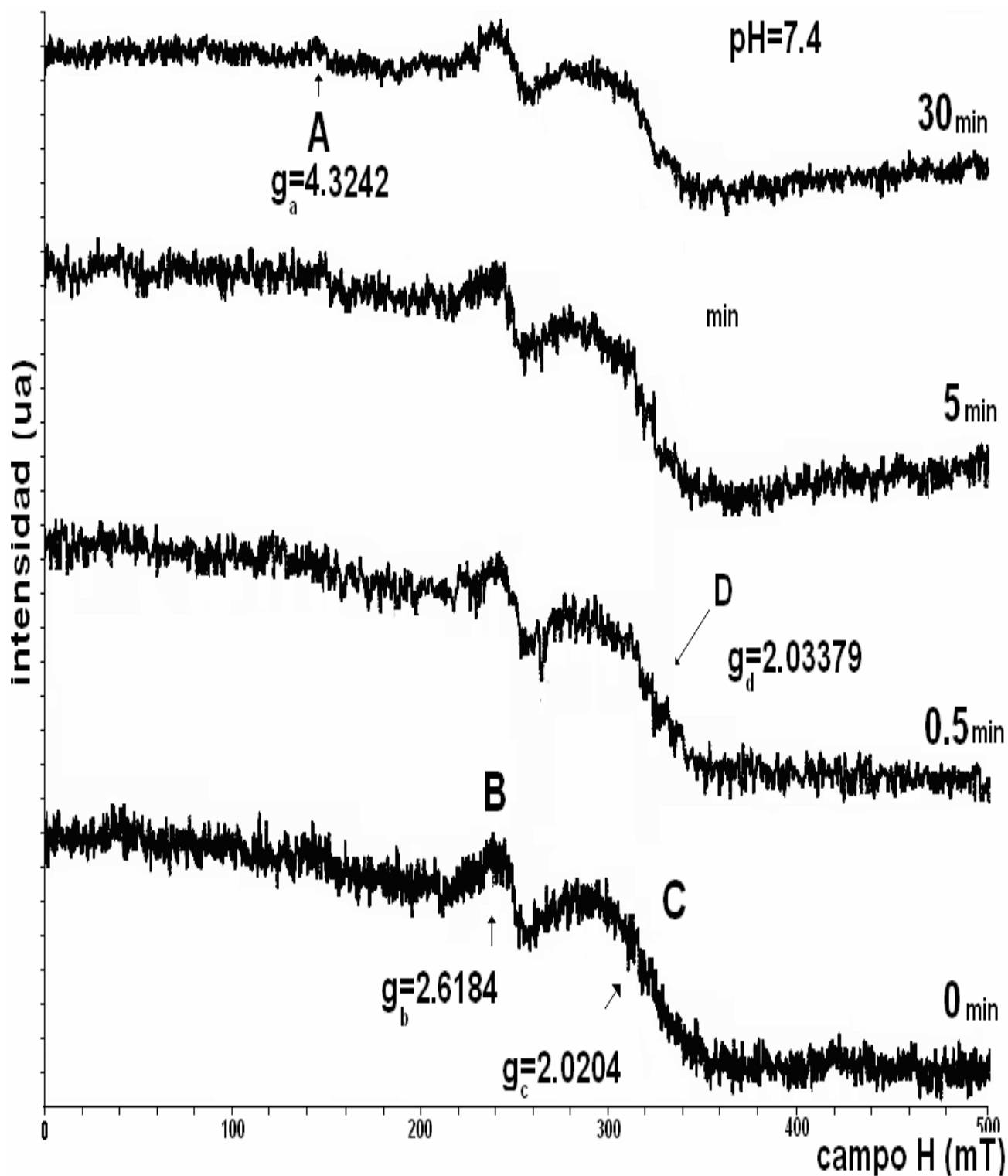


Figura 4.10 Espectros EPR de la reacción de Fenton, en la relación $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]=10$, seguida en el tiempo a los 0 min, 0.5 min, 5 min, 30 min, a pH=7.4. Al iniciar la reacción se tienen las señales B y C, y a los 30 s aparece la señal D debida a un radical con $g=2.03379$, mientras que la señal A se define hasta los 30 min. La reacción fue medida a 77 K, otros parámetros son $\nu = 9.05571$ GHz, $p=5$ mW.

Tabla 4.4 $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}]=10$, $\text{pH}=7.4$

Señal	g	I(ua)	$\Gamma(\text{mT})$	t(min)
A	-	-	-	0
A	-	-	-	0.5
A	-	-	-	5
A	4.324230	6	11.1	30
B	2.618439	17	17.7	0
B	2.631198	16	15.5	0.5
B	2.641402	17	13.3	5
B	2.594538	13	41.1	30
C	2.020455	30	63.3	0
C	2.056781	26.5	24.4	0.5
C	2.048245	23	47.7	5
C	2.055556	16	42.2	30
D	2.033790	27	0.33	0.5

Por otro lado, los espectros EPR en la relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}]=10$ a $\text{pH}=7.4$ (fig. 4.10), tenemos que no se revelo otra señal distinta de las descritas anteriormente, lo que cambio fue la intensidad y el ancho de cada una de ellas como se muestra en la tabla 4.4, tanto así que a los 0 min, sólo se observan la señal B y C, con los valores de g en 2.6184, y la señal C con g en 2.0204. Y es a los 30 s cuando surge la señal D con $g \cong 2.03379$.

Las diferencias entre los espectros a $\text{pH}=7.4$ y los de $\text{pH}=3$ se observan en el tiempo en el que aparece el radical (señal D), pues a $\text{pH}=7.4$ surge a los 30 s de iniciada la reacción mientras que a $\text{pH}=3$ surge hasta los 5 min. En cuanto a las señales de hierro, la señal A surge hasta los 30 min en $\text{pH}=7.4$; mientras que a $\text{pH}=3$ esta presente desde los 0 min. La señal C durante la reacción sufre modificaciones en la intensidad a $\text{pH}=3$ mostradas en la tabla 4.4, pero no a $\text{pH}=7.4$. Por todo lo anterior podemos argumentar que en ambos pH las especies de hierro están presentes, mientras que a $\text{pH}=7.4$ son los radicales libres los que inmediatamente aparecen y permanecen durante toda la reacción en el intervalo de tiempo medido.

4.5 Espectros EPR durante la reacción de Fenton empleando Fe²⁺

Los espectros de la figura 4.11 corresponden a la reacción de Fenton en la relación $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 10$ a pH=3. Sabemos que el Fe²⁺ no absorbe en EPR ya que en su última capa de valencia están los electrones apareados, es decir, no es paramagnético. Por lo que el espectro al tiempo 0 min no debería presentar absorción. Sin embargo tenemos la presencia de la señal B, con rasgos de g alrededor de 2.6319. Esta absorción es debida a que existen impurezas de hierro férrico al 0.05% de nuestro compuesto FeSO₄·7H₂O. Al iniciar la reacción a 0.5 min, observamos como surge una señal A, con líneas de absorción en $g_a = 4.3606$. Además aparece un singulete muy ancho C con $g \cong 2.0287$. Estos centros paramagnéticos son debidos a iones de Fe³⁺ en alto espín (S=5/2) señal A, bajo espín (S=1/2) señal B, bajo espín (S=1/2) señal C. Superpuesta a la señal C se observa una señal D con una $g = 2.007857$ y $\Gamma = 0.33$ debida a un radical libre. En éste estudio proponemos que el radical que surge producto de la reacción de Fenton es un radical hidroxilo, como se muestra en la reacción (3). Debido a que los iones Fe²⁺ son oxidados por el H₂O₂ a iones Fe³⁺ y estos a su vez reaccionan con el H₂O₂ restante para ser reducidos a Fe²⁺ la intensidad de estos centros paramagnéticos de Fe³⁺ decrecen a los 5 min, como se muestra en la tabla 4.5. La relación $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 20$ se encuentra en el apéndice C (fig. C3), el radical que aparece a los 0.5 min producto de la reacción de Fenton esta presente durante todo el tiempo de reacción medido, lo cual no ocurre en la $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 10$, pues este aparece a los 0.5 min pero desaparece a los 30 min. Lo anterior indica que el radical hidroxilo a bajas concentraciones de hierro (0.125 mM) es más estable.

Tabla 4.5 $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 10$, pH = 3

Señal	g	I(ua)	Γ (mT)	t(min)
A	-	-	-	-
A	4.360606	8.5	10	0.5
A	4.296918	7	12.2	5
A	-	-	-	30
B	2.631904	9	15.5	0
B	2.585349	8	15.5	0.5
B	2.608917	9	14.4	5
B	2.631991	8.5	12.2	30
C	-	-	-	0
C	2.028778	31	20	0.5
C	2.015105	27	34.4	5
C	2.028772	29	41.1	30
D	2.030829	12.5	0.33	0.5

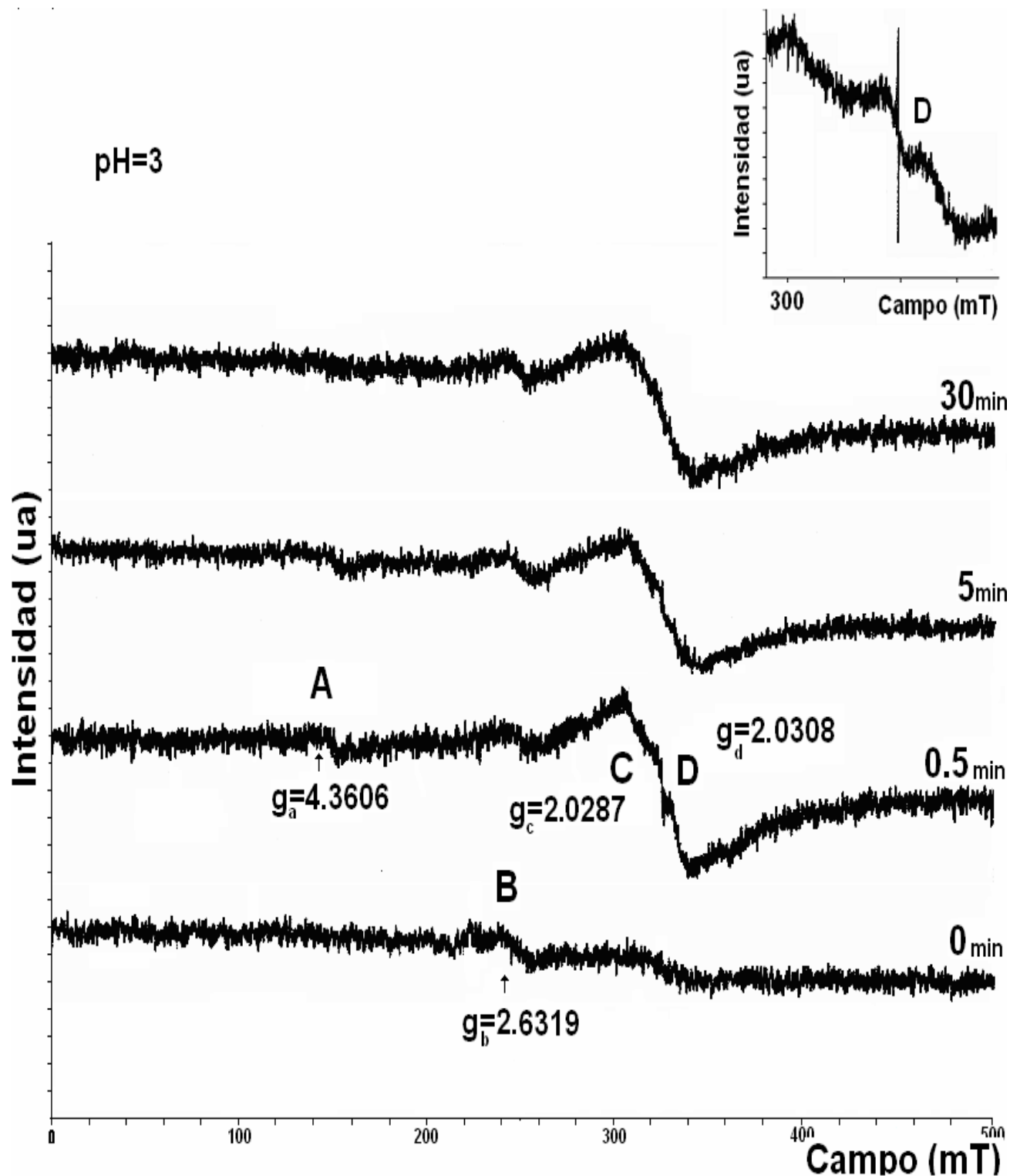


Figura 4.11 Espectros EPR de la reacción de Fenton, en la relación $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]=10$, seguida en el tiempo a los 0 min, 0.5 min, 5 min, 30 min, a pH=3. El sulfato ferroso presenta impurezas de hierro ferrico, señal B a los 0 min, al iniciar la reacción es evidente la presencia de la señal A, B y C. Además de que surge una señal D debida a un radical con $g=2.0308$. La reacción fue medida a 77 K, otros parámetros son $\nu=9.0612$ GHz, $p=5$ mW.

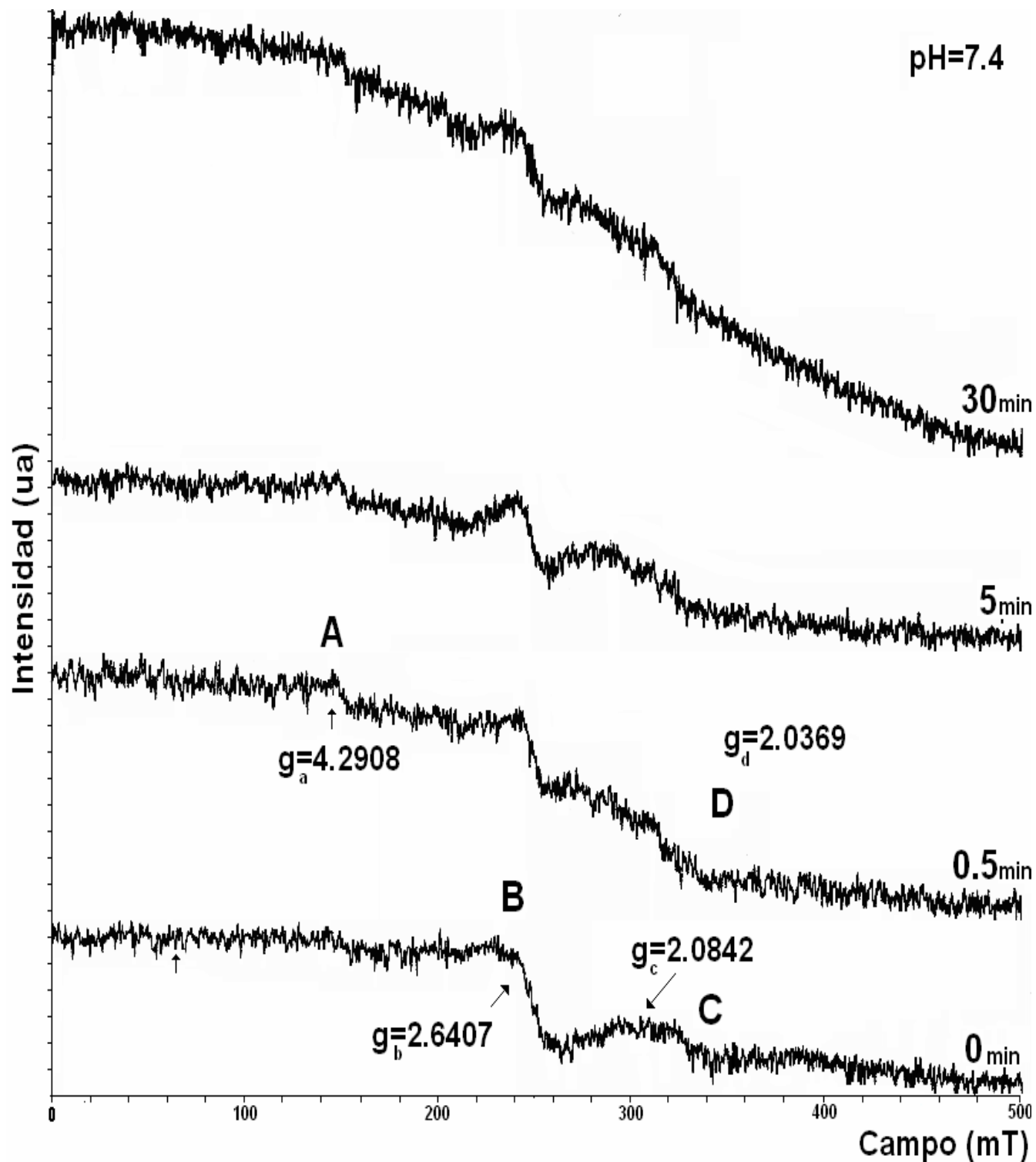


Figura 4.12 Espectros EPR de la reacción de Fenton en la relación $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 20$, seguida en el tiempo a los 0 min, 0.5 min, 5 min, 30 min, a pH=7.4; la señal B se define al tiempo 0, sin embargo, la señal A y C apenas y se insinúan, a los 30 s de comenzar la reacción la señal B disminuye mientras que la A se define. La reacción fue medida a 77 K, otros parámetros son $\nu = 9.0605$ GHz, $p = 5$ mW

En la figura 4.12 se presentan las mismas condiciones que en la figura 4.11 excepto el pH que ahora es a 7.4. En ésta, (fig. 4.12) tenemos que las señales de la impureza de hierro férrico es bastante evidente en contraste con el pH=3, por lo que al igual que en UV-Vis resulta que efectuamos la reacción de Fenton en presencia tanto de iones de Fe^{2+} y Fe^{3+} que según Yamazaki [28] seguirán la reacción $Fe^{2+} + Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow 2Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$ (fig.6).

Cuando efectuamos la reacción de Fenton con sulfato ferroso, la aparición del radical hidroxilo es inmediata, por lo que a los 30 s observamos su presencia y dependencia del pH, siendo más estable a pH=3 que a pH=7.4.

Tabla 4.6 $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 20$, pH = 7.4

Señal	g	I(ua)	Γ (mT)	t(min)
A	-	6	11.1	0
A	4.261448	8.5	22.2	0.5
A	4.290842	8.5	22.2	5
A	4.293240	7.5	16.6	30
B	2.640758	11	16.6	0
B	2.629845	9	16.6	0.5
B	2.635371	9	16.6	5
B	2.633080	9	17.7	30
C	2.084200	12	-	0
C	2.094045	21.5	18.8	0.5
C	2.092132	21.5	18.8	5
C	2.082410	21	16.6	30
D	2.032695	44	0.17	0.5

CONCLUSIONES

- La reacción de Fenton empleando el compuesto $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se efectúa en las $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}]$ de 20, 10 y 15 de acuerdo a $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \cdot\text{OOH}$. Tomando en cuenta que relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 20$, aparece un proceso reversible de la reacción de Fenton.
- La reacción de Fenton empleando el compuesto $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se efectúa en las $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ de 20, 10 y 15 de acuerdo a $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$. En la $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 5$, se efectúa la reacción de Fenton en presencia tanto de iones Fe^{2+} y iones Fe^{3+} , según $\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$. Para $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 10$ nuevamente está presente un ciclo en la reacción de oxidación-reducción del hierro.
- Las diferencias al efectuar la reacción de Fenton a distinto pH radican principalmente en el grado de solubilidad del compuesto de hierro empleado. Siendo más eficiente la reacción de Fenton a pH=3. En cuanto al radical peróxido es estable en ambos pH, aunque es más intenso a pH=3. Mientras que el radical hidroxilo es estable a pH=7.4 y dos veces más intenso a pH=3.
- Mediante EPR se encontraron especies de Fe^{3+} en distintos estados de espín durante la reacción. Dependiendo del compuesto empleado para efectuar la reacción de Fenton tenemos radicales libres, que en ésta tesis son: el radical peróxido para la reacción empleando Fe^{3+} . Y el radical hidroxilo, para la reacción empleando Fe^{2+} . Las especies de hierro son: una señal rómbica de alto espín ($S=5/2$), otra también rómbica pero en bajo espín ($S=1/2$). Y un singulete ancho que se trata de la respuesta magnética de iones férricos en bajo espín ($S=1/2$) con una interacción dipolar. Los iones que originan el singulete tienen diferente ambiente cristalino que los iones que originan la señal rómbica en bajo espín.
- Esta tesis sienta las condiciones de concentración, ligantes y pH, en los cuales pueden realizarse reacciones *in vitro* simulando lo que ocurre en reacciones biológicas. Lo anterior permite un estudio de la formación de RL a partir de proteínas *in vitro* y ver si estos RL se pueden formar en condiciones de estrés oxidativo.

Con lo anterior, el estudiar la reacción de Fenton mediante espectroscopia UV-Vis y EPR, bajo las condiciones establecidas en esta tesis, me permitió describir el comportamiento de los reactivos Fenton durante la reacción, para así poder determinar las mejores condiciones de concentración y pH en los cuales se efectúa dicha reacción. Así como también presentar las características de las especies paramagnéticas presentes durante la reacción de Fenton, cumpliéndose así los objetivos propuestos en esta tesis.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] H.J.H. Fenton, *On a new reaction of tartaric acid*. Chem.News **190**, (1876).
- [2] F.Haber and R.Willstätter, Ber.Deutsch.Chem.Ges., **64**, 2844, (1931).
- [3] W.G.Barb, J.H. Baxendale, P.George and K.R.Hargrave, Tran. Faraday Soc., **47**, 462, (1951).
- [4] W. H. Koppenol, *Chemistry of peroxyntirite and its relevance to biological systems in Metal Ions in Biological Systems*. Interactions Between Free Radicals and Metal Ions in Life Processes, vol. 36, pp. 597–619, ed. A. Sigel and H. Sigel, Marcel Dekker Inc, Basel, (1999).
- [5] J. Vásquez-Vivar, B. Kalyanaraman and M. C. Kennedy, J. Biol. Chem., **275**, 14064, (2000).
- [6] M. J. Burkitt, L. Milne and A. Raafat, Clin. Sci., **100**, 239, (2001).
- [7] M.J.Burkitt. *Chemical, biological and medical controversies surrounding the Fenton Reaction*. Progress in Reaction Kinetics and Mechanism. Vol.**28**, pp.75-103, (2003).
- [8] C.K.Mathews, K.E. Van Holde, K.G.Ahern. *Bioquímica*, Addison Wesley, (2002).
- [9] H.J.H. Fenton, *Oxidation of tartaric acid in presence of iron*. J. Chem.Soc. **65**, 899-910 (1894).
- [10] C.von Sonntag and H-P. Schuchmann. *The elucidation of peroxy radical reactions in aqueous solution with the help of radiation-chemical methods*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **30**, 1229-1253, (1991).
- [11] F.Haber and J.Weiss, *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts*. Proc.R.Soc.London **A147**, 332-351, (1934)
- [12] F.Haber and R. Willstätter, *Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktionmechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge*. Ber Deutsch.Chem.Ges.**64**, 2844-2856, (1931).
- [13] S.Goldstein, D.Meyerstein and G.Czapski, *The Fenton reagents*. Free Radical Biol.Med. **15**, 435-445, (1993).
- [14] A.B.Ross, W.G. Mallard, W.P. Herman, G.V. Buxton, R.E. Huie y P.Neta, *NDRL-NIST Solution Kinetics Database: Ver.2.0*. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, (1994).
- [15] Z.Maskos, J. D. Rush and W.H. Koppenol, *The hydroxylation of the salicylate anion by a Fenton reaction and γ -radiolysis: a consideration of the respective mechanisms* Free Radical Biol. Med., **8**, 153-162, (1990).
- [16] C.Monttley and R.P, Mason, *Nitroxide radical adducts in biology:chemistry, applications, and pitfalls*. In Biological Magnetic Resonance, Vol. **8** (L.J. Berliner and J. Reuben, Eds.), pp.489-546, Plenum Press, New York, (1989).
- [17] G.R.Buettner and R.P.Mason, *Spin-trapping methods for detecting superoxide and hidroxy radical free radicals in vitro and in vivo*. Meth. Enzymol.**186**, 127-133, (1990).
- [18] R.V.Looyd and R.P.Mason, *Evidence against transition metal-independent hydroxyl radical generation by xanthine oxidase*. J.Biol.Chem. **265**, 16733-16736, (1990).
- [19] R.P. Mason, P.M. Hanna, M.J. Burkitt and M.B.Kadiiska, *Detection of oxygen-derived radicals in biological systems using electron spin resonance*. Environ.Health Perspect. **102**, 33-36, (1994).

- [20] M.J. Burkitt, *ESR spin trapping studies into the nature of the oxidizing species formed in the Fenton reaction: pitfalls associated with the use of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in the detection of the hydroxyl radical*. Free Radical Res. Commun **18**, 43-57 (1993)
- [21] W.H.Koppenol, *Chemistry of iron and copper in radical reactions*. In Free Radical Damage and its Control (C.A. Rice-Evans and R.H. Burdon, Eds.), p.p.3-24. Elsevier, Amsterdam, (1994).
- [22] G.Czapski, *On the use of OH[•] scavengers in biological system*. Isr. J.Chem.**24**, 29-32 (1984).
- [23] C. von Sonntag and H.P.Schuchmann, *Suppression of hydroxyl radical reactions in biological system: consideration based on competition kinetics*. Meth. Enzymol. **233**, 47-56, (1994).
- [24] D.A. Wink, C.B. Wink, R.W. Nims and P.C. Ford, *Oxidizing intermediates generated in the Fenton reagent: kinetic arguments against the intermediacy of the hydroxyl radical*. Environ.Health Perspect.**102** (suppl.3), 11-15, (1994).
- [25] S. Croft, B.C. Gilbert, J.R.Lindsay Smith and A.C. Whitwood, *An ESR investigation of the reactive intermediate generated in the reaction between Fe²⁺ and H₂O₂ in aqueous solution. Direct evidence for the formation of the hydroxyl radical*. Free Radical Res.Commun.**17**, 21-39 (1992).
- [26] M.R. Gunther, P.M. Hanna, R.P. Mason and M.S.Cohen, *Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: a spin trapping study*. Arch. Biochem. Biophys. **316**, 515-522, (1995).
- [27] W.K.Pogozelski, T.J. McNeese and T.D. Tullius, *What species is responsible for strand scission in the reaction of [Fe^{II}EDTA]²⁻ and H₂O₂ with DNA?* J.Am.Chem.Soc.**117**, 6428-6433, (1995).
- [28] I Yamazaki, L.H.Piette. *EPR Spin-Trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide*. J.Am.Chem.Soc., **113**, 7588-7593, (1991).
- [29] L.P. Candeias, M.R.L. Stratford and P.Wardman, *Formation of hydroxyl radicals on reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron (II) complex*. Free Radical Res. **20**, 241-249, (1994).
- [30] P.Coutois, A. Vanden Abbeele and N.Pourtois, *Streptococcus saguis survival rates in the presence of lactoperoxidase-produced OSCN⁻ and OF⁻*, Med. Sci.Res.**23**, 195-197 (1995).
- [31] M.Masarwa, H. Cohen, D. Meyerstein, D.L. Hickman, A.Bakac and J.H. Espenson, *Reactions of low-valent transition-metal complexes with hydrogen peroxide. Are they "Fenton-like" or not?. The case of Cu_{aq}⁺ and Cr_{aq}²⁺*. J.Am.Chem.Soc. **110**, 4293-4297, (1988).
- [32] Miguel Rodriguez. *Fenton and UV-vis based advanced oxidation processes in wastewater treatment: Degradation, mineralization and biodegradability enhancement*. Memoria para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química Universidad de Barcelona, (2003).
- [33] M.Gerloch, E.C.Constable. *Transition Metal Chemistry*. VCH (1994).
- [34] P.Biemand, H.G. van Eijk, A.J.G. Swaak and J.F.Koster, *Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes*. J. Clin.Invest. **73**, 1576-1579, (1984).

- [35] H.P. Monteiro, G.F.Vile and C.C. Winterbourn, *Release of iron from ferritin by semiquinone, anthracycline, bipyridyl and nitroaromatic radicals*. Free Radical Biol. Med. **6**, 587-591, (1989).
- [36] L.W.Oberley and G.R.Buettner, *The production of hydroxyl radical by bleomycin and iron (II)* FEBS Lett.**97**, 47-49, (1979).
- [37] B.K.Sinha, H.M. Eliot and B.Kalayanaraman, *Iron-dependent hydroxyl radical formation and DNA damage from a novel metabolite of the clinically active antitumor drug VP-16*. FEBS Lett.**227**, 227, 240-244, (1988).
- [38] P.Wardman, L.P.Candeias. *Fenton Chemistry: An Introduction*. Radiation Research **145**, 523-531 (1996).
- [39] Lentench agua residual y purificación del aire Holding B.V.2005
- [40] N. O. Mwebi. *Fenton & Fenton-Like Reactions: Nature of Oxidizing Intermediates*. Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (2005).
- [41] www.UV-Vis Absorption Spectra of Gaseous Molecules and Radicals Catalogue.com
- [42] P.W. Atkins and M.C.R. Symons. *The structure of Inorganics Radicals*, Elsevier, Amsterdam (1967).
- [43] G.Feher, *Electron Paramagnetic Resonance with Applications to selected problems in Biology*, Gordon and Breach, Science Publishers, N.Y. (1970).
- [44] W.C. Holton and H.Blum, Phys.Rev.,**125**, 89 (1962).
- [45] J.L.Hall and R.T. Schumacher, Phys.Rev., **127**, 1982 (1962).
- [46] W.Weltner, Jr.,*Magnetic Atoms and Molecules*, Dover Publications, Inc., New York (1983).
- [47] E.Merzbacher, *Quantum Mechanics*, John Wiley & Sons, 2nd. Ed., USA (1971)
- [48] A.Messiah, *Quantum Mechanics*, John Wiley & Sons, USA (1976).
- [49] A.Abragam and B.Bleaney, *Electron Paramagnetic Resonance of Transitions Ions*, Clarendon, Oxford (1970).
- [50] A.Carrington and A.D.McLanchlan, *Introduction to Magnetic Resonance*, Harper and Row, New York (1979).
- [51] J.E. Wertz and J.H.Bolton, *Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*, McGraw-Hill, New York (1972).
- [52] W Gordy, *Theory and Applications of Electron Spin Resonance*, Duke University, John Wiley & Sons (1990).
- [53] J.Pilbrow, *Transition Ion Electrón Paramagnetic Resonance*, Clarendon Press, Oxford (1990)
- [54] T.Castner, G.S. Newell, W.C. Holton y C.P. Slichter, J.Chem. Phys., **32**, 668 (1960).
- [55] R.H. Sands, Phys.Rev., **99**,1222 (1955).
- [56] B. Bleaney and K.W.H. Stevens, Reports. Progr.Phys., 16, 108 (1953).
- [57] C.P. Slichter, *Principles of Magnetic Resonance*, Harper & Row, N.Y. (1963).
- [58] J.E. Huheey, Inorganic Chemistry, 3th edition, p.p.385, Harper & Row Publishers, New York.
- [59] Douglas A. Skoog, *Principles of Instrumental Analisis*, Stanford University Saunders Goleen (1984)

APÉNDICE A

A.1 TEORÍA EPR

A.1.1 Principio de resonancia paramagnética electrónica.

El caso mas simple para la discusión de los principios de EPR es el debido a un centro paramagnético con un solo electrón desapareado (de espín un medio). Estos sistemas son notables en la historia de EPR incluyendo radicales libres [42], conducción de electrones en metales [43], centros F en halogenuros alcalinos [44] y átomos de hidrógeno atrapados en matrices cristalinas [45] cuyas propiedades son muy parecidas a las de un electrón libre.

Un átomo en fase gaseosa puede tener un momento dipolar magnético μ . El cual podrá interactuar con un campo magnético externo \mathbf{H} [46]. La energía de esta interacción es descrita por la expresión clásica para la energía dada por :

$$W = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (14)$$

El movimiento orbital electrónico es la fuente de un momento magnético en el átomo, que resulta directamente del momento angular \mathbf{L} , de la carga. Para un electrón moviéndose en una órbita, μ_L se encuentra que tiene el valor :

$$\vec{\mu}_L = \left(-\frac{e}{2mc} \right) \vec{L} \quad (15)$$

donde \mathbf{L} es el momento angular orbital, e y m son las magnitudes de la carga y de la masa del electrón, y c es la velocidad de la luz en el vacío. De aquí se puede ver μ_L es proporcional al momento angular, pero en dirección opuesta debido a la carga negativa que posee el electrón. Esta proporcionalidad a menudo se expresa por la razón giromagnética $\gamma = e/2mc$ ($= 1.7 \times 10^7$ rad gauss⁻¹) como

$$\mu = \gamma \vec{L} \quad (16)$$

Por otro lado, el electrón también tiene un momento magnético intrínseco μ_s debido al espín electrónico dado por

$$\mu_s = 2 \left(-\frac{e}{2mc} \right) \vec{S} \quad (17)$$

Es bien conocido que un átomo o molécula poseerá un momento dipolar magnético permanente sólo si tiene un momento angular electrónico total \mathbf{J} distinto de cero, y contribuciones a éste pueden venir del momento angular de espín \mathbf{S} así como también del momento angular orbital \mathbf{L} sumados vectorialmente.

En términos clásicos, la solución de la ecuación 14 da la energía de la partícula magnética en el campo, expresada como

$$E = -\mu H_0 \cos \theta \quad (18)$$

donde θ es el ángulo entre los vectores de magnitud μ y H_0 , y la energía puede variar continuamente con la orientación del momento magnético.

Sin embargo, la mecánica cuántica nos dice que este ángulo está cuantizado y puede tomar solamente $2J+1$ orientaciones [47,48], donde J es el número cuántico para el momento angular total e igual a $J\hbar$. Las proyecciones permitidas de \mathbf{J} (o $\boldsymbol{\mu}$) cuando el sistema se cuantiza a lo largo de la dirección del campo magnético están dadas por $m_J\hbar$, donde m_J es el número cuántico magnético que toma los valores

$$m_J = +J, J-1, \dots, -J$$

Si solamente tuviéramos el momento angular debido al espín como en los átomos con estado base $^2S_{1/2}$ (también se les conoce como "sistemas sólo de espín"), m_J sería

$$m_s = S, S-1, \dots, -S$$

donde S es el espín total electrónico. Con esto, las diferentes proyecciones de μ_s son:

$$|\mu_s| = 2 \left(\frac{eh}{4\pi mc} \right) m_s \quad (19)$$

donde se sustituyó el eigenvalor $m_s\hbar$ del operador S en la ecuación 17 y se observa que $|\mu_s|$ es proporcional a m_s , la proyección del espín S del átomo. Definiendo el magnetón de Bohr como: $(eh/4\pi mc) = \beta_c = 9.2741 \times 10^{-21} \text{ erg/gauss}$, se encuentra que la ecuación anterior resulta ser $|\mu_s| = 2\beta_c m_s$ y las energías Zeeman permitidas para un átomo en un campo magnético son

$$W_{m_s} = -\mu_s H_0 = (2\beta_e H_0) m_s \quad (20)$$

Para un electrón libre, se requiere una pequeña pero importante corrección por medio de la electrodinámica cuántica a la ecuación 20, para escribirla como

$$W_{m_s} = g_e \beta_e m_s H_0 \quad (21)$$

donde el factor numérico 2 ha sido cambiado por $g_e=2.0023$. Dicha corrección se resume en las últimas dos cifras (23 diezmilésimas) del factor g_e . Experimentalmente la determinación del factor espectroscópico g llega fácilmente a esta cuarta cifra.

Para un estado orbital degenerado de un átomo ($L \neq 0$), donde existe un importante acoplamiento entre L y S (acoplamiento Russell-Saunders [49-52]), tenemos que $J=L+S, L+S-1, \dots, |L-S|$, y para cada J , $m_j = J, J-1, \dots, -J$, así

$$W_{m_j} = g_J \beta_e m_j H_0 \quad (22)$$

donde g es el factor espectroscópico de desdoblamiento

$$g = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)}, \quad (23)$$

β_C es el magnetón de Bohr, y m_j el número cuántico magnético. Por ejemplo, para un estado $^2P_{1/2}$, $S=1/2$, $L=1$, $J=1/2$ y así g_J se reduce a $g_e 2.000$ cuando $L = 0$.

Así la pérdida de momento angular orbital o la imposibilidad de que cambie de valor en el experimento EPR causará que g_J en última instancia se aproxime a g_e , fenómeno que se conoce como el "quenching" del momento angular orbital. En moléculas no lineales y en una gran cantidad de moléculas orgánicas, el momento angular orbital sufre frecuentemente el "quenching" por la simetría de los campos eléctricos internos asimétricos, pero en átomos libres en fase gaseosa esto no sucede.

A.1.2 Principio Básico EPR

Para un sistema de espín $S=1/2$, los $(2S+1)=2$ niveles de energía están igualmente espaciados, cuyos valores obtenidos como solución de la ecuación 18 y dados en la expresión 19 son

$$W_{\pm} = \pm \frac{1}{2} g \beta H \quad (24)$$

La resonancia paramagnética electrónica se efectúa con las transiciones inducidas entre niveles de energía (niveles Zeeman) de un sistema paramagnético situado en un campo magnético estático. Una transición EPR a una frecuencia fija ν , ocurre cuando el campo magnético es variado hasta que se alcanza el valor de resonancia H_r . Por tanto,

$$W_+ - W_- = h\nu = g\beta H_r \quad (25)$$

Como se ilustra en la figura A1.

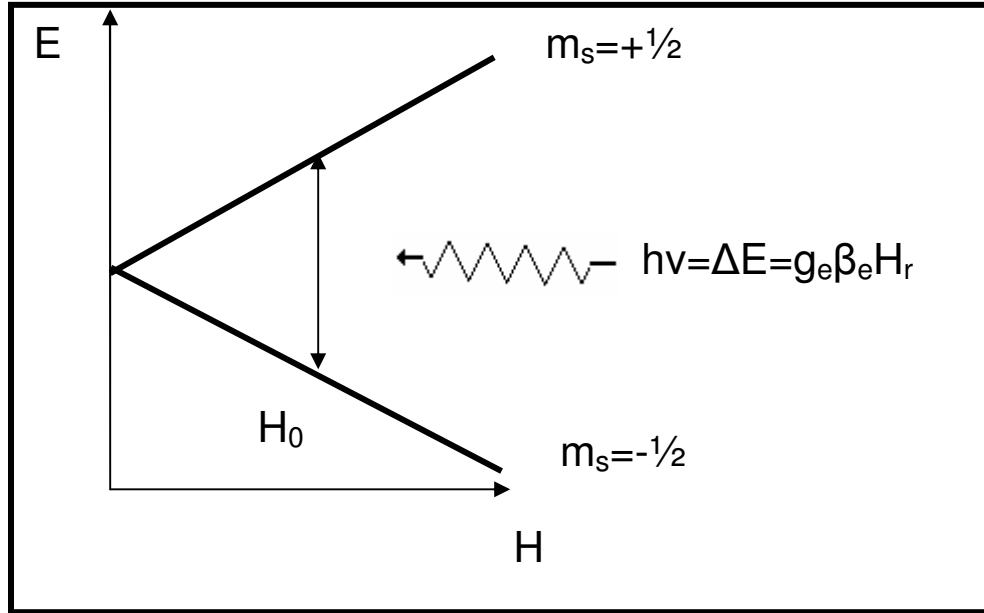


Figura A1. Efecto Zeeman

De la teoría cuántica para probabilidades de transición, las transiciones inducidas ($1/2 \rightarrow -1/2$) y ($-1/2 \rightarrow 1/2$) pueden ser calculadas y es la misma para ambas. Estas transiciones ocurren entre dichos niveles si la muestra es irradiada con un campo electromagnético cuya energía (de frecuencia ν) iguala la diferencia de energía entre los niveles desdoblados. De aquí la condición de resonancia relacionada con la absorción de energía del campo por la muestra es obtenida y expresada por

$$h\nu = \Delta W = g\beta_e H_r \quad (26)$$

En los experimentos normales de EPR, el campo H_1 de la radiación electromagnética de frecuencia ν está polarizado en un plano perpendicular a la dirección del campo estático H_r . Las transiciones que originan un espectro EPR son inducidas sólo entre niveles adyacentes caracterizados por el número cuántico m_s , cuyos valores permitidos, como ya se dijo antes, son $+S, S-1, \dots, -S$ y obedeciendo la regla de selección:

$$|\Delta m_s| = 1 \quad (27)$$

En la figura A1 para el sistema de $S=1/2$, los niveles de energía son descritos por $m_s = \pm 1/2$. Una transición ΔE puede ser inducida entre estos niveles aplicando un campo magnético oscilante $H_1(t)$ de frecuencia ν_0 , perpendicular a H_0 tal que se cumpla la ecuación de resonancia a12, si se sustituye $g_e=2.0023$, $\beta_e=9.2741 \times 10^{-21}$ erg/gauss, $h=6.6262 \times 10^{-27}$ erg seg, encontramos que

$$\frac{\nu_0}{H_0} = 2.8025 \text{ MHz/G}$$

Los experimentos de resonancia paramagnética electrónica son usualmente efectuados a una frecuencia fija, y la condición de resonancia a12 se hace cumplir al variar la intensidad del campo magnético estático. La mayoría de los espectrómetros EPR operan con fuentes de microondas a 9.5 GHz (banda X) o 35 GHz (banda Q), los campos resonantes en estos dos casos son del orden de 3,300 y 12,400 Gauss (G) y las energías magnéticas son 0.31 cm^{-1} y 1.2 cm^{-1} respectivamente, son algunos cientos de veces más pequeñas que kT a temperaturas ordinarias, (a 300K, $kT \approx 200 \text{ cm}^{-1}$).

A.1.3 Hamiltoniano de espín

El éxito de la resonancia paramagnética electrónica (EPR) al contribuir a determinar la estructura de numerosos centros paramagnéticos, lleva a intentar aplicar esta técnica al estudio de compuestos tales como el Fe^{3+} [54]. Un estudio de resonancia pionero ha sido reportado por Sands [55], en el cual él descubrió resonancias de origen desconocido. Las resonancias pueden ser caracterizadas por sus aparentes señales de g , donde tales valores g son definidos por la ecuación de resonancia (26) para un espín de electrón libre, $g=2.0023$.

Con iones tales como el cobre (Cu) el ambiente de los átomos congela (“quenched”) el momento magnético orbital, da en primera aproximación un comportamiento de espín libre, pero el acoplamiento espín-órbita induce suficiente momento orbital para incrementar el valor de g de un 10 a 20% por arriba del valor de g de electrón libre 2.0023. Las resonancias desconocidas que Sands descubrió tienen los valores de $g=4.2$ y $g=6$. Se han propuesto modelos teóricos por medio de los cuales los valores de g desconocidos por Sands son considerados y sugieren posibles ambientes atómicos locales del ion Fe.

Hay dos razones [56] por los cuales el valor de g puede diferir del valor de electrón libre ($g=2.0023$): (a) El movimiento orbital puede contribuir al momento magnético total. En átomos libres, es la combinación vectorial de momento magnético orbital y de espín, la cual da el famoso factor g de Landé. En sólidos, el momento orbital a menudo está casi totalmente congelado (“quenched”), esto es, el momento orbital promedio es cero y por tanto no se puede acoplar con el campo magnético externo y solo un aparente acoplamiento con espín está presente. Un momento orbital residual no congelado (vía acoplamiento espín-órbita puede causar una desviación del valor de $g=2.0023$. (b) Siempre en ausencia de un campo magnético estático, el espín puede preferir alinearse paralelamente a ciertas direcciones (pueden ser las direcciones de un cristal), tal efecto, puede provenir de efectos espín-órbita o de acoplamiento dipolo-dipolo entre espines del ion paramagnético si la nube electrónica del ion no es simétricamente esférica (justo como un par de imanes). Si los espines prefieren alguna dirección cristalina, ellos no precisan libremente en el campo magnético estático y de ahí resulta un valor de g diferente de 2.0023 [54]. Aquí se supone que el efecto (b) es el responsable de los valores de g , distintos de g del electrón libre.

La completa explicación de una resonancia sería dada en principio al resolver un hamiltoniano (hamiltoniano de espín) el cual incluya al ion paramagnético y el acoplamiento con sus vecinos. Consideremos el hamiltoniano [56] más general, el cual no involucra potencias mayores que dos:

$$\hat{H} = g_0 \beta H S_z + DS_z^2 + E(S_x^2 - S_y^2) \quad (28)$$

donde D y E son constantes, S_x , S_y , S_z son componentes de espín a lo largo de los tres ejes cristalinos mutuamente perpendiculares X, Y y Z (elegidos de tal modo que no aparecen términos tales como $S_x S_y$ en \mathbf{H}), Z' es el eje del campo estático H, y g_0 es el valor de g que observaríamos si D y E fueran cero.

Aquí g_0 sería el valor para electrón libre $g \approx 2$ ($g = 2.0023$), excepto para los efectos (a) precedentes, estrictamente hablando, cuando $g_0 \neq 2$, g es un tensor de orden dos. Efectos del tipo (b) dan origen a los términos D y E de campo cristalino. Para Fe^{3+} el estado base es 6S y por tanto, el momento angular orbital del ion libre es cero, así que puede tomarse $g_0 = 2$ y el espín total $S = 5/2$ (para bajo espín $S = 1/2$, hay un tratamiento más simple [57]).

Debe notarse que si los términos cristalinos (D y E) son pequeños, pueden ser tratados por teoría de perturbaciones. Los seis niveles desdoblados por el campo magnético (de energía $2\beta mH$, donde $m = \pm 5/2, \pm 3/2, \pm 1/2$) sufren un corrimiento, pero se puede probar que la frecuencia para la transición entre $m = -1/2$ y $m = +1/2$ no cambian primer orden. Consecuentemente esta transición no es perturbada y se vería una línea (transición) a $g = 2$ si el campo cristalino es débil. "La ausencia de una resonancia A $g = 2$ prueba que el campo eléctrico cristalino no es débil". Si los términos de campo cristalino (D y E) son comparables con el término magnético (Zeeman), no se puede hacer una predicción tan simple como la anterior, esto sugiere que la ecuación (28) debe resolverse suponiendo que los efectos de campo cristalino dominen con $2\beta H \ll D$ ó $2\beta H \ll E$, luego la ecuación (28) es resuelta con $H = 0$, para después tratar H como perturbación.

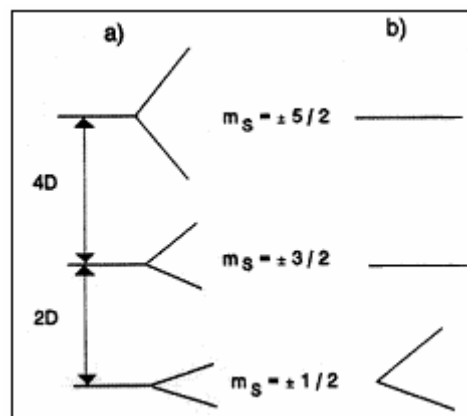


Figura A2 Niveles de energía de un ion con $S = 5/2$ a) ion en un campo cristalino axial con el campo magnético H paralelo a Z y b) lo mismo que a) pero con H perpendicular a Z

Suponiendo $E=0$, el Hamiltoniano (28) es

$$\hat{H} = 2\beta HS_z + DS_z^2 \quad (29)$$

Tomando $H=0$ y cuantizando el espín a lo largo del eje Z, obtenemos la energía W , en campo cero

$$W = Dm^2, \quad m = \pm 5/2, \pm 3/2, \pm 1/2, \quad (30)$$

Donde los niveles de energía forman tres grupos de estados, cada uno de ellos un doblete degenerado usualmente llamados los dobletes de Kramers. Al aplicar un campo magnético paralelo al eje Z resulta cada uno de los estados degenerados m , son ahora desdoblados siendo tal desdoblamiento proporcional a H . Si D es suficientemente grande, no habrá suficiente energía ($h\nu$) para inducir transiciones entre estados de diferente energía de campo cristalino, es decir, diferentes valores de $|m|$. Sin embargo todas las transiciones, excepto para la transición entre $m=\pm 1/2$, son prohibidas por la regla de selección $\Delta m = \pm 1$ para el campo magnético oscilante perpendicular a H , resultado de la expresión (26) $g=2$.

Si el campo magnético es perpendicular al eje Z, no hay desdoblamiento a primer orden de los estados $\pm 5/2$ ó $\pm 3/2$, pero los estados $\pm 1/2$ son desdoblados de acuerdo a la ecuación (28) con $g=6$. Este hecho se muestra al resolver la matriz 2×2 del hamiltoniano de los niveles $m=1/2$ y $m=-1/2$. El tratamiento completo del hamiltoniano se encuentra esbozado en [59].

Finalmente el doblete de Kramers medio es el responsable de la línea cercana a isotrópica a $g \approx 4.3$ a menudo encontrada en complejos férricos de baja simetría, mientras que los dobletes superior e inferior tienen valores de g fuertemente anisotrópicos ≈ 9.67 y $\approx 0.857, 0.607$ respectivamente [54]. La figura (A3) reproduce la derivada de un compuesto férrico a 300 K, donde se muestra que en adición a la resonancia en $g \approx 4.27$, hay valores de g a un campo bajo cerca de $g \approx 10$ y valores de g decrecientes a campos altos correspondientes a $g \approx 1$ hasta $g \approx 0.5$

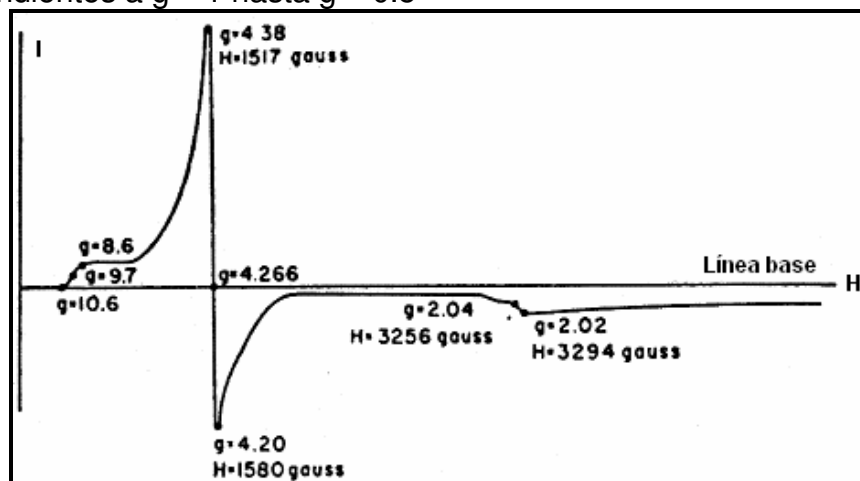


Figura A3 Espectro EPR de un compuesto en estado cristalino [54] que contiene Fe^{3+}

A.1.4 Campo cristalino

En la estructura atómica donde los electrones sucesivamente van llenando orbitales $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10} \dots$ etc., los elementos llamados metales de transición del bloque d (Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni y Zn) son los primeros en llenar los niveles $3d$ y tienen la particularidad de que algunos de ellos son paramagnéticos pues llenan sólo parcialmente los niveles $3d_{+2}$, $3d_{+1}$, $3d_0$, $3d_{-1}$ y $3d_{-2}$. O bien, en la notación de coordenadas cartesianas d_{xy} , d_{yz} , d_{zx} , $d_{x^2-y^2}$ y d_z^2 . En el contexto de teoría de grupos, los orbitales d_{xy} , d_{yz} , d_{zx} , son llamados t_{2g} ; $d_{x^2-y^2}$ y d_z^2 son llamados e_g . En un ion libre la energía de los cinco orbitales d es la misma, es decir, el estado base es degenerado, de orden cinco. Sin embargo, cuando el ion metálico forma parte de una molécula, en el compuesto está enlazado a otros átomos. La teoría de campo cristalino [58] supone que el ion paramagnético reside en un campo eléctrico cristalino cuyas fuentes son cargas puntuales (de los átomos ligados) en el sitio de los ligantes. Esta suposición electrostática es grandemente aproximada al no considerar los orbitales moleculares de los ligantes. La teoría que considera al campo cristalino y los orbitales moleculares de los ligantes, es la teoría de campo ligante y la teoría de orbitales moleculares.

Si se quiere aplicar esta teoría al hierro, se deben considerar los electrones de la capa semillena $3d$. Son justamente estos electrones los que están involucrados en las reacciones de óxido-reducción $\text{Fe}^{3+} + e^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$. Son fundamentales para la discusión de las propiedades del ion hierro, las densidades electrónicas, es decir, las funciones de onda. La dependencia angular de las cinco funciones ortogonales (orbitales) del tipo d se esquematizan en la figura A4.

El desdoblamiento de los niveles de energía degenerados del ion es muy sensible a la simetría de su alrededor. Usualmente para un ion en la geometría de un octaedro regular cuyos vértices representan los ligantes cargados negativamente, una pequeña perturbación a estos ligantes, provocará grandes cambios en su disposición original.

Colocando al ion metálico con sus cinco electrones d en el centro de un octaedro de carga negativa (fig. A5), el origen del desdoblamiento es claro. Los tres orbitales t_{2g} (d_{xy} , d_{yz} , d_{zx}) están evitando los vértices del octaedro, mientras que los orbitales e_g ($d_{x^2-y^2}$ y d_z^2) están apuntando directamente hacia las cargas negativas. Esto les costará (a los orbitales) una energía repulsiva de Coulomb y consecuentemente tendrán una energía más alta. La diferencia de energía entre los orbitales t_{2g} y e_g , es el parámetro Δ llamado de desdoblamiento de campo cristalino.

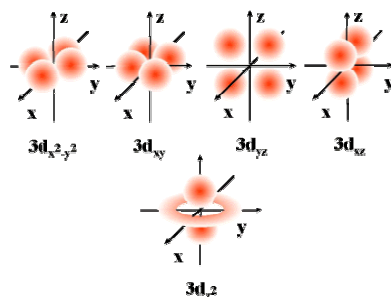


Figura A4 Orbitales moleculares

En la medida que se perturba el octaedro regular al aplicarle una distorsión tetragonal (fig. A6), la degeneración de los orbitales t_{2g} y e_g surgen un desdoblamiento adicional. Esto es debido al hecho que la distorsión mueve las cargas negativas con respecto del ion central a lo largo de la dirección z, y por tanto, reduce la energía repulsiva entre estas cargas y los orbitales que están dirigidos a lo largo de la dirección z. de aquí, se espera una disminución en la energía del orbital d_{z^2} , y un desdoblamiento adicional del orbital d_{xy} , mientras que los orbitales d_{yz} y d_{zx} se mantienen degenerados. Al introducir una distorsión rómbica (fig. A6) la distancia de separación no es equivalente con respecto a los ejes x y y los orbitales d_{xz} y d_{yz} son desdoblados.

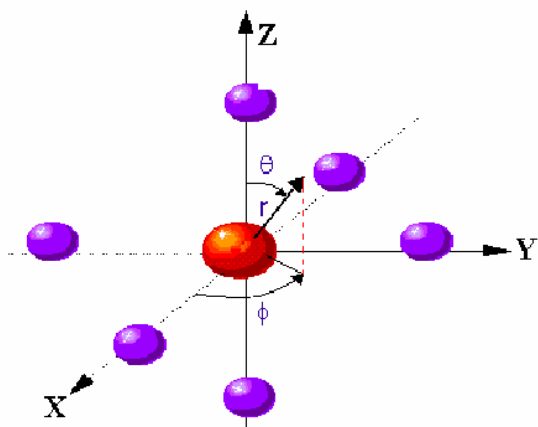


Figura A5 Estructura octaédrica

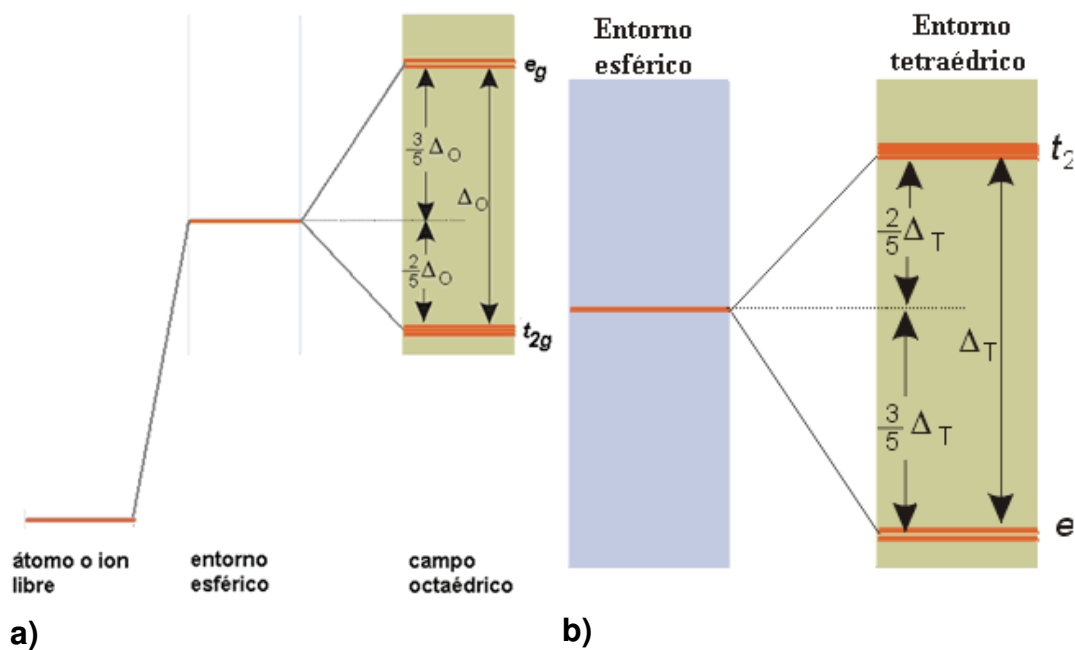


Figura A6. Desdoblamiento de energía

Habiendo establecido el orden de los niveles de energía, se debe decidir como se deben distribuir los electrones en ellos. La pregunta es ¿es energéticamente conveniente poner un electrón en cada orbital y maximizar el espín total, o poner dos electrones con espín opuesto en cada orbital y así minimizar el espín del sistema? En el caso de ion libre y por balance de energías, el arreglo de electrones maximiza el espín total (regla de Hund).

El Fe^{2+} tiene seis electrones en la capa d (6- d electrones), mientras que el Fe^{3+} tiene 5- d electrones los cuales deben ser acomodados en los niveles de energía. En un complejo octaédrico regular, los primeros tres electrones pueden ser puestos con espines paralelos en los orbitales t_{2g} (fig. A7). Si el cuarto electrón, con su espín paralelo a los otros tres, es puesto en un orbital e_g se gana energía de intercambio de espín, pero cuesta aproximadamente la energía Δ para hacerlo, si esto es energéticamente conveniente o no depende obviamente de Δ .

Si Δ es muy grande, se habla de campo cristalino fuerte en el cual los orbitales t_{2g} están llenos al máximo, resultando un compuesto de espín bajo. Para valores pequeños de Δ se tiene el régimen de campo cristalino débil y resultando un compuesto de espín alto. Cuando el octaedro regular es distorsionado el orbital d_{z^2} puede acercarse a los orbitales t_{2g} obteniéndose cuatro orbitales de energía relativamente baja. En este caso, uno obtiene complejos con un valor de espín intermedio. Por ejemplo, $S=3/2$ en el Fe^{3+} .

Los posibles valores de espín para el Fe^{2+} y Fe^{3+} son mostrados en la figura A7. La gran mayoría de compuestos están en la categoría de espín alto o espín bajo, mientras que el espín intermedio es muy raro. Sólo recientemente se han reportado sistemas de Fe con espín intermedio [53]. Debe notarse que hay otra forma de obtener un compuesto de espín intermedio. Si la diferencia de energía de formación entre compuestos de espín alto y espín bajo es pequeña (en el orden de kT), se puede estabilizar una mezcla en equilibrio térmico de las dos especies. Los experimentos EPR o medidas de momento magnético de la temperatura pueden, en principio, indagar el origen del espín intermedio.

	ESPÍN ALTO (campo bajo)	ESPÍN INTERMEDIO	ESPÍNBAJO (campo alto)
5 d-electrones Fe^{3+}			
6 d-electrones Fe^{2+}			

Figura A7 Posibles valores de espín para complejos Fe^{2+} y Fe^{3+}

A.2 TEORIA UV-Vis.

Para medir el espectro ultravioleta (o UV-visible) de un compuesto, la muestra se disuelve con un solvente (con frecuencia etanol) que no absorba por encima de 200 nm. La muestra disuelta se coloca en una celda de cuarzo y parte de disolvente se coloca en una celda de referencia. El haz de referencia pasa a través de la celda de referencia para compensar cualquier absorción de luz debida a la celda y al disolvente.

El espectrofotómetro tiene una fuente que emite todas las frecuencias de luz UV (por encima de 200 nm). La luz pasa a través de un monocromador, que utiliza una red de difracción o un prisma para dispersar la luz descomponiéndola en un amplio espectro y seleccionar una longitud de onda. Esta única longitud de onda de luz se divide en dos haces, uno pasa a través de la celda de muestra y otra a través de la celda de referencia (disolvente). El detector mide constantemente la relación de intensidad entre el haz de referencia (I_r) y el haz de la muestra (I_s). Mientras el espectrofotómetro explora las longitudes de onda en la región UV, un registrador hace el gráfico (espectro) de la absorbancia de la muestra en función de la longitud de onda.

La Absorbancia, A , de la muestra a una longitud de onda determinada viene dada por la ley de Lambert-Beer :

$$A = \log\left(\frac{I_r}{I_s}\right) = \epsilon cl \quad (31)$$

donde:

c = concentración de la muestra en moles por litro.

l = espacio que recorre la luz a través de la celda, en centímetros (pasó óptico)

ϵ = absorción molar (o coeficiente de extinción molar) de la muestra.

La absorción molar (ϵ) es una medida de intensidad con que la muestra absorbe la luz a esa longitud de onda.

El espectro de UV-visible tiende a mostrar picos y valles amplios: Los datos espectrales más característicos de una muestra son los siguientes:

1. Longitud de onda (λ) de máxima absorbancia, denominada $\lambda_{\text{máx}}$.
2. El valor de la absorción molar ϵ de cada máximo.

Como los espectros de UV-visible son amplios y carecen de detalles, generalmente no se suelen utilizar. La información espectral se da en forma de valor o valores de $\lambda_{\text{máx}}$ junto con la absorción molar para cada valor de $\lambda_{\text{máx}}$. El valor de $\lambda_{\text{máx}}$ se lee directamente del espectro, pero la absorción molar ϵ se tiene que calcular a partir de la concentración de la solución y del paso óptico de la celda.

Empíricamente, la absorción molar en un rango de cero a un máximo del orden de 10^5 se observa en la absorción ultravioleta y el visible. Para algún pico en particular, la magnitud de ϵ sobre la sección que cruza de la especie y la probabilidad de que una transición de energía ocurra. La relación entre ϵ y estos parámetros se muestra a continuación

$$\epsilon = 8.7 \times 10^{19} PA \quad (32)$$

donde P es la probabilidad de transición y A es el área de la sección que cruza en centímetros cuadrados.

La mecánica cuántica permite transiciones, valores de P en el rango de 0.1 a 1, cuyas bandas de absorción están en $\epsilon_{\max} = 10^4$ a 10^5 . Los picos que tienen absorción molar menos de 10^3 son clasificadas como de baja intensidad. Estas son resultado de las llamadas transiciones prohibidas, cuyas probabilidades de ocurrir son menos de 0.01.

La absorción de ultravioleta y visible por átomo o molécula especie M, puede considerarse que ocurre en dos partes, la primera involucra la excitación como se muestra en la ec.30



El producto de la reacción entre M y el fotón $h\nu$ es una partícula excitada electrónicamente simbolizada por M^* . El tiempo de vida de esta partícula excitada es corto (10^{-8} a 10^{-9} segundos), esto es debido a algún proceso de relajación, el más común de estos involucra la conversión de la energía de excitación a calor.

La absorción de radiación ultravioleta o visible generalmente resulta de la excitación de los electrones ligantes, como una consecuencia la longitud de onda del pico de absorción puede ser correlacionado con los tipos de ligantes existentes de la especie bajo estudio. La absorción espectroscópica molecular es entonces valiosa para identificar grupos funcionales en una molécula. Sin embargo, más importante es la aplicación de la espectroscopia de absorción ultravioleta y visible para determinar cuantitativamente los compuestos de absorción contenidos en los grupos.

Existen tres tipos de transiciones electrónicas, además de categorías en las especies absorbentes. En las tres incluyen transiciones de: (1) π , σ y n electrones (2) electrones d y f (3) electrones de transferencia de carga.

La mayoría de los iones de metales de transición absorben en la región ultravioleta-visible del espectro. Para la serie de los lantánidos y actínidos, el proceso de absorción resulta de transiciones electrónicas de los electrones 4f y 5f; para los elementos de la primera y segunda serie de los metales de transición los electrones 3d y 4d son los responsables de la absorción.

Los iones y complejos de los 18 elementos de la primera y segunda serie de los metales de transición tienden a absorber radiación visible en uno, si o es que en todos sus estados oxidados, las bandas de absorción son frecuentemente anchas y son influenciadas fuertemente por el ambiente químico.

Los metales de transición están caracterizados por tener 5 orbitales *d* parcialmente ocupados, los cuales son capaces de acomodar un par de electrones. Los electrones de estos orbitales generalmente no participan en la formación de enlaces, aunque es claro que el espectro característico de los metales de transición involucra transiciones electrónicas entre varios niveles de energía de estos orbitales *d*.

Dos teorías han sido desarrolladas para explicar el color [33,59] en los iones de los metales de transición y la profunda influencia del ambiente químico en estos colores. La teoría de campo cristalino (discutida en la teoría EPR) es la más simple de las dos y es adecuada para un entendimiento cualitativo. La más compleja es el tratamiento de orbitales moleculares, sin embargo provee un tratamiento cuantitativo del fenómeno.

Ambas teorías están basadas en la premisa de que las energías de los orbitales *d* de iones de metales de transición en solución no son idénticas y que la absorción involucra la transición de electrones de un orbital *d* de baja energía a uno de alta energía. En ausencia de un campo eléctrico o magnético, en estado fundamental las energías de los orbitales *d* son idénticas, y la absorción de radiación no es requerida para mover un electrón de un orbital a otro. Por otro lado, cuando se forma un complejo en solución entre el ion metálico y agua o algún otro ligante, el desdoblamiento de las energías de los orbitales *d* resulta. Este efecto es debido a las fuerzas electrostáticas de repulsión entre el par de electrones del donador y los electrones en los orbitales *d* del ion metálico central. Para entender el desdoblamiento de energías, la distribución espacial de los electrones en los diversos orbitales *d* es considerada.

APÉNDICE B

Espectros UV-Vis durante la reacción de Fenton empleando Fe^{3+}

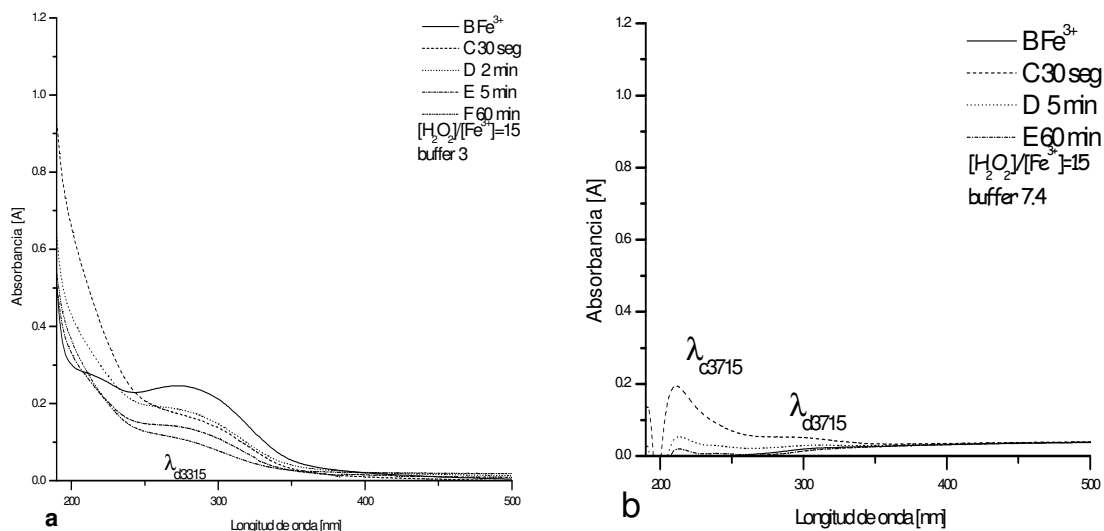


Figura B1 Reacción de Fenton en relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 15$, seguida desde los 30 s hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 al Fe^{3+} . En **a)** a $\text{pH} = 3$ los picos de absorción correspondientes al Fe^{3+} disminuyen inmediatamente de iniciada la reacción, a los 60 min sólo se insinúa λ_{d3315} . En **b)** a $\text{pH} = 7.4$, el pico en $\lambda_{c3715} = 211$ nm permanece hasta los 60 min y λ_{d3715} es muy ancha.

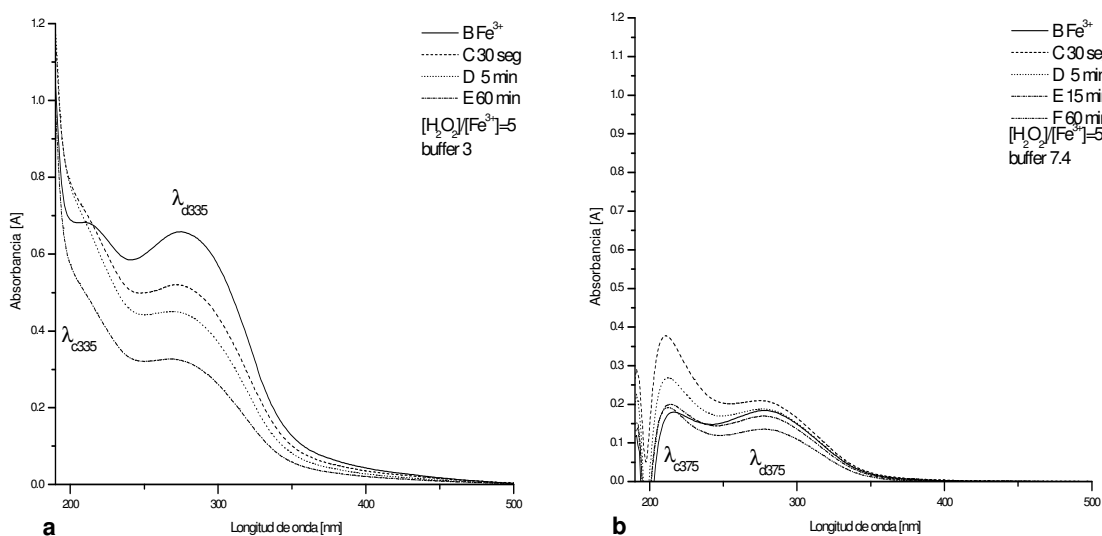


Figura B2 Reacción de Fenton en relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 5$, seguida desde los 30 s hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 al Fe^{3+} . En **a)** a $\text{pH} = 3$ los picos de absorción correspondientes al Fe^{3+} disminuyen en

absorbancia pero todavía se insinúan λ_{c335} y $\lambda_{d335}=272$ nm. En **b)** a pH=7.4 bandas, $\lambda_{c375}=212$ nm y $\lambda_{d375}=278$ nm.

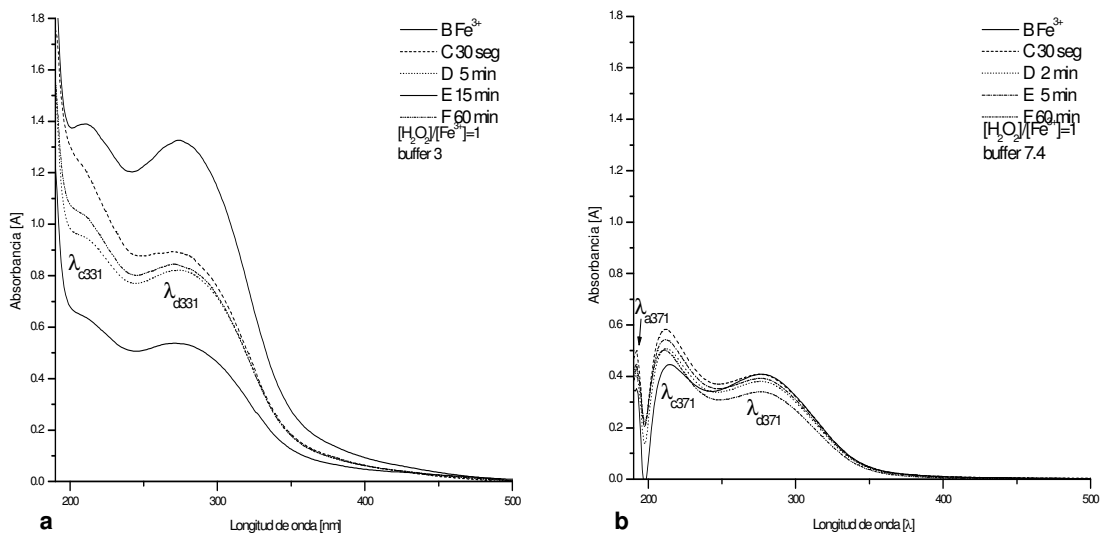


Figura B3 Reacción de Fenton en relación $[H_2O_2]/[Fe^{3+}]=1$, seguida desde los 30 s hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 al Fe^{3+} . En **a)** a pH=3 los picos de absorción correspondientes al Fe^{3+} disminuyen en absorbancia pero el H_2O_2 no es suficiente para transformar al hierro completamente $\lambda_{c331} = 207$ nm y $\lambda_{d331}=270$ nm. En **b)** a pH=7.4 $\lambda_{a371}=191$ nm, $\lambda_{c371}=210$ nm y $\lambda_{d371}=278$ nm.

Espectros UV-Vis durante la reacción de Fenton empleando Fe^{2+}

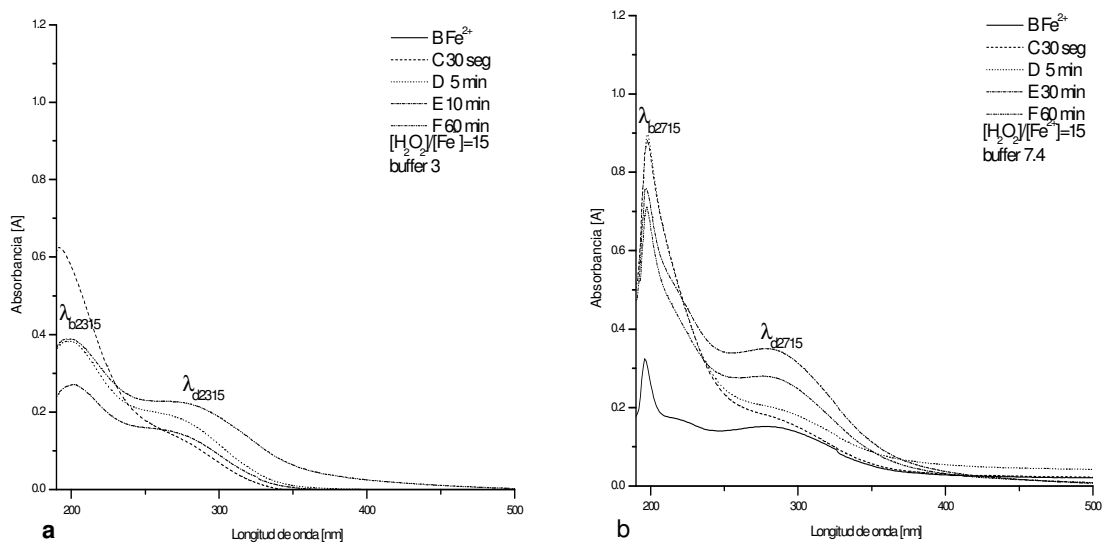


Figura B.4 Reacción de Fenton, $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]=15$, seguida desde los 30 s hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 al Fe^{2+} . En **a)** a pH=3 tenemos las siguientes bandas de absorción $\lambda_{b2315}=198$ nm otra muy ancha en λ_{d2315} . En **b)** a pH=7.4 tenemos picos en $\lambda_{b2715}=197$ nm y en $\lambda_{d2715}=278$ nm.

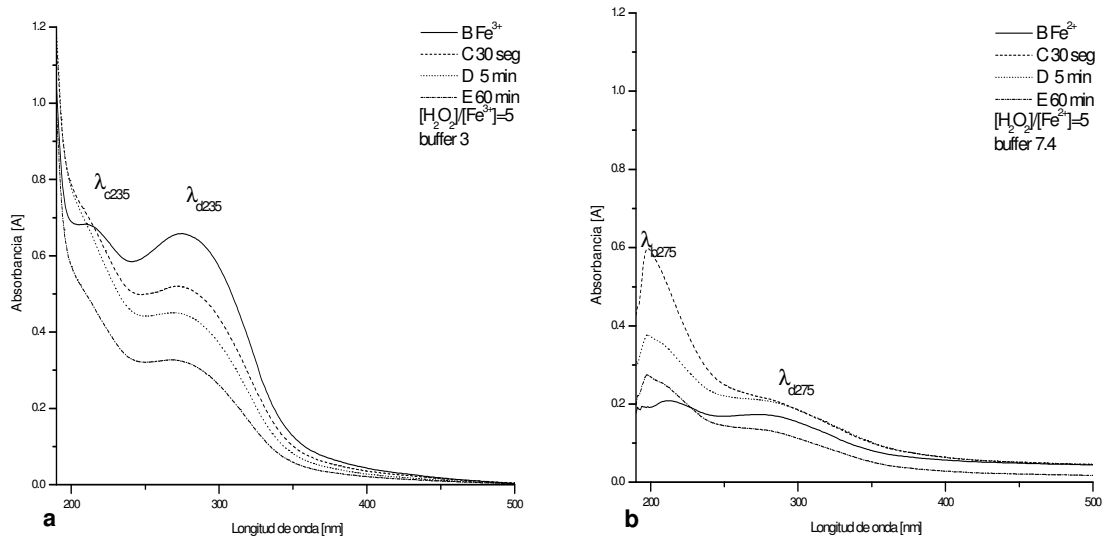


Figura B5 Reacción de Fenton, en $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]=5$, seguida desde los 30 s hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 al Fe^{2+} . En **a)** a pH=3 tenemos las siguientes bandas de absorción $\lambda_{c235}=210$ nm otra en $\lambda_{d235}=274$ nm que pertenecen a la impureza del 0.05% de hierro ferrico al agregar el H_2O_2 se observó una disminución en la absorbancia en la señal de hierro. En **b)** a pH=7.4 tenemos de igual forma picos en $\lambda_{b275}=197$ nm y en λ_{d275} muy ancha.

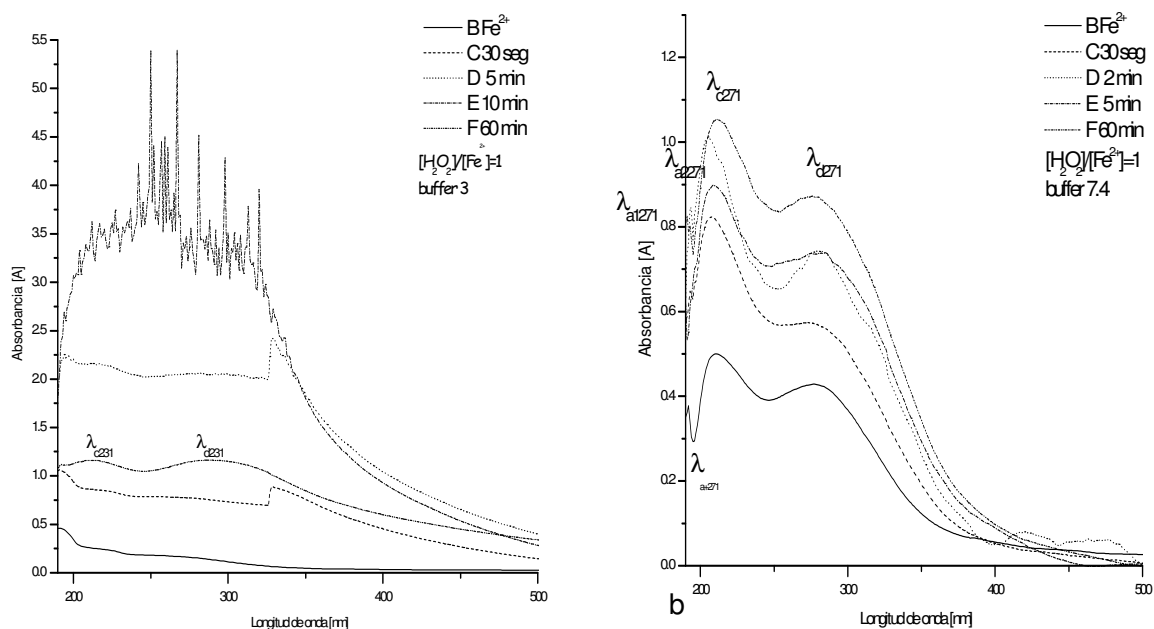


Figura B6 Reacción de Fenton en $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]=1$, seguida desde los 30 s hasta los 60 min de agregar el H_2O_2 al Fe^{2+} . En **a)** a pH=3 desde el inicio de la reacción se observa distorsión en cada una de las señales debido a que saturan el sistema y no es hasta los 60 min que se estabiliza absorbiendo en $\lambda_{c231}=215$ nm y otra en $\lambda_{d231}=288$ nm. En **b)** pH=7.4 ocurre algo similar quedando los siguientes picos $\lambda_{a271}=191$ nm, $\lambda_{c271}=211$ nm y en $\lambda_{d271}=277$ nm.

APÉNDICE C

Espectros EPR durante la reacción de Fenton empleando Fe^{3+}

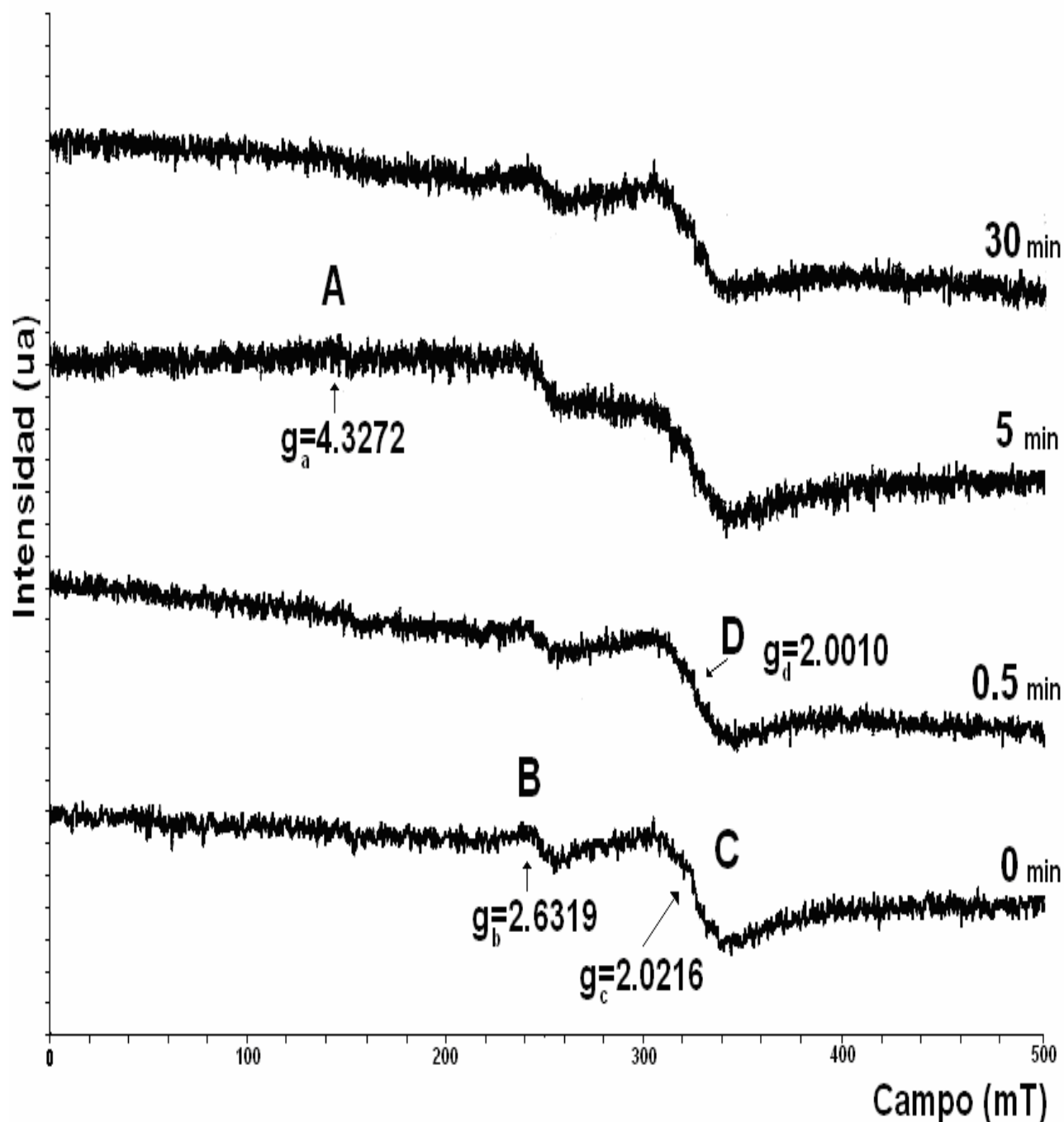


Figura C1. Espectros EPR de la reacción entre Fe^{3+} y H_2O_2 , en la relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 20$, seguida en el tiempo a los 0 min, 0.5 min, 5 min, 30 min, a $\text{pH} = 3$; inicialmente tenemos señal en B y C, hasta los 0.5 min aparece un pico en C. La reacción fue medida a 77 K, otros parámetros son $\nu = 9.0612$ GHz, $p = 5$ mW.

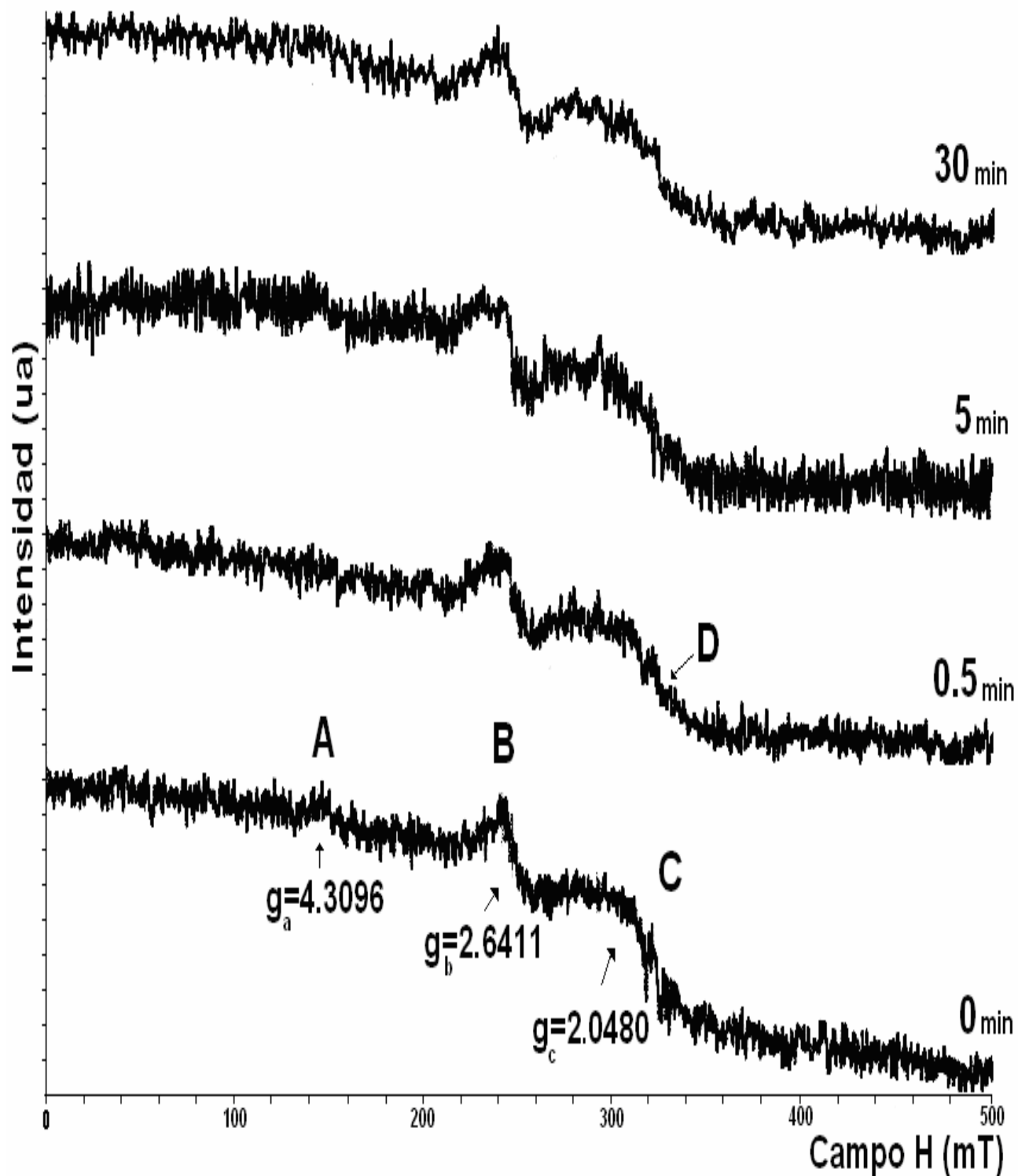


Figura C2 Espectros EPR de la reacción entre Fe^{3+} y el H_2O_2 , en la relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}]=20$, seguida en el tiempo a los 0 min, 0.5 min, 5 min, 30 min, en $\text{pH}=7.4$; al iniciar la reacción se tienen las señales A, B y C pero a los 30 min desaparece el pico en C. La reacción fue medida a 77 K, otros parámetros son $\nu=9.04962$ GHz, $p=5$ mW.

Espectros EPR durante la reacción de Fenton empleando Fe^{2+}

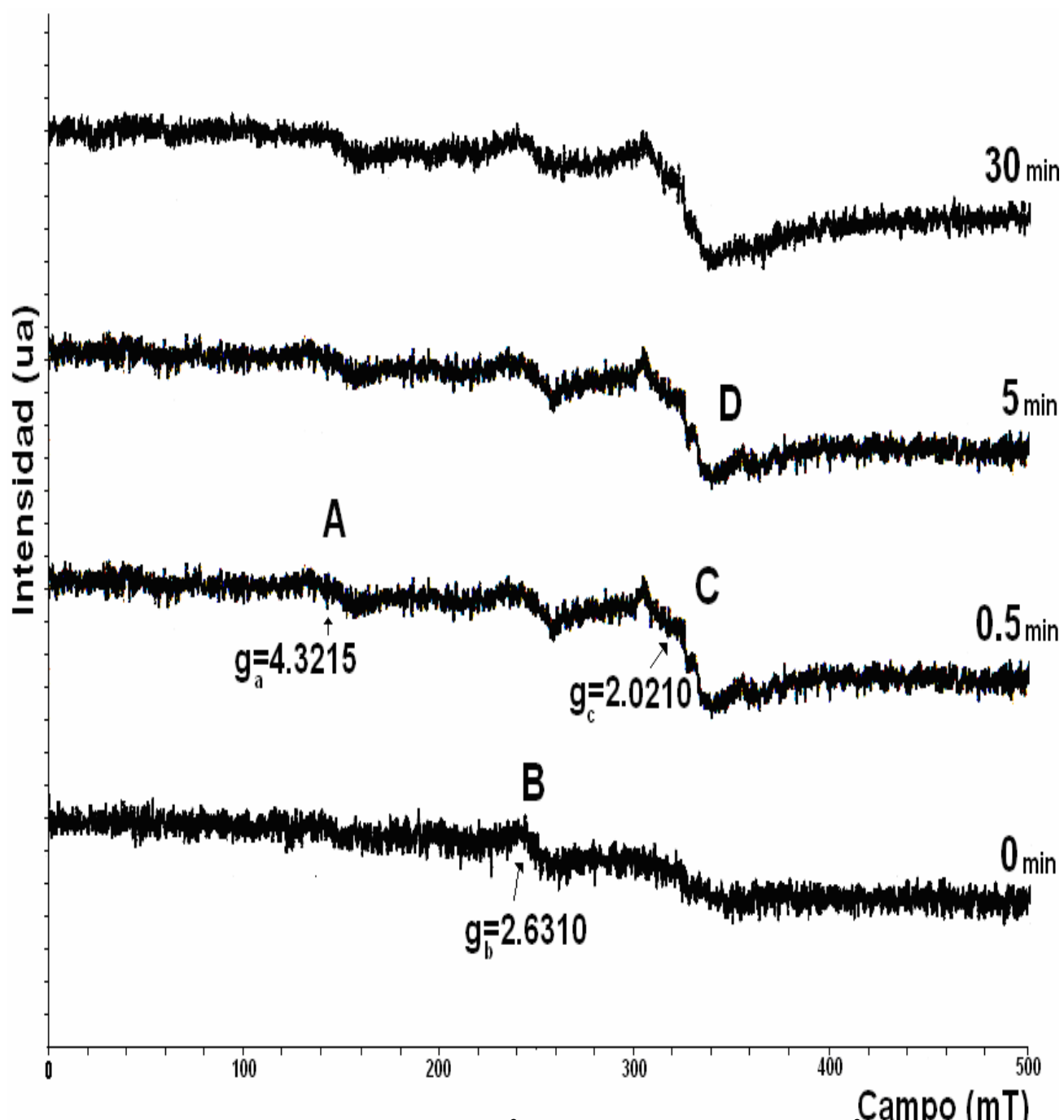


Figura C3. Espectros EPR de la reacción entre Fe^{2+} y H_2O_2 , en la relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 20$, seguida en el tiempo a los 0 min, 0.5 min, 5 min, 30 min, en $\text{pH} = 3$; se ve inicialmente la señal B debida a la impureza de hierro férrico, a los 30 s se define C que es producto de la reacción de Fenton. La reacción fue medida a 77 K, otros parámetros son $\nu = 9.05121$ GHz, $p = 5$ mW.

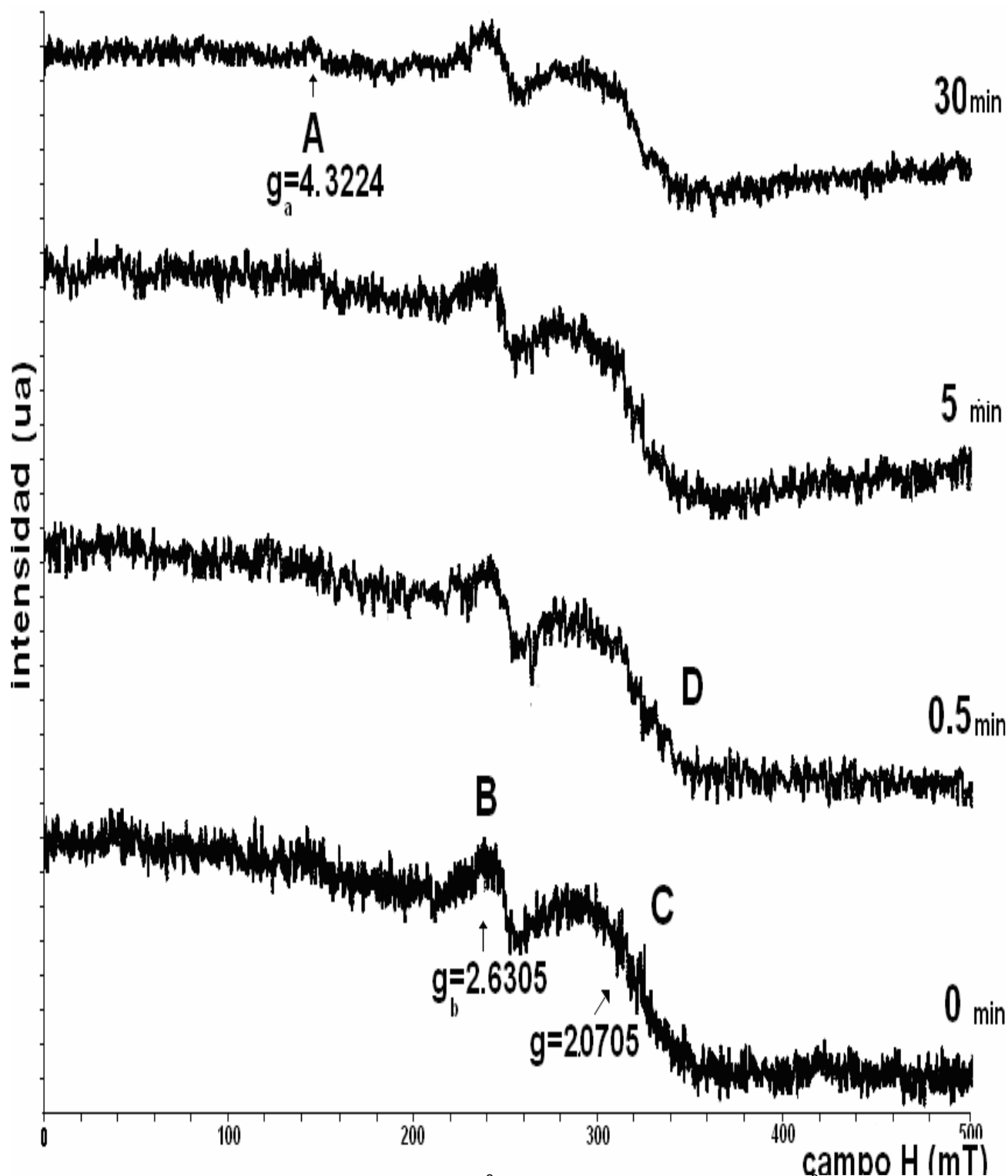


Figura C4. Espectros EPR de la reacción entre Fe^{2+} y H_2O_2 , en la relación $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 20$, seguida en el tiempo a los 0 min, 0.5 min, 5 min, 30 min, en $\text{pH} = 7.4$; se ven inicialmente dos señales A y B debidas a la impureza de hierro férrico, a los 30 s disminuye C producto de la reacción de Fenton. La reacción fue medida a 77 K, otros parámetros son $\nu = 9.05121$ GHz, $p = 5$ mW.