

## **ESTUDIO DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN AGUAS A TRAVÉS DE ANÁLISIS INDIRECTOS (ABSORB)**

**Autores:** Leire Monasterio Velilla (Alumna en prácticas del grado de ingeniería química UPV/EHU); Santos Paunero Herrero (Responsable de unidad de innovación en Consorcio de Aguas Bilbao Bizkaia, CABB); Patricia Maeso Carcedo (Jefa de planta CATABB); Jonatan García Uriarte (Responsable del CATABB); Ana Urkiaga Guinea (Investigadora senior en GAIKER).

El CATABB, Centro Avanzado de Tratamiento de Agua Bilbao Bizkaia, tiene como objetivo el desarrollo de proyectos de I+D+I necesarios para mejorar la calidad del suministro de agua, en concreto de las instalaciones de la ETAP de Venta Alta. Mediante el CATABB, al ser un centro de innovación e investigación en torno al agua urbana, el propio CABB pretende implantar una plataforma abierta con colaboración externa con entidades tanto públicas como privadas, centros tecnológicos o universidades.

Uno de los proyectos presentados en el CATABB es el Proyecto ABSORB (caracterización del agua para consumo mediante el análisis de distintas longitudes de onda de la absorbancia). En este proyecto se estudian las absorbancias 254, 272, 280. Se realiza una clasificación teórica sobre la materia orgánica natural, destacando los ácidos húmicos, que contienen anillos de benceno, precursores de subproductos de la desinfección, en concreto de los THM (trihalometanos).

Se concluye que la longitud de onda característica de la MON es la 254, ya que en las sustancias húmicas hay un predominio de núcleos aromáticos, es decir del benceno, el cual tiene como longitud de onda máxima la 254, y en esa longitud de onda se evitan las interferencias respecto de la materia inorgánica. Además, las sustancias húmicas son complejas, y no sólo hay bencenos, también hay derivados, los cuales suelen presentar sus transiciones electrónicas a longitudes de onda de 272 y 280 nm, de ahí que en diversas bibliografías también empleen estas longitudes.

### **OBJETIVOS ABSORB**

El objetivo principal es caracterizar el agua del río Nervión y del embalse del Zadorra, ya que son las dos aguas empleadas en el CATABB. Para ello se estudia la naturaleza de la materia orgánica presente en el agua a través de análisis indirectos, es decir, mediante el empleo de la absorbancia. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Realizar los espectros de absorbancia de la materia inorgánica, de un ácido húmico y de muestras de agua del Nervión, Zadorra y mezcla (50N50Z).
- Caracterizar la MON (materia orgánica natural) mediante fluorescencia, con la matriz excitación-emisión del agua del Nervión y del Zadorra.
- Estudiar la tirosina y el triptófano (aminoácidos aromáticos) precursores típicos de subproductos de la desinfección.

## EXPERIMENTAL MI

Primeramente, se realizan las absorbancias de la materia inorgánica (MI). Para ello, se utiliza el espectrofotómetro Photolab 7600 UV-VIS que se encuentra en el laboratorio del CATABB, el cual mide a diario las absorbancias de los diferentes puntos de muestreo de la planta.

Para hacer la medición de la longitud de onda, se emplea una cubeta de cuarzo de 10 mL. El espectrofotómetro tiene un rango de longitud de onda desde 190 a 1100 nm, se emplea en las gráficas un espaciamiento de 2nm, y mediante un USB se recogen los datos en forma de Excel.

En la propia cubeta se añade la muestra a medir, que proviene de las analíticas que se hacen a diario en el laboratorio. Entre ellas: amoníaco, nitratos, aluminio, hierro, manganeso, dióxido de cloro, cloro y DQO. El agua que se analiza es 50N50Z (50% agua del río Nervión y 50% agua del embalse del Zadorra).

Por otro lado, en el propio espectrofotómetro aparecen las longitudes de onda específicas en las que se lee la MI. En los Kits del laboratorio del CATABB, donde se encuentran los reactivos para poder leer la MI, viene especificada la longitud de onda de cada compuesto (Tabla 1). Además, con las propias gráficas que se obtienen, se observa generalmente cuál es el pico máximo de cada una.

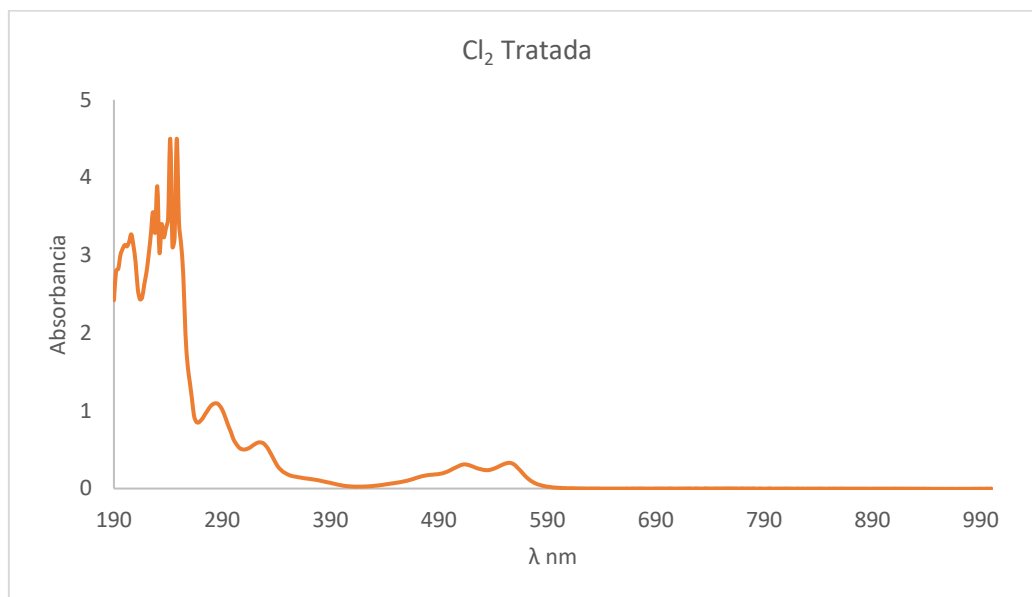
Tabla 1. Longitud de onda máxima característica de cada materia inorgánica.

Compuesto	Longitud de onda (nm)
Mn	445
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	340
Fe	565
Al	550
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	690
Cl <sub>2</sub>	550
ClO <sub>2</sub>	550
DQO	340

La muestra que se mide en el espectrofotómetro, no es sólo materia inorgánica con agua destilada, sino que es una mezcla del agua de la planta, junto con los reactivos, para poder leer su longitud de onda. Los picos no son muy característicos, ya que los puntos de muestra del agua de 50N50Z no presentan grandes cantidades de MI.

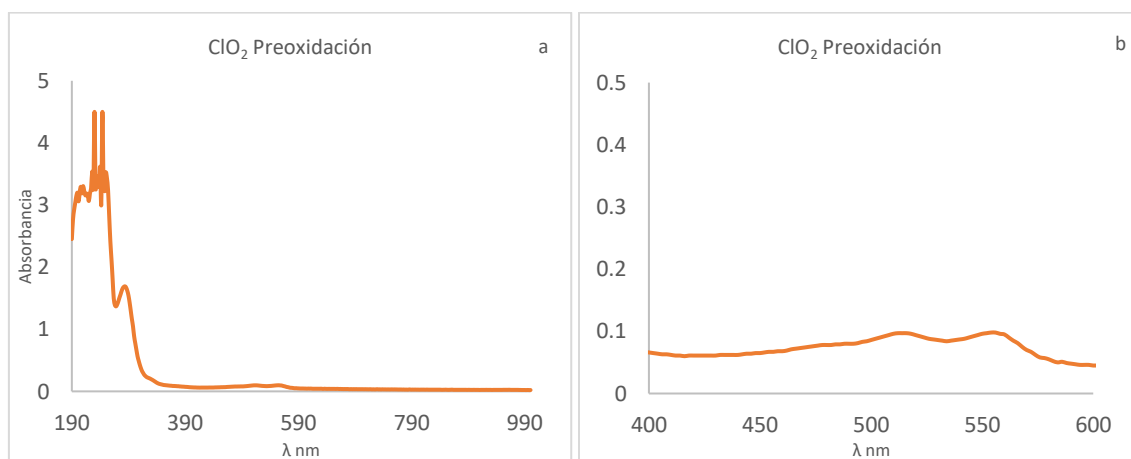
A continuación, se muestra la Figura 1. En ella, se observa el espectro de la muestra de agua tratada con los reactivos del cloro empleados.

Figura 1. Espectro de absorbancia de la muestra de agua de 50N50Z en el punto de tratada, para medir cloro.



Los dos últimos máximos que se observan en esta Figura 1 son los correspondientes a, por un lado, la medición del reactivo 1 del cloro, que se mide a una longitud de onda de 520; y, por otro lado, a la del propio cloro, con longitud de onda máxima a 550. Mencionar que el cloro tiene una concentración en el agua tratada de 50N50Z alrededor de 1 mg/L.

Figura 2. Espectro de absorbancia de la muestra de agua de 50N50Z en el punto de preoxidación, para medir dióxido de cloro.

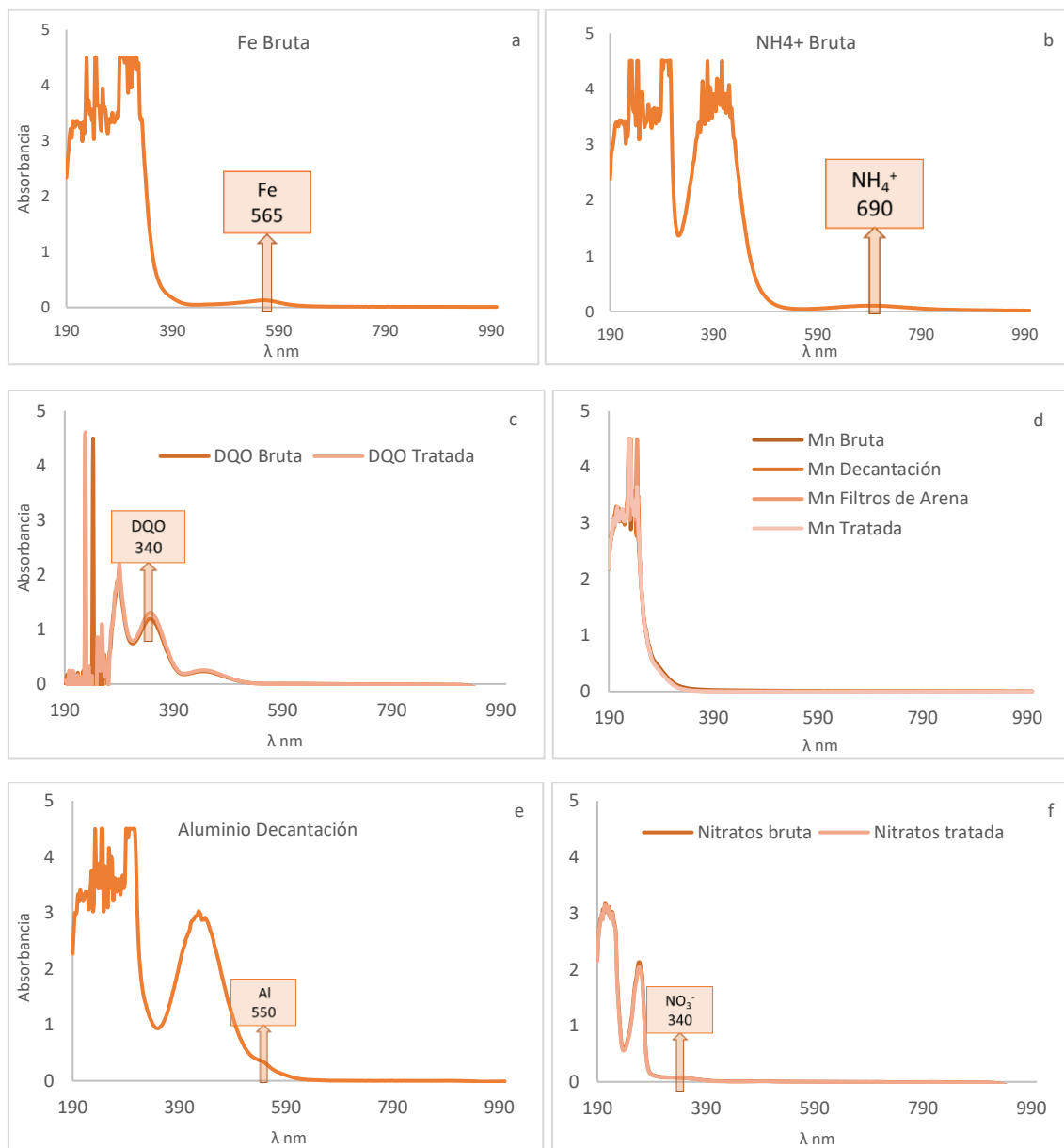


Esta Figura 2 se corresponde con el dióxido de cloro, en comparación con el cloro su concentración en el agua es muy pequeña, por ello en la Figura 2b se amplía la gráfica para poder observar los máximos; correspondiéndose el máximo de 550 con el del dióxido de cloro.

De esta forma, se realizan las gráficas de todos los compuestos (Figuras 3); destacando en el manganeso (Figura 3d) que no se presenta ningún máximo debido a que sólo hay 0,10 mg/L detectados de manganeso, por lo que no se llega a apreciar el máximo alrededor de los 445 nm.

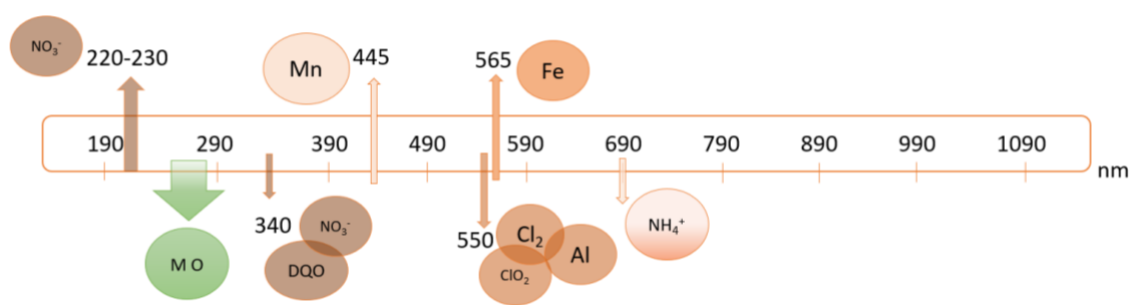
Además, como la muestra es agua de 50N50Z (ya sea del punto de muestreo de bruta, decantación, preoxidación o tratada) con los reactivos para poder leer la MI, no sólo se observan los máximos característicos a cada compuesto, si no que también se obtiene “ruido” en las primeras longitudes de onda.

Figura 3. Espectro de absorbancia de la muestra de agua de 50N50Z en hierro (a), amoniaco (b), DQO (c), manganeso (d), aluminio (e), nitratos (f).



Se puede observar que las mediciones de estos componentes están fuera del rango de 254, 272, 280 nm (Figura 4). Corroborando lo encontrado en bibliografía, que se escogen estas 3 absorbancias para la medición de la MO (materia orgánica), porque la MI no incide en ella, ya que se leen en absorbancias mayores, o menores a 190 nm las cuales no entran en el rango del espectrofotómetro.

Figura 4. Esquema de las longitudes de onda características de cada MI, junto con la específica de la MO.

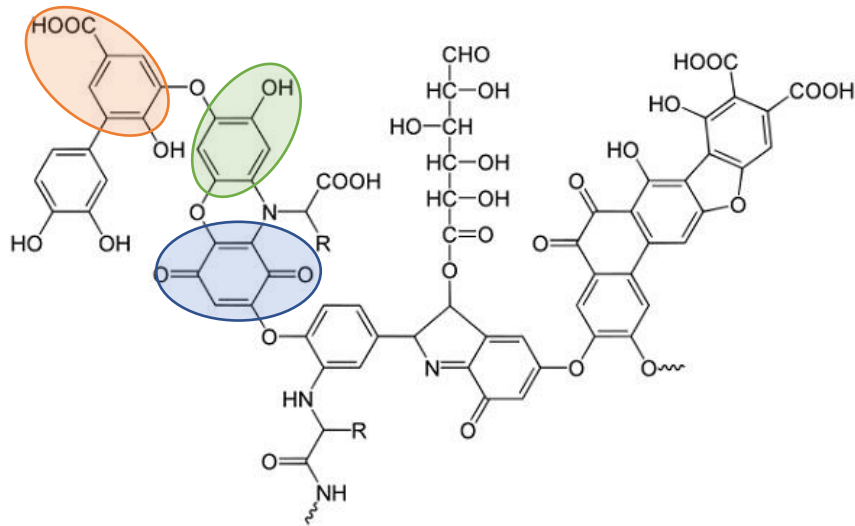


### EXPERIMENTAL MO

Hasta ahora, de los espectros obtenidos se observa que la zona más adecuada para escoger una longitud de onda con las mínimas interferencias es entre 190 y 290; además, se puede centrar más en la zona de 250-280, ya que por bibliografía se sabe que las sustancias orgánicas ocurren las excitaciones de los electrones, es decir, las longitudes de onda máxima en ese rango.

A continuación, se estudia el espectro ultravioleta de un ácido húmico; éstos forman parte de las sustancias húmicas. Los ácidos húmicos son los principales aportadores de materia orgánica en el agua, siendo sus principales grupos funcionales las quinonas, fenoles y ácidos benzoicos, que son los que le dan sus principales características. En la siguiente Figura 5 se representa el esquema molecular de un ácido húmico, junto con las longitudes de onda de los grupos funcionales, siendo las de la banda bencenoide (banda B) las más importantes.

Figura 5. Estructura modelo de un ácido húmico.

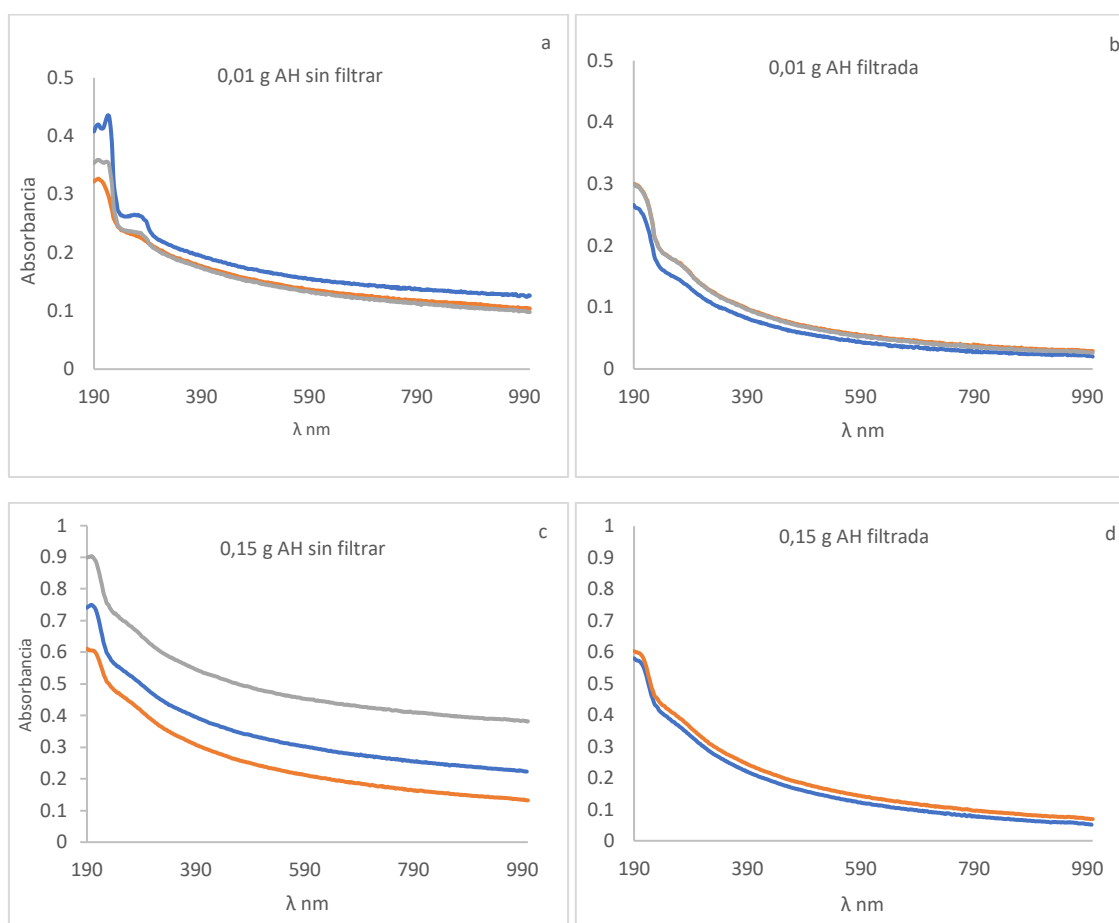


Compuesto	Banda M.	Banda B.
Quinona	-	254
Fenol	210	270
Acido benzoico	230	272

Sabiendo esto, se va a mostrar el espectro de absorción del ácido húmico. Éste, es un producto que viene de la marca Aldrich y tiene un punto de fusión de 300 °C. Con la muestra se pesa 0,01 g = 10 mg de ácido húmico, y se introduce en un vaso, rellenándolo con agua destilada hasta 100 mL. En otro vaso se hace lo mismo, pero con 0,15 g = 150 mg de ácido húmico. Estos valores de peso se escogen por bibliografía, y uno es más alto que el otro para comprobar si hay diferencias en las gráficas al añadir más cantidad.

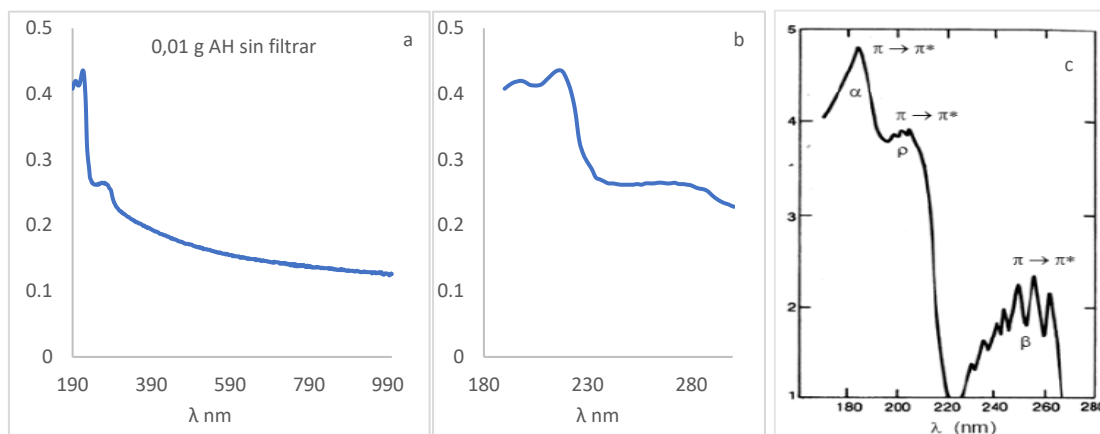
Después, se agita para asegurar que sea una mezcla lo más homogénea posible, y se ve que se disuelve parcialmente. Tras realizar el blanco con agua destilada, se introduce la muestra en el espectrofotómetro.

Figura 6. Espectros de absorbancia del ácido húmico con diferentes pesos.



Lo que se observa de estos espectros es que cuanto menos cantidad de ácido húmico el espectro se lee mejor, y se pueden ver longitudes de onda máxima. Esto se debe a que con 0,15 g se excede la cantidad afectando la forma en la que las moléculas interactúan con la luz lo que influye en el espectro, en este caso no detectándose de forma tan pronunciada los máximos de absorción. Mientras que con el 0,01 sí se consiguen detectar.

Figura 7. Espectro de absorbancia del ácido húmico 0,01 g sin filtrar (a), ampliado (b), comparativa con el espectro de absorbancia del benceno (c).

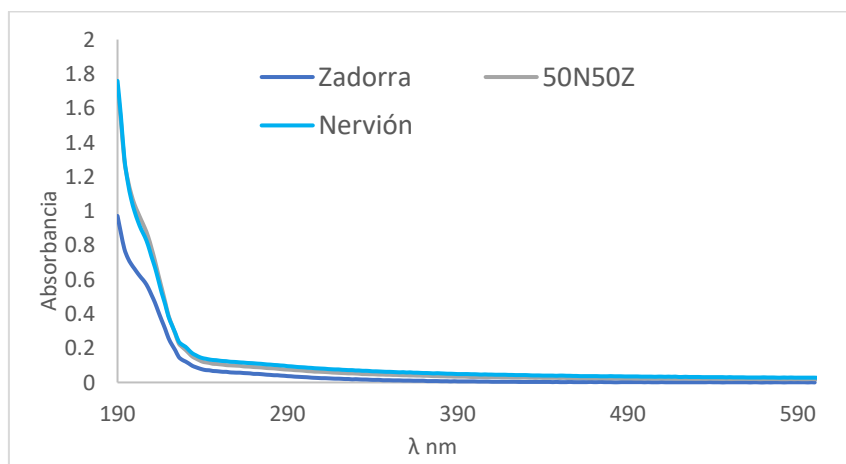


Es común observar múltiples picos en el espectro de absorción del ácido húmico, ya que hay presencia de diferentes grupos funcionales y estructuras. Esos picos que se ven a la izquierda (Figura 7b) están relacionadas con la banda moderada y la banda intensa a 210, 230 o a otras excitaciones electrónicas de otros enlaces. Siendo el pico más característico el de la banda bencenoide que en el caso del ácido húmico abarca de 250 a 280 nm aproximadamente.

### ESPECTROS DEL NERVIÓN, ZADORRA Y 50N50Z

A continuación, se muestran los espectros de absorbancia del Nervión, Zadorra y 50N50Z (Figura 8). Se observa que los espectros de absorción UV-Vis no presentan estructura ya que no hay una longitud de onda máxima como tal, y normalmente, para este tipo de materiales se muestra una disminución continua de la absorbancia con el aumento de la longitud de onda. Esto ocurre también con el ácido húmico, que a medida que aumenta la longitud de onda, disminuye la absorbancia.

Figura 8. Espectros de absorbancia de muestras del río Nervión, embalse del Zadorra y mezcla 50N50Z.



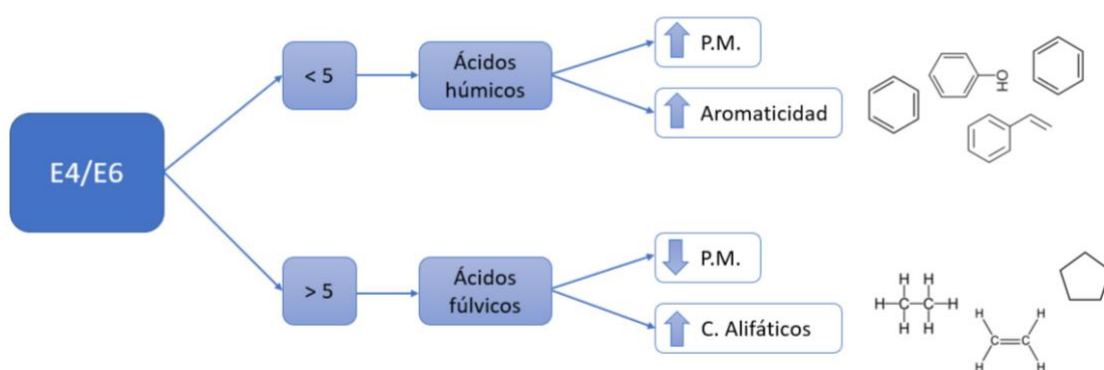
La gráfica del Zadorra en comparación con mezcla y Nervión, se observa que tiene una menor cantidad de sustancias orgánicas disueltas en el agua.

Además, para constatar esto último, hay un parámetro frecuentemente empleado en la caracterización de las sustancias húmicas, el cual es la relación entre las absorbancias a 465 y 665 nm, conocida como relación E4/E6.

Esta relación, en general, tiene valores más elevados para ácidos fúlvicos (AF) que para ácidos húmicos (AH), y suele tener un valor menor de cinco en los AH (1-3) y mayor de cinco en los AF (6-8,5) (Stevenson, 1994).

Además, la relación E4/E6 es un buen indicador del peso molecular (PM) de diferentes fracciones de sustancias húmicas. Que la relación E4/E6 sea mayor en los ácidos fúlvicos, indica que éstos tienen pesos moleculares bajos y están menos polymerizados. También indica que los AF tienen un bajo grado de aromatización y presencia más grande de estructuras alifáticas.

Figura 9. Esquema de la relación E4/E6.



Para demostrar esto, se realizan mediante el espectrofotómetro del laboratorio, las mediciones de absorbancia de 465 y 665 en el ácido húmico, y después su relación.

Al filtrar la muestra, la relación E4/E6 es mayor, ya que el peso molecular que entra en la cubeta disminuye. Por otra parte, se realizan también las mediciones de absorbancia 465 y 665 en las muestras de agua de Nervión, Zadorra y 50N50Z en el punto de muestreo del agua bruta (Tabla 2).

Tabla 2. Relaciones de E4/E6.

Compuesto		E4/E6
Ácido húmico	Filtrada	1,7
	Sin filtrar	1,3
Bruta Nervión		1,4
Bruta 50N50Z		1,5
Bruta Zadorra		3

Se observa que en los cuatro casos el valor de la relación es menor de cinco, indicando en el caso del ácido húmico que se trata de un ácido húmico como tal, y en el caso de las muestras de agua que de lo que se caracterizan es más de húmico que de fúlvico.

Por consiguiente, que las muestras de agua tengan una relación E4/E6 baja (es decir, un valor cercano a 1) generalmente se asocia con ácidos húmicos, que son moléculas más grandes y más complejas, tienen una mayor cantidad de carbono.



En todo caso, es importante tener en cuenta que la relación E4/E6 puede verse afectada por otros factores, como la presencia de otras sustancias y las condiciones ambientales. Por lo tanto, se recomienda utilizarla junto con otras técnicas de análisis, como puede ser mediante fluorescencia.

## FLUORESCENCIA

En este proyecto ABSORB II se pide caracterizar el agua del Nervión y del Zadorra. Para ello, mediante el método de la fluorescencia, se va a demostrar que el agua que se emplea en la planta, es más característico en ácidos húmicos que en fúlvicos.

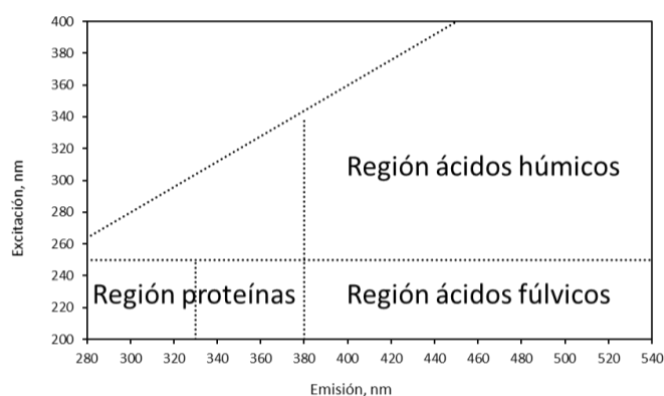
A continuación, se introduce el concepto de matriz excitación-emisión por fluorescencia (EEM), la cual es una técnica en la que se emplea la espectroscopía de fluorescencia. Mediante esta matriz se puede caracterizar y estudiar muestras de aguas naturales ya que presentan fluorescencia.

En esta técnica se emplea el concepto de fluoróforo. Este término es referido a una molécula absorbente de luz, capaz de excitarse por la absorción de la energía y después emitir luz de energía más baja, aunque a una longitud de onda más larga.

Para entender el concepto de la fluorescencia, se le compara con la absorbancia, en la que se emplea radiación ultravioleta. Este tipo de radiación es una radiación electromagnética invisible, mientras que la fluorescencia es un fenómeno óptico en el que ciertos materiales emiten luz visible después de absorber luz de una longitud de onda específica, como la luz ultravioleta.

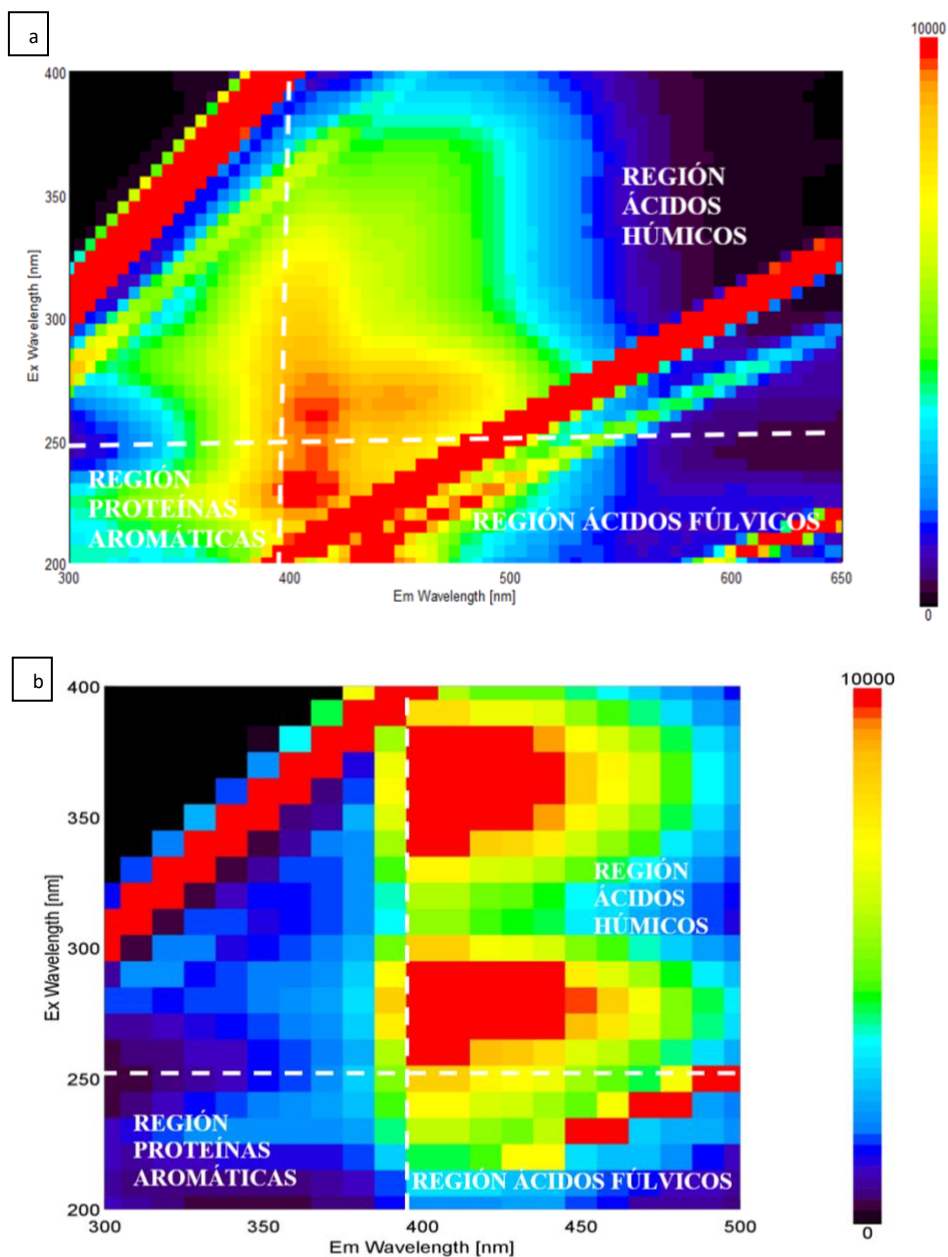
Esta técnica de matriz excitación-emisión por fluorescencia (EEM) es interesante ya que presenta ubicaciones específicas que se corresponden con picos de emisión fluorescente, y estos picos a su vez se corresponden con fluoróforos de la muestra analizada. Estas ubicaciones pueden variar, pero generalmente hay una ubicación de ácidos húmicos (se encuentra generalmente en la esquina superior derecha de la EEM), ácidos fúlvicos (se encuentra en la parte inferior derecha de la EEM) y proteínas aromáticas (se encuentra en la parte inferior izquierda de la EEM) (Figura 10).

Figura 10. Esquema de una matriz excitación-emisión.



En la siguiente Figura 11, se adjuntan dos gráficas, correspondiente a cada agua bruta del Zadorra y del Nervión.

Figura 11. Caracterización del agua bruta dentro del Entregable E1.3-Final del proyecto CETHAP. Zadorra (a), Nervión (b).



Se realizan las mediciones de la matriz de Excitación-Emisión (EEM) por espectroscopia de Fluorescencia del agua bruta procedente del embalse del Zadorra y del río Nervión. Como resultado, la intensidad de los picos (color amarillo-rojo) en las regiones asociadas a los ácidos orgánicos hidrofóbicos (HPOA: ácido húmico, ácido fúlvico y derivados) es significativamente mayor que la intensidad de los picos (color verde-azul) correspondientes al resto de regiones asociadas a otras fracciones hidrofóbicas (HPOB: proteínas y aminoácidos, etc.), independientemente de la fuente de agua bruta.

Po tanto, como se puede observar sobre todo en la gráfica del Nervión, la intensidad de los picos rojo-amarillo se centra en la zona de los ácidos húmicos, por lo que al igual que con la relación E4/E6, las muestras de agua que se emplean en el CATABB son más características de ácidos húmicos, que de proteínas.

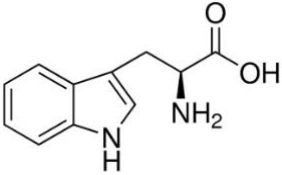
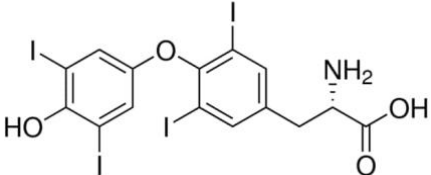
Es cierto que se puede observar tanto en Zadorra como en Nervión intensidades rojas-amarillas en la zona de ácidos fúlvicos, pero se caracteriza más por los húmicos.

**AMINOÁCIDOS TIROSINA Y TRIPTÓFANO**

Por último, en la matriz excitación-emisión, se da una zona de proteínas, en las cuales entran la tirosina y triptófano. Éstos son importantes puesto que son aminoácidos aromáticos y son precursores de los subproductos de la desinfección.

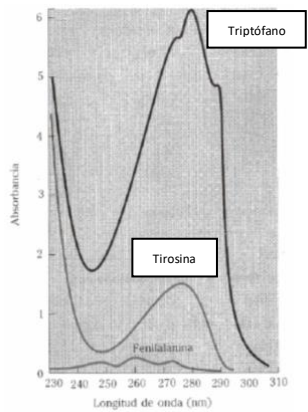
Para su análisis, se escogen productos de la empresa Sigma-Aldrich y en la siguiente Tabla 3 se presentan sus características.

Tabla 3. Composición/Información sobre las proteínas aromáticas a tratar.

	Triptófano	Tirosina
Sinónimos, fórmula	L-Tryptophan, C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	L-Thyroxine, T4, C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>
Peso molecular(g/mol)	204,23	776,87
T fusión (°C)	280-285	223
Aspecto	Cristalino, blanco	Sólido, blanco
Molécula		

Según bibliografía estos dos aminoácidos tienen su longitud de onda máxima en 280 nm, Figura 12.

Figura 12. Espectro de absorbancia de la tirosina y el triptófano.



## CONCLUSIONES

Se puede finalizar que en las mediciones de absorbancia del CATABB en las muestras de agua la absorbancia a 254 nm ( $A_{254}$ ) es siempre más alta que en las absorbancias a 272 y 280; ésta última es siempre más baja, indicando una menor presencia de proteínas aromáticas en la muestra. Además, esto comparándolo con las gráficas de fluorescencia (Figuras 11a y 11b) se observa en el rango de las proteínas aromáticas las intensidades no llegan a color rojo-amarillo, por lo que hay muy poca presencia de estos compuestos. Si hubiese tirosina y triptófano, al analizar las muestras a 280 tendría que aumentar el valor, no siendo este el caso puesto que disminuye.

Por último, en el laboratorio del CATABB se emplea, por un lado, el agua del río Nervión, y por otro lado agua del embalse del Zadorra. Con los datos que se recogen de las absorbancias 254, 272 y 280, se observa siempre que las absorbancias del Nervión son más altas que las del Zadorra. Esto es debido, a que el Nervión presenta más materia orgánica, debida a más presencia de ácidos húmicos; mientras que el Zadorra tiene menor proporción de éstos. Además, con los datos de THM (trihalometanos) obtenidos, el Nervión tiene más cantidad que el Zadorra, ya que la cantidad de materia orgánica al ser mayor, al reaccionar con los desinfectantes, se forman más productos de la desinfección.