

Degradación de azul de metileno bajo irradiación visible sobre electrodos de TiO₂ sensibilizados con pigmentos de clorofila extraídos de la planta de *Spinacia Oleracea*

Methylene blue degradation under visible irradiation on TiO₂ electrodes sensitized by dye chlorophyll extract from *Spinacia Oleracea* plant

Carlos E. Diaz-Uribe¹, William Vallejo-Lozada^{2*}, Álvaro Cantillo-Guzman³,
Maria Alvis-Padilla⁴, Catalina Fajardo-Rangel⁵

^{1,2}Doctor en Ciencias, Docente Tiempo Completo,

Grupo de Investigación en Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico

³Estudiante Maestría en Ciencias Química,

Grupo de Investigación en Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico

⁴Químico, Grupo de Investigación en Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico.

⁵Ingeniero Químico, Grupo de Investigación en Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico

Email: williamvallejo@mail.uniatlantico.edu.co

Recibido: 2/11/2017

Aceptado: 18/04/2018

Cite this article as: C. E. Diaz-Uribe, W. Vallejo-Lozada, A. Cantillo-Guzman, M. Alvis-Padilla, C. Fajardo-Rangel "Methylene blue degradation under visible irradiation on TiO₂ electrodes sensitized by dye chlorophyll extract from *Spinacia Oleracea* plant", *Prospectiva*, Vol 16, N° 2, 7-12, 2018.

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la actividad fotocatalítica de pigmentos fotosintéticos (clorofila), adsorbidos sobre superficie de dióxido de titanio en presencia de luz visible, los pigmentos fueron extraídos por maceración en frío, a partir de plantas de espinaca (*Spinacia Oleracea*), la fabricación de las películas de TiO₂ fue realizada utilizando la técnica de Doctor Blade, la cuantificación de los pigmentos se realizó mediante el método tricromático según la norma estandarizada para la cuantificación de clorofila 10200 H. Finalmente, se evaluó la capacidad, fotocatalítica del TiO₂ modificado bajo irradiación visible, la degradación del azul de metileno se evaluó durante 140 minutos. Los resultados indicaron que el proceso de sensibilización las películas de TiO₂ con el extracto *Spinacia Oleracea* mejoró significativamente la fotorespuesta del fotocatalizador en el rango visible del espectro electromagnético; además, los resultados de fotodegradación mostraron un porcentaje de degradación de los electrodos modificados (25%) superior al de los electrodos de TiO₂ sin modificar (<5%).

Palabras clave: Fotocatálisis; TiO₂; Sensibilización; Clorofila.

ABSTRACT

In this work, we studied photocatalytic activity of photosynthetic pigments (chlorophyll) adsorbed on titanium dioxide surface under visible light irradiation, pigments were extracted by cold maceration from spinach plants (*Spinacia Oleracea*), TiO₂ films were deposited through doctor blade technique, the quantification of the pigments was carried out the trichromatic method according to the standardized standard for the quantification of chlorophyll 10200H. Finally, we determined the photocatalytic capacity of the modified TiO₂ under visible irradiation, we tested degradation of the methylene blue during 140 minutes. The results indicated that the sensitization process of the TiO₂ films by *Spinacia Oleracea* extract improved photocatalyst optical response at the visible range of the electromagnetic spectrum; furthermore, the photodegradation results showed that modified electrodes degradation percentage (25%) was higher than TiO₂ unmodified degradation percentage (<5%).

Key words: Photocatalysis; TiO₂; Sensitization; Chlorophyll.

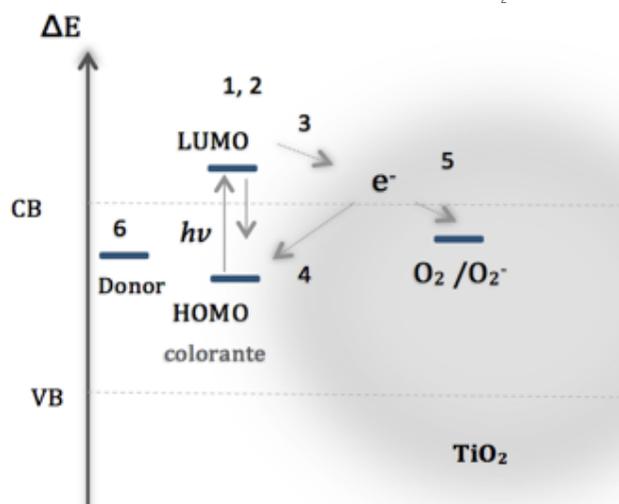
1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los semiconductores más empleados para los procesos de oxidación avanzada se encuentra el dióxido de titanio (TiO₂); diferentes propiedades físicas y químicas como: (a) la resistencia a la corrosión, (b) la estabilidad en soluciones acuosas, (c) la buena actividad fotocatalítica, (d) su abundancia en la naturaleza y (e) bajo costo, lo han convertido en uno de los materiales más investigados en el área [1-3], sin embargo, a pesar de estas características, el TiO₂ presenta valor de band gap elevado (3,2 eV), para el TiO₂, el porcentaje de aprovechamiento de la radiación solar se encuentra en el rango de 4-5%, un porcentaje bajo que representa una desventaja para el uso de este catalizador a gran escala [4-5]. Con el ánimo de mejorar esta situación, diferentes estrategias se han implementado para mejorar la fotorespuesta del TiO₂ en el rango visible: (I) dopaje con metales de transición [6-8], (II) dopaje con no metales [9-10], (III) puntos cuánticos [11], (IV) anisotropía cristalina [12] y (V) sensibilización con colorantes sintéticos o naturales [13-15].

En el proceso de sensibilización, después de la absorción de radiación, una entidad molecular (sensibilizador) altera otra molécula (semiconductor) por transferencia de energía o transferencia electrónica desde el sensibilizador hacia el semiconductor, algunos requisitos para fotosensibilizadores son: (a) absorción de luz visible intensa (400-750 nm), coeficientes de absorción molar superiores a 10⁴ M⁻¹cm⁻¹, (b) largas duraciones de estados excitados y (d) alta foto estabilidad. Diferentes colorantes orgánicos se han investigados para la sensibilización de TiO₂, varios complejos de metales de transición y tintes orgánicos (por ejemplo, porfirinas y ftalocianinas) han sido empleados con éxito como sensibilizadores en la fotocatalisis [16-17]. Los sensibilizadores como las porfirinas tienen un núcleo del que se derivan numerosos materiales de gran importancia biológica como la hemoglobina, la clorofila y la vitamina B12 [18].

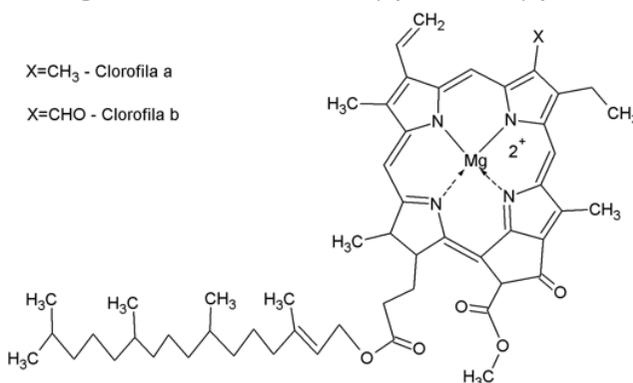
En un primer instante el sensibilizador absorbe radiación electromagnética y excita una entidad del estado energético HOMO al estado LUMO, este electrón puede ser transferido a la banda de conducción del TiO₂ donde este puede interactuar con oxígeno adsorbido en la superficie del TiO₂ para generar el anión radical superóxido y dar inicio al proceso de degradación del contaminante. La figura 1 muestra el proceso general de fotosensibilización: (1) excitación del sensibilizador, (2) decaimiento al estado basal, (3) transferencia electrónica, (4) recombinación, (5) generación especie reactiva del oxígeno, (6) regeneración del colorante por transferencia desde una especie donadora como el contaminante [19].

Figura 1. Esquema general del sistema colorante TiO₂.
Figure 1. General scheme of dye sensitized TiO₂.



Cuando se utilizan las porfirinas como sensibilizadores de TiO₂, se mejoran la absorción en la región visible del espectro electromagnético; la estabilidad del sensibilizador depende de la fortaleza de la unión al soporte, la preparación, la aplicación general y su estabilidad. La clorofila es una porfirina formada por 4 anillos de pirrol unidos por puentes metílicos, en el centro de la porfirina se encuentra un átomo de magnesio, la figura 2 muestra las estructuras químicas de las clorofilas a y b cuya diferencia estructural corresponde al tipo de sustituyente del anillo pirrólico número 2, para el caso de la clorofila a, el sustituyente corresponde a un grupo metilo y para la clorofila b, corresponde a un grupo etaldehído [20, 21].

Figura 2. Estructura química de la clorofila a y la clorofila b.
Figure 2. Chemical structure of chlorophyll a and chlorophyll b.



En este trabajo se evaluó la degradación del colorante azul de metileno bajo luz visible sobre electrodos de TiO₂ sensibilizados con los pigmentos extraídos de las plantas de *Spinacia Oleracea*.

2. METODOLOGÍA

2.1 Fabricación de las películas de TiO₂

Se utilizaron sustratos de vidrio, los cuales se so-

metieron a un proceso de lavado con solución sulfocrómica sumergidas por una hora, luego de esto los sustratos fueron enjuagadas con agua destilada Tipo II y se pusieron en contacto con solución alcalina para lavado de materiales en un ultrasonido. Finalmente se calentaron hasta sequedad. Para la suspensión de TiO_2 se utilizó una mezcla de TiO_2 Degussa P-25, polietilenglicol y EDTA 0,1 M, los recubrimientos fueron obtenidos por la técnica de Doctor Blade [22]. Las películas fueron sometidas a calentamiento por 30 minutos a 90°C , luego sinterizaron durante una hora a 500°C en una mufla.

2.2 Extracción de los pigmentos fotosintéticos de la planta *Spinacia Oleracea*

Las plantas de *Spinacia Oleracea* se sometieron a procesos de lavado y eliminación de las nervaduras más gruesas, separado el material a utilizar, se pesó 10,0210 g. La trituración de las plantas se hizo agregando en todo el proceso pequeñas cantidades de solución acuosa de acetona 90% hasta completar 40,0 mL y se dejó en agitación magnética por 12 horas en oscuridad y a temperatura ambiente, finalmente se procedió filtrando al vacío.

2.3 Cuantificación de pigmentos del extracto *Spinacia Oleracea*

La cuantificación de los pigmentos se hizo utilizando el método espectrofotométrico de acuerdo lo estipulado por la norma estándar para cuantificación de clorofila en cuerpos de agua [23]. Para la determinación del contenido de clorofila a se tuvo en cuenta la corrección por la presencia de feofitina a.

Se tomaron 3,0 mL de la solución preparada del extracto y se agregó a una celda de cuarzo de 1,0 cm y se midió a 664 nm en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Spectronic). Después se procedió a adicionar al extracto 0,100 mL de HCl 0,100 N, se agitó vigorosamente y se realizó la lectura a 665nm después de 90 segundos. La adición de HCl resulta en la pérdida del átomo de magnesio (transformando la clorofila en feofitina) y un cambio en la intensidad de la señal, cuando una muestra de clorofila es transformada en feofitina por acidificación la relación del intensidad del pico (664nm/ 665nm) es 1,70, indicando la presencia de clorofila, si la muestra solo está constituida por feofitina la relación de las señales después de acidificar será de 1,00, la cuantificación de la cantidad de clorofila se basó en las siguientes ecuaciones [23]:

$$\text{Clorofila } a = \frac{26,7 (664_b - 665_a) * V_1}{V_2 * L} \quad (1)$$

$$\text{Feofitina } a = \frac{26,7 [1,7 * (665_a) - 664_b] * V_1}{V_2 * L} \quad (2)$$

Donde:

V_1 = volumen del extracto, expresado en (L)

V_2 = volumen de la muestra, expresado en (L)

L = longitud paso de la luz o ancho de la celda espectrofotométrica, expresado en (cm)

$664_b, 665_a$ = absorbancia del extracto en acetona 90% antes y después de la acidificación

La constante 26,7 equivale a un factor de corrección de las absorbancias, teniendo en cuenta un coeficiente de absorbancias de la clorofila a, a 664 nm y la corrección para la acidificación a 665 nm [23].

Para la determinación del posible contenido de clorofila b y c en la muestra, se utilizó el método tricromático utilizando el siguiente procedimiento [23]: se determinó la absorbancia (A) a una longitud de 750 nm, 664 nm 647 nm y 630 nm y para determinar la concentración de la clorofila se utilizan las siguientes ecuaciones [23]:

$$\text{Clorofila } b = 21.03(A_{664}) + 5.43(A_{647}) + 2.66(A_{630}) \quad (3)$$

$$\text{Clorofila } c = 24.52(A_{664}) + 7.60(A_{647}) + 1.67(A_{630}) \quad (4)$$

Donde:

Clorofila a, b = concentración de clorofila mg/L

$A_{664, 647, 630}$ = absorbancia del extracto

2.4 Sensibilización del TiO_2 con extracto de *Spinacia Oleracea*

En dos recipientes que contenían 50 mL de la solución de clorofila se introdujeron los sustratos con TiO_2 y se dejaron en contacto por 12 horas, en agitación y a temperatura ambiente. Luego de esto las placas pusieron a secar a temperatura ambiente evitando la luz.

2.5 Degradación de azul de metileno con electrodos TiO_2 /extracto *Spinacia Oleracea*

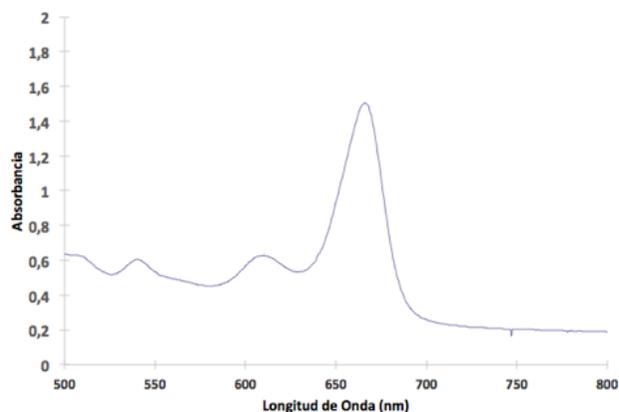
Los experimentos de la fotodegradación de la solución de azul de metileno de concentración de 10 ppm se llevaron a cabo en un fotoreactor de aluminio, utilizando una lámpara LED con potencia de 20W. Para evaluar la degradación natural de azul de metileno y estudiar el efecto del sensibilizador, los electrodos fueron sumergidos en la solución con el contaminante con agitación por una hora en la oscuridad. Seguido de esto la solución se sometió a irradiación con luz visible y en presencia de oxígeno durante 140 minutos.

Para la evaluación de la fotodegradación se tomaron alícuotas de 2,5 mL a diferentes intervalos de tiempo [24, 25].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización UV-Vis del extracto *Spinacia Oleracea*

Figura 3. Espectro UV-Vis del extracto de *Spinacia Oleracea*.
Figure 3. UV-Vis spectrum of *Spinacia Oleracea* extract.



La figura 3 muestra el espectro UV-Vis del extracto obtenido de la planta *Spinacia Oleracea*, debido a las diferencias estructurales entre estos pigmentos (clorofila a, b y carotenoides), los compuestos tienen distintos espectros de absorción de luz. Las clorofilas a y b tienen máximos de absorción en las zonas azul y roja del espectro. Los carotenoides sólo absorben en la zona azul. Por tanto, la absorción de la luz por las hojas en la zona roja del espectro se debe exclusivamente a las clorofilas a y b [26-27]. La figura 3 muestra las señales características de la clorofila a 538 nm, 608 nm y 664 nm, esta última señal es característica de la clorofila a y será utilizada para la su cuantificación [28].

3.2 Cuantificación de la clorofila

Tabla 1. Resultados de la cuantificación de la clorofila.
Table 1. Quantification results to chlorophyll.

Tipo de pigmento	Promedio de medidas día 1	Promedio de medidas día 2	Promedio	%Error	%RSD
Clorofila a (mg/L)	25,03	24,43	24,73	2,40	1,72
Feofitina a (mg/L)	6,51	6,41	6,46	1,54	1,09

La absorbancia fue corregida frente a la lectura realizada del mismo extracto a 750 nm como corrección de la turbidez.

Debido a que la clorofila a puede ser sobreestimada por la presencia de productos de degradación denominados feopigmentos (compuestos absorben cerca a la longitud de onda de la clorofila a), es necesario la acidificación del extracto que la contiene para verificar que no interfieren. De esta manera se provocó la reacción de sustitución del átomo de magnesio del anillo porfirínico, dando lugar al feopigmento de coloración parda, cuando el extracto se somete a pH ácido, el átomo central de magnesio es sustituido por los protones del ácido clorhídrico generando la feofitina a; la tabla 1 muestra la concentración de clorofila a y de feofitina

a, el ensayo se realizó por duplicado en días diferentes con el objetivo para la estabilidad del extracto bajo las condiciones de almacenamiento.

Las concentraciones reales de clorofila a, uno de los pigmentos más abundantes en los extractos de las plantas verdes, se calcularon teniendo en cuenta las concentraciones de feofitina a, que se le pueden aportar a la clorofila a como un error de sobrestimación, debido a que la feofitina a es un producto de degradación de la clorofila a cuya región de absorción máxima coincide con la del pigmento parental, la tabla 1 muestra presencia de feofitina en el extracto, la cantidad de clorofila es cerca de cuatro (4) veces mayor que la feofitina, adicionalmente la tabla 1 muestra que las concentraciones de los pigmentos no variaron significativamente, con un error y una desviación estándar relativa menor al 5%, este resultado confirma la estabilidad del extracto durante el proceso de almacenamiento previo al proceso de sensibilización. Los resultados de cuantificación del contenido de clorofila b y se listan en la tabla 2. En ambos casos el contenido de clorofila es inferior al contenido de feofitina, la relación de clorofila a/b es cercano a 5 y en el caso de la relación clorofila a/c es superior a 12. La mayor cantidad de clorofila obtenida del extracto *Spinacia Oleracea* corresponde a la clorofila a.

Tabla 2. Resultados de la cuantificación de la clorofila b y c.
Table 2. Quantification results to chlorophyll b and c.

Tipo de pigmento	Promedio de medidas día 1	Promedio de medidas día 2	Promedio	%Error	%RSD	Relación C/C
Clorofila b	5,04	4,90	4,97	2,78	1,99	4,98
Clorofila c	2,10	1,96	2,03	6,67	4,88	12,18

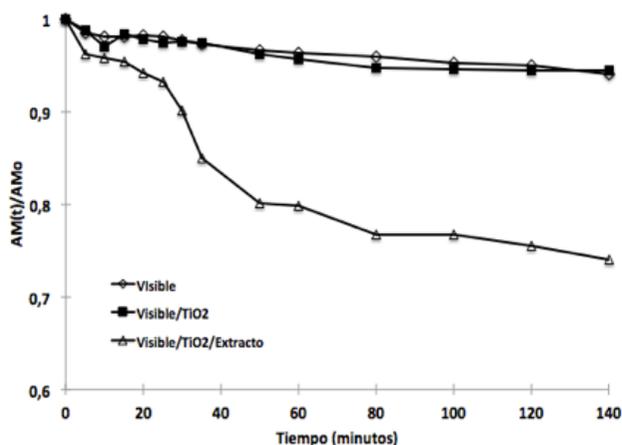
3.3 Degradación de azul de metileno

El cambio en la concentración de azul de metileno en función del tiempo de iluminación con radiación visible sobre diferentes sistemas fotocatalíticos se muestran en la figura 4. Se comparan tres sistemas diferentes: (a) solución de azul de metileno bajo irradiación visible sin electrodos de TiO₂, (b) solución de azul de metileno bajo irradiación visible en presencia de electrodo de TiO₂ y burbujeo de oxígeno y (c) solución de azul de metileno bajo irradiación visible en presencia de electrodo de TiO₂/sensibilizado y burbujeo de oxígeno. Para el caso de exposición directa a radiación visible en presencia y ausencia de TiO₂ se observa que la concentración del azul de metileno se reduce en cerca del 4%, esto indica que no hay fotodegradación por acción de la luz visible, adicionalmente el elevado valor de band gap de TiO₂ ocasiona que la radiación visible no sea suficiente para la generación de portadores de carga siendo inactivo fotocatalíticamente en este rango del espectro electromagnético esto concuerda con otros reportes.

Adicionalmente, la figura 4 evidencia un incremento significativo en la velocidad de degradación del azul de metileno cuando se utiliza el electrodo de TiO_2 sensibilizado con el extracto de *Spinacia Oleracea*, después de 140 minutos de exposición se alcanza un 25% de reducción en la concentración de azul de metileno, se incrementa un factor mayor a 6 veces, este es un factor muy relevante teniendo en cuenta la abundancia de este tipo de material y la posibilidad de uso como potencial sensibilizador natural.

Figura 4. Dependencia de la concentración de azul de metileno en función el tiempo de irradiación visible.

Figure 4. Methylene blue concentration change as function of visible irradiation time.



4. CONCLUSIONES

En este trabajo, se fabricaron películas de TiO_2 por medio de la Doctor Blade, las películas fueron sensibilizadas utilizando el extracto de la planta *Spinacia Oleracea*. La caracterización del extracto evidenció la presencia de clorofila y feofitina en baja proporción. La caracterización óptica indicó que la fotorespuesta de las películas mejoró significativamente después del proceso de sensibilización. El estudio de la degradación de azul de metileno indicó que bajo radiación visible y en presencia de TiO_2 no hubo degradación significativa, sin embargo, el proceso de sensibilización de las películas de TiO_2 con el extracto de la planta *Spinacia Oleracea* evidenció un efecto positivo en el proceso de fotodegradación bajo irradiación visible, alcanzado una degradación del 25% después de 140 minutos. Finalmente, los resultados indican que el extracto de la planta *Spinacia Oleracea* muestra potencial como sensibilizador alternativo de TiO_2 para procesos fotocatalíticos.

REFERENCIAS

- [1] V. Binas, D. Venieri, D. Kotzias, G. Kiriakidis, "Modified TiO_2 based photocatalysts for improved air and health quality", *Journal of Materionics*, 3, 3-16, 2017.
- [2] M. E. Borges, M. Sierra, E. Cuevas, R. D. García, P. Esparza, "Photocatalysis with solar energy: Sunlight-responsive photocatalyst based on TiO_2 loaded on a natural material for wastewater treatment", *Solar Energy*, 135, 527-535, 2016.
- [3] K. Nakata, A. Fujishima, " TiO_2 photocatalysis: Design and applications", *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13, 169-189, 2012.
- [4] C. Mariena, T. Cottineau, D. Roberta, P. Drogui, " TiO_2 Nanotube arrays: Influence of tube length on the photocatalytic degradation of Paraquat", *Applied Catalysis B: Environmental*, 194, 1-6, 2016.
- [5] H. Liang, Z. Jia, H. Zhang, X. Wang, J. Wang, "Photocatalysis oxidation activity regulation of Ag/ TiO_2 composites evaluated by the selective oxidation of Rhodamine B", *Applied Surface Science*, 422, 1-10, 2017.
- [6] A. Sasania, A. Baktashb, K. Mirabbaszadehc, B. Khoshnevisan, "Structural and electronic properties of Mg and Mg-Nb co-doped TiO_2 (101) anatase surface", *Applied Surface Science*, 384, 298-303, 2016.
- [7] K. Ubonchonlakate, L. Sikonga, F. Saito, "Photocatalytic disinfection of *P. aeruginosa* bacterial Ag-doped TiO_2 film", *Procedia Engineering*, 32, 656-662, 2012.
- [8] J. Vargas, S. Coste, A. García, F. Romo, A. Kassiba, "Effects of metal doping (Cu, Ag, Eu) on the electronic and optical behavior of nanostructured TiO_2 ", *Journal of Alloys and Compounds*, 710, 355-363, 2017.
- [9] M. R. Delsouz, M. S. Shafeeyan, A. A. Abdul, W. M. Daud, "Application of doped photocatalysts for organic pollutant degradation - A review", *Journal of Environmental Management*, 198, 78-94, 2017.
- [10] B. Appavu, S. Thiripuranthagan, "Visible active N, S co-doped TiO_2 /graphene photocatalysts for the degradation of hazardous dyes", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 340, 146-156, 2017.
- [11] J. Cheng, Y. Wang, Y. Xing, M. Shahida, W. Pan, "A stable and highly efficient visible-light photocatalyst of TiO_2 and heterogeneous carbon core-shell nanofibers", *RSC Advances*, 7, 15330-15336, 2017.
- [12] H. Wang, L. Qiao, H. Xu, Y. Lin, Y. Shen, C. Nan, "Anisotropy of Photocatalytic Properties in Nanostructured Photocatalysts", *Soft Nanoscience Letters*, 6, 11-30, 2016.
- [13] P. Chowdhury, H. Goma, A. K. Ray, "Dye-Sensitized Photocatalyst: A Breakthrough in Green Energy and Environmental Detoxification Sustainable Nanotechnology and the Environment: Advances and Achievements", *ACS Symposium Series*, 1124, 231-266, 2013.
- [14] X. Zhang, T. Peng, S. Song, "Recent advances in dye-sensitized semiconductor systems for photocatalytic hydrogen production", *Journal of Materials. Chemistry A*, 4, 2365-2402, 2016.

- [15] P. Chowdhury, G. Malekshoar, A. K. Ray, "Dye-Sensitized Photocatalytic Water Splitting and Sacrificial Hydrogen Generation: Current Status and Future Prospects", *Inorganics*, 5, 34-41, 2017.
- [16] J. L. Thomas, N. S. Allen, "The degradation of dyed cotton fabrics by the sensitised production of singlet oxygen via an aqueous soluble phthalocyanine dye", *Dyes and Pigments*, 53, 195-217, 2002.
- [17] K. Krumova, G. Cosa, "Overview of Reactive Oxygen Species". En Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Editors: Santi Nonell, Cristina Flors, p. 1-21.
- [18] R. Cain, S. Schmidt, "biodegradation of aromatic compounds by microalgae". *FEMS Microbiology Letters*, 170(2), 291-300, 1999.
- [19] G. Granados, C. A. Páez, F. Martínez, E. Páez-Mozo, "Photocatalytic degradation of phenol on TiO₂ and TiO₂/Pt sensitized with metallophthalocyanines", *Catalysis Today*, 107-108, 589-594, 2008.
- [20] S. Hörtensteiner, B. Kräutler, "Chlorophyll breakdown in higher plants", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 977-988, 2011.
- [21] C. Yilmaz, V. Gökmen. Chlorophyll. *Encyclopedia of Food and Health*, Editorial Advisory Board, p. 37-41.
- [22] A. I. Kontos, A. G. Kontosa, D. S. Tsouklerisa, M. C. Bernard, N. Spyrellis, P. Falaras, "Nanostructured TiO₂ films for DSSCS prepared by combining doctor-blade and sol-gel techniques", *Journal of Materials Processing Technology*, 196, 243-248, 2008.
- [23] APHA, AWWA, WEF, "Standard Methods for examination of water and wastewater", American Public Health Association, p. 10-22.
- [24] S. Ghasemi, S. Rahimnejad, S. Rahman Setayesh, M. Hosseini, M. R. Gholami, "Kinetics Investigation of the Photocatalytic Degradation of Acid Blue 92 in Aqueous Solution Using Nanocrystalline TiO₂ Prepared in an Ionic Liquid", *Progress in Reaction Kinetics & Mechanism*, 34, 55-76, 2009.
- [25] M. Arami, N. Yousefi Limaee, N. M. Mahmoodi, N. Salman, Tabrizi, "Equilibrium and kinetics studies for the adsorption of direct and acid dyes from aqueous solution by soy meal hull", *Journal of Hazardous Materials B.*, 135, 171-179, 2006.
- [26] J. F. Wintermans, A. De Mots, "Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol", *Biochimica et Biophysica Acta*, 109, 448 - 453, 1965.
- [27] W. P. Inskepp, P. R. Bloom, "Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N, N-Dimethylformamide and 80% Acetone", *Plant Physiology*, 77, 483-485, 1985.
- [28] J. Gregor, B. Marsálek, "Freshwater Phytoplankton Quantification by Chlorophyll A: A Comparative Study of in Vitro, in Vivo and in Situ Methods", *Water Research*, 38, 517-522, 2004.