



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

Sistemas basados en el empleo de peróxido de hidrógeno para el tratamiento de efluentes textiles

Tesista: Bioq. Jorge Andrés Donadelli

Director: Dr. Fernando Sebastián García Einschlag

Codirector: Dr. Luciano Carlos

Año: 2018

Tabla de contenido

Tabla de contenido.....	1
Índice de figuras.....	3
Índice de tablas.....	5
Índice de reacciones.....	6
Índice de ecuaciones.....	6
1- Introducción general.....	7
1.1 Introducción a la problemática de los xenobióticos.....	7
1.2 Características de los efluentes textiles y los colorantes sintéticos.....	7
1.3 Legislación local.....	8
1.4 Oxidación con peróxido de hidrógeno.....	8
1.5 Objetivos generales de la tesis.....	9
2- Estudios en batch de los procesos de Fenton avanzada.....	10
2.1 FAZ en batch: Introducción y objetivos.....	10
2.1.1 Procesos de oxidación avanzada (PAOs).....	10
2.1.2 Química del hierro en solución acuosa.....	10
2.1.3 Corrosión del ZVI.....	13
2.1.4 Reacciones Fenton y Tipo Fenton.....	14
2.1.5 Uso de ZVI en el tratamiento de contaminantes.....	17
2.1.6 FAZ y sistemas continuos.....	19
2.1.7 Objetivos.....	19
2.2 FAZ en batch: Material y métodos.....	19
2.2.1 Reactivos.....	19
2.2.2 Técnicas colorimétricas.....	20
2.2.3 Determinación de Carbono Orgánico Total (TOC).....	21
2.2.4 Determinación por CG-MS.....	22
2.2.5 Medidas de toxicidad.....	23
2.2.6 Medidas de HPLC.....	23
2.2.7 Procedimiento general.....	24
2.2.8 Parámetros de degradación.....	25
2.3 FAZ en batch: Resultados y discusión.....	28
2.3.1 Degradación de AB1 con ZVI.....	28
2.3.2 Efecto del pH inicial y de la presencia de Na_2SO_4	31
2.3.3 Efecto de las variables operativas sobre los perfiles de decoloración.....	33
2.3.4 Perfiles de pH y su influencia sobre los perfiles de hierro en solución.....	37

2.3.5	Perfiles de H ₂ O ₂ en el sistema ZVI/O ₂ /H ₂ O ₂	43
2.3.6	Experimentos en presencia de 2-Propanol y dimetilsulfóxido	44
2.3.7	Experimentos en presencia de O-Fenantrolina y EDTA	46
2.3.8	Análisis cromatográficos del sistema ZVI/N ₂	51
2.3.9	Análisis cromatográficos del sistema ZVI/O ₂ /H ₂ O ₂	53
2.3.10	Medidas de toxicidad y carbono orgánico total	57
2.3.11	Efecto de la fuente de ZVI.....	59
2.4	FAZ en batch: Conclusiones	63
3-	Reactor continuo basado en la técnica FAZ.....	65
3.1	FAZ en continuo: Introducción	65
3.1.1	Antecedentes	65
3.1.2	Objetivos	66
3.2	FAZ en continuo: Material y métodos	66
3.2.1	Reactivos	66
3.2.2	Montaje experimental y metodología.	66
3.2.3	Características de la lámpara	70
3.2.4	Parámetros de funcionamiento	70
3.2.5	Análisis mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM)	71
3.3	FAZ en continuo: Resultados y discusión.....	73
3.3.1	Efecto del H ₂ O ₂ sobre el relleno de la columna	73
3.3.2	Espectros obtenidos durante la degradación de AB1 en el sistema FAZ continuo	74
3.3.3	Efecto del pH inicial.....	75
3.3.4	Efecto de la irradiación y del pH del reactor.....	77
3.3.5	Efecto de la [H ₂ O ₂] y del HRT	78
3.3.6	Efecto de la concentración de colorante	79
3.3.7	Estudio mediante superficies de respuesta (RSM)	80
3.4	FAZ en continuo: Conclusiones.....	86
4-	Peroxidasa de soja inmovilizada en nanomateriales magnéticos.....	88
4.1	SBP inmovilizada: Introducción	88
4.1.1	Uso de enzimas inmovilizadas para el tratamiento de efluentes.....	88
4.1.2	Estrategias de inmovilización.....	88
4.1.3	Enzima utilizada	89
4.1.4	Mecanismos de catálisis	90
4.1.5	Soportes	92
4.1.6	Objetivos	92

4.2	SBP inmovilizada: Material y métodos	92
4.2.1	Reactivos	92
4.2.2	Síntesis de los materiales.....	93
4.2.3	Caracterización de los materiales	95
4.2.4	Evaluación de la capacidad para la remoción de colorantes	97
4.3	SBP inmovilizada: Resultados y discusión.....	98
4.3.1	Cantidad de SBP inmovilizada.....	98
4.3.2	Microscopia de transmisión electrónica (HRTEM).....	98
4.3.3	Difractogramas.....	99
4.3.4	Análisis por FTIR.....	100
4.3.5	Medidas de potencial- ζ	102
4.3.6	Isotermas de adsorción de N_2 a 77 K	102
4.3.7	Propiedades magnéticas.....	104
4.3.8	Remoción de colorantes	105
4.3.9	Medidas de actividad para la degradación de verde de Malaquita.....	107
4.3.10	Ensayos en presencia de metanol y 2-propanol	109
4.3.11	Efecto de la temperatura	110
4.3.12	Reutilización del material	111
4.4	SBP inmovilizada: Conclusiones.....	113
5- Reflexiones finales y perspectivas.....		115
Agradecimientos		117
Referencias		118

Índice de figuras

Figura 1: Diagrama de Parboux para el hierro soluble en solución acuosa.	11
Figura 2: Esquema de las especies presentes en la superficie del ZVI en solución acuosa.	14
Figura 3: Equipo de medición de carbono orgánico	22
Figura 4: Cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas	22
Figura 5: Luminómetro utilizado para las medidas de toxicidad	23
Figura 6: HPLC multimodular Shimadzu.....	24
Figura 7: Sistema utilizado para las cinéticas ZVI/ N_2	25
Figura 8: Comparación entre los distintos parámetros de degradación obtenidos experimentalmente para el sistema ZVI/ N_2 (A) y ZVI/ O_2/H_2O_2 (B).....	27
Figura 9: Estructura del AB1	28
Figura 10: Espectros obtenidos durante la degradación de AB1 en un sistema ZVI/ N_2 (A) y en un sistema ZVI/ O_2/H_2O_2 (B).....	29
Figura 11: Efecto del Na_2SO_4 en las k_{obs} obtenido a distintos pH para el sistema ZVI/ N_2 (A) y ZVI/ O_2/H_2O_2 (B).....	31

Figura 12: Efecto de la $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ en las cinéticas de decoloración para el sistema ZVI/ N_2 (A) y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ (B).....	32
Figura 13: Efecto de la carga del ZVI para los sistemas ZVI/ N_2 y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$	34
Figura 14: Cinéticas llevadas a cabo a distintas cargas de ZVI en los sistemas ZVI/ N_2 y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$ (A) y $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$ (B).	35
Figura 15: Efecto de la concentración de H_2O_2 utilizada para el sistema ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$ (A) y $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$ (B).	35
Figura 16: Efecto de la de la presencia de O_2 a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$ (A) y $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$ (B).	36
Figura 17: Efecto de la de la presencia de O_2 y de H_2O_2 sobre los perfiles de pH a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$	37
Figura 18: Efecto de la de la presencia de O_2 y de H_2O_2 sobre los perfiles de hierro a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$	38
Figura 19: Efecto de la de la presencia de O_2 y de H_2O_2 sobre los perfiles de pH a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$	40
Figura 20: Perfiles de hierro obtenidos para el sistema ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ obtenidos a partir de una solución de $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$	41
Figura 21: Evolución del pH de la solución en los sistemas ZVI/ N_2 y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ para distintas cargas de ZVI a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$ (A) y $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$ (B).....	42
Figura 22: Perfiles cinéticos de consumo de H_2O_2 y de decoloración para el sistema ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ a $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de 3.00 y 5.00.	44
Figura 23: Perfiles de decoloración y de consumo de H_2O_2 en el sistema ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ a $\text{pH}=3.00$ (A y C) y $\text{pH}=5.00$ (B y D).	45
Figura 24: Perfiles de H_2O_2 observados en el sistema ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ en presencia de OFen o EDTA.	47
Figura 25: Efecto de la O-Fen sobre los perfiles de decoloración del AB1 para el sistema ZVI/ N_2 operado a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$	48
Figura 26. Esquema de las principales reacciones involucradas en el sistema ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ tanto en ausencia como en presencia de complejantes.	50
Figura 27: Esquema propuesto para los productos de la reducción completa de AB1 con ZVI.	51
Figura 28: Productos de autooxidación del TAHNDS.	51
Figura 29: Perfiles normalizados de las áreas obtenidos por HPLC en función del tiempo para los productos de reducción del AB1 en un sistema ZVI/ N_2 a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$	52
Figura 30: Esquema de las vías de obtención de los productos detectados por CG-MS.	54
Figura 31: Cromatogramas obtenidos por HPLC obtenidos a distintos tiempos para los sistemas ZVI/ N_2 y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$	55
Figura 32: Selección de cromatogramas para los distintos sistemas estudiados.	56
Figura 33: Degradación de AB1 a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$ seguida por HPLC para el sistema ZVI/ N_2 , $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ (5mM)/ H_2O_2 0.43 mM y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$	57
Figura 34: Medidas de carbono orgánico total.	58
Figura 35: Medidas de toxicidad por LVF del sistema ZVI/ N_2 (A) y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ (B).	59
Figura 36: Perfiles de pH (A) y decoloración (B) para los sistemas ZVI/ N_2 y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ utilizando lana de acero como fuente de Fe°	61
Figura 37: Perfiles de hierro soluble para obtenidos para la lana de acero (A) y el ZVI en polvo (B).	61
Figura 38: Decoloración para los sistemas ZVI/ N_2 y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ utilizando nZVI como fuente de Fe°	63
Figura 39: Esquema del sistema utilizado donde se indican los puntos de muestreo C_{out} y R_{out}	67
Figura 40: Foto del sistema utilizado.	68
Figura 41: Detalle de las bombas peristálticas utilizadas.	68
Figura 42: Sistema controlador de pH Aquatron®.	69
Figura 43: Detalle del reactor (izquierda) y detalle de la columna (derecha).	69
Figura 44: Espectro de irradiación de la lámpara utilizada.	70
Figura 45: Esquema de las ejecuciones a realizar en un CCD aplicado a 3 variables.	72

Figura 46: Medidas de [H₂O₂] (A) y [Fe(II)] (B) a la salida de la columna en función de la [H₂O₂] a la entrada..... 73

Figura 47: Fotos de la columna antes y después del pasaje de una solución de H₂O₂ con su respectivo control..... 74

Figura 48: Espectro (izquierda) y fotografía (derecha) de una muestra de la solución inicial, la solución a la salida de la columna (C_{out}) y la solución a la salida del reactor (R_{out}) durante un tratamiento FAZ continuo..... 75

Figura 49: Efecto del pH inicial sobre la decoloración para C_{out}, R_{out} y R_{out}-C_{out}..... 76

Figura 50: Efecto del pH inicial sobre los perfiles de cationes de hierro a la salida de la columna..... 77

Figura 51: Efecto de la irradiación sobre la remoción de color y TOC utilizando un pH de reactor de 4.0 (A) y 5.0 (B). 78

Figura 52: Efecto de la [H₂O₂] y del HRT sobre la remoción de color y el TOC luego del tratamiento (R_{out}). 79

Figura 53: Efecto de la concentración inicial de AB1 sobre la remoción de color..... 80

Figura 54: Valores predichos de remoción de color % en función de los valores experimentales obtenidos. 83

Figura 55: Superficies de respuesta obtenidas para la remoción de color en el sistema FAZ continuo. 84

Figura 56: Diagrama de Pareto del modelo. 85

Figura 57: Dependencia de la concentración de Fe(II) en C_{out} en función del HRT. 86

Figura 58: Estructura de la SBP. 90

Figura 59: Mecanismos involucrados en la oxidación por peroxidasas. 91

Figura 60: Esquema de las síntesis realizadas..... 94

Figura 61: Esquema del proceso de inmovilización. 94

Figura 62: Equipo utilizado para las medidas de adsorción de N₂ a 77 K. 95

Figura 63: Microscopio electrónico de transmisión utilizado..... 96

Figura 64: Equipo utilizado para las medidas de DRX..... 96

Figura 65: Equipo utilizado para las lecturas de FTIR 97

Figura 66: Imágenes de HRTEM obtenidas para los soportes (NPA, NPSA5, NPSA2)..... 99

Figura 67: Distribución de tamaños de los núcleos de maghemita. 99

Figura 68: Difractogramas obtenidos por DRX para NP, NPA, NPSA2 y NPSA5..... 100

Figura 69: Espectros de FTIR obtenidos para los distintos soportes. 101

Figura 70: Espectro FTIR de los materiales en la región de la banda para amida I..... 102

Figura 71: Isotermas de adsorción/desorción de N₂ a 77 K para NP, NPA, NPSA2 y NPSA5. 103

Figura 72: Distribución de los tamaño de poros obtenidas por el modelo BJH a partir de las ramas de adsorción de las isotermas. 103

Figura 73: Curvas de magnetización para NPA, NPSA2 and NPSA5..... 105

Figura 74: Estructura de los colorantes ensayados 106

Figura 75: Dependencia del grado de decoloración utilizando SBP libre (9.02x10⁻⁹ M) con la relación H₂O₂/sustrato para el VM (A) y el AB1 (B). 107

Figura 76: Decoloración del VM utilizando SBP inmovilizada en los materiales magnéticos NPA, NPSA2 y NPSA5 (2.00 g. L⁻¹) y para SBP libre (9.02x10⁻⁹ M). 108

Figura 77: Efecto de la temperatura sobre la actividad de los materiales. 111

Figura 78: Evolución de la actividad de los materiales en función de los ciclos de reacción..... 112

Índice de tablas

Tabla 1: Velocidades iniciales de generación de Fe_{total} en presencia y ausencia de Ofen..... 49

Tabla 2: Ejecuciones y respuestas obtenidas en el CCD.	81
Tabla 3: Análisis de ANOVA del modelo de superficie de respuesta	82
Tabla 4: Resultados de inmovilización de SBP sobre los distintos soportes utilizados.....	98
Tabla 6: Espaciamentos interplanares (dhkl) observada en las imágenes de HRTEM y los patrones de difracción relativos para la maghemita tetragonal y cubica.....	99
Tabla 6: Datos del área específica superficial (BET) y de la porosidad (BJH) para los materiales.	104
Tabla 7: Decoloración luego de 2 hs de tratamiento con SBP libre (9.02×10^{-9} M) o NPSA5 (2.00 g.L^{-1}).	106
Tabla 8: Actividad enzimática de los distintos materiales.....	109
Tabla 9: Velocidad inicial de degradación para la en la enzima inmovilizada en los materiales magnéticos NP, NPSA5 y NPSA2 (2.00 g. L^{-1}) y para la enzima libre (9.02×10^{-9} M).	110

Índice de reacciones

Reacción 1.....	12
Reacción 2.....	12
Reacción 3.....	13
Reacción 4.....	13
Reacción 5.....	13
Reacción 6.....	14
Reacción 7.....	15
Reacción 8.....	15
Reacción 9.....	16
Reacción 10.....	17
Reacción 11.....	17
Reacción 12.....	17
Reacción 13.....	18
Reacción 14.....	18
Reacción 15.....	29
Reacción 16.....	30
Reacción 17.....	39
Reacción 18.....	53
Reacción 19.....	53
Reacción 20.....	76

Índice de ecuaciones

Ecuación 1.....	12
Ecuación 2.....	27
Ecuación 3.....	71
Ecuación 4.....	108
Ecuación 5.....	109
Ecuación 6.....	109

1- Introducción general

1.1 Introducción a la problemática de los xenobióticos

La actividad humana produce una gran cantidad de moléculas orgánicas sintéticas (llamadas colectivamente xenobióticos) las cuales terminan en contacto con el ambiente. En particular se han creado una gran variedad de fármacos, colorantes, pesticidas e intermediarios de síntesis, que son volcados a los cuerpos de agua luego de su uso o como subproductos de la actividad industrial. A pesar de encontrarse en concentraciones relativamente bajas, muchas de estas sustancias poseen efectos nocivos en el ambiente, siendo los ecosistemas acuáticos particularmente sensibles. Más aún, muchas de estos xenobióticos tienen baja biodegradabilidad y el impacto producido por la mayoría es actualmente desconocido y difícil de predecir.

Uno de los objetivos de la química verde consiste en tratar de disminuir la cantidad de xenobióticos generados en la industria mediante la optimización de los procesos productivos. Sin embargo, siempre existe una cierta cantidad de estas sustancias que debe eliminarse y muchos esfuerzos se han direccionado hacia su tratamiento previo al volcado en los cuerpos de agua.

Esta tesis se ha enfocado en el estudio de la degradación de colorantes sintéticos con vistas al tratamiento de efluentes provenientes de industrias textiles. No obstante, las técnicas desarrolladas han demostrado ser útiles para otro tipo de xenobióticos y la mayoría de los conocimientos obtenidos son fácilmente extrapolables a otro tipo de efluentes.

1.2 Características de los efluentes textiles y los colorantes sintéticos

La industria textil contribuye de manera importante a la contaminación de los ríos, ya que utiliza grandes volúmenes de agua durante el lavado y teñido de las telas, que luego es volcada a los cuerpos de agua conteniendo una gran cantidad de colorantes. Se estima que en el mundo se vuelcan aproximadamente 280.000 toneladas de colorante por año de esta manera [1]. Estos efluentes son extremadamente variables en su composición y características, dependiendo del material a fabricar y su uso final. En particular las aguas provenientes del proceso de teñido generan efluentes con una carga orgánica moderada (entre 50-1100 mg de C orgánico. L⁻¹), con un alto contenido de sólidos disueltos, muy coloreados (ADMI 50-12500) y un pH variable de entre 3-12 dependiendo del proceso de coloración utilizado [2]. Poseen además auxiliares químicos, en particular una carga importante de sales (principalmente NaNO₃, NaCl y Na₂SO₄ [3]) que son usadas como retardantes y para neutralizar el potencial zeta de la fibra a teñir, facilitando la fijación del colorante. Los procesos biológicos convencionales para tratar estos efluentes son efectivos a la hora de disminuir la carga orgánica y los sólidos disueltos, pero son ineficientes en cuanto a la remoción de color debido a la baja biodegradabilidad de las moléculas de colorante [2].

Además de la industria textil, los colorantes sintéticos son utilizados en otras aplicaciones industriales tales como la alimenticia, la farmacéutica, la cosmética y la impresión de papel. Los colorantes normalmente son clasificados en función de su forma

de aplicación (ácidos, básicos, directos, dispersos, mordientes, reactivos, pigmentos) o en base a su estructura química (azoicos, antraquinónicos, derivados del trifenilmetano, ftalocianínicos, xantenos, acridinas, indigoides). De esta última clasificación, los azoicos ($R_1-N=N-R_2$) representan casi dos tercios del total [4].

1.3 Legislación local

A pesar de los efectos nocivos del vuelco de colorantes tanto estéticos, ecológicos y de impacto en la salud humana, al momento de la escritura de este trabajo, la legislación de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) permite su vuelco en cursos hídricos y conductos pluviales de manera casi irrestricta, siempre y cuando los efluentes cumplan con los parámetros globales (pH, temperatura, DQO y salinidad, entre otros) establecidos por la Autoridad del Agua (Resolución 336/2003). La situación de aquellos cuerpos de agua cuya regulación no depende de esta autoridad sino de autoridades específicas, como es el caso de ACUMAR en la cuenca Matanza Riachuelo, es similar (por ejemplo ver resolución N° 46/17 ACUMAR)

La única mención sobre la regulación del color de los vuelcos está dada por el decreto provincial N° 2009/1960 que reglamenta la ley N° 5.965, donde se establece en el artículo 4 inciso F que “No se admitirá la descarga de sustancias nocivas mal olientes, inflamables, explosivas o capaces de producirlas. **Tampoco se aceptarán efluentes muy coloreados**”. No existe ningún límite específico en lo que respecta al color, concentración de colorantes o a la toxicidad de los efluentes.

Numerosos países (E.E.U.U., Alemania, Italia, Inglaterra, Taiwan, Singapur y Filipinas, entre otros [5]) regulan con parámetros cuantitativos el color máximo permitido de los efluentes líquidos. Incluso en Argentina, provincias como Neuquén ponen objetivos claros con respecto al color de las aguas superficiales (menor a 6 U.C.) y prohíben explícitamente la modificación del color del cuerpo receptor (Resolución 181/2000 del Ente Provincial de Agua y Saneamiento de Neuquén). En este contexto es imperativo que la legislación local se adecue a los conocimientos científicos generados durante el último medio siglo.

1.4 Oxidación con peróxido de hidrógeno

Entre las distintas estrategias estudiadas para el tratamiento de colorantes, la oxidación con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una de las más prometedoras. Es un oxidante que luego de reaccionar no deja productos secundarios que puedan afectar al ambiente, ya que se consume totalmente durante el proceso. Por otro lado, la oxidación de los compuestos orgánicos presenta la ventaja frente a otros tratamientos de que, en caso de ser completa, puede mineralizar las sustancias orgánicas dejando productos inocuos (principalmente CO_2 , H_2O y sales inorgánicas). Otras estrategias tales como la remoción física por adsorción o coprecipitación son capaces de remover la sustancia del medio acuoso mediante un cambio de fase, que luego es necesario disponer o eliminar mediante algún otro tipo de tratamiento [6]. Los tratamientos reductivos, por otra parte, son capaces de generar en algunos casos productos más tóxicos que los compuestos de partida.

El H_2O_2 tiene un alto potencial normal de reducción ($E^\circ = 1.776 \text{ V}$ a 25.0°C [7]) por lo que en principio es capaz de oxidar a la mayoría de los xenobióticos. No obstante la oxidación directa con H_2O_2 es muy lenta [7] y es necesario utilizar algún proceso de activación tal como el uso de un catalizador (inorgánico o biológico) y/o de alguna fuente

de energía (lumínica, ultrasonido, eléctrica). La gran variedad de combinaciones de catalizadores y fuentes de energía es lo que da origen a los diversos tratamientos posibles.

1.5 Objetivos generales de la tesis

Esta tesis se basará en la implementación de dos sistemas para realizar la oxidación de xenobióticos con H_2O_2 : el uso de hierro metálico como reactivo/catalizador y el uso de enzimas inmovilizadas. En el primer sistema se estudiará la química involucrada en el tratamiento con hierro metálico y H_2O_2 (que llamaremos Fenton Asistida por ZVI o FAZ) mediante ensayos en batch (capítulo 2). Los conocimientos adquiridos sobre esta técnica se utilizarán luego para construir y evaluar un tratamiento FAZ que opere en continuo (capítulo 3). En el segundo sistema se estudiará el uso de peroxidasa de soja libre e inmovilizada en nanopartículas magnéticas recubiertas con sílice (capítulo 4). La descripción exacta de los sistemas a estudiar así como los antecedentes y el estado del arte de estas técnicas se realizará en sus correspondientes capítulos.

2- Estudios en batch de los procesos de Fenton avanzada

2.1 FAZ en batch: Introducción y objetivos

2.1.1 Procesos de oxidación avanzada (PAOs)

Bajo el nombre de especies reactivas de oxígeno se engloba un conjunto de fuertes oxidantes derivados del oxígeno tales como el radical oxhidrilo (OH^\bullet), ozono (O_3), el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el radical hidropéroxido (HO_2^\bullet), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Estas especies son capaces de oxidar la materia orgánica de manera rápida y no selectiva [8].

Se han desarrollado muchas técnicas que utilizan uno o más activadores, tales como catalizadores metálicos o fuentes de energía, para generar especies reactivas de oxígeno a partir del H_2O_2 u otro oxidante. Estas técnicas, que se agrupan bajo el nombre de procesos de oxidación avanzada (PAOs), son metodologías limpias, rápidas y muy efectivas para la remoción de colorantes [6]. Debido a esto, son las más estudiadas como alternativa a los tratamientos biológicos convencionales para la eliminación de colorantes: entre 2007-2010, el 65 % de las publicaciones sobre el tema involucran a distintos PAOS, correspondiendo el resto a tratamientos biológicos y a remoción por procesos no destructivos [6].

Dentro de los PAOs se encuentran la oxidación con O_3 , los procesos relacionados con la reacción de Fenton ($\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$), la tratamientos con radiación (UV, electrones acelerados, rayos X, rayos γ), la fotocatalisis con catalizadores heterogéneos (TiO_2 , ZnO), la oxidación electroquímica, el tratamiento con ultrasonido y la oxidación térmica [9]. Existen muchas variantes en las que se combinan distintos oxidantes (O_3 , H_2O_2 , persulfato), distintos catalizadores y distintas fuentes de energía lo que da lugar a un gran número de alternativas de tratamiento.

De estos PAOs los más estudiados y factibles a mediano plazo son la fotocatalisis con TiO_2 , la oxidación electroquímica y los procesos relacionados con la reacción de Fenton [6]. En estos últimos procesos nos enfocaremos en los capítulos 2 y 3 de esta tesis.

2.1.2 Química del hierro en solución acuosa

Como veremos más adelante, la efectividad de los procesos que involucran la reacción de Fenton está determinada principalmente por la especiación del hierro en las condiciones de reacción. En soluciones acuosas que no sean fuertemente alcalinas, el hierro puede encontrarse en solución principalmente en dos estados de oxidación: (II) y (III). Temporalmente pueden formarse estados de oxidación más altos, (IV) y (V), pero estos son inestables en solución acuosa [10].

El Fe(II) puede estar formando distintas especies en función del pH, existiendo como Fe^{+2} , Fe(OH)^+ y $\text{Fe(OH)}_{2(\text{aq})}$. El Fe(III) tiene un comportamiento similar, existiendo como complejos acuosos de Fe^{+3} en soluciones muy ácidas, que se hidrolizan fácilmente a pHs más altos para formar especies hidroxiladas tales como Fe(OH)^{+2} , Fe(OH)_{2^+} , $\text{Fe(OH)}_{3(\text{aq})}$ y Fe(OH)_{4^-} [10]. Las especies neutras, $\text{Fe(OH)}_{2(\text{aq})}$ y $\text{Fe(OH)}_{3(\text{aq})}$, son inestables y tienden a

precipitar, como se discutirá más adelante. Tanto el Fe^{+2} como el Fe^{+3} son ácidos conjugados de bases débiles, por lo que son capaces de hidrolizarse para formar sus hidroxiderivados, liberando protones en el proceso y acidificando la solución.

La especie predominante en solución acuosa dependerá de la cantidad de hierro disuelto, del potencial redox del sistema y del pH. Los diagramas que representan la especiación del hierro al alcanzar el equilibrio termodinámico para una determinada cantidad de hierro total disuelto y una temperatura dada se conocen como diagramas de Pourbaix. El diagrama de Pourbaix para las especies solubles del sistema de $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}$ a 25 °C publicado por Hem et al. [11] se muestra en la Figura 1.

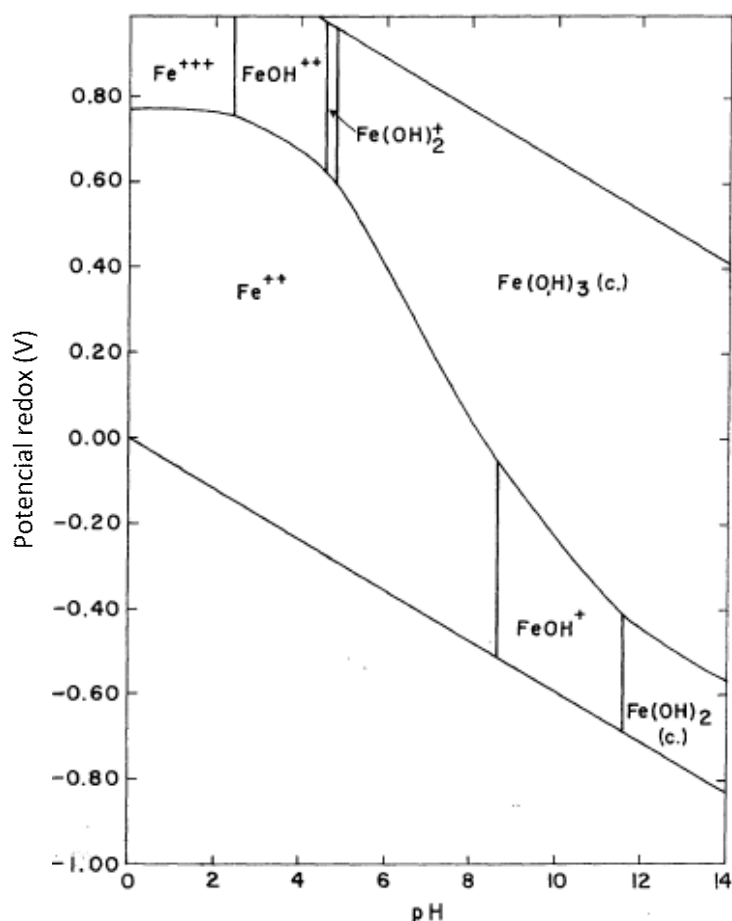
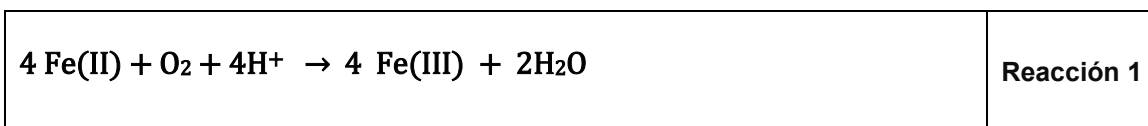


Figura 1: Diagrama de Parbouix para el hierro soluble en solución acuosa. Imagen publicada por Hem et al [11]. Actividad total de hierro = 2×10^{-7} molal. Temperatura 25 °C.

Como puede observarse en el diagrama, por encima de $\text{pH} = 5$ la especie férrica predominante es el $\text{Fe}(\text{OH})_{3(\text{aq})}$, que es inestable. Esto limitará el pH máximo de trabajo de aquellas reacciones que requieran la presencia de $\text{Fe}(\text{III})$ soluble. Este valor de pH máximo disminuirá al considerar actividades de hierro mayores o la presencia de sólidos formados al partir del $\text{Fe}(\text{OH})_{3(\text{aq})}$.

En cuanto a las especies de $\text{Fe}(\text{II})$, estas son solubles en un rango de pH más amplio. No obstante, el diagrama muestra que conforme aumenta el pH , el potencial redox requerido para la oxidación de $\text{Fe}(\text{II})$ a $\text{Fe}(\text{III})$ se reduce drásticamente. Esto tiene importantes consecuencias en relación con la oxidación del $\text{Fe}(\text{II})$ por parte del oxígeno soluble (Reacción 1).



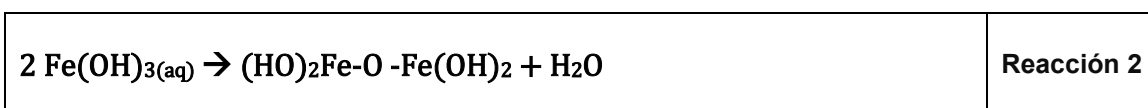
Más allá de las cuestiones termodinámicas, para las condiciones estudiadas la estabilidad del Fe(II) en solución en presencia de O₂ está condicionada por la cinética de la reacción de oxidación. La ley de velocidad que la describe fue estudiada por Sung y Morgan [12] y se muestra en la Ecuación 1.

$\frac{d\text{Fe(II)}}{dt} = -k * [\text{OH}^-]^2 * p\text{O}_2 * [\text{Fe(II)}]$	Ecuación 1
--	-------------------

Donde $k=8 \times 10^{13} \text{ min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$ para 20.0 °C.

Esta ecuación es una ecuación empírica y solo es válida a $4 < \text{pH} < 8$, antes de que ocurra la precipitación del Fe(II) como Fe(OH)₂(s). En nuestros experimentos donde trabajaremos con concentraciones de Fe(II) no mayores a 1 mM, esta precipitación no ocurre hasta pH mayores a 8. Puede demostrarse por aplicación de la Ecuación 1 que para los tiempos normalmente estudiados en este trabajo (2 hs) la velocidad de oxidación del Fe(II) comienza a ser relevante (>10 % de Fe(II) oxidado/h) por encima de pH 6. Sin embargo cabe aclarar que esta reacción se ve favorecida por la presencia de superficies de óxidos, así como aumentos locales de pH, ambos plausibles de encontrar en la superficie del ZVI. Una buena discusión sobre el tema y donde se encuentran los diagramas de especiación del Fe(II) fue publicada por Morgan y Lahav (2007) [13].

Como puede observarse, tanto cinética como termodinámicamente un aumento en el pH de la solución favorece la oxidación de Fe(II) a Fe(III) por O₂ [13]. La velocidad de precipitación del Fe(III), así como la forma en que este precipite dependerá de la [OH⁻] y de la naturaleza de los aniones presentes en la solución. A relaciones de [OH⁻]/[Fe(III)] > 3, el Fe(OH)_{3(aq)} precipita en forma de ferrihidrato, el cual consiste en polímeros obtenidos por condensación de varias moléculas de acuerdo al siguiente mecanismo:



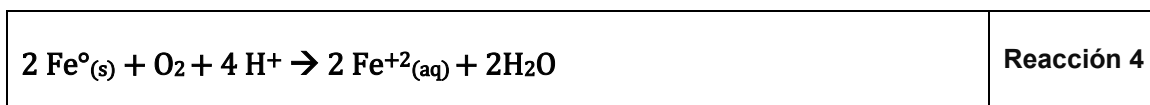
Este mecanismo prosigue con la condensación adicional de más núcleos de Fe(OH)_{3(aq)} formando un coloide polimérico amorfo (de color amarillo/marrón) que puede representarse como Fe₂O₃·nH₂O, donde n representa el grado de hidratación, el cual decrece a medida que prosigue la nucleación. La estabilidad de estos polímeros en suspensión dependerá de su tamaño, y por encima de un tamaño crítico precipitan. El tiempo en que tardan en precipitar es variable y depende del pH y de la cantidad de Fe(OH)_{3(aq)}, pudiendo tardar días en precipitar completamente. Los polímeros amorfos de ferrihidrato son termodinámicamente inestables y se transforman con el tiempo a formas cristalinas como la goethita (α-FeO(OH)) o la hematita (α-Fe₂O₃). Estos cristales pueden formarse directamente si la relación [OH⁻]/[Fe(III)] < 3. En manera general, la precipitación del Fe(III) se ve favorecida cinéticamente por la presencia de núcleos de condensación previos [14].

2.1.3 Corrosión del ZVI

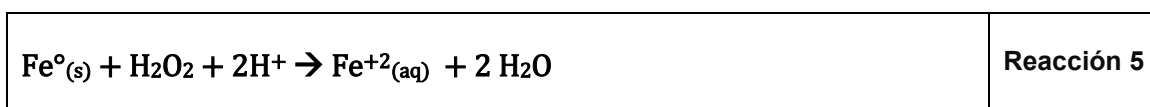
Cuando se introduce hierro metálico (también llamado hierro cero-valente, o ZVI por sus siglas en ingles) en una solución acuosa ácida, este es oxidado por la presencia de H^+ según la reacción:



Normalmente en solución acuosa existe una cierta cantidad de O_2 disuelto, que produce una vía adicional de oxidación:



Por último si en solución existen otras especies oxidantes, como el H_2O_2 , pueden plantearse otras vías adicionales:



La suma de estas reacciones de oxidación del metal es lo que llamaremos fenómeno de corrosión. Notese que independientemente de cuál de los 3 oxidantes sea el causante de la corrosión, por cada mol de Fe^{+2} generado se consumen 2 moles de protones, lo que tiene como consecuencia un incremento del pH de la solución. Más aún, como estas reacciones son superficiales el aumento no será homogéneo, sino que habrá un pH más alto en las cercanías de la interfase.

Como discutimos anteriormente, salvo en condiciones de pH menores a 5, el Fe(II) soluble no es estable y tiende a precipitar ya sea como $Fe(OH)_{2(s)}$ o como alguna de las formas insolubles de Fe(III), previa oxidación por parte del O_2 . Este proceso es particularmente importante en la interfase, por lo que normalmente el ZVI tendrá un núcleo de Fe° recubierto por una capa de especies ferrosas ($FeO/Fe(OH)_2$), mixtas (Fe_3O_4 /GreenRust) y férricas ($Fe_2O_3/FeOOH/Fe(OH)_3$), donde las especies de mayor grado de oxidación tienden a ubicarse en la superficie [15,16]. Un esquema que ilustra la composición de la superficie del ZVI se muestra en la Figura 2. El espesor de esta capa irá aumentando conforme prosigue la corrosión y se irá haciendo menos permeable. Esta capa es habitualmente llamada capa de corrosión (“corrosion layer”, o CL) y puede limitar la difusión del oxidante, que debe atravesarla para poder reaccionar con el núcleo de Fe° [17]. Este proceso de generación de una CL con disminución de la reactividad del ZVI se denomina pasivación.

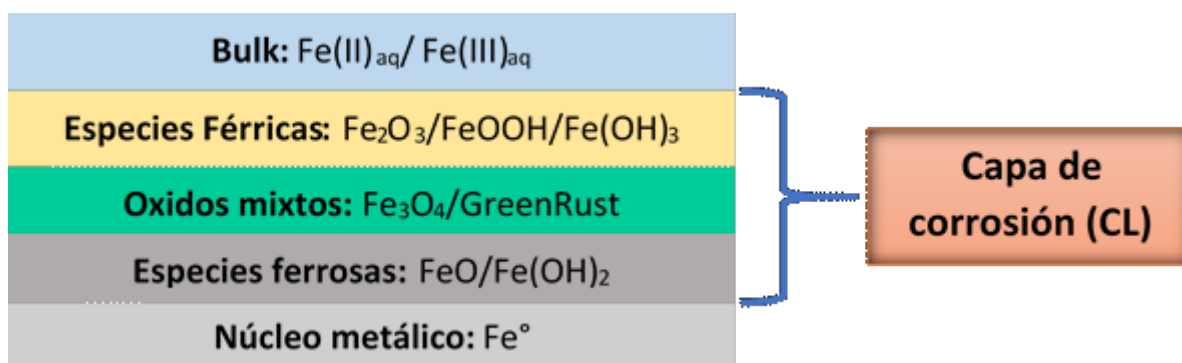
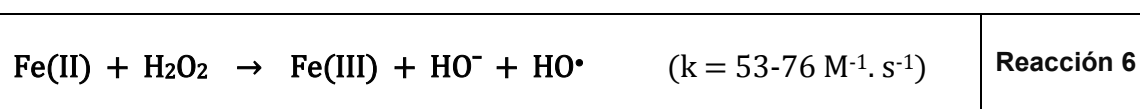


Figura 2: Esquema de las especies presentes en la superficie del ZVI en solución acuosa.

La presencia de aniones capaces de complejar las especies de hierro soluble afectara al proceso de corrosión, en función de cuanto afecten la solubilidad de estas especies. Aquellos que formen especies estables (SO_4^- , Cl^- , O-Fenantrolina, EDTA) favorecerán la corrosión debido a que desestabilizan la capa de óxidos sobre la superficie, mientras aquellos que forman complejos más insolubles (PO_4^{3-} , CO_3^{2-}) fomentarán el proceso de pasivación. En algunos de los ensayos relacionados con el presente trabajo se ha utilizado el anión ClO_4^- para evitar la complejación de las especies solubles, debido a que este anión no forma complejos con el hierro y es cinéticamente inerte a la mayoría de los procesos redox.

2.1.4 Reacciones Fenton y Tipo Fenton

La reacción de Fenton consiste en la reacción de Fe(II) con H_2O_2 para generar radicales OH^\bullet , especie muy oxidante ($E^\circ = 2.59 \text{ V}$ a $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ [7]) que ataca de manera poco selectiva a los compuestos orgánicos con constantes de velocidad del orden difusional ($10^8\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).



Está ampliamente probado que los radicales OH^\bullet son los principales oxidantes en los procesos Tipo-Fenton en medio ácido. No obstante se discute el posible rol de otros oxidantes, como especies de hierro en alto estado de oxidación (principalmente FeO^{2+}) a pH neutros o básicos [7]. Cualquiera sea la especie involucrada, los contaminantes aromáticos son oxidados en forma secuencial, generando primero intermediarios quinónicos que son luego convertidos en ácidos orgánicos alifáticos y, en las condiciones adecuadas, a sustancias inorgánicas tales como CO_2 y H_2O . Esta transformación en sustancias inorgánicas es llamada mineralización y es lo más deseable a la hora de plantear un tratamiento de efluentes.

El mecanismo por el cual los radicales OH^\bullet atacan a los compuestos aromáticos involucra la adición al anillo, con la consecuente formación de un radical orgánico. Este radical orgánico es inestable y puede reaccionar mediante distintos mecanismos:

I) Desproporción, donde dos radicales reaccionan entre sí, uno de los cuales adiciona el oxhidrilo y el otro lo pierde.

II) Dimerización, donde dos radicales reaccionan entre sí para formar un dímero. Este proceso puede repetirse para formar moléculas de mayor tamaño.

III) Adición de O₂ y liberación de radical perhidroxilo (H₂O[•]), lo que puede llevar a la adición de un grupo alcohol o a la apertura del anillo. Este mecanismo es el principal responsable de la ruptura del anillo, para lo cual la presencia de O₂ en el medio es indispensable [9].

IV) Reacción con otros radicales del medio generados en el proceso, que puede llevar a la adición nuevos grupos (ejemplo, adición de grupos metoxi).

V) Interacción con otras sustancias del medio, como por ejemplo la oxidación de un radical orgánico por parte del Fe(III). Esta mecanismo es de particular importancia ya que explica la existencia de cinéticas autocatalíticas observadas en los procesos Tipo-Fenton [18].

Los mecanismos I y II son bimoleculares y requieren altas concentraciones de radicales. En el caso del estudio de degradación de colorantes por PAOs suelen usarse concentraciones bajas de sustrato y de H₂O₂, por lo que la concentración de radicales orgánicos en un momento dado es muy baja y son los mecanismos unimoleculares (mecanismos III, IV y V) los más relevantes.

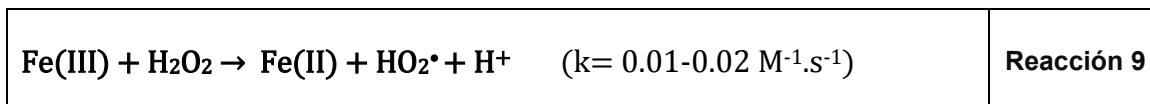
La reacción de Fenton es eficiente como técnica de degradación en un rango amplio de pH, aunque normalmente se considera que posee un pH óptimo de 2.8, ya que a valores mayores la formación de compuestos hidroxilados de Fe(II) desfavorecen la reacción [7]. Normalmente un aumento en las concentraciones de los reactivos involucrados provoca un aumento en la velocidad de la generación de radicales y, por lo tanto, en la velocidad de degradación. Sin embargo concentraciones elevadas de Fe(II) o H₂O₂ tienden a reaccionar con los radicales producidos [19], compitiendo con el contaminante, lo que lleva a que exista una concentración óptima a partir de la cual la velocidad de degradación disminuye [7]. Las reacciones del radical OH[•] con el Fe(II) y el H₂O₂ se muestran a continuación:

$\text{HO}^{\bullet} + \text{H}^+ + \text{Fe(II)} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Fe(III)}$	Reacción 7
$\text{HO}^{\bullet} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2^{\bullet} + \text{H}_2\text{O}$	Reacción 8

Cuando una sustancia compite con el sustrato a degradar por los radicales se la denomina “scavenger” (secuestrante). Por lo tanto, a partir de la discusión anterior podemos decir que el Fe(II) y el H₂O₂ pueden actuar como scavengers de radicales cuando se encuentran en altas concentraciones. Es común el agregado de scavengers como el metanol, el 2-propanol y el dimetilsulfóxido para proteger al contaminante de la oxidación, lo que permite “congelar” la reacción hasta el momento del análisis. Nótese que este congelamiento es solo con respecto a la degradación del contaminante, ya que la reacción de Fenton seguirá ocurriendo normalmente aunque los radicales generados no ataquen al sustrato debido a la competencia con los scavengers. La selectividad de los distintos scavengers por distintos radicales también permite su utilización para estudiar mecanismos de reacción.

En la forma clásica, durante un proceso Fenton el Fe(II) es agregado en cantidades estequiométricas con el H₂O₂. Este procedimiento tiene el inconveniente de generar una

gran cantidad de barros proveniente de la precipitación de óxidos férricos que requieren ser separados para evitar la polución de los cursos de agua [20]. Para evitar esto se desarrollaron las técnicas Tipo-Fenton (Fenton-Like en inglés) en donde el hierro es agregado en forma de sal en cantidades catalíticas, para lo cual es necesario encontrar condiciones en que el Fe(II) pueda ser regenerado por el Fe(III) a través de la reacción:



La Reacción 9 es más lenta que la reacción de Fenton y suele ser el paso limitante del proceso [18]. Esta reacción se ve disminuida a pH bajos y es la responsable de la pérdida de efectividad de los procesos Fenton y Tipo-Fenton a $\text{pH} < 2.8$ [20]. A pesar de no ser la reacción principal en los procesos Fenton clásicos, la Reacción 9 también participa en ellos e influye en su velocidad.

Además de la reducción por parte del H_2O_2 , el Fe(III) puede ser reducido por intermediarios aromáticos generados durante la oxidación de la materia orgánica, tales como los radicales de compuestos centrados en carbono y sustancias con estructura semiquinónica [21]. Debido a que estos intermediarios son producidos durante la degradación de muchos compuestos, tales como la mayoría de los colorantes textiles, las cinéticas de degradación en procesos Tipo-Fenton pueden presentar un comportamiento del tipo autocatalítico [18].

Los procesos Tipo-Fenton tienen dos grandes inconvenientes. En primer término, la cantidad de catalizador a utilizar está altamente limitada por la solubilidad del Fe(III), el cual precipita en forma de óxidos férricos a pH cercanos a la neutralidad. Esto provoca una pérdida de eficiencia al aumentar el pH, mucho más notoria que para el proceso Fenton clásico. Como se discutió en el capítulo 1, los efluentes textiles tienen un pH variable que puede llevar a valores tan alcalinos como 12, muy alejados del pH óptimo de 2.8 de los procesos Tipo-Fenton. Debido a esto los efluentes deben de ser acidificados antes del tratamiento y luego neutralizados para poder ser volcados, gastándose gran cantidad de ácido y base en el proceso, además de obligar a mantener una instalación preparada para manejar efluentes ácidos, lo que aumenta el costo del tratamiento.

El otro inconveniente está relacionado con la presencia de cualquier sustancia que compleje fuertemente al Fe(III), puesto que la forma complejada del Fe(III) es muchas veces incapaz de participar en la regeneración del Fe(II) a través de la Reacción 9, y como consecuencia la reacción de Fenton se ve impedida por la falta de Fe(II). Esto ocurre con los ácidos generados durante los estadios finales de la oxidación de contaminantes orgánicos, en particular con el oxalato, lo cual impide la mineralización de los efluentes mediante estos tratamientos [18].

Para mejorar la velocidad de los tratamientos y lograr la mineralización del efluente, se diseñaron estrategias que utilizan una fuente de energía externa para facilitar la reducción del Fe(III). Estas incluyen el uso de ultrasonido (Sono-Fenton), la aplicación de un potencial eléctrico (Electro-Fenton) y la irradiación con luz visible/UV cercano (Foto-Fenton). Esta última estrategia es la más estudiada debido a la posibilidad de usar la luz solar como fuente de irradiación [22]. En estas circunstancias, la irradiación genera una nueva fuente de Fe(II) y radicales OH^\bullet :

$\text{Fe(III)} + h\nu + \text{OH}^- \rightarrow \text{Fe(II)} + \text{HO}^\bullet$	Reacción 10
---	--------------------

En el proceso Foto-Fenton ocurre la reducción del Fe(III) incluso cuando este se encuentra complejoado con ácidos orgánicos y el proceso foto-reductivo frecuentemente conlleva la descarboxilación de los mismos [18]. Esto hace que a diferencia de los procesos Tipo-Fenton desarrollados en ausencia de radiación, la fotocatalisis permite lograr una importante reducción de la carga orgánica de la solución.

Últimamente se ha propuesto reemplazar el uso sales de hierro por hierro metálico, cuya corrosión actuaría como fuente de Fe(II) para ser utilizada en la reacción de Fenton. El uso de ZVI con agregado de H₂O₂ de manera externa es llamado Fenton Asistida por ZVI (FAZ), ZVI-Fenton o Fenton avanzada. El hierro metálico tiene la ventaja con respecto a las sales de hierro de ser autosoportable, permitiendo su uso como relleno de columnas reactivas fácilmente adaptables a sistemas continuos de tratamiento. Además la generación continua de Fe(II) permitiría su empleo en valores de pH donde los procesos Tipo-Fenton se encuentran limitados por la solubilidad del Fe(III) [23].

2.1.5 Uso de ZVI en el tratamiento de contaminantes

El ZVI tiene una química compleja que le permite eliminar contaminantes por distintos mecanismos dependiendo de la naturaleza de la fuente de Fe⁰ y de las condiciones utilizadas. Podemos diferenciar 3 tipos de mecanismos distintos: reducción, remoción física y oxidación, si bien en muchos casos el contaminante puede eliminarse por una combinación de mecanismos.

La reducción involucra una transferencia de electrones desde el ZVI al contaminante, produciendo Fe(II) en el proceso. Se han propuesto dos mecanismos para esta transferencia: uno directo y otro indirecto [24]. En el directo, los electrones producidos durante la oxidación del Fe⁰ son transferidos directamente desde la superficie metálica (Reacción 11). En el mecanismo indirecto los electrones son transferidos a los protones presentes en la solución formando radical hidrógeno, que es el responsable de la reducción del contaminante (Reacción 12).

$\text{Fe}^0 \rightarrow \text{Fe(II)} + 2 e^-$ $\text{Contaminante} + 2 e^- \rightarrow \text{Contaminante reducido}$	Reacción 11
$\text{Fe}^0 + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe(II)} + 2 \text{H}^{\bullet(\text{sup})}$ $2 \text{H}^{\bullet(\text{sup})} + \text{Contaminante} \rightarrow \text{Contaminante reducido}$	Reacción 12

La reducción de colorantes azoicos con ZVI está muy favorecida termodinámicamente considerando su alta tendencia a oxidarse ($E^\circ_{\text{Fe(II)/Fe(0)}} = -0.44\text{V}$ [17]) en comparación con los potenciales necesarios para reducir los enlaces azoicos ($E^\circ_{\text{grupos azoicos}} = +0.23/+0.39 \text{ V}$ [25]). También se ha utilizado mucho el ZVI como reductor de compuestos nitroaromáticos, aunque en este caso su aplicabilidad es más limitada ya que el E° del grupo nitro en estos compuestos suele encontrarse entre -0.21 V y -0.63 V [26].

Se ha propuesto además que el Fe(II) que se encuentra formando parte de la capa de corrosión (Fe(II)_{cl}) podría actuar también como intermediario de reducción (Reacción 13). Esto se debe a que a diferencia del Fe(II)_{aq} ($E^{\circ}_{\text{Fe(III)}/\text{Fe(II)aq}} = +0.77 \text{ V}$), el Fe(II)_{cl} puede llegar a ser un reductor aún más fuerte que el ZVI ($E^{\circ}_{\text{Fe(III)}/\text{Fe(II)cl}} = -0.34/ -0.65 \text{ V}$) [17].



Independientemente de cuál de estas especies sea la responsable, Weber (1996) demostró que el proceso de reducción es un fenómeno de superficie y que las especies solubles son incapaces de llevarlo a cabo [27]. La reducción con ZVI ha resultado efectiva para tratar una gran variedad de contaminantes como nitratos [28,29], nitrobenzeno [30], organoclorados [24] y colorantes [31,32]. En el caso de tratamientos de pesticidas y compuestos nitrados el uso de ZVI en condiciones reductoras permite disminuir su toxicidad [33]. En cambio, durante tratamiento de colorantes azoicos la toxicidad suele aumentar [31]. Sumado a esto la decoloración reductiva no contribuye a disminuir la carga orgánica (TOC, COD) del efluente debido a que, en esencia, los fragmentos de la molécula de colorante se mantienen intactos [5].

Nótese que en estas vías el contaminante se encuentra actuando como oxidante y contribuirá al proceso de corrosión, si bien en la mayoría de las situaciones su concentración con respecto a los otros oxidantes (H⁺, O₂, H₂O₂) es baja y, por ende, su contribución es normalmente despreciable.

Otro de los mecanismos de remoción involucra el secuestro del contaminante por medios físicos a través de la adsorción o coprecipitación de este por parte de los óxidos formados durante la corrosión. Este mecanismo ha demostrado ser muy efectivo en la remoción de metales pesados y metaloides, entre ellos uranio [34], cromo [35] y arsénico [36]. Muchas veces la especie eliminada es la forma reducida del metal, por lo que el tratamiento posee una mezcla de ambos mecanismos. Si bien el secuestro físico de contaminantes es importante en la remoción de especies inorgánicas, no es el mecanismo de remoción habitualmente aceptado para la remoción de compuestos orgánicos.

Además de la reducción y la remoción física, el ZVI puede ser utilizado como fuente de hierro para oxidar el contaminante a través de la reacción de Fenton (R1) como describimos en la sección anterior. En esta el Fe(II) es aportado por la corrosión del ZVI mediada por H⁺, O₂, el H₂O₂ o el mismo contaminante; mientras que el H₂O₂ puede ser agregado externamente (en un proceso llamado Fenton Asistida por ZVI) o ser generado in-situ a través de la siguiente reacción:



La generación in-situ de H₂O₂ tiene la ventaja de no necesitar el agregado externo de oxidante, que es uno de los mayores insumos del tratamiento. Es una estrategia prometedora en lo que refiere al uso de ZVI como relleno de barreras permeables reactivas para tratar cursos de agua contaminados con trazas de sustancias orgánicas sintéticas. No obstante es una reacción muy lenta e ineficiente para el tratamiento de efluentes a la salida de una planta industrial, donde la carga de contaminantes es muy elevada. En estos casos la Fenton avanzada con agregado de H₂O₂ externa es un enfoque

más apropiado. La oxidación mediado por ZVI ha demostrado ser muy efectiva a la hora de remover contaminantes orgánicos como DDT [37], fenol [38] y colorantes [31]. Incluso se ha utilizado en Argentina para el abatimiento de hidrocarburos in situ (ISCO) y on site (OSCO) frente a derrames y filtraciones de estaciones de servicio [39].

En particular, la técnica FAZ ha demostrado tener ventajas sobre los otros sistemas tipo-Fenton a la hora de tratar compuestos nitrados, debido a que los grupos $-\text{NO}_2$ actúan como desactivantes para el ataque por parte de los radicales OH^\bullet . La presencia de ZVI permite la reducción de los grupos $-\text{NO}_2$ a $-\text{NH}_2$ que posteriormente pueden oxidarse más fácilmente. Esta ventaja ha sido explotada para sustratos tales como el TNT [40,41], el p-cloronitrobenzeno [42] y el ácido p-nitrobenzoico [43].

2.1.6 FAZ y sistemas continuos

Los procesos en batch, si bien más sencillos de estudiar a nivel laboratorio, son de aplicación menos práctica a nivel industrial. En los sistemas de tratamiento continuo el efluente es tratado a medida que se va generando, facilitando la automatización del proceso y el escalado para el tratamiento de mayores volúmenes. En el caso particular del FAZ existe una ventaja adicional al usar sistemas continuos como consecuencia de la separación espacio-temporal de las fases reductiva y oxidativa, lo que permite evitar ciertos fenómenos que se estudiarán en detalle en este capítulo.

2.1.7 Objetivos

En este capítulo se realizará una serie de estudios en batch para indagar en los mecanismos de degradación involucrados en un sistema FAZ, cuyos resultados se utilizarán luego para diseñar y entender los procesos que ocurren en un sistema continuo.

Se estudiará asimismo el uso del ZVI como agente reductor de manera aislada, para poder comprender el abanico de reacciones involucradas en el proceso FAZ. En particular se realizará un enfoque que permita caracterizar el sistema a pH cercanos a la neutralidad con vistas a minimizar la cantidad de ácido agregado, que es una de las principales desventajas de los procesos tipo-Fenton convencionales.

En esta sección se seleccionarán condiciones adecuadas de reacción que, junto con el agregado de aditivos, permitan evidenciar mejor los fenómenos involucrados en el tratamiento. Como modelo de contaminante proveniente de la industria textil, se estudiará la degradación de un colorante azoico, el Negro ácido 1.

2.2 FAZ en batch: Material y métodos

2.2.1 Reactivos

Los compuestos químicos empleados en los experimentos fueron ZVI en forma de polvo electrolítico (Anedra, > 98 %, 325 mesh, 37-44 μm , área superficial 0.67 m^2/g), Negro Ácido 1 (Anedra), Orto-Fenantrolina (Anedra), KSCN (99%, Anedra), AcNa (>99%, Anedra), 2-propanol (99.8 %, Anedra), el Na_2SO_4 (99 %, Anedra), H_2O_2 (30 %, Cicarelli), H_2SO_4 (98 %, Merck), NaOH (99 %, Merck) y metanol (pro-análisis, 99.8 %, Cicarelli). En todos los casos los compuestos fueron usados sin previa purificación y las soluciones

fueron preparadas en el día, utilizándose agua de calidad mili-Q (agua ultra pura, 18.2 MOmhs.cm a 25 °C).

El área superficial del ZVI en polvo fue determinada utilizada a partir de aplicar el modelo BET a una isoterma de adsorción de N₂ a 77 K con un quipo Micromeritics ASAP 2020.

2.2.2 Técnicas colorimétricas

2.2.2.1 Determinación de Fe(II)

El análisis de la concentración Fe(II) en las muestras fue realizado empleando el método colorimétrico de la O-Fenantrolina [44] modificado. El fundamento del método se basa en la formación de un complejo estable de color rojo-anaranjado entre el Fe(II) y la O-Fenantrolina. La formación cuantitativa del complejo se observa en el rango de pH comprendido entre 2 y 9, por lo cual se utilizó un buffer acetato (1.4 M) en la mezcla de reacción a pH 4.75. El complejo formado absorbe radiación en la región del visible presentado un máximo de absorción a 510 nm. Para evitar las posibles interferencias de Fe(III) en la determinación, se agregó NaF a la mezcla de reacción.

Solución de determinación: 1 parte de O-Fenantrolina 0.018 M, 1 parte de buffer acetato 1.4 M llevado a pH 4.75 y 1 parte de NaF 0.02 M.

Medida: se mezcla una parte de solución de determinación con una parte de muestra y se sigue la absorbancia a 511 nm, la cual se correlaciona con la concentración de Fe(II) a partir de una curva de calibración realizada con Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O.

2.2.2.2 Determinación de Fe(III)

El Fe (III) fue determinado a partir del complejo rojo formado con SCN⁻ en medio ácido ([Fe(NCS)₂(H₂O)₄]⁺), que presenta un máximo de absorción a 480 nm.

Solución de determinación: 1 parte de KSCN 6 M, 1 parte de H₂SO₄ 5 M y 4 partes de agua.

Medida: se mezcla una parte de solución de determinación con una parte de muestra y se sigue la absorbancia a 480 nm, la cual se correlaciona con la concentración de Fe(III) a partir de una curva de calibración realizada con Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O.

NOTA: De acuerdo al standard methods [45], las determinaciones de hierro pueden realizarse sobre la fracción soluble (obtenida luego de filtrar por una membrana de 0.45 μm) o total (sin filtrar). En esta tesis hemos decidido hacer determinaciones sobre la fracción total para reflejar mejor los procesos de corrosión, ya que la recuperación de Fe(III) disminuye mucho luego del filtrado para muestras a pH > 5. A estos pH el Fe(III) forma coloides, lo que hace que la muestra pierda homogeneidad y lleva a que las medidas posean una incertidumbre mayor (≈ 20 %). Más allá de los problemas asociados a la homogeneidad de la muestra, la alta concentración de H₂SO₄ de la determinación de Fe(III) hace que los coloides se redisuelvan y puedan ser medidos por complejación con SCN⁻. La determinación de Fe(II) no se ve afectada por cual fracción es utilizada, ni por la presencia de H₂O₂ en la muestra una vez en contacto con la solución de determinación. Todas estas cuestiones fueron determinadas experimentalmente durante la puesta a punto de las técnicas a partir de soluciones conteniendo cantidades conocidas de Fe(II) y Fe(III).

2.2.2.3 Determinación de H₂O₂

La concentración de H₂O₂ en las muestras de reacción se determinó mediante un método enzimático-colorimétrico empleando un kit comercial de Wiener para determinación de colesterol (Colestat®).

El kit comercial provee los siguientes reactivos: una solución de 4-aminofenazona (4-AF), una solución de fenol y una mezcla de enzimas: peroxidasa, lipasa fungal y colesterol oxidasa. El método se basa en la reacción del H₂O₂ con una mezcla de 4-AF y fenol para dar como producto la quinoneimina (4-(p-benzoquinona monoimino)-fenazona) que presenta un máximo de absorbancia a 505 nm.

Medida: se mezclan 3 mL de kit de colestat con 75 µl de muestra, se deja reaccionar entre 15-60 min y se mide la absorción a 505 nm, la cual se correlaciona con la concentración final de H₂O₂ a partir de una curva de calibración.

2.2.2.4 Medidas espectrofotométricas

Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-1800, usando celdas de cuarzo de 0.2 cm o 1 cm de camino óptico y barriendo los espectros entre 200-800 nm con un ancho de rendija de 1 nm.

2.2.3 Determinación de Carbono Orgánico Total (TOC)

La evolución del carbono orgánico total (TOC) fue determinada para evaluar el grado de mineralización del contaminante durante el tratamiento. Las medidas fueron realizadas empleando un equipo Shimadzu 5000 TOC analyzer (Figura 3). Este dispositivo mide el carbono total (TC) y el carbono inorgánico total (TIC) de la muestra y por diferencia de ambos parámetros (TC - TIC) se obtiene el carbono orgánico total (TOC). Las medidas de TC están basadas en la combustión de la muestra acuosa sobre un catalizador de platino soportado sobre esferas de óxido de aluminio, que transforma todo el carbono presente en la muestra en CO₂. La temperatura de la cámara de combustión es 680 °C. La mezcla gaseosa resultante es conducida por un gas transportador (aire analítico libre de CO₂, flujo de aproximadamente de 150 mL.min⁻¹) hacia un detector de infrarrojo para el análisis de CO₂.

En las medidas de TIC, la muestra es inyectada en una cámara que contiene ácido fosfórico al 25 % p/v, de este modo el carbonato y el bicarbonato son liberados como CO₂ y el gas es desalojado de la cámara por el mismo gas transportador empleado en la medida de TC y llevado hacia el mismo detector de infrarrojo para analizar la concentración de CO₂. El área del pico obtenida está relacionada linealmente con la concentración de carbono en la muestra (para TC o TIC). Se realizaron curvas de calibración con soluciones estándares de biftalato ácido de potasio para la determinación de TC y de NaHCO₃ para el TIC.



Figura 3: Equipo de medición de carbono orgánico

2.2.4 Determinación por CG-MS

La identificación de los principales productos de reacción fue realizada utilizando un cromatógrafo gaseoso GCMS-QP2010S Shimadzu (Figura 4) equipado con una columna Meta.X5 (Teknokroma).

Antes del análisis la muestra fue preconcentrada por extracción en fase sólida utilizando un cartucho LiChrolut EN 200 mg (Merck) haciendo pasar 200 mL de muestra y eluyéndola con 3 mL de metanol. Un volumen de 10 μl fue inyectado en el equipo, manteniendo el puerto de inyección a 250 $^{\circ}\text{C}$ y una relación de Split 1:30. Durante el análisis se utilizó una rampa de temperatura incrementándola de 60 $^{\circ}\text{C}$ a 250 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Como gas transportador se usó helio con un caudal de 35 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.



Figura 4: Cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas

2.2.5 Medidas de toxicidad

Las medidas de toxicidad fueron realizadas a partir de la técnica de inhibición de luminiscencia de *V. Fisheri* (NRRL B-11177, Macherey-Nagel) de acuerdo al procedimiento estándar ISO 11348-3. Esta técnica consiste en incubar una dilución apropiada del efluente a evaluar con esta cepa de bacterias marinas, las cuales presentan una bioluminiscencia natural. Si el efluente posee sustancias tóxicas que alteren el metabolismo de la bacteria, se observa una disminución de la fluorescencia luego de la incubación. Esta disminución se utiliza como parámetro de toxicidad.

La luminiscencia fue medida usando un luminómetro Lumifix-Bio-10 (Macherey-Nagel, Figura 5). La luminiscencia fue determinada luego de 15 minutos de incubación con la solución, y comparada con la de un blanco de agua destilada para calcular la toxicidad. Tanto las soluciones como los blancos fueron medidos por triplicado. Los resultados obtenidos fueron corregidos para evitar la interferencia del color de la solución utilizando el procedimiento publicado por Ashworth et. al [45]. Esta corrección es necesaria debido a que una solución coloreada puede absorber parte de la luz emitida por la bacteria, y llevar a una sobrestimación de la toxicidad.



Figura 5: Luminómetro utilizado para las medidas de toxicidad

2.2.6 Medidas de HPLC

Los análisis de HPLC fueron realizados utilizando un instrumento multimodular Shimadzu, compuesto por un dosificador de solventes LC-20AT, un desgasificador DGU-20A5, un detector UV-visible con arreglo de diodos SPD-M20A, un termostatizador de columna CTO-10 A5 VP y un autosampler SIL-20AAT. La columna utilizada fue una Lichrospher 5u RP-18 100 A (125x4 mm). Como fase móvil se utilizó una mezcla 22.5 % acetonitrilo (Baker, grado HPLC)/77.5 % de una solución acuosa de AcNH_4 0.01 M pH 6.5 (Aldrich 98 %). El flujo utilizado fue de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

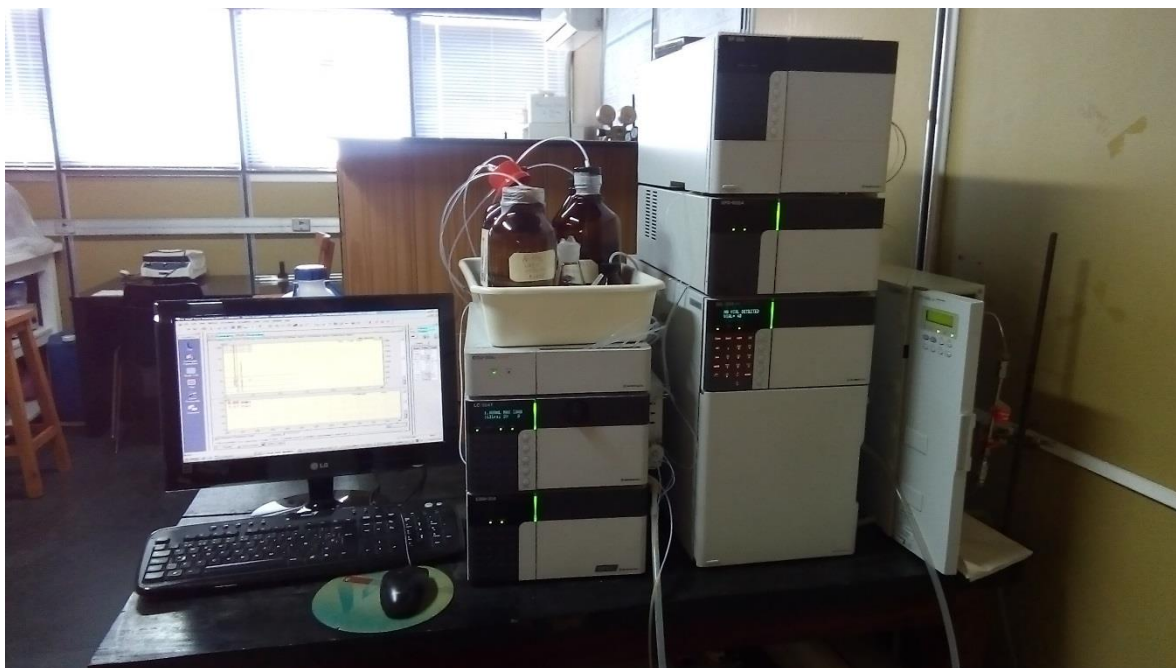


Figura 6: HPLC multimodular Shimadzu

2.2.7 Procedimiento general

Las cinéticas en los sistemas ZVI/N₂ fueron realizadas preparando una solución de Negro Ácido 1 en una concentración de 50 mg/L (0.0811 mM), con el agregado de NaSO₄ en una concentración 5 mM y llevando al pH deseado con H₂SO₄ o NaOH con una precisión de ± 0.02 unidades. A este pH, ajustado antes de la realización de los ensayos, lo llamaremos pH_{inicial} para poner en evidencia que su valor puede variar durante el experimento.

250 mL de la solución de trabajo fueron introducidos en un matraz Erlenmeyer continuamente agitado con un buzo magnético. Para lograr una buena reproducibilidad es de particular importancia estandarizar el tamaño del buzo magnético y la velocidad de agitación, ya que se conoce que el proceso de corrosión/reducción se encuentra limitado por transporte de masa [26]. En todos los experimentos se utilizó un buzo magnético de 2 cm de largo X 0.58 cm de diámetro y una velocidad de agitación de 270 RPM.

Para los ensayos reductivos (ZVI/N₂) se burbujeó con nitrógeno 30 minutos antes de realizar la cinética y durante toda la experiencia de manera de disminuir el O₂ soluble que puede llegar a interferir con la reducción por parte del ZVI. Es importante aclarar que el procedimiento no elimina por completo el O₂, sino que lo reduce desde un valor de alrededor de 9.3 mg/L hasta un valor cercano a las 0.6 mg/L (datos obtenidos con una sonda de O₂ a 20 °C). Para alcanzar este valor es imprescindible el burbujeo continuo de la solución durante el experimento. Al comienzo de la cinética se agregó el ZVI en polvo.

Las cinéticas en los sistemas ZVI/O₂/H₂O₂ fueron realizadas de manera análoga, obviando el proceso de burbujeo con N₂ y agregando H₂O₂ a la concentración deseada al comienzo de la cinética, antes del agregado del ZVI. Los ensayos se realizaron sobre sistemas abiertos a la atmósfera debido a que la presencia de O₂ en la oxidación es indispensable para la ruptura oxidativa de los anillos aromáticos, tal como fue discutido previamente.

En ambos sistemas se muestrearon 2.5 mL de muestra a los tiempos deseados, que se mezclaron inmediatamente con 2.5 mL de solución scavenger (metanol al 25 % en agua). La función es secuestrar los radicales que puedan generarse y de esta manera frenar las reacciones de oxidación. En los sistemas reductivos no existe generación de radicales, pero se realiza el agregado de scavenger con motivo de estandarizar el procedimiento. Para las medidas de carbono total y toxicidad se reemplazó el uso de scavenger con una alcalinización rápida con NaOH para evitar la interferencia del agregado de metanol. En todos los casos las muestras se filtraron con filtros de acetato de celulosa de 0.45 μm para eliminar los óxidos de hierro insolubles. Las medidas de H_2O_2 , Fe(II) y Fe(III) se realizaron por las técnicas colorimétricas ya descritas sin utilizar scavenger ni filtrar.



Figura 7: Sistema utilizado para las cinéticas ZVI/ N_2 .

2.2.8 Parámetros de degradación

Existen distintas maneras de seguir la eficacia de degradación de un colorante [6], donde la elección de cada una dependerá de los objetivos a estudiar. En orden creciente de exigencia en lo que a eficiencia global del tratamiento se refiere, clasificaremos los parámetros en:

1. Seguimiento de la especie química:

Para esta medida es necesario separar la sustancia en estudio de los productos de degradación, lo cual puede hacerse por un método cromatográfico (HPLC, CG), para así poder seguir el decaimiento de esta en el tiempo. Alternativamente, en vez de realizar una separación real, se pueden aislar las contribuciones de las distintas especies mediante métodos quimiométricos. Uno de estos métodos es la resolución multivariada de curvas por cuadrados mínimos alternados (MCR-ALS), que permite aislar las contribuciones de los espectros de absorción individuales que contribuyen a una mezcla en una medida espectrofotométrica y, a partir de estos, reconstruir los perfiles de concentración de la especie química [46].

Estas estrategias permiten un estudio más detallado desde un punto de vista químico de las transformaciones que sufre la molécula a tratar. No obstante, poseen el inconveniente de sobreestimar la eficiencia del tratamiento, ya que en muchos casos los productos o intermediarios pueden resultar tanto o más tóxicos y/o coloreados que el compuesto de partida.

2. Decaimiento del máximo de absorbancia:

Es la estrategia más utilizada en investigación debido a su sencillez. Consiste en seguir el decaimiento de la absorbancia en el máximo del colorante (620 nm para AB1) y expresarlo como porcentaje del valor inicial. La degradación seguida de esta manera suele llamarse decoloración. Tiene el inconveniente de no tener en cuenta la posible aparición de productos o intermediarios que absorban en el visible pero que tengan un cambio en el máximo de absorción, en cuyo caso sobrestimaré la verdadera pérdida de color de la solución [5].

3. Medidas del color total:

Estos parámetros pretenden tener en cuenta la contribución a la coloración de todo el espectro visible, teniendo en cuenta la coloración proveniente de intermediarios y productos de degradación. Debido a esto, resultan más exigentes que medir únicamente el máximo de absorbancia.

El parámetro de control más utilizado para aguas de consumo y aguas provenientes de gran parte de las industrias (químicas, petroquímicas, plásticas y farmacéuticas) es el APHA Color Index, también conocido como color Pt-Co. En este se compara de manera visual el color del efluente con estándares de soluciones conocidas de K_2PtCl_6 y $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, expresando el resultado en unidades de color (U.C.). Tiene la ventaja de no requerir equipamiento, pero es poco práctico para el estudio en un laboratorio de investigación debido a su carácter semicuantitativo. Para darle un carácter más cuantitativo algunos equipos, como el LaMotte LTC3000We (con el cual se hicieron las medidas de U.C. de la Figura 8) toman la absorbancia a 428 nm y la comparan con el valor de la escala Pt-Co. De todas maneras, ninguna de las variantes resulta adecuada para efluentes de color marcadamente distinto al amarillo, situación común en los efluentes textiles. En estos se utiliza generalmente la escala ADMI, que mide el color de la solución por el método Triestímulo y lo normaliza para poder compararlo con la escala Pt-Co [47,48].

Una alternativa más sencilla y apropiada para un laboratorio de investigación consiste en utilizar la integral de la absorbancia de la solución en el rango de longitud de onda que comprende el espectro visible (400-700 nm), que está directamente correlacionado a la coloración general de la muestra y da resultados similares al métodos Triestímulo ADMI [49].

4. Parámetros globales:

Estos parámetros dan cuenta del contenido de materia orgánica del efluente. En esta tesis utilizaremos la disminución del carbón orgánico total (TOC). Debido a que la oxidación de la materia orgánica a CO_2 y otros compuestos inorgánicos es el paso final de una oxidación, este representa el parámetro más exigente de los mencionados y es el último en disminuir. Otros parámetros globales de degradación muy utilizados son la demanda química de oxígeno (DQO), asociado a la cantidad y al estado de oxidación de la materia orgánica presente, y la demanda biológica de oxígeno (DBO), que además se ve influido por la biodegradabilidad.

Por último existen métodos que permiten evaluar la evolución de la toxicidad del efluente. Uno de los más utilizados debido a su practicidad es la técnica de inhibición de luminiscencia de *V. Fisheri* (LVF), que fue descrita en la sección 2.2.5.

En esta tesis se utilizaron varias de estas estrategias, eligiendo la más adecuada para cada discusión particular. A modo ilustrativo la comparación entre las distintas estrategias en dos de los sistemas estudiados se muestra en la Figura 8. Puede observarse como la velocidad de degradación sigue el orden comentado anteriormente para los distintos parámetros de seguimiento. Así los métodos que siguen el perfil de la especie química (HPLC y MCR-ALS) decaen más rápidamente que el máximo de absorbancia, seguido por los parámetros de color total (área 400-700 nm y U.C.) y por último el TOC.

En algunos casos además se observa como la elección del parámetro de degradación puede cambiar el comportamiento cualitativo del sistema, y a la vez depender del sistema estudiado. Por ejemplo en el sistema ZVI/N₂, podemos ver como a los 120 minutos ya no quedan moléculas de AB1 (seguidas por HPLC) pero la absorbancia a 620 nm y el área entre 400-700 nm llegan a un plateau mientras que el TOC no se ve afectado y las unidades de color (U.C.) pasan por un mínimo. En cambio en el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ todos los parámetros disminuyen cuando avanza la degradación, a excepción de la escala de U.C. que pasa por un máximo como consecuencia de los corrimientos hacia el violeta esperables durante una oxidación de compuestos aromáticos mediada por radicales OH[•].

Nótese también como la estimación por MCR-ALS es un buen indicador del perfil de la molécula, comparable con el HPLC en un sistema donde existe una limitada cantidad de productos como el sistema ZVI/N₂, pero presenta diferencia significativas cuando existe una gran cantidad de productos de degradación posibles como en el sistema ZVI/O₂/H₂O₂.

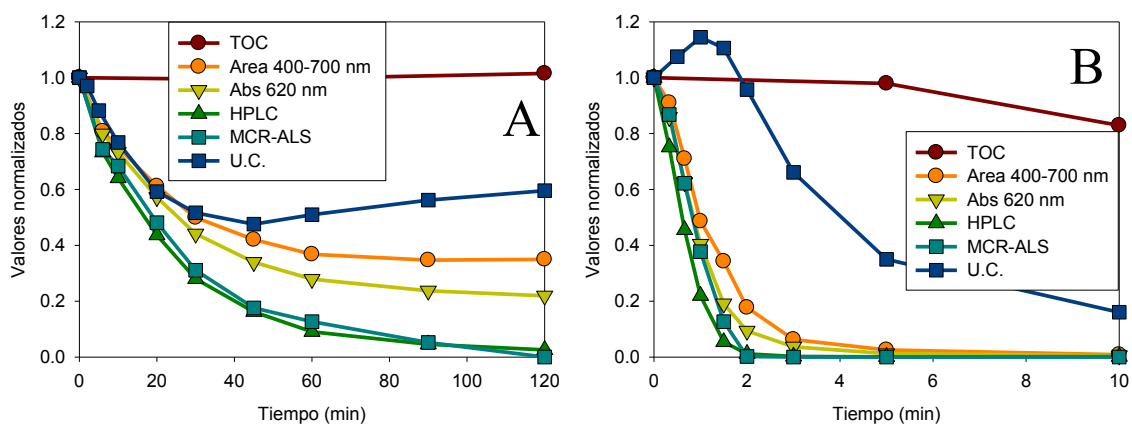


Figura 8: Comparación entre los distintos parámetros de degradación obtenidos experimentalmente para el sistema ZVI/N₂ (A) y ZVI/O₂/H₂O₂ (B). Todos los datos se encuentran normalizados al valor inicial.

En esta tesis se utilizarán distintas estrategias en función del fenómeno a investigar. En el capítulo 2 se utilizará sobre todo la absorbancia a 620 nm normalizada. Para comparar las velocidades de degradación se calculará una constante de velocidad observada (k_{obs}) a partir del ajuste de la siguiente ecuación exponencial con 3 parámetros:

$A(t) = (1 - A_{\infty}) * e^{(-k_{obs} * t)} + A_{\infty}$	Ecuación 2
---	-------------------

Donde $A(t)$ es la absorbancia a 620 nm observada al tiempo t dividido la absorbancia a 620 nm a tiempo cero, t es el tiempo de reacción en minutos y A_{∞} representa la absorbancia normalizada extrapolada a tiempo infinito. De esta manera k_{obs} puede obtenerse numéricamente o a partir de la pendiente de un gráfico de $\ln(A - A_{\infty})$ vs t .

2.3 FAZ en batch: Resultados y discusión

2.3.1 Degradación de AB1 con ZVI

El contaminante modelo estudiado fue el Negro Ácido 1, también conocido como Amidoblack 10B, Naphthol Blue Black o AB1. Se trata de un colorante ácido sintetizado por diazotación del H-acid (precursor naftalénico sulfonado muy utilizado en la síntesis de colorantes) con anilina y p-nitroanilina. Su estructura se muestra en la Figura 9.

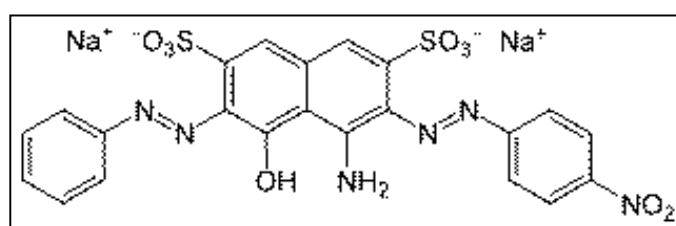


Figura 9: Estructura del AB1

Como primera aproximación para el estudio de la degradación del AB1 mediante el uso de ZVI se plantearon 2 sistemas: uno sin adición de H₂O₂ y que se ha purgado de O₂ mediante burbujeo con N₂ (ZVI/N₂); y otro donde no se realiza el burbujeo y se agregó H₂O₂ (ZVI/O₂/H₂O₂).

Si bien estamos interesados principalmente en el desarrollo de un tratamiento oxidativo, la reducción siempre está presente al poner en contacto ZVI junto con un colorante azoico, por lo que el conocimiento de los procesos que ocurren en el sistema ZVI/N₂ permitirá obtener información del sistema ZVI/O₂/H₂O₂. Además la reducción de colorantes azoicos utilizando ZVI es un proceso que se ha reportado efectivo como tratamiento y resulta interesante para comparar las ventajas, si es que las hay, del agregado de oxidantes (O₂ y H₂O₂) al sistema. Los cambios espectrales ocurridos mediante el tratamiento con ambos procesos se muestran en la Figura 10. Los sistemas ZVI/O₂/H₂O₂ no fueron purgados de aire debido a que el O₂ puede formarse por descomposición del H₂O₂ por distintos mecanismos, y además el oxígeno disuelto participa en la apertura de los anillos aromáticos.

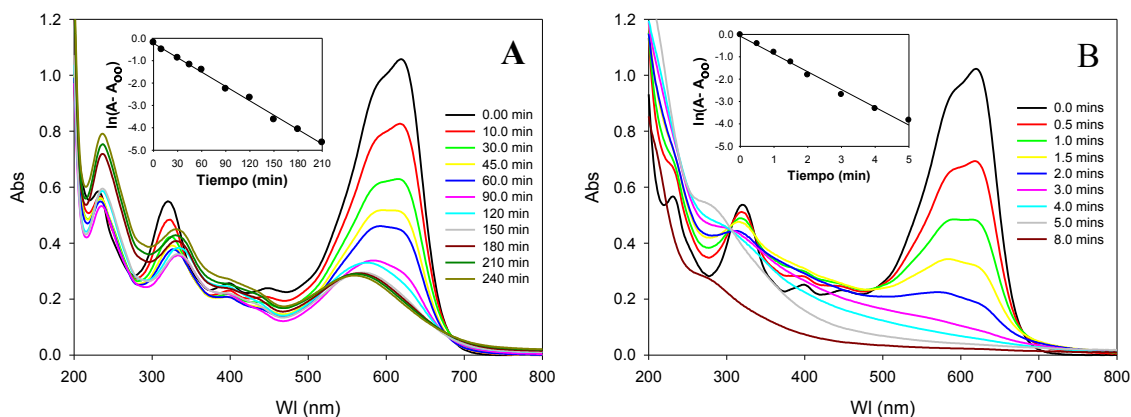


Figura 10: Espectros obtenidos durante la degradación de AB1 en un sistema ZVI/N₂ (A) y en un sistema ZVI/O₂/H₂O₂ (B).

Condiciones: ZVI = 0.2 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 1.96 mM, pH_{inicial} = 3.00.

En el inset de las figuras se muestran los datos linealizados según fue descrito en la sección 2.2.8.

Como puede observarse en la Figura 10, el AB1 tiene un espectro complejo con 3 máximos bien definidos: uno en la región visible (620 nm) correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$ de una conjugación extensa que involucra a los 3 anillos y a los enlaces azoicos, y dos en la zona ultravioleta (232 y 320 nm) correspondientes a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los anillos bencénicos y el anillo naftalénico [50].

En el sistema ZVI/N₂ se observa que la degradación del AB1 provoca cambios principalmente en la región visible, conservando en gran medida la estructura de la región UV. Esto indica una ruptura de la conjugación del compuesto con pocos cambios en la estructura de los anillos. La decoloración del AB1 alcanza un plateau como consecuencia de la aparición de un producto coloreado con un máximo de absorción alrededor de 560 nm, que se observa a simple vista como un pasaje de la solución de un color azul a un violáceo. Este corrimiento hipsocrómico del espectro puede explicarse considerando la existencia de un intermediario coloreado formado durante la reducción. En el caso de colorantes azoicos, como el AB1, el mecanismo de decoloración aceptado involucra la reducción de los enlaces azoicos para formar las correspondientes aminas, llevando a la pérdida de conjugación entre los anillos [31,32]:



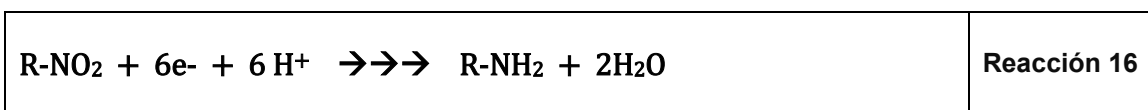
Reacción 15

La reducción con ZVI probablemente se produzca en 2 pasos, generando hidrazo compuestos (R-NH-NH-R') como intermediarios [32], los cuales son inestables y tienden a descomponerse rápidamente [51] por lo que son difíciles de detectar. En la Reacción 15 hemos postulado al Fe[°] como principal reductor, aunque también es posible que el Fe(II)_{CL} participe en el proceso. Por otra parte, el Fe(II)_{soluble} no tiene un poder reductor suficiente para llevar a cabo la reacción, lo que fue corroborado experimentalmente agregando FeSO₄ en una concentración 1 mM a la solución de AB1, no observándose cambios luego de varias horas de incubación.

Como puede verse en la estequiometría de reacción, se requieren 2 moles de Fe[°] para reducir cada mol de enlaces azoicos. En nuestras condiciones el ZVI se encuentra en

un considerable exceso, siendo la relación molar $\text{Fe}^{\circ}/\text{AB1}$ de aproximadamente 44, por lo que la presencia del plateau no se debe a un agotamiento del ZVI. En cuanto al cambio espectral, se observa una disminución de la absorción en el visible adjudicada a los enlaces azoicos y poco cambio en los picos que corresponden a las transiciones de los anillos, sugiriendo que estos se conservan durante la reducción en línea con el mecanismo propuesto.

En el caso de AB1, el grupo $-\text{NO}_2$ puede llegar reducirse por el ZVI a través de 3 sucesivas transferencias de $2 e^-$ para formar un grupo nitroso ($-\text{N}=\text{O}$), hidroxilamina ($-\text{NH}-\text{OH}$) y, finalmente, la amina correspondiente ($-\text{NH}_2$). Esta otra reducción puede llegar a observarse en los espectros como un segundo corrimiento, esta vez batocrómico, hasta alrededor de los 595 nm que solo se hace evidente en condiciones más drásticas de reacción (por ejemplo empleando nanopartículas de ZVI o cargas de ZVI de 3 g/L).



La bibliografía normalmente atribuye un decaimiento de pseudo-primer orden cuando se siguen las cinéticas de decoloración por reducción con ZVI de colorantes azoicos a bajas concentraciones [31], comportamiento similar al observado en la Figura 10A. En nuestro caso en particular, la evidencia de un producto coloreado obliga a introducir un término que tenga en cuenta la absorbancia a tiempo infinito, tal como se hizo en la Ecuación 2.

En el sistema $\text{ZVI}/\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ se observa una rápida y casi completa remoción del color como producto de la oxidación mediada por la reacción de Fenton. Los espectros muestran una disminución inicial en la zona visible, generada tanto por reducción como por ruptura oxidativa de los enlaces azoicos. En el caso de AB1, de ambos enlaces azoicos, aquel unido al anillo bencénico sin substituir es el que posee electrones más disponibles y por ende el más susceptible a ser atacado [52]. Se observa además una pérdida de la estructura de las bandas con aumento de la absorbancia a bajas longitudes de onda, que luego disminuye a altos grados de oxidación. Este comportamiento espectral es típico del ataque por radicales HO^{\bullet} , donde la oxidación genera compuestos aromáticos más simples que son a su vez oxidados a compuestos no aromáticos. A simple vista se observa una disminución en la intensidad del color de la solución con un viraje hacia un color negro, que luego desaparece dejando una solución levemente amarillenta como consecuencia de la aparición de polímeros de Fe(III) .

Las cinéticas de decoloración en procesos tipo-Fenton suelen presentar un comportamiento de pseudo-primer orden [53] o autocatalítico [21] dependiendo del compuesto y de las condiciones ensayadas. En nuestro caso, se observa una cinética de pseudo-primer orden, por lo que de existir un comportamiento autocatalítico, la fase lenta de este es muy rápida y no llega a apreciarse. En las condiciones de la Figura 10 la decoloración es completa por lo que la corrección por A_{∞} no sería necesaria, aunque si lo será en aquellos sistemas $\text{ZVI}/\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ donde las condiciones experimentales no permitan llegar a estos grados de oxidación (por ejemplo si se utilizan $[\text{H}_2\text{O}_2] \leq 0.44 \text{ mM}$).

Las k_{obs} obtenidas a partir de los datos de la Figura 10 son de 0.80 min^{-1} para el sistema $\text{ZVI}/\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ y de 0.02 min^{-1} para el ZVI/N_2 . Como puede observarse, la velocidad de decoloración en el primer sistema es más de 1 orden de magnitud mayor, lo que demuestra que los procesos oxidativos son la principal fuente de decoloración en los

sistemas ZVI/O₂/H₂O₂ a pH_{inicial} = 3.00. Por esta razón llamaremos sistema reductivo al que contiene ZVI/N₂ y oxidativo al ZVI/O₂/H₂O₂, a pesar de que en este último la reducción también está presente y tendrá un peso relativo mayor o menor en función de las condiciones utilizadas.

2.3.2 Efecto del pH inicial y de la presencia de Na₂SO₄

Es bien sabido que el pH inicial es el principal factor que afecta la eficiencia tanto de corrosión del ZVI como de la reacción de Fenton, siendo ambas favorecidas a pH ácidos. No obstante, es necesario conocer los límites para nuestro sistema de manera de poder diseñar un reactor que funcione con el menor agregado de ácido posible.

Asimismo, cabe destacar que, aunque es un hecho bien conocido que la presencia de sales tiene un gran impacto sobre las velocidades de corrosión, en el caso de los sistemas Fenton asistidos por ZVI el efecto de la presencia de sales varía de acuerdo a su naturaleza y, aún para una misma sal, su efecto es controvertido. Para limitar la discusión nos enfocaremos en el efecto del Na₂SO₄, que como hemos mencionado en la introducción, es un mordiente muy utilizado en el proceso de tinción y suele estar presente en grandes cantidades en los efluentes textiles.

Se ha demostrado que la velocidad de corrosión es altamente dependiente de la conductividad de la solución debido a su naturaleza electroquímica [54]. En este sentido la presencia de sales debería de aumentar la transferencia de electrones hacia el colorante así como la generación de Fe(II) para catalizar la reacción de Fenton. Por otro lado los aniones pueden afectar la corrosión mediante la generación de complejos solubles/insolubles con los cationes de hierro. En particular, el complejo FeSO_{4(aq)} (K_c=22.9 M⁻¹ [55]) es soluble, por lo que se espera que favorezca la corrosión.

Los resultados obtenidos a partir del estudio de las velocidades de decoloración para los sistemas ZVI/N₂ y ZVI/O₂/H₂O₂ en función del pH, tanto en presencia como en ausencia de Na₂SO₄ se resumen en la Figura 11.

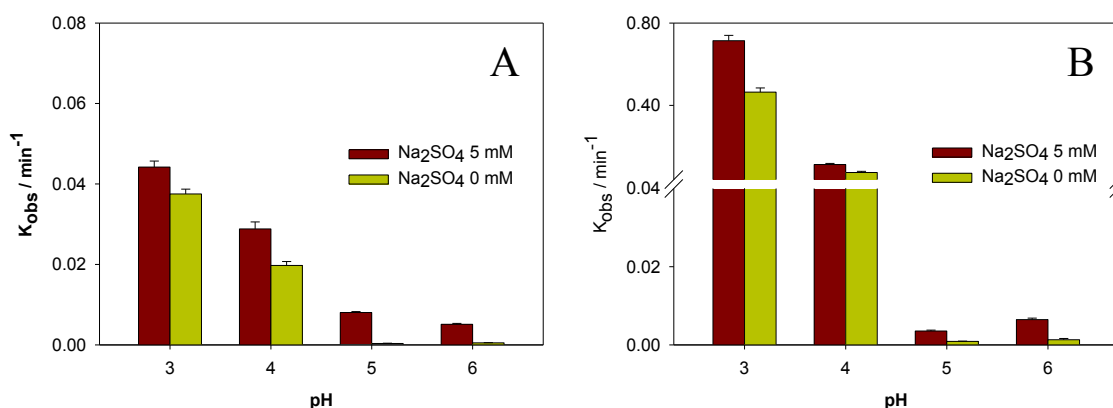


Figura 11: Efecto del Na₂SO₄ en las k_{obs} obtenidos a distintos pH para el sistema ZVI/N₂ (A) y ZVI/O₂/H₂O₂ (B).

Condiciones: [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 1.96 mM, pH_{inicial} = 3.00 - 6.00.

Como puede observarse la decoloración es significativamente más veloz a pH más bajos para ambos sistemas. Esto se debe mayormente a que pH más altos la formación de oxohidróxidos sobre la superficie del ZVI inhibe su capacidad de transferir electrones para reducir el colorante o formar Fe(II) para participar en la Fenton. El sistema ZVI/O₂/H₂O₂ en particular muestra una enorme disminución en la velocidad de más de un orden de

magnitud entre $\text{pH}_{\text{inicial}} = 4.00$ y $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$. Además a $\text{pH}_{\text{inicial}} \geq 5$, la velocidad de reacción se vuelve del orden de la observada para el sistema ZVI/ N_2 .

En cuanto al efecto del Na_2SO_4 en las condiciones estudiadas, se encontró un aumento notable de la velocidad de decoloración debida al agregado de la sal para ambos sistemas a todos los pH. Este efecto es más importante en los sistemas ZVI/ N_2 que en los sistemas ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$. Para confirmar esto se siguieron los perfiles para distintas $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 4.00$. Los resultados se muestran en la Figura 12. Como puede observarse en el sistema ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ un aumento por encima de 5 mM en la concentración de la sal no produce un aumento significativo en la velocidad de decoloración. Por esta razón, se decidió realizar todos los experimentos siguientes utilizando este valor para emular las condiciones de un efluente textil.

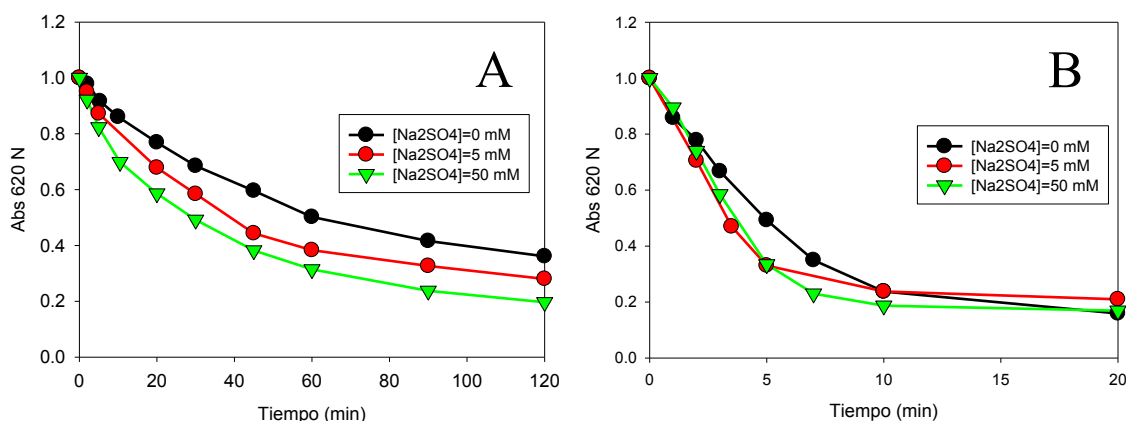


Figura 12: Efecto de la $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ en las cinéticas de decoloración para el sistema ZVI/ N_2 (A) y ZVI/ $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ (B).

Condiciones: $[\text{ZVI}]_0 = 0.20 \text{ g.L}^{-1}$, $[\text{AB1}]_0 = 50 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 0.44 \text{ mM}$, $\text{pH}_{\text{inicial}} = 4.00$.

Para diferenciar si el aumento en las constantes velocidad observadas para ambos sistemas se debía principalmente a la complejación por parte de los SO_4^{2-} o a un aumento en la conductividad de la solución se realizaron cinéticas en presencia de 7.5 mM de NaClO_4 y ajustando el pH con HClO_4 . Tal como se mencionó al final de la sección 2.1.3, el anión ClO_4^- suele utilizarse en los sistemas Fenton para estudios básicos debido a que es cinéticamente inerte y no forma complejos con el hierro. En estas condiciones no se observaron diferencias significativas con los experimentos llevados a cabo en ausencia de Na_2SO_4 , lo que sugiere que el principal efecto del anión SO_4^- consiste en la estabilización del Fe(II) en solución por formación de $\text{FeSO}_4(\text{aq})$, con disolución de los oxohidróxidos ferrosos de la CL [56].

El efecto del anión SO_4^- en los sistemas FAZ no es homogéneo en los estudios publicados sobre el tema. Weng encontró que para sistemas FAZ/ultrasonido el agregado de Na_2SO_4 produce un efecto inhibitorio en la decoloración del Reactive Black 5 [57] y un efecto nulo sobre el Direct Blue 15 [58]. Lo mismo ocurre en sistemas reductivos, donde Fan encontró un efecto inhibitorio para el tratamiento de Methyl Orange con nanopartículas de ZVI [59]. Considerando que se ha reportado que la presencia de iones sulfato afecta tanto los procesos de corrosión [54] como los procesos Tipo-Fenton [60], el efecto final del NaSO_4 sobre la degradación parece depender tanto con las condiciones específicas del sistema utilizado como de la sustancia a tratar.

2.3.3 Efecto de las variables operativas sobre los perfiles de decoloración

Entre las principales variables operativas estudiadas en este tipo de sistemas se encuentran la carga inicial de ZVI utilizado, la concentración inicial de H_2O_2 agregada (para los sistemas ZVI/ O_2 / H_2O_2) y el efecto de la presencia de O_2 .

2.3.3.1 Efecto de la carga de ZVI

La Figura 13 muestra el efecto de la carga de ZVI utilizada sobre la k_{obs} para los sistemas ZVI/ N_2 y ZVI/ O_2 / H_2O_2 . Para todas las cargas utilizadas el sistema oxidativo muestra constantes de velocidad mucho mayores que el sistema reductivo. Además, la decoloración reductiva no alcanza a ser completa (máximo 92 %) incluso con cargas de ZVI de 4 g/L, mientras que en el sistema oxidativo la decoloración es completa para todas las cargas utilizadas. Es importante notar que el incremento en la velocidad de decoloración no es lineal, sino que disminuye conforme aumenta la carga de ZVI, siendo este efecto mucho más importante que en el sistema oxidativo.

Este cambio en la curvatura puede deberse a varios factores. Para el caso de los sistemas ZVI/ N_2 la curvatura puede estar asociada a:

- Un cambio en el paso limitante de reacción desde una limitación por transferencia de masa a bajas dosis, a una limitación por la cinética de reacción a altas dosis [61].
- Una disminución en la reactividad de la superficie como consecuencia de un mayor efecto de la pasivación por el incremento más veloz del pH y de la cantidad de Fe(II) [61].
- Una disminución en el número de sitios reactivos disponibles por gramo como consecuencia de la aglomeración de partículas a altas dosis [62].

En el caso de los sistemas oxidativos, aunque estos factores puedan jugar algún rol, la mayor curvatura observada sugiere que existen otros procesos con más peso. Algunos autores han sugerido [63,64] que la mayor cantidad de Fe(II) formado al aumentar la dosis puede actuar como scavenger de radicales (Reacción 7). Además, es probable que al aumentar la cantidad de ZVI, una mayor proporción del H_2O_2 reaccione con el ZVI (Reacción 9) en lugar de utilizarse para la reacción de Fenton.

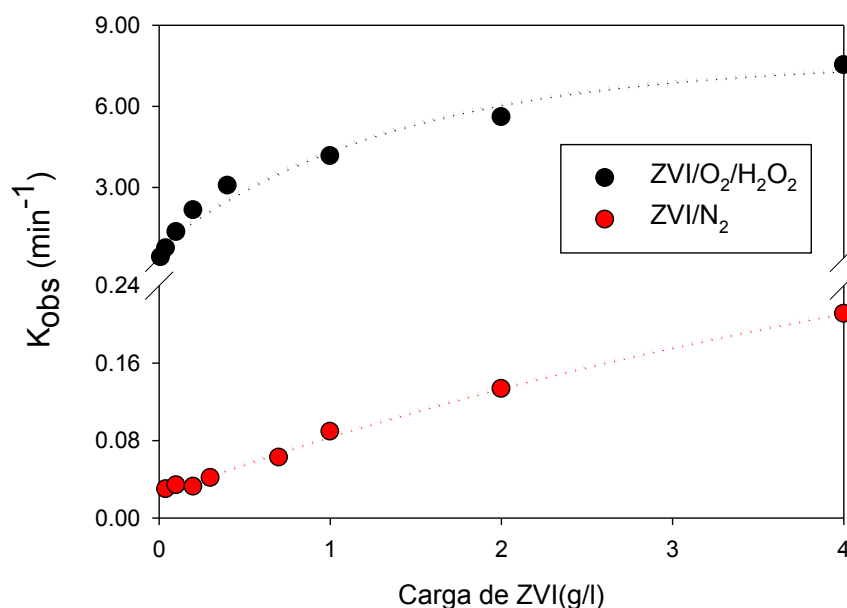


Figura 13: Efecto de la carga del ZVI para los sistemas ZVI/ N_2 y ZVI/ O_2 / H_2O_2 .
 Condiciones: $[\text{AB1}]_0 = 50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 0\text{-}1.96 \text{ mM}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_4]_0 = 5.00 \text{ mM}$, $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$.

En la Figura 14 se muestran las cinéticas de decoloración registradas para 3 cargas de ZVI tanto en el sistema reductor como en el oxidativo de modo de poder compararlos. A $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$ (Figura 14A) el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 es más rápido en todos los casos. Sin embargo, el sistema ZVI/ N_2 con una carga ZVI alta (3.0 g/L) posee una **velocidad inicial de decoloración** que es del mismo orden que la observada para el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 , lo que sugiere que el peso relativo de las vías oxidativas y reductoras depende no sólo de la composición de la fase acuosa sino también de la carga de ZVI utilizada.

Esta cuestión es más notable cuando se trabaja a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$ (Figura 14B) donde la velocidad inicial de decoloración (durante los primeros 20 minutos de reacción) es más rápida para el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 cuando se utilizan cargas bajas (0.05 g/L), similar en ambos sistemas para cargas de ZVI medias (0.2 g/L) y más rápida para el sistema ZVI/ N_2 a cargas altas (3.0 g/L). Nótese que a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$, incluso a tiempos largos el grado de decoloración alcanzado por el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 nunca supera al alcanzado por sistema ZVI/ N_2 a esa misma carga de ZVI.

Estos últimos resultados son de particular relevancia porque muestran el efecto perjudicial de la presencia de oxidantes para sistemas de tratamientos operados a pHs cercanos a la neutralidad.

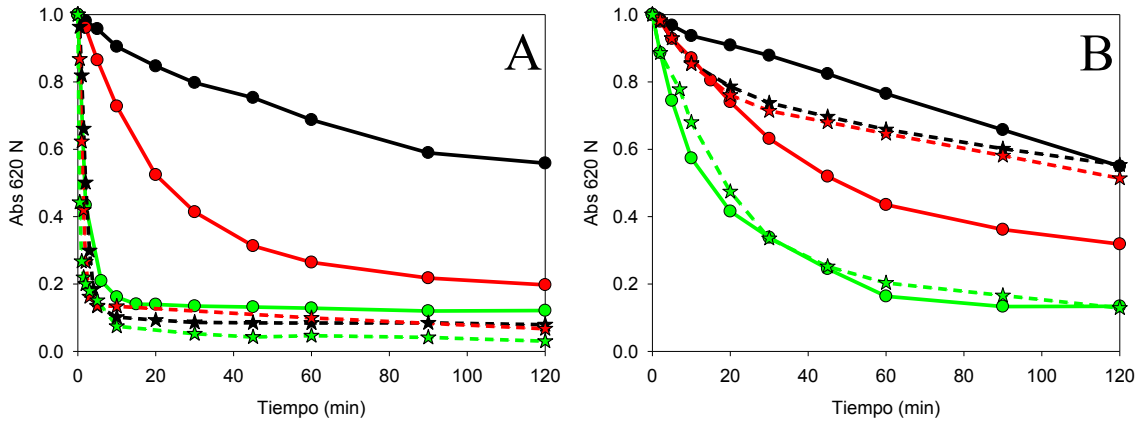


Figura 14: Cinéticas llevadas a cabo a distintas cargas de ZVI en los sistemas ZVI/N₂ y ZVI/O₂/H₂O₂ a pH_{inicial} = 3.00 (A) y pH_{inicial} = 5.00 (B).

Las líneas negras, rojas y verdes corresponden a cargas de 0.05, 0.2 y 3.0 g/L respectivamente. Las líneas continuas con círculos corresponden al sistema ZVI/N₂ y las punteadas con estrellas al sistema ZVI/O₂/H₂O₂.

Condiciones: [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 0.44 mM, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM.

2.3.3.2 Efecto del H₂O₂ en los sistemas ZVI/O₂/H₂O₂

Cuando se trabaja a pH_{inicial} = 3.00 la cantidad de H₂O₂ agregada tiene un efecto secundario sobre la velocidad de la reacción, lo que sugiere que la producción de Fe(II) es el paso limitante del proceso y no la reacción de Fenton. Igualmente, si la concentración de H₂O₂ es demasiado baja, como por ejemplo cuando se usa una concentración de 0.44 mM, la cantidad de OH[•] generados no es la suficiente para alcanzar la completa decoloración de la solución por lo que se alcanza un plateau una vez que toda el H₂O₂ es consumida. A pH_{inicial} = 5.00, los grados de decoloración alcanzados son bajos para todas las concentraciones de H₂O₂ utilizadas y se observan pocas diferencias en los perfiles cinéticos de decoloración al aumentar la concentración de peróxido de 0.00 a 8.00 mM. Los resultados del efecto de la concentración de H₂O₂ sobre las cinéticas de decoloración se muestran en la Figura 15. Es necesario señalar que el sistema etiquetado como ZVI/O₂/H₂O₂ con [H₂O₂] = 0.00 mM es distinto al sistema ZVI/N₂, debido a que el primero fue realizado sin burbujeo de N₂, por lo que existe O₂ disuelto en el medio.

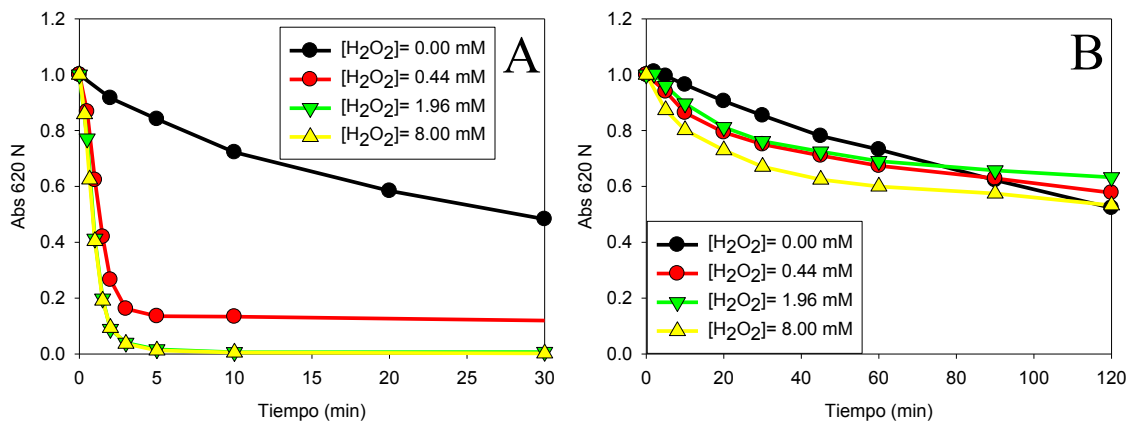


Figura 15: Efecto de la concentración de H₂O₂ utilizada para el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ a pH_{inicial} = 3.00 (A) y pH_{inicial} = 5.00 (B).

Condiciones: [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 0-8 mM, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM. Temp 24 ± 2°C.

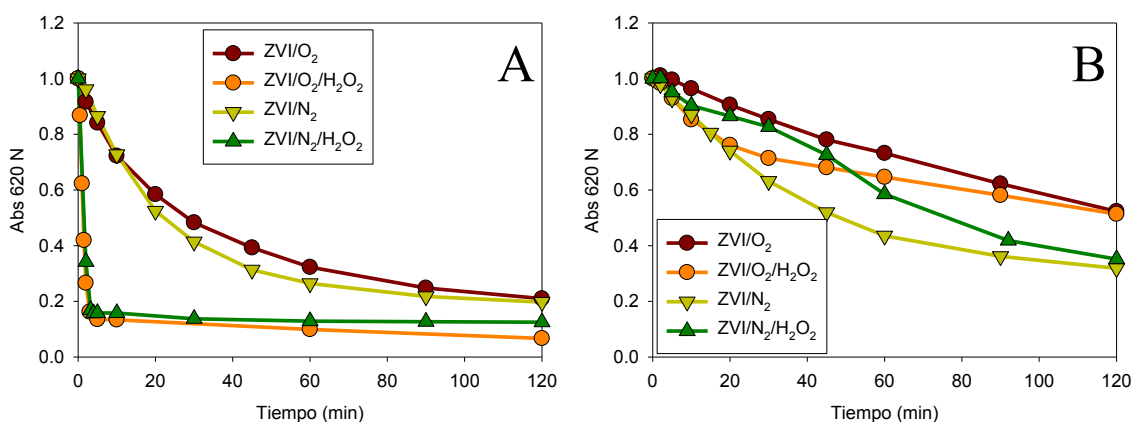
2.3.3.3 Efecto de la presencia de O₂

El sistema oxidativo difiere del reductivo en que posee dos oxidantes en el medio: el O₂ disuelto y el H₂O₂ agregada. Para diferenciar que rol cumple cada uno de los oxidantes se hicieron cinéticas en 4 condiciones distintas:

- I. **Sistema ZVI/N₂:** Sistema purgado de O₂ mediante el burbujeo con N₂
- II. **Sistema ZVI/N₂/H₂O₂:** Igual sistema ZVI/N₂, pero con el agregado de H₂O₂ antes del agregado de ZVI.
- III. **Sistema ZVI/O₂:** Sistema abierto al atmósfera donde no se ha realizado el burbujeo con N₂. Debido a su contacto con la atmósfera el sistema posee una concentración de O₂ disuelto de 0.25 mM.
- IV. **Sistema ZVI/O₂/H₂O₂:** Igual al sistema ZVI/O₂, pero con el agregado de H₂O₂ antes del agregado de ZVI.

Los resultados se muestran en la Figura 16. Como puede observarse, en ausencia de H₂O₂ la presencia de O₂ produce una disminución en la velocidad de decoloración a ambos valores de pH_{inicial}, lo que sugiere que su contribución a la oxidación a través de la generación in situ de H₂O₂ (Reacción 14) es mínima y que la presencia de O₂ actúa inhibiendo la reducción del AB1. Este último efecto puede deberse a una competencia entre el O₂ y el AB1 por los electrones provenientes del ZVI, o a que la presencia de O₂ genere una mayor cantidad de óxidos férricos que lleven a una disminución de la reactividad de la superficie del ZVI (pasivación) [65].

Cuando se utiliza H₂O₂, la presencia de O₂ no tiene ningún efecto notable en la degradación de AB1 a pH_{inicial} = 3.00. A pH_{inicial} = 5.00 el O₂ parecería tener cierta sinergia con el H₂O₂ en los primeros estadios de la cinética debido a que se observa una mayor decoloración en el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ con respecto al sistema ZVI/N₂/H₂O₂ en los primeros 45 minutos de reacción. Esto sugeriría que el O₂ favorece los procesos Fenton en estos sistemas. A tiempos más largos, el comportamiento se invierte, y se observa una mayor degradación en el sistema ZVI/N₂/H₂O₂. Luego de los 45 minutos, la depleción del H₂O₂ hace que los procesos oxidativos pierdan peso y son los procesos reductivos la principal fuente de degradación, los cuales se ven inhibidos por la presencia de O₂.



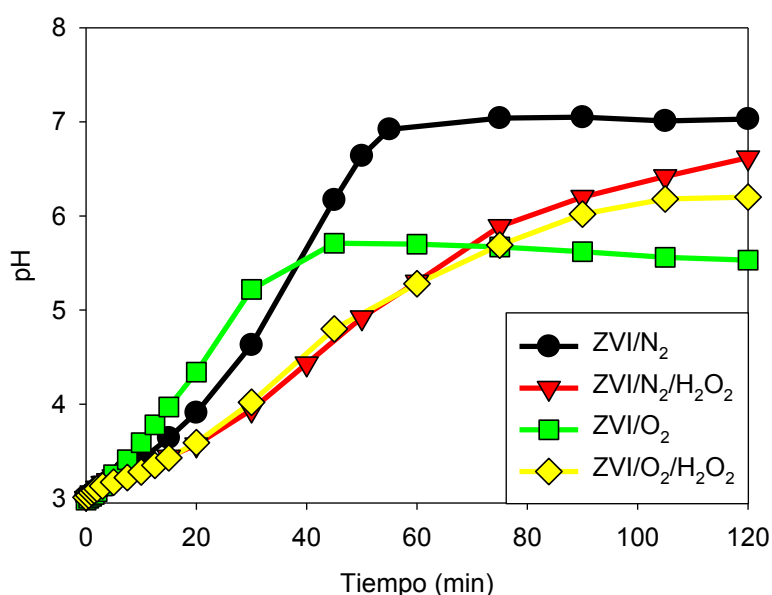
**Figura 16: Efecto de la de la presencia de O₂ a pH_{inicial} = 3.00 (A) y pH_{inicial} = 5.00 (B).
Condiciones: [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 0-0.44 mM, [Na₂SO₄]₀ = 5.00mM.
Temp 26 ± 1°C.**

2.3.4 Perfiles de pH y su influencia sobre los perfiles de hierro en solución

2.3.4.1 Efecto de la presencia de oxidantes a un pH inicial de 3.00

En la introducción a este capítulo (Sección 2.1.3) hemos mencionado que en presencia de ZVI existe un cambio en el pH de la solución. El comportamiento del pH es de particular relevancia teniendo en cuenta que es un factor que afecta de manera muy significativa tanto a los procesos reductivos como oxidativos, como se vio en la sección 2.3.2. Este hecho está directamente relacionado con la dependencia de la estabilidad del Fe(II) y el Fe(III) con el pH.

Para estudiar en detalle cuál es la influencia de la presencia de oxidantes (O_2 , H_2O_2) en la evolución del pH se estudiaron sus perfiles en 4 sistemas: ZVI/ N_2 , ZVI/ N_2/H_2O_2 , ZVI/ O_2 y ZVI/ O_2/H_2O_2 . Los perfiles de pH obtenidos a partir de una solución preparada con un pH inicial de 3.00 se muestran en la Figura 17.



**Figura 17: Efecto de la de la presencia de O_2 y de H_2O_2 sobre los perfiles de pH a $pH_{inicial} = 3.00$.
 $[ZVI]_0 = 0.20 \text{ g.L}^{-1}$, $[AB1]_0 = 50 \text{ mg.L}^{-1}$, $[H_2O_2]_0 = 0-1.96 \text{ mM}$, $[Na_2SO_4]_0 = 5.00 \text{ mM}$,
 Temp $26 \pm 1^\circ\text{C}$.**

Al comparar el sistema ZVI/ O_2 con el sistema ZVI/ N_2 , puede observarse que la presencia de O_2 produce un aumento en la velocidad inicial de consumo de H^+ (< 40 min) como consecuencia de que otorga una vía adicional de corrosión: la oxidación de ZVI por O_2 . La comparación entre estos sistemas muestra que la corrosión del ZVI mediada por el O_2 contribuye de forma significativa a las tasas de corrosión observadas. Los perfiles iniciales de pH están fuertemente influidos por la presencia de aire ($[O_2] = 0.25 \text{ mM}$), ya que durante los primeros 20 minutos de reacción se observan incrementos de 1.27 y 0.90 unidades de pH en presencia (ZVI/ O_2) y en ausencia del mismo (ZVI/ N_2), respectivamente.

Luego de los 45 minutos, el pH del sistema ZVI/ O_2 se estabiliza a un valor estacionario de aproximadamente 5.6, mientras que en el sistema ZVI/ N_2 el pH continua aumentando al alcanzar un valor de aproximadamente 7. En ambos sistemas, la presencia de H_2O_2 produce una disminución en el incremento inicial del pH, sin alcanzarse a llegar a un estado estacionario en las escalas de tiempo estudiadas. El valor de pH estacionario

que se alcanza no es del todo estable, y tiende a disminuir con una pendiente leve a tiempos largos.

La explicación de la distinta evolución de pH en los sistemas puede obtenerse a partir del estudio de los perfiles de Fe(II), Fe(III) y Fe_{Total} (Fe(II)+Fe(III)) (Figura 18).

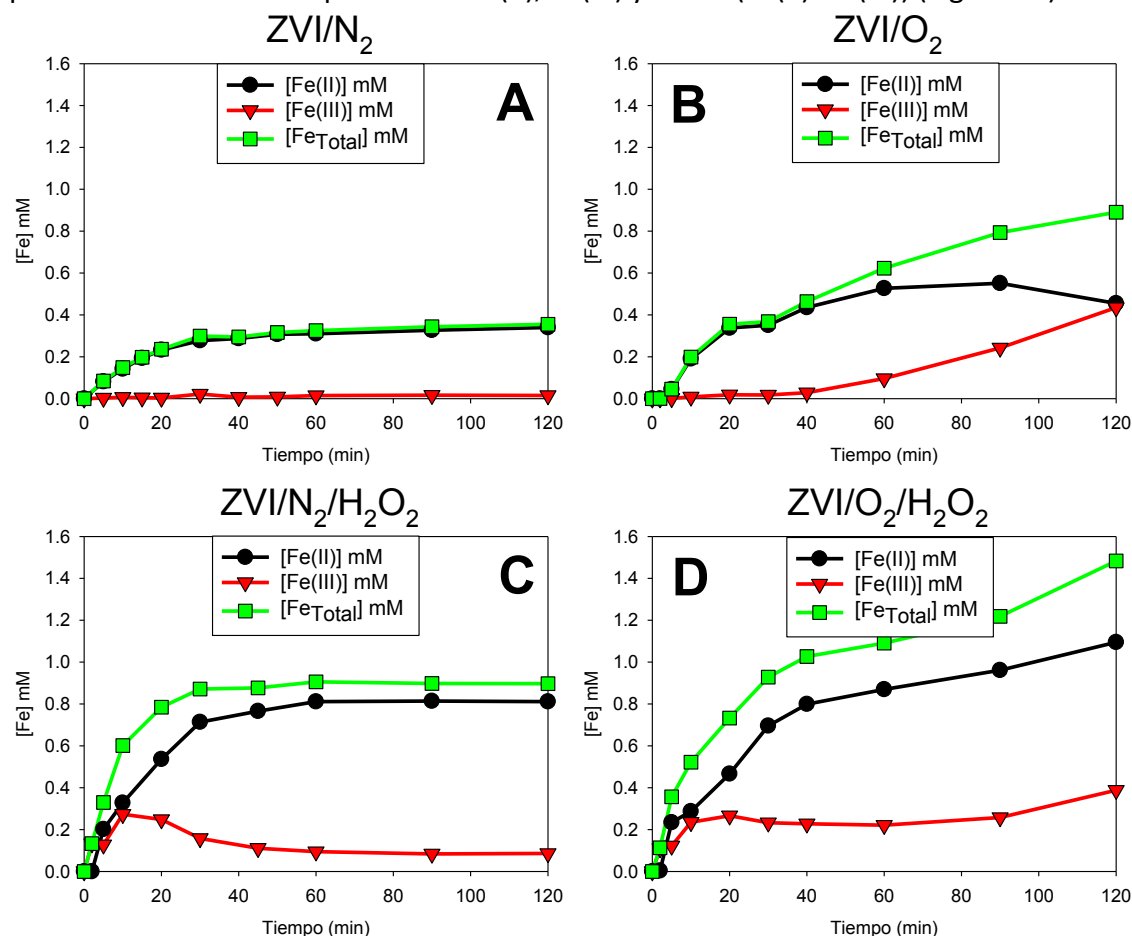


Figura 18: Efecto de la de la presencia de O₂ y de H₂O₂ sobre los perfiles de hierro a pH_{inicial} = 3.00. [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 0 - 1.96 mM, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM, Temp 26 ± 1 °C.

La corrosión del ZVI mediada por H⁺ produce en primer término Fe(II). En ausencia de oxidantes más fuertes (como O₂ o H₂O₂) el Fe(II) es el único estado de valencia del hierro que se encuentra en el bulk, como se observa en el sistema ZVI/N₂ (Figura 18 A). Nótese que independientemente del sistema, todos los sistemas donde se parte de un pH inicial de 3.00 poseen cantidades importantes (> 0.3 mM) de Fe(II). Esto es una cuestión que tiene importantes consecuencias en la degradación observada en sistemas oxidativos, como se discutirá más adelante

Si comparamos los perfiles de hierro entre los sistemas ZVI/N₂ y ZVI/O₂ (Figura 18 A y B), se puede corroborar que el mayor aumento de pH en los primeros 40 minutos de reacción en presencia de O₂ es consecuencia de un aumento en la corrosión, evidenciado como una mayor cantidad de hierro total en solución. La presencia de H₂O₂ (Figura 18 C y D) también produce un aumento en la corrosión debido su capacidad de oxidar al ZVI (Reacción 5).

Como discutimos anteriormente, la oxidación del Fe(II) por parte del O₂ tiene una dependencia cuadrática con la [OH⁻] y es depreciable por debajo de pH 5. Como consecuencia de esto, el sistema ZVI/O₂ posee cantidades despreciables de Fe(III) (<0.03

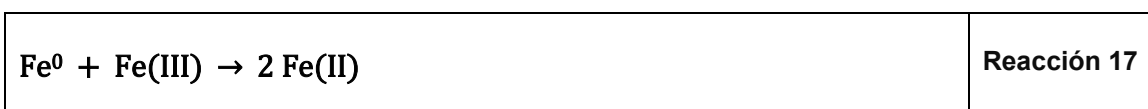
mM) durante los primeros 40 minutos de reacción. Luego de este tiempo, el aumento del pH hasta un valor de 5.6 tiene como consecuencia que la oxidación del Fe(II) por parte del O₂ comience a pesar, lo que se evidencia como un aumento del Fe(III) medido a expensas del Fe(II) a tiempos superiores a los 40 minutos. Esta oxidación del Fe(II) a Fe(III) consume un H⁺ adicional.

El Fe(III) generado es rápidamente hidrolizado para generar Fe(OH)⁺, Fe(OH)²⁺ y Fe(OH)₃, siendo este último el mayoritario a pH 5 o superiores. El Fe(OH)₃ tiende a deshidratarse y formar oxohidróxidos que precipitan sobre la superficie del hierro, disminuyendo su reactividad. Cuando el producto final es Fe(OH)₃, los 2 H⁺ consumidos durante la oxidación del ZVI y el H⁺ extra generado durante la oxidación del Fe(II) son compensados por los 3 H⁺ generados durante la hidrólisis del Fe(III). Esto tiene como consecuencia que el pH deje de incrementar y se estabilice en un valor estacionario de 5.6. Hablamos de estado estacionario porque no involucra que la corrosión se haya frenado totalmente por la pasivación (como puede observarse en el continuo aumento del Fe total en el sistema ZVI/O₂), sino que existe una compensación entre los protones consumidos durante la corrosión y los generados por la hidrólisis.

En el caso del sistema ZVI/N₂ la situación es similar, pero con la diferencia de que el aumento del pH es mayor, y alcanza valores suficientemente elevados (pH > 7) para que se produzca la hidrólisis del Fe(II) para formar Fe(OH)⁺ y Fe(OH)₂. Como consecuencia el pH alcanza un nuevo estado estacionario, pero en un valor más alto (cercano a 7). Tampoco puede descartarse de que las mínimas cantidades de O₂ presente a pesar de la purga con N₂, contribuyan a este estancamiento del pH mediante la formación de Fe(III).

En cambio, la oxidación de Fe(II) por parte del H₂O₂ (a través de la reacción de Fenton) tiene poca dependencia con el pH y por lo tanto comienza a ocurrir desde un principio. Esto se evidencia con la generación de Fe(III) en los sistemas donde el H₂O₂ está presente (Figura 18 C y D) durante los primeros 10 minutos de reacción. Este tiempo es el que tarda en consumirse el H₂O₂ en estas condiciones. La generación de Fe(III) y su posterior hidrólisis a Fe(OH)₃, es la responsable de que el aumento de pH inicial sea menor en los sistemas donde el H₂O₂ está presente.

Luego de los 20 minutos, en ambos sistemas se ve una disminución del Fe(III) en solución, compensado con un mayor aumento del Fe(II). Esto puede explicarse a través de la reducción del Fe(III) por parte ZVI a través de la Reacción 17.



En el sistema ZVI/O₂/H₂O₂, la oxidación del Fe(II) por parte del O₂ comienzan a pesar cuando el pH supera el valor de 5.6. Este valor se alcanza a tiempos mayores en el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ (75 minutos) que en el sistema ZVI/O₂ (40 minutos), como consecuencia del incremento más lento del pH provocada por el H₂O₂.

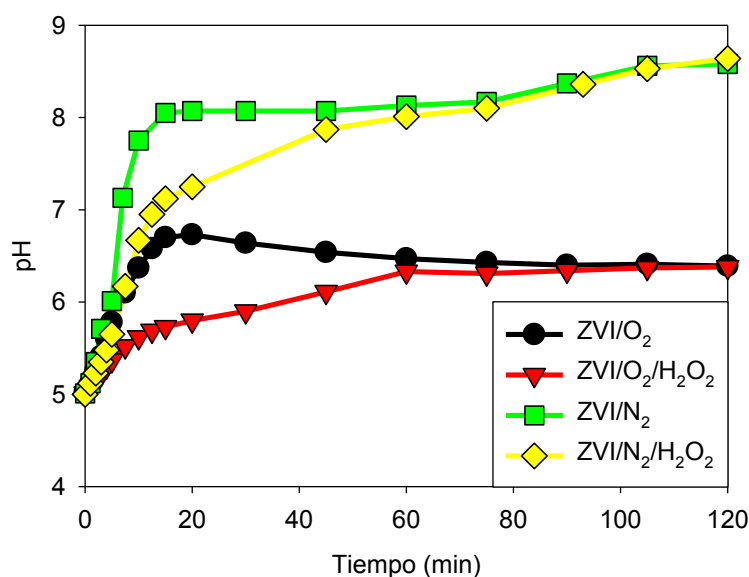
En los sistemas que poseen H₂O₂ el pH estacionario no se alcanza dentro de los 120 minutos estudiados en la Figura 17, pero si a tiempos mayores. El valor del pH estacionario es mayor cuando el H₂O₂ está presente, debido a que la oxidación del ZVI por parte del H₂O₂ genera una capa de corrosión más porosa que mantiene la superficie del ZVI más reactiva aún a pHs donde la capa de corrosión es importante [66].

El uso de cantidades menores de H₂O₂ (0.44 mM) en los sistemas ZVI/N₂/H₂O₂ y ZVI/O₂/H₂O₂ presenta una situación intermedia, con un crecimiento inicial de pH

intermedio entre los sistemas donde no se ha agregado H_2O_2 , y el obtenido en los sistemas que poseen una concentración inicial de H_2O_2 de 1.96 mM. El estado estacionario en presencia de H_2O_2 se alcanza dentro de los 120 minutos, a un valor de pH algo superior a los obtenidos de los sistemas que no la poseen (7.8 para el sistema ZVI/ N_2 / H_2O_2 y 5.7 para el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2), como consecuencia del efecto depasivante de la oxidación del ZVI con H_2O_2 . Para simplificar la lectura de los gráficos, las curvas con $[H_2O_2] = 0.44$ mM no fueron incluidas en la Figura 17.

2.3.4.2 Efecto de la presencia de oxidantes a un pH inicial de 5.00

Si se estudia el mismo sistema pero comenzando a un pH inicial de 5.00, los procesos que ocurren son los mismos, con la diferencia de que el O_2 es capaz de oxidar al Fe(II) desde los primeros momentos, generando Fe(III) capaz de hidrolizarse a $Fe(OH)_3$. Este efecto en la generación e hidrólisis del Fe(III) por el O_2 sobre el pH es más importante que el debido al aumento en la corrosión mediada por O_2 . Como consecuencia, la presencia de O_2 provoca un incremento inicial del pH más lento que el que se obtiene en los sistemas en los que se ha purgado con N_2 . Los perfiles de pH obtenidos utilizando un pH inicial de 5.00 se muestran en la Figura 19.



**Figura 19: Efecto de la de la presencia de O_2 y de H_2O_2 sobre los perfiles de pH a $pH_{inicial} = 5.00$.
 $[ZVI]_0 = 0.20$ g.L⁻¹, $[AB1]_0 = 50$ mg.L⁻¹, $[H_2O_2]_0 = 0-0.44$ mM, $[Na_2SO_4]_0 = 5.00$ mM,
 Temp $26 \pm 1^\circ C$**

En la Figura 20 se muestran los perfiles de hierro para el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 operado a pH inicial de 5.00. A diferencia de lo observado cuando la cinética se realizaba con un pH inicial de 3.00, cuando se comienza a un pH inicial de 5.00 no se observan cantidades detectables de Fe(II) ($[Fe(II)] < 0.01$ mM) y la mayor parte del hierro que se encuentra en el bulk está como Fe(III).

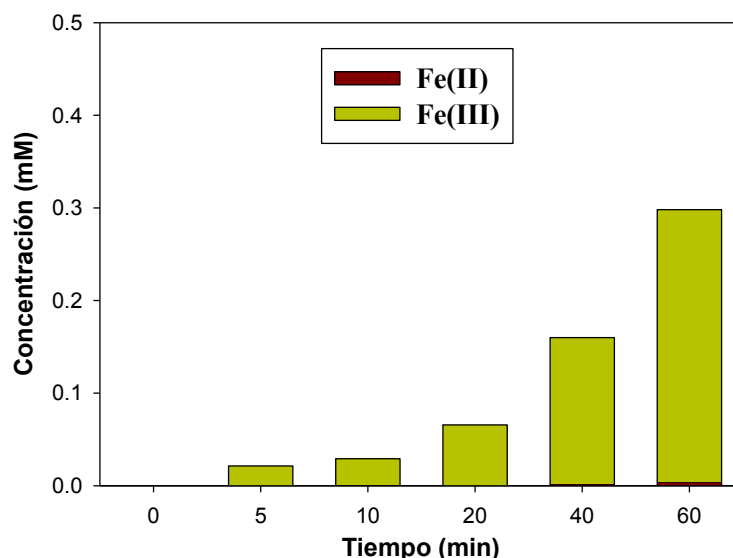


Figura 20: Perfiles de hierro obtenidos para el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ obtenidos a partir de una solución de pH_{inicial} = 5.00. [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 0.44 mM, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM, Temp 26 ± 1°C

Ahora bien, las reacciones de corrosión en los sistemas estudiados, tanto la corrosión mediada por H⁺ (Reacción 3), O₂ (Reacción 4) u H₂O₂ (Reacción 5) descritas en la sección 2.1.3, postulan la generación de Fe(II). No obstante cuando trabajamos a un pH_{inicial} = 5.00, a pesar de que observamos corrosión, no detectamos niveles apreciables de Fe(II) en el bulk. Esto puede deberse a la contribución de 2 fenómenos:

- I. A este pH la capa de corrosión de la superficie del ZVI es menos permeable e impide que el Fe(II) generado difunda desde la superficie del ZVI, por lo que queda en las partículas como Fe(II)_{CL}.
- II. Por otro lado, el alto pH local y el mayor poder reductor del Fe(II)_{CL} (aquel Fe(II) que se encuentra asociado a la capa de corrosión) favorecen la oxidación del Fe(II) por parte del O₂ (Reacción 1), generando Fe(III) que es el estado de oxidación mayoritario observado en la Figura 20.

La limitada disponibilidad de Fe(II) a este pH es lo que limita la oxidación del contaminante a través de la reacción de Fenton y es una cuestión clave en la efectividad de los sistemas Fenton asistidos por ZVI al trabajar a estos pHs. Volveremos sobre esto en las secciones siguientes.

2.3.4.3 Efecto de la carga de ZVI sobre la evolución del pH

Para profundizar sobre el entendimiento de los factores que afectan la evolución del pH, se siguieron los perfiles de pH obtenidos para distintas cargas de ZVI en los sistemas ZVI/N₂ y ZVI/O₂/H₂O₂. Los resultados obtenidos al trabajar con un pH inicial de 3.00 y un pH inicial de 5.00 se muestran en la Figura 21.

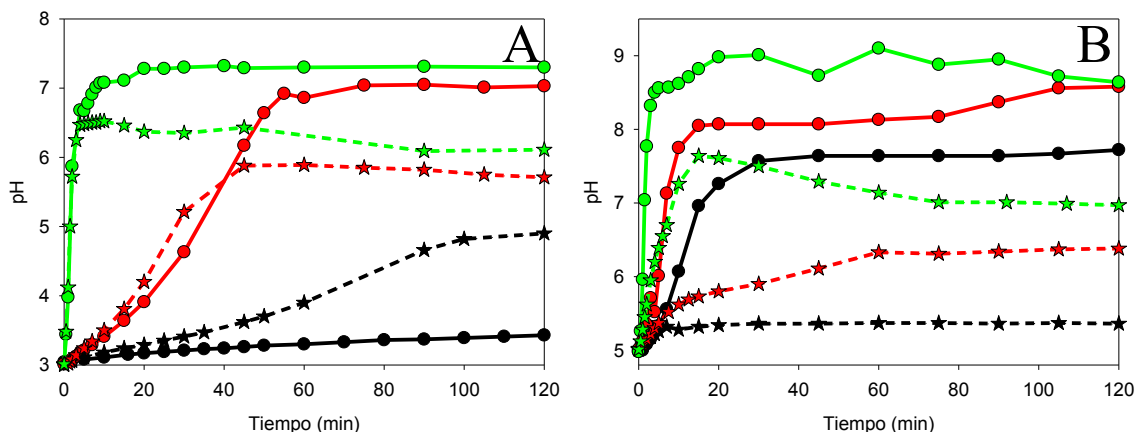


Figura 21: Evolución del pH de la solución en los sistemas ZVI/N₂ y ZVI/O₂/H₂O₂ para distintas cargas de ZVI a pH_{inicial} = 3.00 (A) y pH_{inicial} = 5.00 (B). Condiciones: [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 0.44 mM, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM. Las líneas continuas con círculos corresponden al sistema ZVI/N₂, mientras que las punteadas con estrellas corresponden al sistema ZVI/H₂O₂. En negro, rojo y verde se muestran las cargas de ZVI de 0.05, 0.20 y 3.00 g/L respectivamente.

Puede observarse que para todos los casos, cuanto mayor es la carga de ZVI utilizada mayor es el aumento inicial de pH como consecuencia de la mayor corrosión resultante de una mayor área expuesta de ZVI. Este aumento en la corrosión también se ve reflejado en el pH final o estacionario alcanzado por el sistema. El pH estacionario es consecuencia de la igualdad entre los procesos de corrosión (que aumentan el pH) y los procesos de hidrólisis de las especies de Fe(II)/Fe(III) (que tienden a disminuirlo). Si el proceso de corrosión se ve favorecido por un aumento en la carga de ZVI, mayor será el pH estacionario alcanzado por el sistema. Para el caso especial de la carga más baja (0.05 g/L) con un pH inicial de 3.00, el pH se mantiene por debajo de 5 tanto para el sistema ZVI/N₂ como para el ZVI/O₂/H₂O₂ durante el tiempo estudiado. Como consecuencia, la oxidación del Fe(II) por el O₂ nunca alcanza a ser importante, la hidrólisis nunca llega a compensar la corrosión y, por ende, el pH estacionario nunca se observa.

Al trabajar a un pH inicial de 3.00 utilizando una [H₂O₂] de 0.44 mM, el aumento de pH como consecuencia del aumento de corrosión por la presencia de oxidantes es el proceso que domina los perfiles de pH. El efecto del pH de la hidrólisis del Fe(III) producido por oxidación del Fe(II) en presencia de H₂O₂ es de menor importancia. Como consecuencia de esto, el pH aumenta más rápidamente en el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ que en el sistema ZVI/N₂. Esta diferencia es mucho más notoria cuanto menor sea la carga de ZVI. De hecho, para la carga de ZVI más alta (3.00 g/L) la diferencia entre ambos sistemas no llega a apreciarse claramente. Esto se debe que, debido a que la cantidad de oxidantes fuertes (O₂ y H₂O₂) en el medio es limitada, a altas cargas de ZVI serán los H⁺ los principales aceptores de electrones. Dicho de otra manera, cuanto mayor sea la carga de ZVI, el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ tendrá un comportamiento en sus perfiles de pH más similar al sistema ZVI/N₂.

Esta similitud en los perfiles de pH obtenidos para ambos sistemas al aumentar la carga de ZVI también se observa al trabajar a pH inicial 5 (Figura 21 B). Como fue expuesto anteriormente, a este pH inicial el O₂ contribuye a la oxidación de Fe(II) (y por ende al proceso de hidrólisis del Fe(III)) desde un comienzo y, por lo tanto, el aumento de pH es más lento en el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ que para el sistema ZVI/N₂ para todas las cargas ensayadas.

2.3.4.4 Interpretación de los perfiles de pH

Resumiendo los resultados de la sección 2.3.4, el cambio de pH observado es consecuencia de la interacción entre dos procesos contrapuestos: la corrosión del ZVI que consume H^+ , y la hidrólisis del Fe(II)/Fe(III) que libera H^+ . Debido a que el Fe(III) se hidroliza a pH más bajos que el Fe(II), la oxidación de Fe(II) a Fe(III) favorecerá la hidrólisis y la liberación de H^+ . De esta manera los procesos que favorecen la corrosión (vías adicionales de corrosión, mayor permeabilidad de la capa de corrosión, mayor carga de ZVI) favorecerán un aumento del pH, mientras que aquellos procesos que favorezcan la oxidación del Fe(II) (presencia de H_2O_2 a cualquier pH, presencia de O_2 a $pH > 5$) favorecerán una disminución del pH. Si estos procesos llegan a un punto de compensación, se alcanza un estado estacionario.

Como mencionamos en la sección 2.3.4.1, el estado estacionario tiene una leve pendiente negativa. Esto se debe a que el consumo de ZVI durante la corrosión hace que el proceso de corrosión vaya perdiendo peso con el tiempo, por lo que el valor estacionario entre corrosión e hidrólisis se alcanza a valores más bajos de pH. Para apoyar esta hipótesis, se realizó un ensayo en el cual a un sistema ZVI/ N_2 con una carga de 0.2 g/L se lo dejó funcionar durante 120 minutos de reacción. En estas condiciones el sistema alcanzó un pH estacionario de 7.0. Posteriormente se interrumpió el burbujeo de N_2 y se dejó al sistema en contacto con la atmósfera bajo agitación. Al encontrarse en contacto con el aire, se observó una rápida disminución del pH hasta un valor de 5.8. Luego de transcurridos 10 minutos el pH se estabilizó, presentando una muy ligera pendiente negativa, exactamente el mismo comportamiento que el observado para el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 . Transcurridas 17 horas en estas condiciones, la mayor parte del ZVI se ha oxidado, y se alcanzó un pH final de 4.7.

Si en cambio se separa el ZVI sólido y se pone al sistema en contacto con el aire, el pH desciende rápidamente hasta un valor de aproximadamente 4.7. El pH alcanzado es el mismo ya que es aproximadamente el valor de equilibrio del sistema cuando no existe una fuente de corrosión que lo aumente, pero se alcanza de forma más rápida porque no es necesario esperar a que se consuma todo el ZVI.

En la sección 2.3.4 se realizó una interpretación completa de los perfiles de pH en el tiempo frente a distintas condiciones, y como la evolución del pH se ve reflejada en los perfiles de hierro. Como mencionamos anteriormente, estos perfiles de hierro son de suma relevancia debido a que condicionan la disponibilidad del Fe(II) necesario para que la reacción de Fenton se lleve a cabo.

Comportamientos similares de aumento de pH en presencia de ZVI fueron reportados para la degradación de alizarina roja en un sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 con irradiación UV [67]. Sin embargo, hasta donde sabemos, no se había realizada antes un seguimiento detallado de los perfiles de pH ni una discusión en detalle del efecto de las distintas especies de hierro involucradas en función del pH inicial de la solución.

2.3.5 Perfiles de H_2O_2 en el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2

Para profundizar en los conocimientos se siguieron los perfiles de H_2O_2 del sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 a $pH_{inicial} = 3.00$, donde el sistema mostraba una buena velocidad de degradación, y a $pH_{inicial} = 5.00$ donde la decoloración era muy lenta. Los perfiles se muestran en la Figura 22, junto con los perfiles de decoloración a modo comparativo.

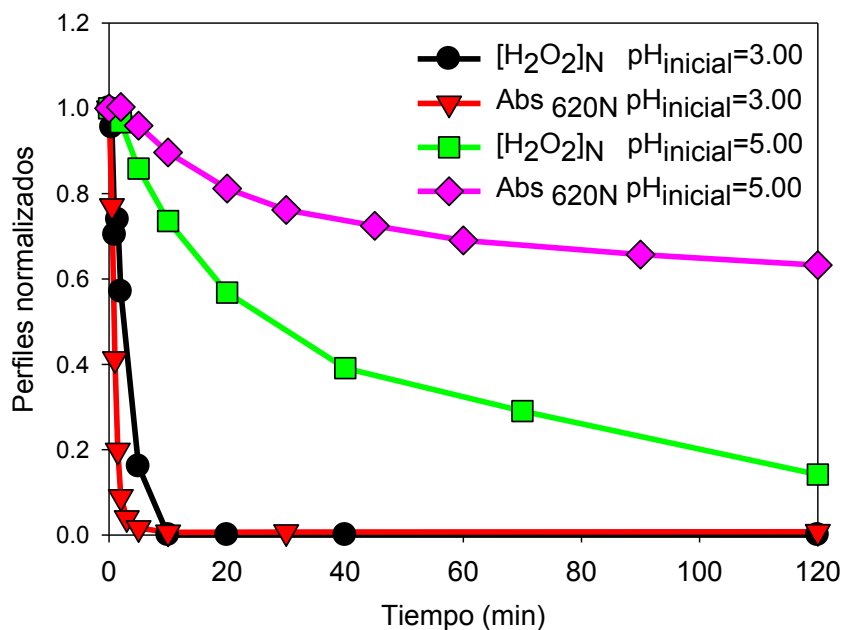


Figura 22: Perfiles cinéticos de consumo de H₂O₂ y de decoloración para el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ a pH_{inicial} de 3.00 y 5.00.
 Condiciones: [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM, [H₂O₂]₀ = 1.96 mM.

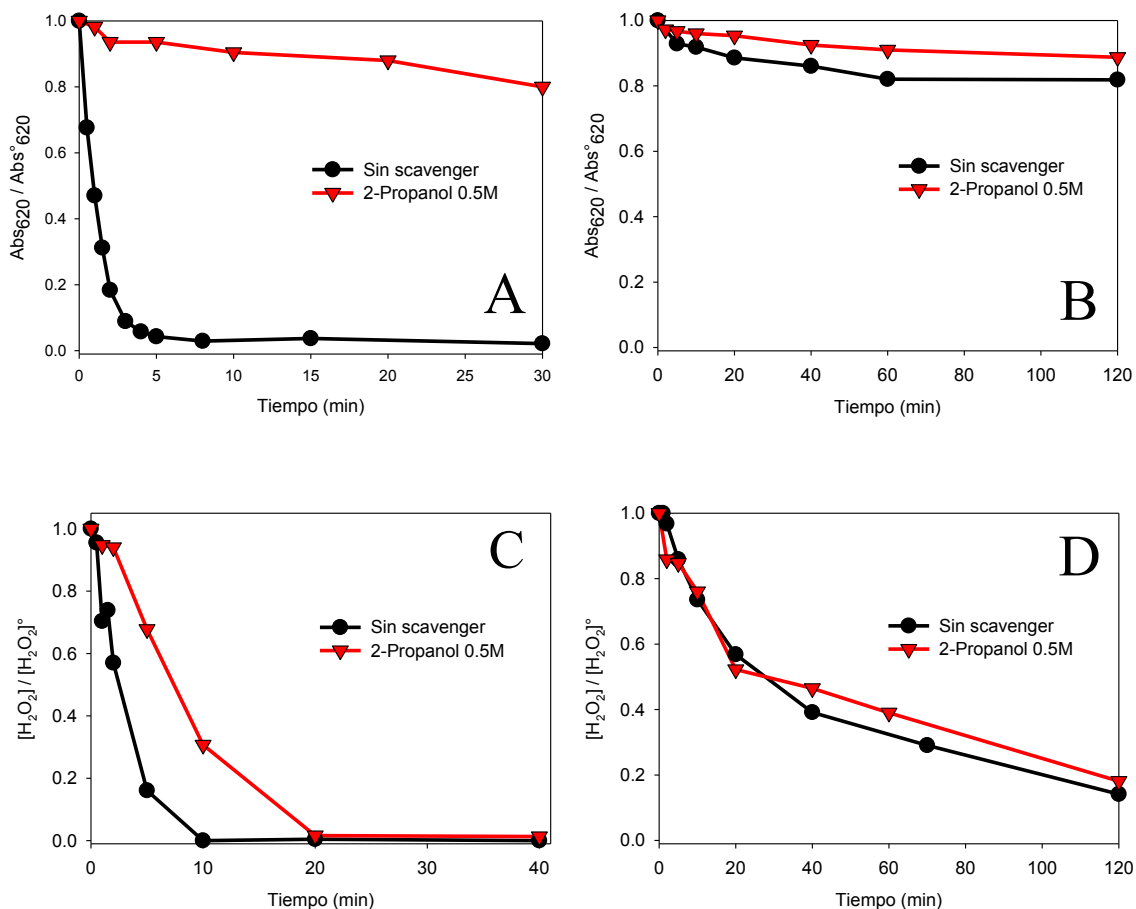
A pH_{inicial} = 3.00 el H₂O₂ se consume completamente en los primeros 10 minutos de reacción, logrando una completa decoloración de la solución. A pH_{inicial} = 5.00 el H₂O₂ tiene un decaimiento más lento, pero a pesar de haberse consumido más del 85 % en 120 minutos de reacción, no se observa un grado similar de decoloración. Más aún, tal como se sugirió en la sección 2.3.2, la disminución en la Abs₆₂₀ observada es del orden de la encontrada en los sistemas ZVI/N₂, por lo que podría ser atribuida a fenómenos no oxidativos.

Esta disociación entre los perfiles de H₂O₂ y de decoloración a pH 5 implica que existe una vía importante de consumo de oxidante que no conlleva la oxidación de AB1 a través de la reacción de Fenton. Esta cuestión es de gran importancia ya que limita la eficiencia de los sistemas FAZ a valores de pH alejados del óptimo para los procesos tipo Fenton, y será uno de los centros de atención en las siguientes secciones.

Para poder realizar un análisis más profundo sobre la relación entre el pH inicial de la solución, la degradación del AB1 y los perfiles de H₂O₂ observados, se realizó una serie de experimentos en presencia de aditivos complejantes de especies de hierro, O-Fenantrolina (OFen) y EDTA, y de scavengers de especies reactivas (2-propanol y DMSO).

2.3.6 Experimentos en presencia de 2-Propanol y dimetilsulfóxido

El 2-propanol es usualmente considerado como un scavenger selectivo del radical HO• y suele agregarse como aditivo para discriminar la degradación mediada por éste de la de otro tipo de especies reactivas [68]. Estos experimentos fueron realizados utilizando el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ ya descrito pero agregando a la solución 2-propanol en una concentración de 0.5 M; los resultados se muestran en la Figura 23.



**Figura 23: Perfiles de decoloración y de consumo de H₂O₂ en el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ a pH=3.00 (A y C) y pH=5.00 (B y D).
 Condiciones: [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 1.96 mM, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM, [2-propanol] = 0.5 M, ZVI₀ = 0.20 g.L⁻¹**

Como se discutió anteriormente, la presencia de O₂ y H₂O₂ afectan notablemente el proceso de corrosión, influyendo entre otras cosas en los perfiles de hierro y la evolución del pH. Debido a esto no puede estimarse el peso relativo de las vías reductivas y oxidativas de decoloración en un sistema FAZ comparando los ensayos en presencia y ausencia de oxidantes, sino que es necesario trabajar con un sistema donde los oxidantes estén presentes, pero que estos sean incapaces de oxidar al contaminante. El uso de scavengers puede ser de utilidad para este fin.

Para que los ensayos con 2-propanol permitan evaluar el peso relativo de la vía reductiva en los sistemas ZVI/O₂/H₂O₂ deben de cumplirse 2 condiciones: i) el radical HO[•] tiene que ser el principal responsable de la vía oxidativa (y no otros, como el Fe(IV)) y ii) el 2-propanol no debe alterar la vía reductiva. Para el primer caso se realizaron experiencias con dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es capaz de reaccionar con los radicales HO[•] en presencia de O₂ para formar ácido metasulfínico y formaldehído, y con Fe(IV) para formar dimetilsulfona [71], por lo que se lo utiliza normalmente como scavenger para detectar la presencia de este último. Experimentos llevados a cabo en presencia de 0.5 M de DMSO en sistemas ZVI/O₂/H₂O₂ operados a valores de pH iniciales de 3.00 y 5.00 no mostraron diferencias significativas con los experimentos realizados en presencia de 2-propanol, descartando una vía oxidativa mediada por Fe(IV).

En cuanto al efecto del 2-propanol sobre la vía reductiva, Loraine [69] ha reportado que puede existir una inhibición en la reducción de organoclorados en presencia de altas concentraciones de 2-propanol (57 % v/v). Frente a este antecedente, se realizaron ensayos en presencia de 0.5 M de 2-propanol (3.8 % v/v) en el sistema ZVI/N₂. En estas condiciones, no se encontraron diferencias significativas en la decoloración de AB1 respecto de los ensayos realizados en ausencia del alcohol, por lo que puede concluirse que en nuestras condiciones el 2-propanol no tiene un efecto relevante sobre la vía reductiva.

Como puede observarse en la Figura 23C el 2-propanol provoca una clara inhibición de la decoloración del AB1 a pH_{inicial} = 3.00, confirmando que la misma se debe principalmente a la oxidación por radicales HO[•]. Si se considera que en presencia del scavenger todos los radicales HO[•] fueron secuestrados y se adjudica la decoloración residual a los procesos reductivos, a pH_{inicial} = 3.00 más del 98 % de la degradación observada se debe a procesos oxidativos. Un análisis similar de los resultados obtenidos a pH_{inicial} = 5.00 (Figura 23D) muestra que la vía oxidativa solo representa un 57 % de la decoloración observada, siendo el 43 % restante adjudicable al proceso reductivo. Los cambios en la velocidad de consumo del H₂O₂ (Figura 23C) pueden explicarse por el bloqueo de la oxidación del AB1, lo que impide la generación de intermediarios de oxidación del AB1 que puedan acelerar el consumo de H₂O₂ por medio de la reducción del Fe(III).

En conjunto estos resultados indican que a pH_{inicial} = 3.00 el principal mecanismo de oxidación es el ataque de radicales HO[•], mientras que a pH_{inicial} = 5.00 la principal vía de decoloración es la reducción.

2.3.7 Experimentos en presencia de O-Fenantrolina y EDTA

La O-Fenantrolina forma un complejo coloreado muy estable con Fe(II) [70], y en menor medida con Fe(III). Las constantes termodinámicas de estabilidad (K_{TD}) para los complejos de O-Fen con Fe(II) y Fe(III) son del orden de 10²¹ y 10¹⁴ respectivamente. El hecho de que estas constantes sean tan altas favorece la redisolución de los óxidos que se encuentran formando parte de la capa de corrosión y por lo tanto permite estudiar la superficie del ZVI sin la interferencia de los fenómenos de pasivación.

Por otro lado el hecho de que el complejo con Fe(II) sea mucho más estable (7 órdenes de magnitud) que el de Fe(III) permite evitar que el Fe(II) sea oxidado por O₂ o H₂O₂. Esto fue confirmado experimentalmente incubando Fe(II) (1.00 mM) en presencia de OFen (3.00 mM) y H₂O₂ (0.8 mM) durante 120 minutos bajo agitación, tanto a pH_{inicial} = 3.00 como a pH_{inicial} = 5.00, no observándose cambios apreciables en la concentración del complejo o del H₂O₂. Al evitarse la oxidación por H₂O₂ del Fe(II) se logra inhibir efectivamente la reacción de Fenton.

En la Figura 24 se observa que a ambos pH el H₂O₂ disminuye con el tiempo en presencia de O-Fen lo que indica que existe una vía de consumo distinta a la reacción de Fenton, que podemos adjudicar a la reacción directa entre el ZVI y el H₂O₂ (Reacción 5). En estas condiciones los perfiles de H₂O₂ en presencia de O-Fen a pH_{inicial} = 3.00 son los mismos que los obtenidos a pH_{inicial} = 5.00. Con este resultado podemos decir que la reacción entre el H₂O₂ y la superficie de Fe⁰ es independiente (o poco dependiente) del pH. Más aún el perfil del consumo de H₂O₂ a pH_{inicial} = 5.00 en ausencia de complejante es del orden (aunque algo menor) que el observado en presencia de O-Fen. Esto es esperable

si la oxidación del ZVI por el H_2O_2 es la principal vía de consumo de H_2O_2 (como señalamos anteriormente). La diferencia observada es consecuencia de la inhibición de la reacción entre el ZVI y el H_2O_2 por la presencia de la capa de corrosión.

El EDTA también es capaz de complejar tanto al Fe(II) ($K_{TD} [Fe II (EDTA)]^{2-} = 1 \times 10^{14.3}$) como al Fe(III) ($K_{TD} [Fe III (EDTA)]^{1-} = 1 \times 10^{25.1}$), pero a diferencia de la O-Fen, el EDTA forma compuestos más estables con el Fe(III) lo que permite que la reacción de Fenton se lleve a cabo, pero evita la regeneración del Fe(II) y la hidrólisis de las especies de hierro. Cuando el EDTA está presente, el consumo de H_2O_2 es el mismo independientemente del pH utilizado, y es similar al observado en ausencia de complejante a $pH_{inicial} = 3.00$. Este resultado es evidencia adicional de que a $pH_{inicial} = 3.00$ en los sistemas sin complejantes, es la reacción de Fenton la principal vía de consumo del H_2O_2 . Asimismo, sugiere que el ciclo catalítico que involucra la regeneración de Fe(II) a partir del Fe(III) es de poca importancia en estos sistemas, siendo la corrosión del ZVI la principal fuente de Fe(II). Por último indica que la reacción de Fenton per se no tiene una fuerte dependencia del pH, sino que el pH actúa indirectamente limitando la disponibilidad del Fe(II) para la reacción.

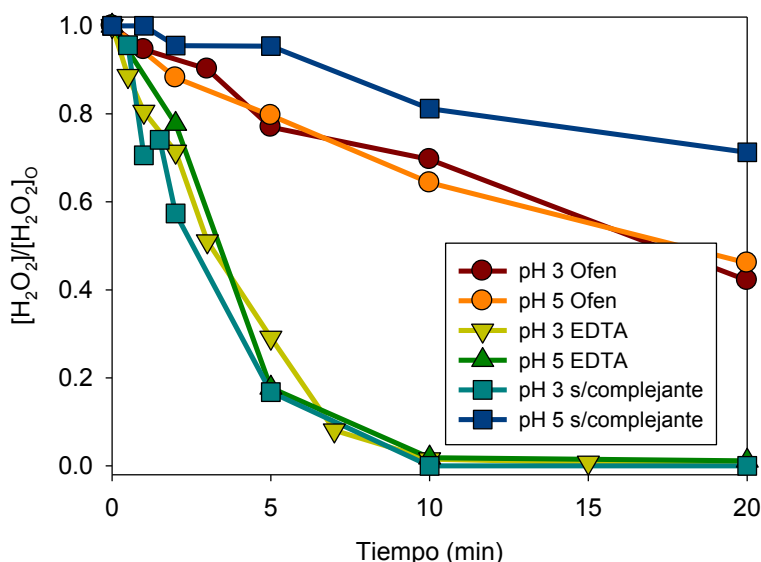


Figura 24: Perfiles de H_2O_2 observados en el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 en presencia de Ofen o EDTA.

Condiciones: $pH_{inicial} = 3.00-5.00$, $[ZVI]_0 = 0.20 \text{ g.L}^{-1}$, $[Na_2SO_4]_0 = 5.00 \text{ mM}$, $[H_2O_2]_0 = 1.96 \text{ mM}$, $[Complejante] = 3 \text{ mM}$.

Con respecto a la decoloración del AB1 en los sistemas ZVI/ N_2 (Figura 25), se observa un pequeño aumento de la decoloración en presencia de O-Fen, debido probablemente a un incremento en la reactividad del ZVI como reductor en ausencia de la CL. Nótese como este efecto se observa solo luego de los 10 minutos de reacción. Esto se debe a que la pasivación a $pH = 3.00$ es muy pequeña, pero comienza a tomar relevancia conforme la corrosión produce un aumento de pH.

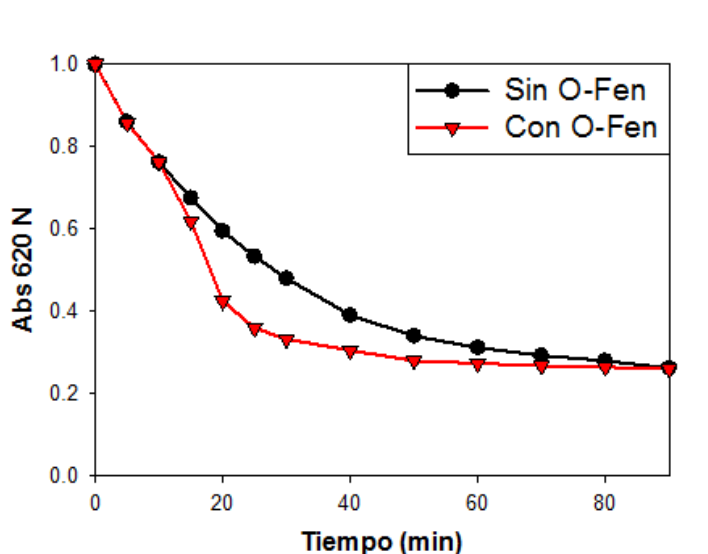


Figura 25: Efecto de la O-Fen sobre los perfiles de decoloración del AB1 para el sistema ZVI/N₂ operado a pH_{inicial} = 3.00. Condiciones: [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM, [Complejante] = 3 mM.

La Tabla 1 compara las velocidades iniciales de liberación de cationes de hierro al bulk de la solución ($V_{Fe}^{Tot} = dFe_{total}/dt$) para el sistema reductor y oxidativo, a pH_{inicial} 3.00 y 5.00, tanto en presencia como en ausencia de O-Fen. Estas medidas de liberación de hierro son un muy buen indicio del proceso de corrosión del ZVI.

En ambos sistemas se observa un aumento de la velocidad de corrosión en presencia de O-Fen como consecuencia de la disolución de la CL. Este efecto es mucho más pronunciado a pH_{inicial} = 5.00 (240 veces para el sistema ZVI/N₂ y 20 veces para el sistema ZVI/O₂/H₂O₂) que a 3.00 (4.3 y 3.4 veces respectivamente), donde la pasivación por la CL es menos importante. Esto confirma la mayor importancia que toma la capa de corrosión al aumentarse el pH.

A su vez, el hecho de que este efecto sea más notorio para el sistema reductor (~240 veces a pH_{inicial} = 5.00) que para el oxidativo (~20 veces), se debe al efecto depasivante que posee el H₂O₂ sobre la capa de corrosión [66], lo que permite altas tasas de corrosión a pHs elevados. Este efecto depasivante es consecuencia de su alto poder oxidante que provoca la generación de una CL más porosa y permeable a la corrosión. Es este efecto depasivante el responsable de que los sistemas en los que el H₂O₂ se encuentra presente, se alcancen pH finales superiores a los que se alcanzan en su ausencia.

	OFen	V_{ZVI/N_2}^{Fe} (mM.min ⁻¹)	$V_{ZVI/O_2/H_2O_2}^{Fe}$ (mM.min ⁻¹)	$V_{ZVI/N_2}^{Fe} /$ $V_{ZVI/O_2/H_2O_2}^{Fe}$
pH 3	Ausente	$5.8 (\pm 0.7) \times 10^{-2}$	$1.7 (\pm 0.2) \times 10^{-1}$	0.34
pH 5	Ausente	$3.1 (\pm 0.4) \times 10^{-4}$	$8.3 (\pm 0.3) \times 10^{-3}$	0.04
pH 3	Presente	$2.5 (\pm 0.1) \times 10^{-1}$	$5.8 (\pm 0.5) \times 10^{-1}$	0.43
pH 5	Presente	$7.4 (\pm 0.3) \times 10^{-2}$	$1.7 (\pm 0.1) \times 10^{-1}$	0.44
$V_{Con OFen}^{Fe} /$ $V_{Sin OFen}^{Fe}$	pH 3	4.3	3.4	
	pH 5	239	20	

Tabla 1: Velocidades iniciales de generación de Fe_{total} en presencia y ausencia de Ofen. Condiciones: $pH_{inicial} = 3.00-5.00$, $[ZVI]_0 = 0.20 \text{ g.L}^{-1}$, $[Na_2SO_4]_0 = 5.00 \text{ mM}$, $[H_2O_2]_0 = 1.96 \text{ mM}$, $[Complejante] = 3 \text{ mM}$.

En su conjunto, los resultados de la sección 2.3.7 demuestran que cuando se parte de $pH_{inicial} = 3.00$ en ausencia de complejante, es la reacción de Fenton la principal responsable del consumo de H_2O_2 y la reacción entre el ZVI y el H_2O_2 cumple un rol secundario en el consumo de peróxido, mientras que a $pH_{inicial} = 5.00$ es esta última la principal vía de consumo.

Es importante destacar que en ambos sistemas no hubo diferencias significativas en el consumo de H_2O_2 a ambos pH evaluados cuando se evita la formación de la CL con complejantes, sugiriendo que tanto la reacción directa entre H_2O_2 y ZVI como la reacción de Fenton propiamente dicha son poco dependientes del pH en las condiciones utilizadas.

A modo de resumen de lo discutido, la Figura 26 esquematizan las principales reacciones que ocurren en el sistema ZVI/O₂/H₂O₂, tanto en ausencia como en presencia de complejantes.

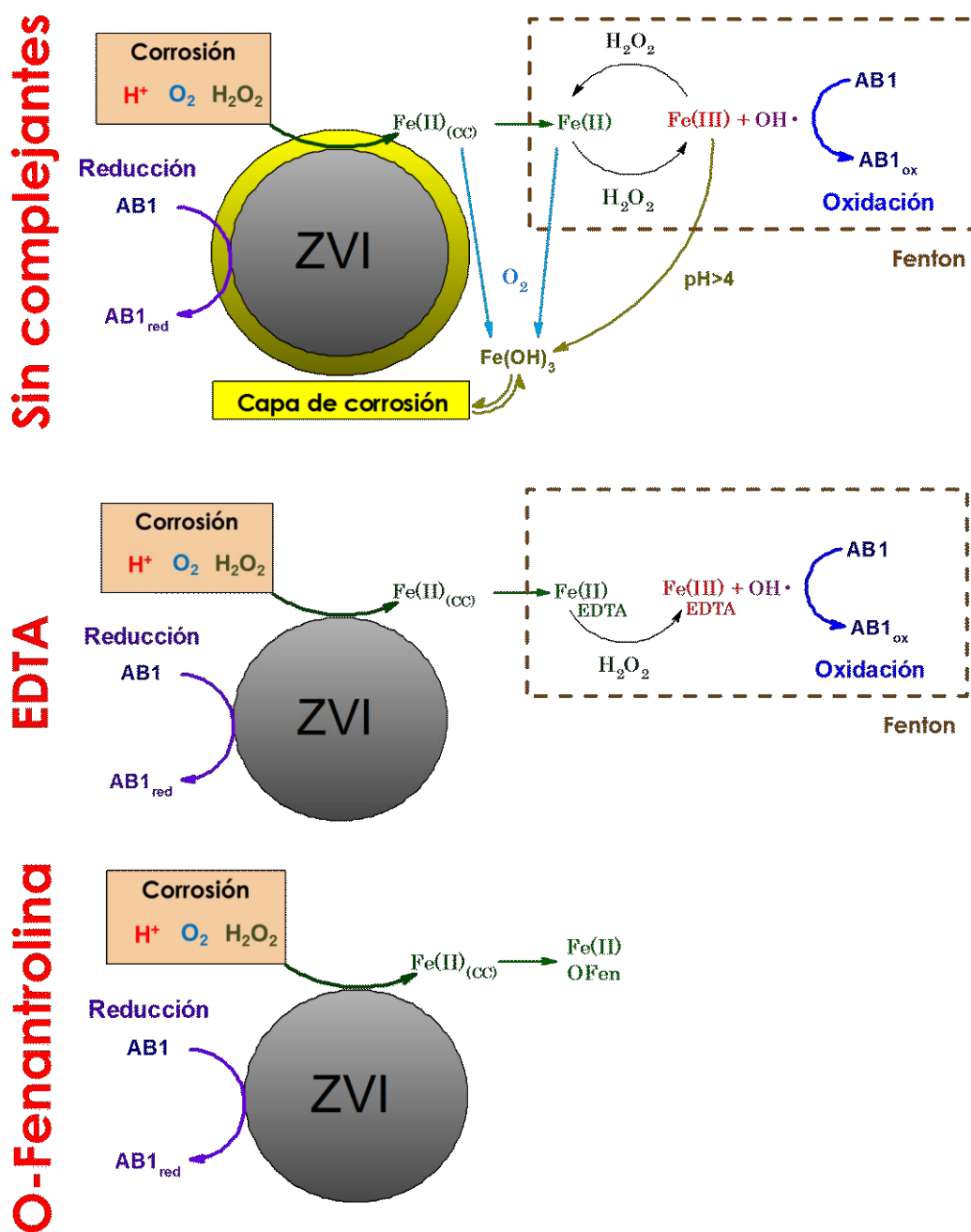


Figura 26. Esquema de las principales reacciones involucradas en el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ tanto en ausencia como en presencia de complejantes.

2.3.8 Análisis cromatográficos del sistema ZVI/N₂

Según el mecanismo de reducción propuesto para la reducción de los colorantes azoicos (Reacción 15), los productos esperados en el sistema ZVI/N₂ para AB1 serían anilina, p-nitroanilina y el anillo correspondiente al 1,2,7-triamin-8-hidroxi-naftalen-3,6-disulfonato (TAHNDS), tal como se esquematiza en la Figura 27. Este mecanismo ha sido propuesto por otros autores para el AB1 [31] y otros colorantes azoicos [59].

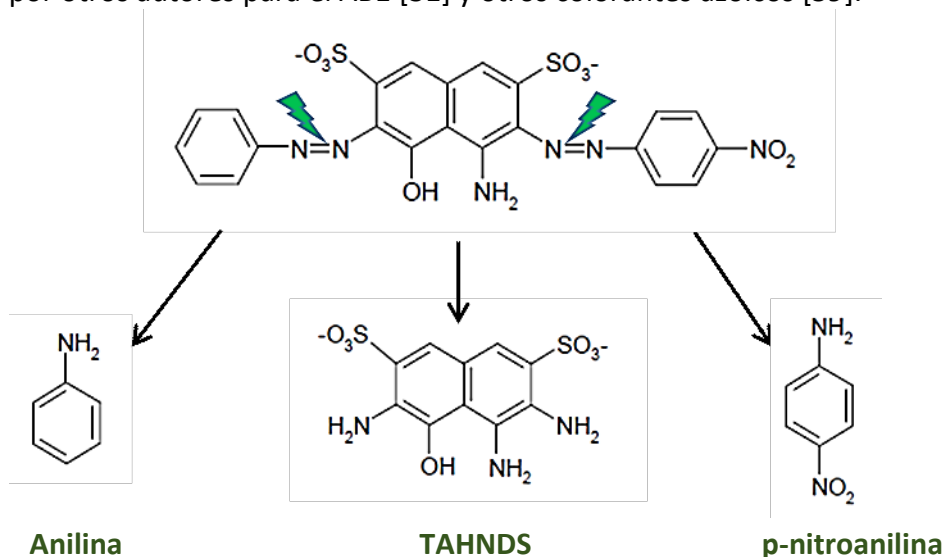


Figura 27: Esquema propuesto para los productos de la reducción completa de AB1 con ZVI.

Tanto la anilina como la p-nitroanilina fueron encontrados como productos de reacción del sistema ZVI/N₂ a pH_{inicial} = 3.00 por CG-MS. El TAHNDS y sus derivados no fueron detectados por esta técnica, debido a la alta polaridad que poseen por la presencia de grupos sulfonato.

El TAHNDS es un producto de reducción común a todos los colorantes azoicos sintetizados a partir de H-acid. Si bien no posee absorción en la región visible del espectro, se ha reportado que en presencia de trazas de O₂ el TAHNDS es capaz de autooxidarse a compuestos que si lo hacen, siendo estos posibles responsables de la coloración residual de las soluciones. Los productos de autooxidación reportados por Kudlich et al. [71] se muestran en la Figura 28.

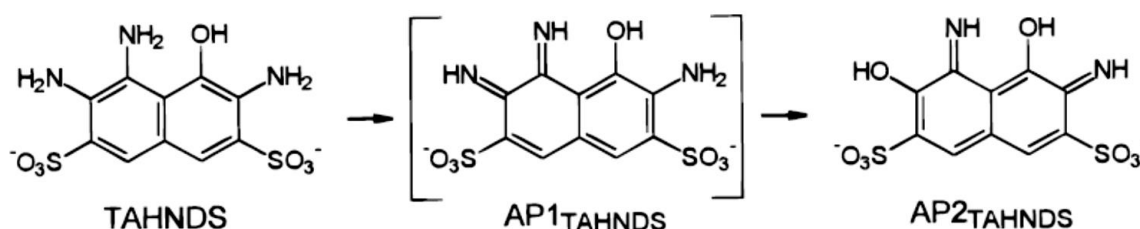


Figura 28: Productos de autooxidación del TAHNDS.

De acuerdo con el autor, prácticamente todo el TAHNDS se encuentra en la forma de AP2TAHNDS luego de 2 horas de reacción. Este producto tiene 3 máximos de absorción: 250, 320 y 595. El análisis de la evolución de los espectros UV-Vis registradas en el sistema ZVI/N₂ sugiere que este producto es el responsable del cambio de color de azul a violeta

observado como producto final de los experimentos reductivos. Un análisis quimiométrico por la técnica de MCR-ALS [18] de los espectros registrados en el sistema ZVI/N₂ a pH_{inicial} = 3.00 permite explicar la varianza en los espectros observados en un 99.92% utilizando 2 factores: i) un factor cuyo espectro coincide claramente con el del AB1 y ii) otro cuyo perfil espectral posee 3 máximos a 235/328/589 nm, que es muy probable que corresponda a la suma de los espectros del AP2_{TAHNDS}, la anilina, la p-nitroanilina y el metanol utilizado como scavenger.

El seguimiento de los perfiles de HPLC del sistema ZVI/N₂ a pH_{inicial} = 3.00 se muestra en la Figura 29. En los cromatogramas se encuentran 3 picos: uno correspondiente al AB1 cuya área decae conforme avanza la reducción, y dos picos correspondientes a la p-nitroanilina y la anilina respectivamente. La anilina es un producto que posee un crecimiento sostenido en el tiempo, mientras que la p-nitroanilina crece y posteriormente presenta un lento decaimiento a partir de los 60 minutos, posiblemente debido a la reducción del grupo nitro. Si bien se conoce que el ZVI es capaz de reducir estos grupos (como hemos mencionado en la sección 2.1.5), esta reacción es evidentemente más lenta que la reducción de los enlaces azoicos. Además de la aparición de la anilina y la p-nitroanilina en los cromatogramas, junto al frente del solvente aparece una sustancia que tanto por su espectro como por su alta polaridad es posible que se trate del AP2_{TAHNDS}, aunque debido a la falta de patrones y a la dificultad para su separación con una columna de fase reversa, no pudo realizarse una identificación inequívoca.

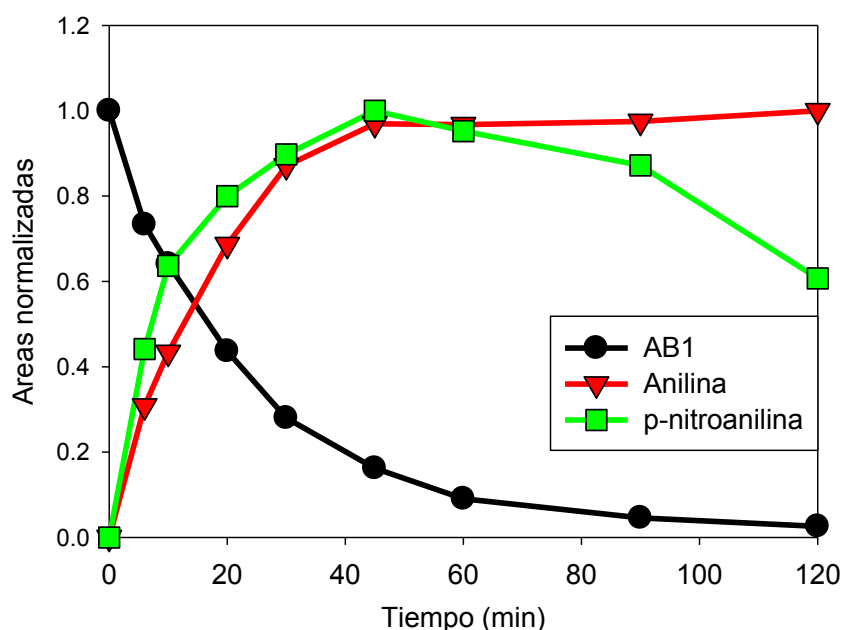


Figura 29: Perfiles normalizados de las áreas obtenidos por HPLC en función del tiempo para los productos de reducción del AB1 en un sistema ZVI/N₂ a pH_{inicial} = 3.00.

Condiciones: [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [Na₂SO₄]₀ = 5.00mM.

Anilina: área a 230 nm, tr = 4.8 min. P-nitroanilina: área a 380 nm, tr = 7.9 min. AB1: área a 620 nm, tr = 12.5 min.

A pH_{inicial} = 5.00 el sistema ZVI/N₂ presenta 2 picos adicionales de espectros similares a AB1 pero con corrimientos de los máximos de absorción, adjudicables a productos de reducción del grupo nitro que todavía conservan los enlaces azoicos.

2.3.9 Análisis cromatográficos del sistema ZVI/O₂/H₂O₂

El agregado de H₂O₂ a los sistemas con ZVI provoca la aparición de una gran cantidad de productos de oxidación adicionales debido a la inespecificidad de la oxidación mediada por HO•. Existe un consenso general de que existe una mayor tendencia del ataque de los enlaces azoicos en etapas tempranas, ya sea en los átomos de nitrógeno que forman el enlace (Reacción 18), o en los carbonos a los que estos se encuentran unidos (Reacción 19) [9]. En este último caso los nitrógenos pertenecientes al enlace azoico suelen liberarse como N₂ [72]. El ataque a los nitrógenos genera una gran variedad de intermediarios: hidroxilaminas (R-NHOH), hidroxil-hidrazinas (R-NH-NHOH), compuestos nitrosos (R-N=O), compuestos diazo (R-N=NH), aminas (R-NH₂) y cetoiminas (R=NH), tal como fue reportado por Meetani et al. [73] para la degradación de AB1 con UV/H₂O₂.

$\text{Ar-N=N-Ar}' + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{Ar-N}^\bullet\text{-N(OH)-Ar}' \rightarrow \text{Ar-N}^\bullet\text{H} + \text{O=N-Ar}'$	Reacción 18
$\text{Ar-N=N-Ar}' + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{Ar(OH)-N=N-Ar}' \rightarrow \text{ArOH} + \bullet\text{N=N-Ar}'$	Reacción 19

A pesar de que los enlaces azoicos son los más susceptibles a la oxidación, existe la posibilidad de que el ataque sea directamente a uno de los anillos. Para el caso del azobenceno, se encontró que aproximadamente el 60 % de los radicales atacan el enlace azoico, mientras que el resto reaccionan con los anillos [9]. Esta adición a los anillos sin pérdida de aromaticidad suele producir un corrimiento batocrómico del espectro [9]. A pesar de haber cierta preferencia por el ataque al enlace azoico, es importante destacar que este valor de 60 % es muy bajo y no difiere demasiado del esperado para un ataque inespecífico.

Independientemente de cual sea el orden en el cual se produzca el ataque por parte de los radicales OH•, el ataque consecutivo de radicales lleva a la rotura de los enlaces azoicos y a la hidroxilación de los anillos con pérdida de los grupos sulfonato y los grupos nitrogenados [73]. Estos anillos oxidados son en última instancia abiertos, formando ácidos lineales y compuestos peroxidados que para altos grados de avance de oxidación terminan formando CO₂ y H₂O, con disminución del TOC. En estos últimos pasos de oxidación el O₂ y los radicales derivados del mismo tienen un rol crucial, a pesar de que los colorantes de partida son en general inertes a la presencia de O₂ [9].

Esta inespecificidad en la oxidación mediada por radicales HO• hace que se generen una gran cantidad de intermediarios y productos de reacción, cada uno de los cuales se encuentra en una concentración muy baja, dificultando enormemente su identificación y cuantificación. Esto es un problema particularmente importante cuando se estudia la degradación de moléculas complejas, tales como el AB1.

Los análisis de HPLC del sistema ZVI/O₂/H₂O₂ a pH_{inicial} = 5.00 muestran que cuando el peróxido se agrega en una concentración inicial de 0.43 mM, aparecen una multitud de picos: aquellos descritos para el sistema ZVI/N₂ sumados a otros menos definidos generados durante la oxidación (Figura 32C). Esto indica que tanto los procesos reductivos como los oxidativos se producen simultáneamente en estas condiciones. En conjunto, esta variedad de productos presenta absorciones en todo el rango visible del espectro, lo que otorga el color negro observado en las oxidaciones incompletas.

La presencia de anilina y p-nitroanilina en estos sistemas fue confirmada por CG-MS. Por esta técnica también se encontraron fenol y p-nitrofenol formados por ataque de los radicales HO^\bullet a los C unidos a los enlaces azoicos (Reacción 19), aunque una cierta contribución debida al ataque -ipso a las correspondientes aminas no puede descartarse. Por último, se observó la presencia de hidroquinonas, benzoquinonas y resorcinol como productos de oxidación posteriores. Por lo expuesto anteriormente, la cromatografía gaseosa solo permite detectar lo que ocurre con los grupos laterales, y no aporta información de aquellos compuestos que contengan el anillo naftalénico central. Un esquema que representa las posibles vías de obtención de estos productos se muestra en la Figura 30.

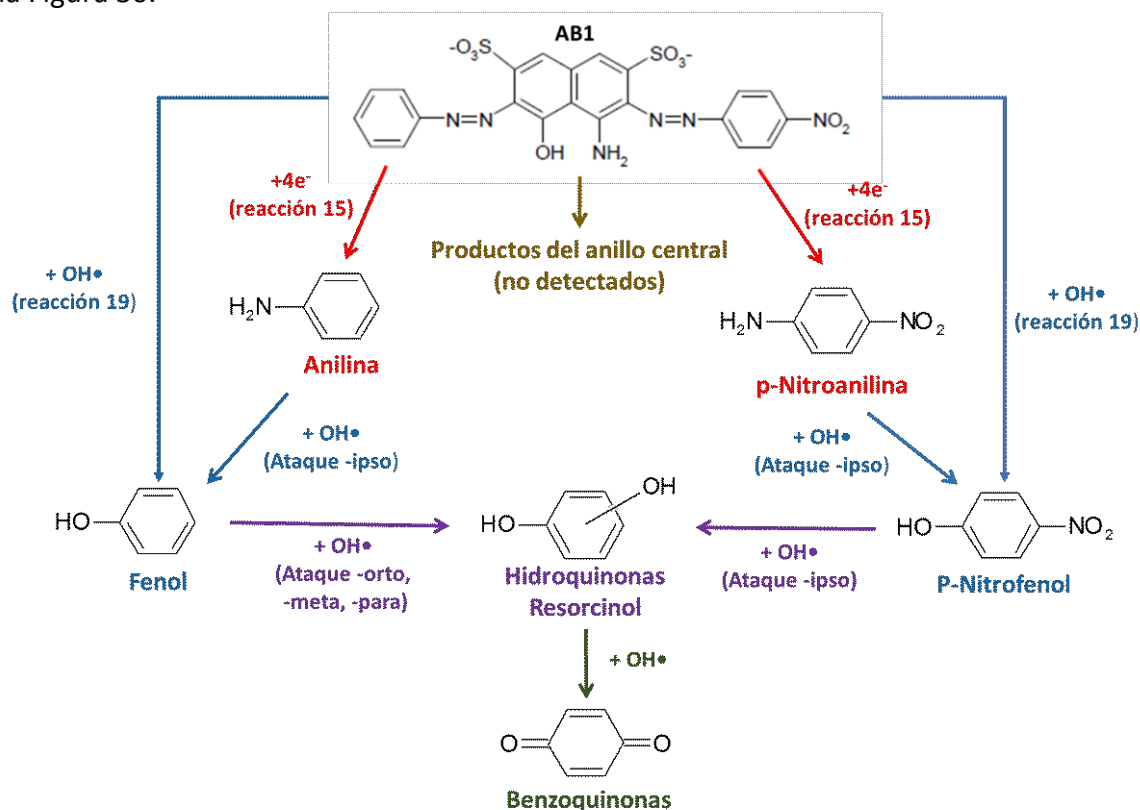


Figura 30: Esquema de las vías de obtención de los productos detectados por CG-MS.

El agregado de cantidades mayores de H_2O_2 (8 mM) provoca un cambio en la proporción de los productos, disminuyendo significativamente la cantidad de productos de reducción (anilina, p-nitroanilina) a costa de la generación de una mayor cantidad de productos de oxidación. Los productos de reducción del grupo nitro no se observan en este caso (Figura 32D).

Cuando la reacción es llevada a cabo a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$ en los primeros minutos se observa la presencia de anilina y p-nitroanilina, junto a la presencia de otros productos de oxidación. Conforme avanza la reacción estos se van oxidando y a los 30 minutos de reacción ya no se observa ninguna estructura en el cromatograma, como consecuencia de la degradación a moléculas no aromáticas que no poseen absorción en el UV/visible. Los cromatogramas para el sistema ZVI/ N_2 y del sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00$ para distintos tiempos se muestran en la Figura 31.

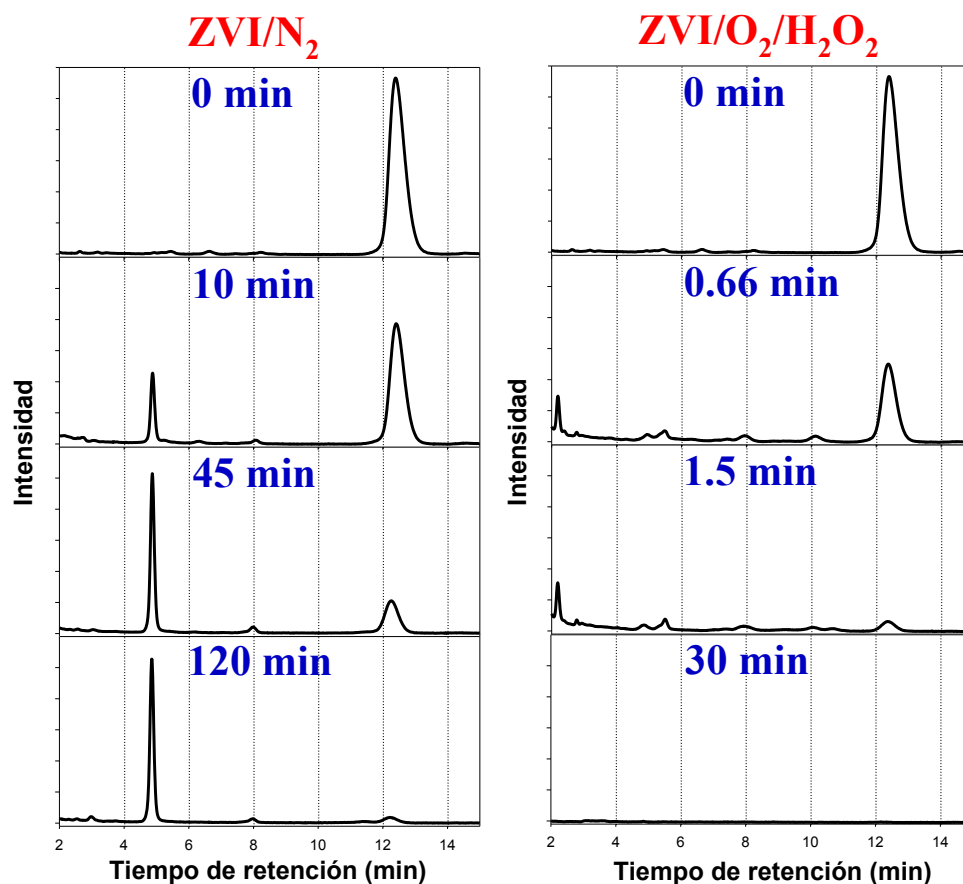


Figura 31: Cromatogramas obtenidos por HPLC obtenidos a distintos tiempos para los sistemas ZVI/N_2 y $ZVI/O_2/H_2O_2$.

Con fines comparativos, se realizó una cinética a $pH_{inicial} = 5.00$ reemplazando el ZVI por una sal de Fe(III). En estas condiciones se encontró un perfil oxidativo con gran cantidad de picos, sin niveles detectables de anilina, p-nitroanilina o de los compuestos generados por reducción de los grupos nitro, confirmando que su presencia no se debe al ataque de los radicales HO^\bullet .

La Figura 32 muestra los cromatogramas obtenidos por HPLC mencionados anteriormente. Los tiempos de reacción para cada condición fueron elegidos para niveles de conversión de AB1 similares, con el fin de utilizar siempre la misma escala y poner en evidencia las diferencias en la distribución de productos. El orden utilizado fue elegido para enfatizar como la elección de las condiciones de degradación ($pH_{inicial}$, $[H_2O_2]$, fuente de hierro) pueden cambiar la distribución de productos desde claramente reductiva (A y B, sistema ZVI/N_2) a una puramente oxidativa (F, sistema tipo-Fenton). En este último caso es importante señalar que aunque se observen picos con tiempos de residencia similares a los presentes en el sistema ZVI/N_2 , estos poseen espectros de absorción totalmente distintos.

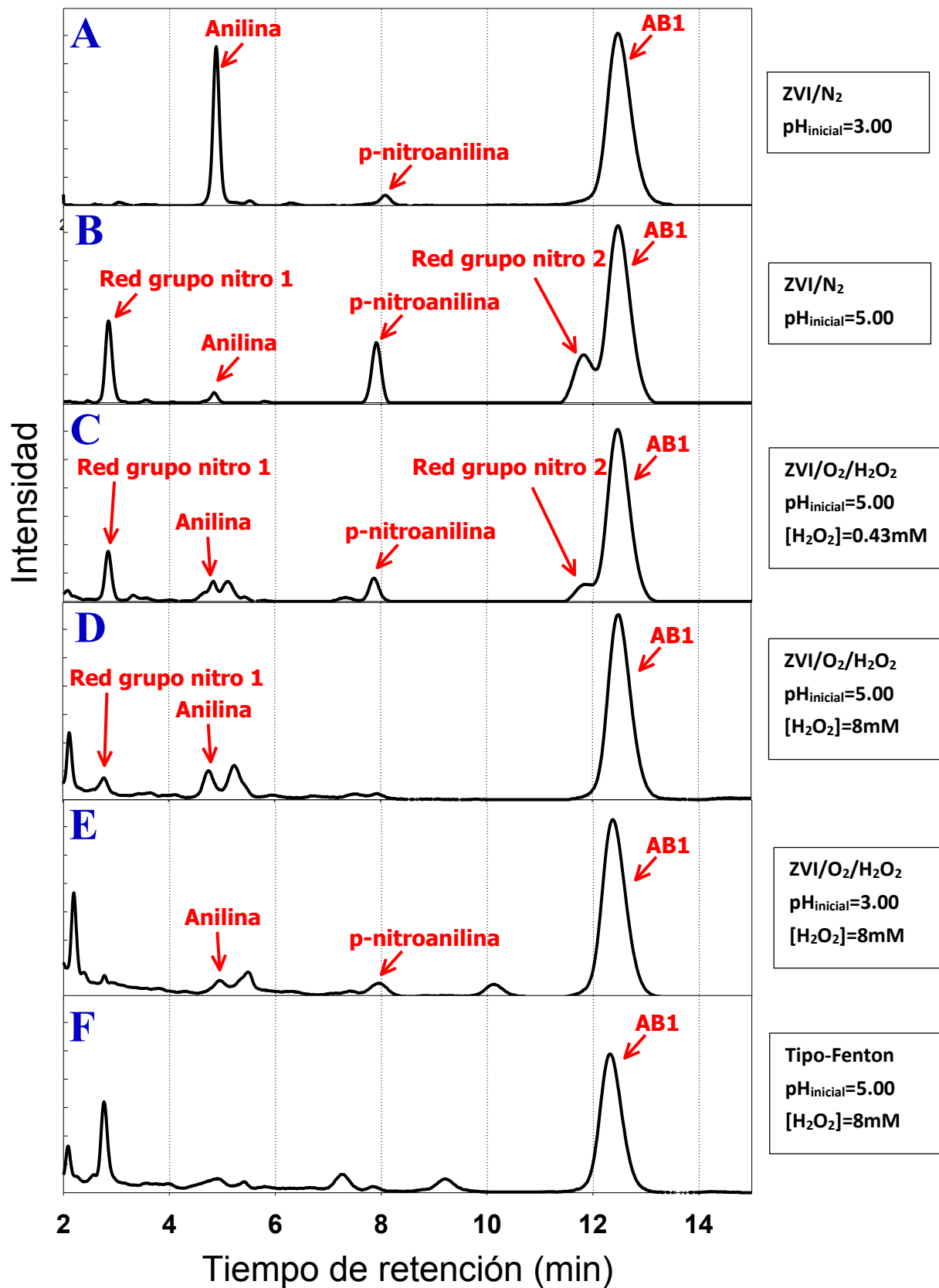


Figura 32: Selección de cromatogramas para los distintos sistemas estudiados. Tiempos de reacción de los sistemas: A=20 min, B=45min, C=120min, D=90min, E=0.66min, F=7min.

Los perfiles de decaimiento del AB1 para los distintos sistemas a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$ se muestran en la Figura 33. Al comparar el sistema ZVI/ N_2 con los de ZVI/ O_2 / H_2O_2 se observa que a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$ este último posee una mejor remoción de AB1 en los primeros 30 minutos, luego del cual el sistema reductivo pasa a ser más eficiente. Nótese que el decaimiento de área de AB1 es más veloz que el de la Abs 620 nm en todos los sistemas (comparar con Figura 16B), lo que es particularmente importante en el sistema ZVI/ N_2 debido a la absorción en el visible de sus productos de reducción.

Esto demuestra que a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$, la adición simultánea de ZVI y H_2O_2 no solo es poco eficiente como sistema oxidante, sino que además el peróxido inhibe la reducción del colorante. La alta velocidad de degradación observada al agregar el Fe(III) en forma de sal con una concentración de 5 mM a pH de 5.00, contrasta con la obtenida con el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 . Esta diferencia entre las eficiencias de oxidación de los sistemas tipo-Fenton y los FAZ puede atribuirse a la contribución de factores tales como: i) el aumento de pH durante la corrosión, ii) la pérdida de H_2O_2 por reacción con ZVI o iii) la diferencia en la disponibilidad del Fe(III).

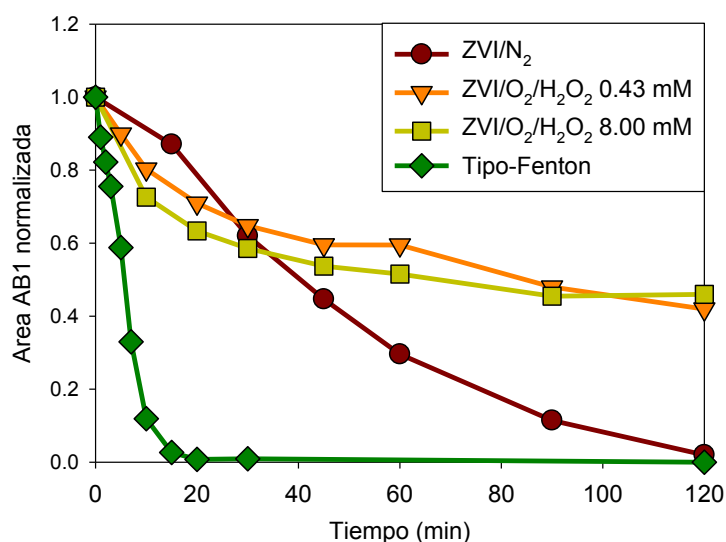


Figura 33: Degradación de AB1 a $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$ seguida por HPLC para el sistema ZVI/ N_2 , $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ (5mM)/ H_2O_2 0.43 mM y ZVI/ O_2 / H_2O_2 . Condiciones: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.43\text{-}8.00$ mM, $[\text{AB1}]_0 = 50$ mg.L $^{-1}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_4]_0 = 5.00$ mM, $\text{ZVI}_0 = 0.20$ g.L $^{-1}$.

En conjunto, los resultados obtenidos por cromatografía indican que para todas las condiciones estudiadas, la reducción mediada por ZVI es un fenómeno que debe de ser tenido en cuenta en los tratamientos FAZ.

2.3.10 Medidas de toxicidad y carbono orgánico total

Como mencionamos anteriormente, la pérdida de color por parte de la solución es solo uno de los parámetros a tener en cuenta a la hora de evaluar la efectividad de un tratamiento. Otro de los parámetros a evaluar es la disminución en carga de materia orgánica del efluente, que puede medirse a partir de los perfiles de carbono orgánico total. Para el sistema ZVI/ N_2 no se observaron cambios significativos, tal como era de esperarse si consideramos que la reducción genera aminas derivadas del colorante sin comprometer la estructura de los anillos. También confirma que, en las condiciones de

reacción utilizadas en este trabajo, la remoción de materia orgánica por procesos físicos no es significativa y los cambios espectrales pueden atribuirse a los procesos redox.

El sistema ZVI/O₂/H₂O₂ cuando se utiliza a un pH_{inicial} de 3.00 provoca una disminución de alrededor del 40 % del valor inicial de TOC (Figura 34). Este valor, si bien se encuentra lejos del ideal que implicaría una mineralización completa del colorante, muestra que a diferencia del sistema ZVI/N₂, el sistema ZVI/O₂/H₂O₂ sí es capaz de disminuir la cantidad de materia orgánica. Esto puede resultar una ventaja de los sistemas FAZ frente a los Tipo-Fenton, donde la mineralización no es posible en ausencia de otra fuente de energía (ultrasonido, radiación, eléctrica).

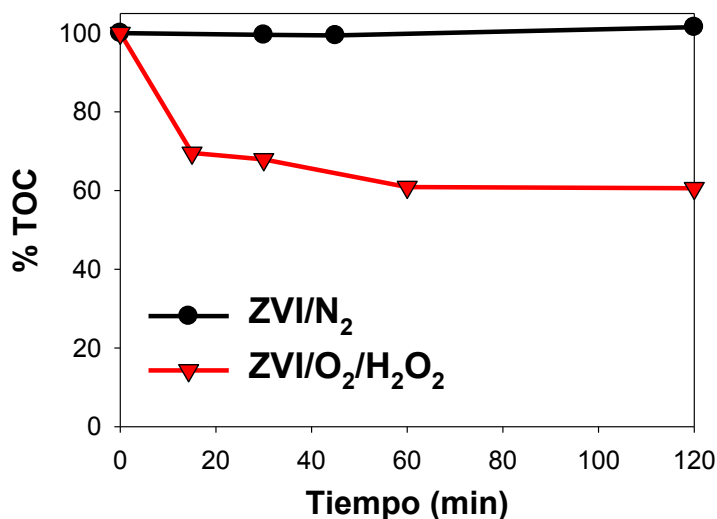


Figura 34: Medidas de carbono orgánico total.

Condiciones: [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [Na₂SO₄] = 5.00 mM, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, pH_{inicial} = 3.00, [H₂O₂] = 0.44 mM.

Otro de los parámetros que puede medirse es el cambio en la toxicidad que presenta el efluente para los organismos acuáticos. Existen muchas técnicas para evaluar la toxicidad debido a la gran variedad de organismos acuáticos y a su distinta susceptibilidad frente a distintas sustancias. Una de las técnicas más sensibles y más usadas es la inhibición de la luminiscencia de *Vibrio Fischeri*, y por este motivo fue la utilizada para evaluar los cambios de toxicidad en este trabajo. Los valores de inhibición para ambos tratamientos se muestran en la Figura 35.

El sistema ZVI/N₂ presenta un paulatino aumento en la inhibición de la luminiscencia desde un valor inicial de 10 % hasta un valor de 50 % luego de 120 minutos de tratamiento. Este aumento en la toxicidad ha sido reportado por otros autores [31] y se debe a la toxicidad que poseen las aminas aromáticas producidas durante la reducción [74].

Para evitar el efecto tóxico que puede ocasionar la presencia de H₂O₂, la evolución de la toxicidad del sistema ZVI/O₂/H₂O₂ a pH_{inicial} = 3.00 fue evaluada a los 40 minutos de tratamiento, luego de consumido todo el oxidante. Para evaluar la toxicidad a distintos grados de oxidación se varió la cantidad de H₂O₂ inicial (0.11 - 0.88 mM). La inhibición de luminiscencia presentó niveles variables en función del grado de oxidación alcanzado, nunca superando un 20 % de inhibición. Este comportamiento en la toxicidad es común en los PAOs y es normalmente atribuida a la formación y posterior degradación de compuestos aromáticos hidroxilados que pueden ser más tóxicos que el compuesto de partida [75]. Si bien sería necesario hacer un estudio más detallado relacionando los

valores de inhibición con los distintos productos generados, se puede decir que el sistema oxidativo tiene la ventaja de limitar la toxicidad del efluente tratado.

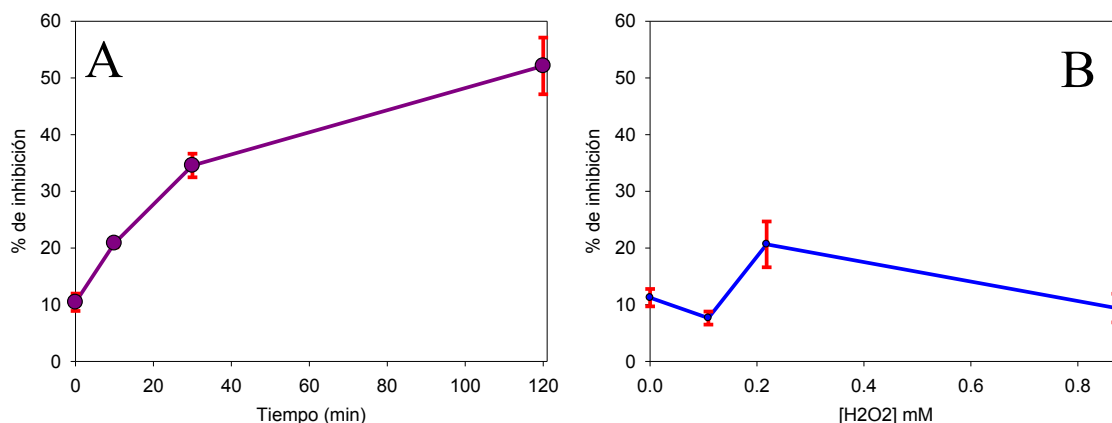


Figura 35: Medidas de toxicidad por LVF del sistema ZVI/N₂ (A) y ZVI/O₂/H₂O₂ (B). Condiciones: [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [Na₂SO₄] = 5.00 mM, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, pH_{inicial} = 3.00. Las barras de error representan un intervalo de confianza del 95 %, n = 3.

2.3.11 Efecto de la fuente de ZVI

Durante este capítulo se ha estudiado el comportamiento del sistema utilizando ZVI en forma de polvo electrolítico. Con el objetivo de evaluar hasta qué punto este comportamiento es extrapolable a otros sistemas a base de ZVI, tales como los que utilizan lana de acero o nanopartículas de ZVI, se realizaron ensayos enfocados en el sistema operado a pH inicial 5, que es donde mejor se observa la competencia entre las vías oxidativas y reductivas.

2.3.11.1 Lana de acero

La lana de acero se produce industrialmente en grandes cantidades debido a su extenso uso para el pulido de madera y metal, así como para la limpieza de vajilla. Industrialmente se vende en bobinas de 1.5 kg. Es un material relativamente barato (aproximadamente 3.0 U\$D/kg) y fácil de manipular. Este material posee un área superficial muy baja, menor que la del ZVI en polvo y que el límite mínimo de detección que posee el equipo de determinación de área superficial utilizada (Micromeritics ASAP2020).

Estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo [54] han encontrado que la lana de acero es menos propensa a pasivarse y es capaz de liberar cantidades importantes de cationes de hierro, aún a pH neutros. Además, es un material particularmente apropiado para utilizarse como relleno de columnas. Por último cabe destacar que, a pesar de la posible inhomogeneidad del material o el hecho de que su presentación es poco adecuada para ensayos en batch con agitación magnética, el sistema es altamente reproducible si se tienen los mismos recaudos que para el ZVI en polvo.

Los perfiles de pH y de decoloración obtenidos al reemplazar el ZVI en polvo por lana de acero se muestran en la Figura 36. Como puede observarse, al igual que en el caso del ZVI en polvo, en ausencia de oxidante el pH aumenta hasta un valor cercano a 8 y se mantiene constante. La presencia de O₂ en el medio disminuye el pH estacionario alcanzado hasta un valor de entre 6.5-7.0.

En presencia de H_2O_2 se observa un efecto peculiar, a $[H_2O_2] \geq 1.96$ el pH aumenta en un principio, luego decae y por último vuelve a subir después de la primera hora de reacción. Este comportamiento oscilante es más notorio conforme se aumenta la concentración de peróxido. Por ejemplo cuando la $[H_2O_2] = 1.96$ mM el pH disminuye hasta 4.8 y luego vuelve a subir hasta el estado estacionario, mientras que con una $[H_2O_2] \geq 8.00$ mM el pH disminuye hasta un valor menor para luego aumentar levemente, no alcanzando el estado estacionario en el tiempo estudiado. Esta disminución de pH no se observa en ausencia de AB1 (ver Figura 36A), lo que sugiere que es debida a la aparición de productos ácidos durante la decoloración.

En cuanto a la decoloración, los experimentos reductivos muestran una reducción del AB1 menor que para el polvo coincidiendo con la menor crecida de pH observada, como consecuencia de la menor área superficial específica del material. Al igual que antes, la presencia de O_2 inhibe parcialmente la reducción. En presencia de H_2O_2 se observan buenos niveles de decoloración partiendo de pH 5.00, alcanzando una decoloración casi total con $[H_2O_2] \geq 1.96$ mM, lo que supone una mejora sustancial de la vía oxidativa en comparación con el ZVI en polvo.

Es interesante el hecho de que, a diferencia de lo observado para el hierro en polvo (Sección 2.3.3.2), la $[H_2O_2]$ tiene un efecto importante sobre la decoloración al aumentar su concentración desde 0.00 mM (ZVI/O_2) a 1.96 mM. Esto se debe a que cuando se utilizaba ZVI en polvo existía una compensación entre la inhibición de la reducción por parte del H_2O_2 y el aumento de la oxidación al aumentar la concentración de peróxido. En el sistema que utiliza lana de acero, el mayor peso relativo de los procesos oxidativos evita que esta compensación ocurra, y el aumento de la vía oxidativa al incrementar la $[H_2O_2]$ resulta en un aumento en la degradación observada.

Si comparamos con el sistema $ZVI/O_2/H_2O_2$ operado a $pH_{inicial} = 3.00$, el sistema que utiliza lana de acero a $pH_{inicial} = 5.00$ posee una mayor pérdida de H_2O_2 a través la reacción directa con el ZVI, al igual que en el caso del ZVI en polvo. De esta manera, para lograr la decoloración completa del AB1 es necesaria una mayor concentración inicial de H_2O_2 (cercana a 1.96 mM). Por encima de este valor, el exceso de H_2O_2 no se ve traducido en una mayor degradación.

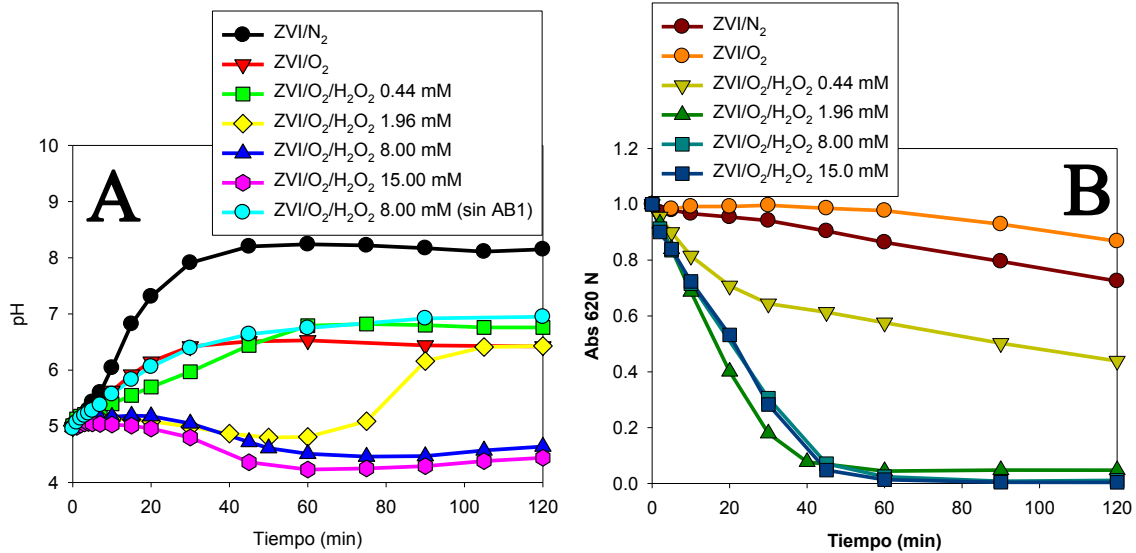


Figura 36: Perfiles de pH (A) y decoloración (B) para los sistemas ZVI/N₂ y ZVI/O₂/H₂O₂ utilizando lana de acero como fuente de Fe⁰. Condiciones: [Lana de acero]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 0-8.00 mM, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM, Temp = 20 ± 1°C.

Se midieron los perfiles de hierro del sistema (Figura 37A) y se compararon con los del hierro en polvo en las mismas condiciones (Figura 37B). Los niveles de hierro obtenidos son mucho mayores en el caso de la lana de acero que en el hierro en polvo, posiblemente debido a la menor adherencia de los óxidos de hierro sobre la superficie de este material. Además, una fracción importante de este se encuentra como Fe(II), cosa que no ocurría para el ZVI en polvo.

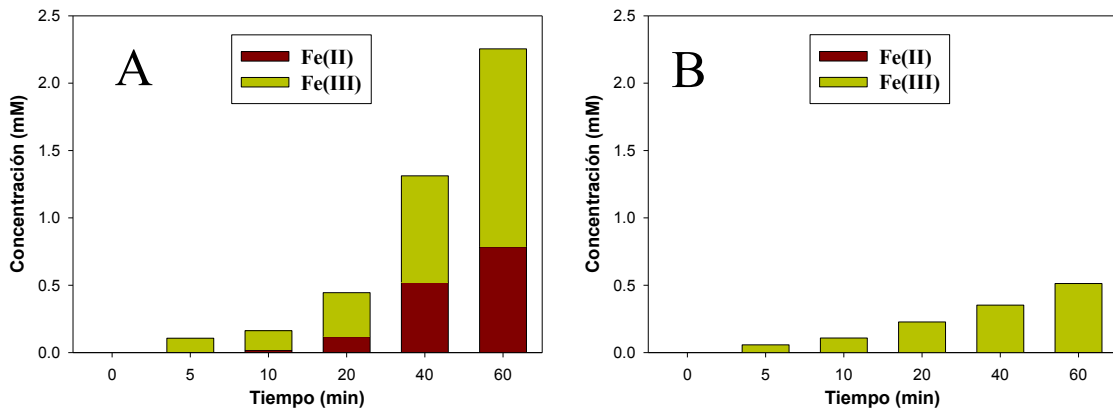


Figura 37: Perfiles de hierro soluble para obtenidos para la lana de acero (A) y el ZVI en polvo (B). Condiciones: pH_{inicial} = 5.00, [ZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM, [H₂O₂]₀ = 1.96 mM, Temp = 20 ± 1°C.

Es posible que la capacidad de la lana de acero de liberar Fe(II) a un pH inicial de 5.00 tenga como consecuencia que la reacción de Fenton ocurra, generando productos ácidos de la oxidación del AB1 que disminuyen el pH, favoreciendo la solubilidad del Fe(III) y la estabilidad del Fe(II) frente al O₂, y por lo tanto, que la reacción prosiga. Esta característica hace de la lana de acero una excelente fuente de ZVI para tratamientos FAZ.

2.3.11.2 Nanopartículas de ZVI

El uso de nanopartículas de ZVI (nZVI) es una de las técnicas actualmente más importantes en lo que respecta a nanoremediación ambiental. Esto se debe a que el nZVI es uno de los nanomateriales más baratos y sencillos de sintetizar, y a su versatilidad para tratar una gran cantidad de contaminantes. La mayor área superficial del nZVI lo hace mucho más reactivo que el ZVI en polvo, obteniendo una mayor eficiencia en la eliminación de contaminantes, en particular si se trabaja a pH cercanos a la neutralidad [76]. Existen muchos estudios que plantean la ventaja del n-ZVI para el tratamiento de contaminantes, ya sea solo [59,77] o con el agregado de oxidantes [64,78,79].

Normalmente se considera que el mecanismo de eliminación de contaminantes al utilizar nZVI es el mismo que el del ZVI granular o micrométrico [76], por lo que en principio se esperaría encontrar un comportamiento similar al del ZVI en polvo. No obstante, existen evidencias que sugieren que en los sistemas que emplean ZVI, al disminuir el tamaño de la partícula existe una mayor proporción de reacciones laterales que disminuyen la eficiencia tanto de la reducción del contaminante [80] como del uso de oxidante [64]. La evidencia ha sido reportada para sistemas que utilizan persulfato como oxidante, pero es probable que también ocurra para sistemas basados en el uso de H_2O_2 .

Para corroborar lo mencionado en el párrafo anterior se sintetizaron nanopartículas de ZVI siguiendo un procedimiento similar al publicado por Lien et al [81]. Brevemente, a 200 mL de una solución acuosa conteniendo 7.5 % p/p de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Cicarelli, 99 %), llevada a pH 4 y purgada de O_2 por burbujeo con N_2 durante 20 min, se agregó por goteo a razón de 3 mL/min 200 mL de una solución al 2 % p/p de $NaBH_4$ (Riedel-de Haën, 98.5 %) a pH 10, agitando magnéticamente a 20 °C. El precipitado de nZVI obtenido fue separado con imanes de neodimio y lavado 2 veces con agua destilada y 2 con etanol. Por último fueron secadas al vacío con rotavapor a 60 °C y guardadas en desecador bajo atmósfera de N_2 . Con este procedimiento, habitualmente se obtienen nanopartículas de alrededor de 50 nm. La determinación del área superficial reportó un área específica para estas nanopartículas de 62.28 m^2/g , casi cien veces superior a la medida para el ZVI en polvo (0.67 m^2/g). Las cinéticas fueron realizadas de manera análoga a las de ZVI en polvo.

La Figura 38B muestra los perfiles de decoloración obtenidos a pH inicial = 5.00. Si se comparan con los resultados obtenidos para el ZVI en polvo (sección 2.2.2), se observa que en ausencia de H_2O_2 la reducción es notablemente más veloz, alcanzándose una reducción total del AB1 en los primeros 30 minutos de reacción. La presencia de O_2 provoca una pequeña inhibición de la reducción, al igual que en el ZVI en polvo, aunque parecería de menor importancia. En cambio, la inhibición de la reducción por H_2O_2 es mucho más notoria. De hecho, en lo que respecta a la decoloración la presencia de H_2O_2 es completamente contraproducente debido a que, a diferencia del caso del polvo, la disminución de la reducción no se ve compensada por un aumento de la vía oxidativa.

Esto puede explicarse a partir de los perfiles de pH (Figura 38A), los cuales crecen por encima de pH = 8.00 en los primeros 5 minutos de reacción, lo que impide la liberación de Fe(II) al bulk de la solución. Esto fue corroborado experimentalmente haciendo la determinación de Fe(II) por la técnica de la O-Fen previo filtrado de la muestra (para evitar el arrastre de nanopartículas de ZVI), no encontrándose valores detectables de Fe(II). La ausencia de Fe(II) en el bulk imposibilita que la reacción de Fenton se lleve a cabo. Este aumento tan brusco del pH es consecuencia de la mayor reactividad de la superficie.

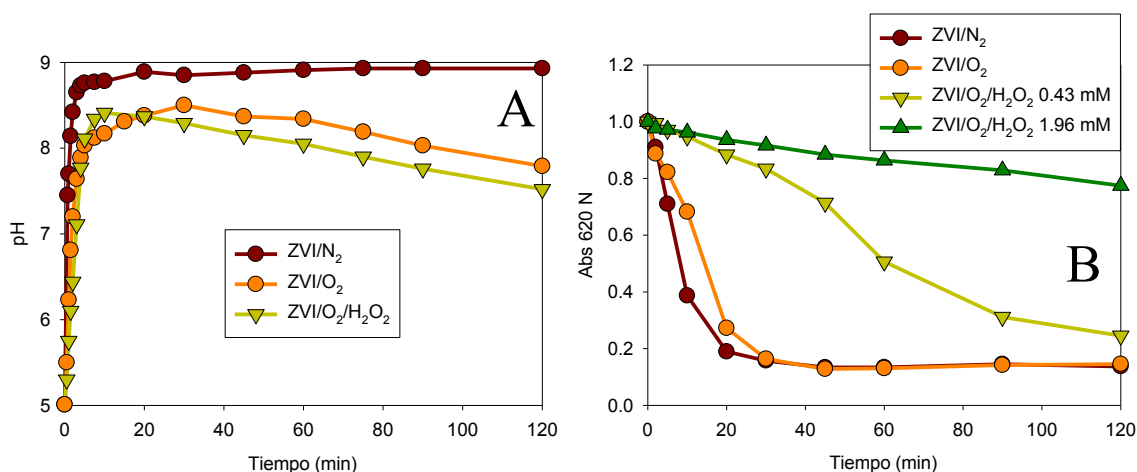


Figura 38: Decoloración para los sistemas ZVI/N₂ y ZVI/O₂/H₂O₂ utilizando nZVI como fuente de Fe⁰.

Condiciones: pH_{inicial} = 5.00, [nZVI]₀ = 0.20 g.L⁻¹, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 0-1.96 mM, [Na₂SO₄]₀ = 5.00 mM. Temp 20 ± 1°C.

2.4 FAZ en batch: Conclusiones

En esta sección se evaluaron dos sistemas: uno donde el ZVI actúa mayormente como reductor del colorante azoico y otro donde la adición H₂O₂ provoca una oxidación a través de la reacción de Fenton.

Se encontró que el sistema ZVI/N₂ puede producir una importante remoción del color vía el clivaje de los enlaces azoicos formando aminas. La decoloración no es completa sino que llega un máximo debido a que algunos intermediarios/productos absorben radiación en la región visible, siendo posibles candidatos los derivados del TAHNDS y productos reducidos que conservan alguno de los enlaces azoicos. Este problema fue observado por Chang et al. [31] para la reducción del AB1, pero hasta donde sabemos no había sido explicado previamente. Además de esta limitación encontramos que este sistema se ha mostrado incapaz de disminuir la carga orgánica del efluente y produce aminas aromáticas que son más tóxicas para los organismos acuáticos que el colorante de partida. Debido a estas cuestiones, el uso de ZVI como reductor posee importantes desventajas para el tratamiento de colorantes azoicos, a pesar de la gran cantidad de trabajos que lo proponen por su capacidad de decolorar efluentes [31,32,59,82]. En este sentido, el agregado de H₂O₂ para producir un sistema Fenton asistido por ZVI resulta ventajoso, ya que en estas condiciones es posible decolorar completamente la solución, reducir la carga orgánica y limitar la toxicidad de los productos de reacción.

Tanto en el sistema oxidante como en el reductor, la corrosión del ZVI provoca un aumento de pH, cuyo perfil es dependiente de las condiciones utilizadas. Las diferencias encontradas en los perfiles de pH fueron interpretadas detalladamente en función de los procesos de corrosión y las especies de hierro formadas. La comprensión de los perfiles de pH y los fenómenos involucrados es de especial relevancia, teniendo en cuenta que el pH es el principal factor que afecta la eficiencia de las técnicas que involucran ZVI. La dependencia con el pH es particularmente importante para el sistema ZVI/O₂/H₂O₂, que resulta muy poco eficiente para decolorar AB1 a valores de pH_{inicial} 5 o superiores, incluso en comparación con los tratamientos tipo-Fenton. En particular se encontró que una importante fracción del H₂O₂ es consumida en reacciones que no generan radicales HO[•],

principalmente por reacción directa con el ZVI. A diferencia de lo esperado en función del mecanismo aceptado (Reacción 5), en la práctica no se observa que la reacción directa entre el ZVI y el H_2O_2 produzca un aumento apreciable del Fe(II) en solución para valores de $\text{pH}_{\text{inicial}}$ cercanos a 5. Se postuló que al ser producido en la superficie del ZVI, el Fe(II) queda formando parte de la capa de corrosión (CL), donde es oxidado por O_2 en una reacción que no lleva a la oxidación del colorante.

Asimismo se demostró que la reacción de reducción juega un rol en todos los sistemas estudiados, aun cuando haya oxidantes presentes como el O_2 y el H_2O_2 . Se observó que en el sistema ZVI/ O_2 / H_2O_2 , el peso relativo de las vías reductivas y oxidativas es dependiente de las condiciones utilizadas ($\text{pH}_{\text{inicial}}$, presencia de aditivos, carga de ZVI y [H_2O_2]), existiendo una competencia entre ambas vías. También se encontró que al trabajar a pH iniciales levemente ácidos (5.00), la presencia de H_2O_2 puede resultar perjudicial para el tratamiento de decoloración.

Cabe destacar que algunos de estos problemas del uso de la FAZ en sistemas batch fueron observados por otros autores a partir del análisis de los perfiles de degradación. Sin embargo la medida simultánea de los perfiles de hierro, H_2O_2 y pH, así como el uso de scavengers y complejantes, permitió desarrollar una explicación más completa del comportamiento de los sistemas FAZ. Hasta donde sabemos, la medición simultánea de estos perfiles para un tratamiento FAZ no había sido realizada. Esto es importante ya que permitió evaluar la validez de varias hipótesis acerca de los fenómenos fisicoquímicos involucrados en su funcionamiento. En particular la interpretación de las distintas vías de degradación y de consumo de H_2O_2 como fenómenos que pueden competir entre sí, en lugar del enfoque más usual de considerar que contribuyen aditivamente, presenta un enfoque novedoso que permite un diseño más racional de los sistemas de tratamiento que utilizan ZVI en función de los objetivos planteados.

Por último se encontró que los resultados obtenidos para el ZVI en polvo pueden extrapolarse para otros sistemas que basados en el empleo de ZVI, teniendo en cuenta que a pesar de que los procesos sean cualitativamente los mismos, existen diferencias cuantitativas sobre el peso de cada uno de acuerdo con la fuente de ZVI seleccionada. Debido a estas diferencias, un tratamiento viable con una determinada fuente de hierro puede llegar a ser muy ineficiente si se emplea una fuente diferente de ZVI, aun en condiciones operativas similares. Por ejemplo, en las condiciones estudiadas en esta tesis, las nanopartículas de ZVI resultan un excelente material para tratamientos reductores (muy útiles en general para eliminar compuestos organoclorados) pero es una mala fuente de hierro para un tratamiento oxidativo mediante FAZ. Esto había sido sugerido en sistemas que utilizan persulfato como oxidante [64], pero hasta donde sabemos no se había reportado para el caso del H_2O_2 . El caso contrario es el de la lana de acero, que resulta un mal reductor pero un material muy adecuado para FAZ debido a su capacidad de sostener una liberación continua cationes de hierro en condiciones donde los otros materiales no lo hacen.

Una alternativa al FAZ en batch que combine el uso de ZVI con la reacción de Fenton consiste en separar espacialmente los procesos reductivos de los oxidativos, evitando de esta manera la reacción directa entre el ZVI y el H_2O_2 . Esta separación beneficiaría tanto la vía reductiva como la oxidativa al evitar la reacción directa entre el H_2O_2 y el ZVI. La revisión de los antecedentes así como el diseño y evaluación de un prototipo basado en este concepto se realizará en el próximo capítulo.

3- Reactor continuo basado en la técnica FAZ

3.1 FAZ en continuo: Introducción

3.1.1 Antecedentes

Como se discutió en el capítulo anterior, el agregado simultáneo de ZVI y H_2O_2 presenta varios inconvenientes: la reacción directa entre ambos provoca un consumo de oxidante en un ciclo fútil, perjudicando la vía oxidativa, reacción que además inhibe la reducción del colorante por parte del ZVI. Una solución evidente es hacer una separación del proceso de corrosión/reducción del proceso de oxidación. Existen pocos trabajos hechos en este sentido. Moon et al [83] demostró que si se realiza primero la incubación del colorante con el ZVI y el H_2O_2 es agregada luego de un tiempo se obtiene una mejora en la eficiencia de decoloración comparando con el agregado de ambos al inicio del proceso. Le et al. [42] fue un poco más allá y realizó una separación del ZVI y corrigió el pH antes de agregar H_2O_2 , obteniendo una mejora sustancial en la degradación.

Un sistema integrado donde la oxidación y la reducción son llevados en dos batchs agitados con un paso de sedimentación entre ellos fue estudiado por Jiang [84] para la degradación de nitrobenzeno, obteniéndose buenos resultados de degradación y con la ventaja adicional de disminuir la cantidad de dinitrobenzeno generado- un subproducto indeseado generado durante la reacción de Fenton.

Otros autores [43,85,86] propusieron un reactor con recirculado, donde la solución es bombeada en un ciclo cerrado entre una columna rellena con ZVI y un reactor donde se agrega el H_2O_2 para que se produzca la reacción de Fenton. Esta estrategia es una gran mejora comparada con una FAZ en batch clásica, pero no es un verdadero proceso continuo, ya que consiste en un ciclo cerrado donde la solución nunca se renueva. Además, parte del H_2O_2 sigue llegando al ZVI cuando la solución recircula por la columna, lo cual afecta la eficiencia de reducción, consume oxidante y disminuye el tiempo de vida de la columna. Por último, el continuo aumento de pH originado por la corrosión de la columna hace que la cantidad de ácido a agregar sea mayor. Estas cuestiones fueron observadas en ensayos preliminares durante esta tesis mientras se elegía el sistema más apropiado para el tratamiento. Se encontró que el agregado de H_2O_2 reducía notablemente la vida útil de la columna y que luego de unas horas de funcionamiento terminaba desintegrándose por la oxidación.

Diseños acoplado la reducción con ZVI y un proceso Fenton en sistemas continuos fueron publicados por Shen [87], Oh [41] y Barreto [40]. Los dos primero trabajos mencionados no son verdaderas FAZ ya que utilizan el pasaje por la columna con ZVI para que ocurra la reducción pero, en lugar de aprovechar los cationes de hierro producidos por esta, hacen un agregado de Fe(II) en forma de sal. Hasta donde sabemos, el único trabajo publicado que plantea un sistema FAZ continuo es el de Barreto, el cual obtiene excelentes resultados para la degradación de TNT. Sin embargo los efluentes de TNT a los que va dirigido el tratamiento tienen pH muy bajos (alrededor de 2), por lo que la eficiencia del sistema fue evaluada solo en esas condiciones de pH. Como ya mencionamos este no es el caso de muchos efluentes, tales como los textiles, que tienen

usualmente pHs neutros o alcalinos: la acidificación y posterior neutralización requieren un gasto adicional que es deseable minimizar.

Ninguno de estos trabajos acoplado un sistema ZVI con un proceso Fenton fue realizado en presencia irradiación con luz UV/Visible (Foto-Fenton), la cual es una alternativa interesante frente a la posibilidad de poder reemplazarla en un futuro por radiación solar. Esta estrategia ha demostrado muy buenos resultados para la degradación de procesos tipo-Fenton en batch, llegándose incluso a construirse plantas de tratamiento que utilizan radiación solar [22].

3.1.2 Objetivos

Diseñar un sistema FAZ continuo para el tratamiento de colorantes que funcione alrededor de pH 5, que como se vio en el capítulo anterior, es un punto de inflexión para la eficiencia de los procesos FAZ. Para mejorar la eficiencia de este sistema, se utilizará radiación UV-Visible.

Evaluar la respuesta del prototipo frente distintas variables operativas, de manera de encontrar un conjunto de estas que posean una buena eficacia de decoloración en condiciones moderadas de funcionamiento, en particular en lo concerniente al pH.

Obtener una superficie de respuesta para las variables operativas más relevantes del sistema. Por último, realizar ensayos complementarios así como medidas de Fe(II), Fe(III) y pH que contribuyan a interpretar los resultados obtenidos.

3.2 FAZ en continuo: Material y métodos

3.2.1 Reactivos

Como relleno de ZVI se utilizó lana de acero comercial (Mapavirulana®: C % 0.076–0.84, P % 0.015–0.018, S % 0.011–0.014, Mn % 0.810–0.86, Si % 0.115–0.146 [54]). Todas las soluciones fueron preparadas en agua destilada. El resto de los reactivos son los mismos que los descritos en la sección 2.2.1.

3.2.2 Montaje experimental y metodología.

La representación esquemática y la imagen del equipo utilizado, junto a un detalle de las partes que lo componen, se muestran a continuación. El sistema consta de un recipiente plástico conteniendo una solución de AB1 (50 mg/L, salvo que se indique lo contrario) y Na₂SO₄ (5 mM) cuyo pH fue ajustado con NaOH y H₂SO₄ hasta el pH deseado con una precisión de ± 0.02 . Esta solución fue bombeada con un caudal de entre 15.00–75.00 mL/min, utilizando una bomba peristáltica (Longerpump BT100-2J, que llamaremos Bomba 1), a través de una columna cilíndrica (12.0 cm de lado x 2.15 cm de diámetro) que se encuentra rellena con 3.0 g de lana de acero.

La elección de la lana de acero frente a otros rellenos se debió a estudios previos de nuestro grupo en los cuales se encontró que este material presenta muchas ventajas prácticas frente a otros (tales como las granallas o el hierro en polvo). Entre estas podemos mencionar la facilidad de manejo y la baja pérdida de conductividad hidráulica durante el tiempo de operación (lo que permite mantener el caudal constante sin variar la presión de entrada). Además, como se vio en la sección 2.3.11.1, la lana de acero

presenta una buena capacidad de liberar cationes de hierro aún a pH cercanos a la neutralidad.

Luego del pasaje a través de la columna, la solución tratada por contacto con el ZVI (que llamaremos C_{out} a partir de ahora) pasó a través de una manguera donde se le dosificó H_2O_2 (0.1-1.5 M) utilizando una segunda bomba peristáltica (Apema PC25, Bomba 2 a partir de ahora) ajustada a un caudal igual al 1% del de la bomba 1.

Esta solución entró en un reactor de pyrex de 1,5 l con agitación magnética, dentro del cual se encuentra la lámpara y se produce la oxidación. El pH del reactor fue monitoreado y ajustado de manera automática al pH deseado ± 0.1 utilizando un sistema Aquatron que utiliza dos bombas de diafragma para dosificar H_2SO_4 (0.05 M) o $NaOH$ (0.1 M) de acuerdo a la necesidad. En todas las condiciones ensayadas, las adiciones de ácido o base para la corrección de pH representaron menos del 1 % del volumen de solución tratada.

El volumen de solución contenido en el reactor fue regulado por rebalse a partir de la altura de una manguera de silicona conectada a la parte inferior de este. Es por esta manguera por donde salió la solución tratada. Todas las otras mangueras utilizadas con en el sistema eran también de silicona.

El sistema se deja funcionar hasta que alcanza el estado estacionario, aproximadamente luego del pasaje de 6 litros de solución. La solución tratada en el reactor (R_{out}) es recogida y analizada de manera análoga a los procedimientos en batch (ver sección 2.2.7).

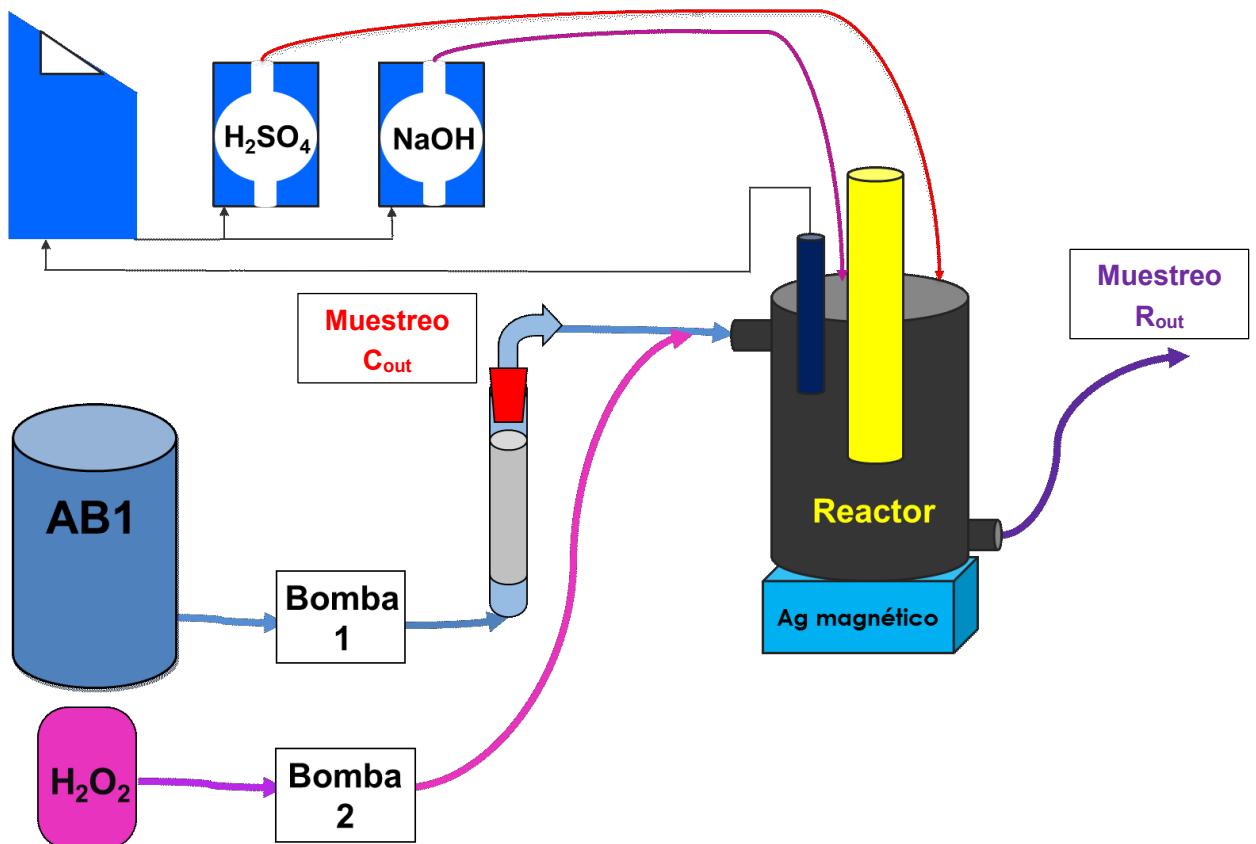


Figura 39: Esquema del sistema utilizado donde se indican los puntos de muestreo C_{out} y R_{out} .

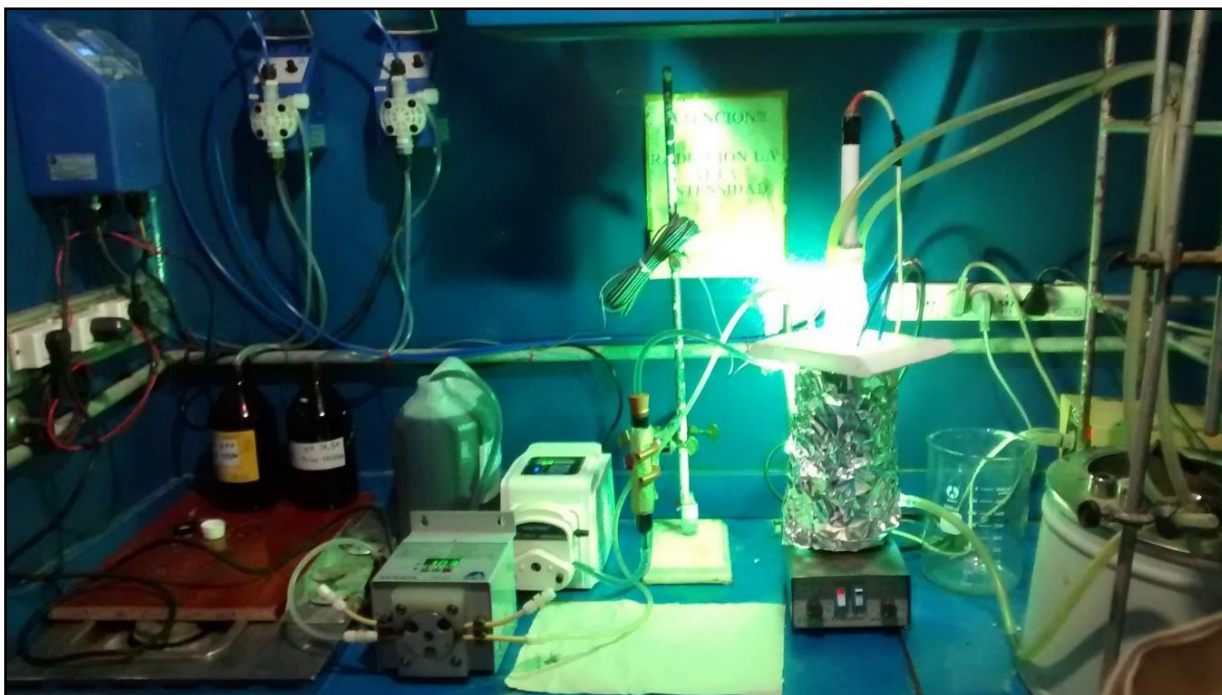


Figura 40: Foto del sistema utilizado.



Figura 41: Detalle de las bombas peristálticas utilizadas. A la izquierda se muestra la bomba 1 y a la derecha la bomba 2.

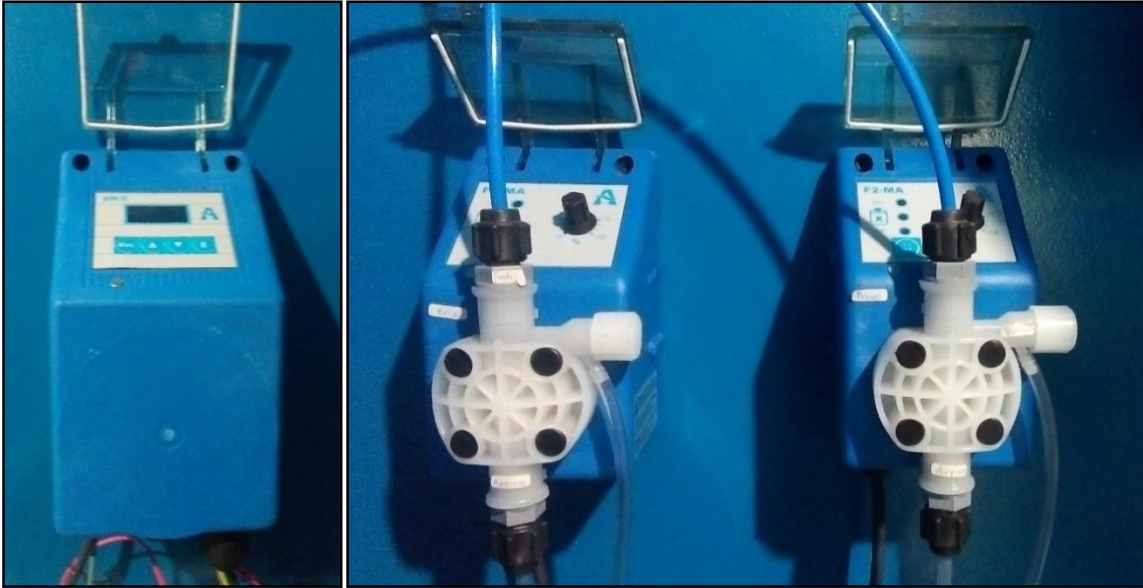


Figura 42: Sistema controlador de pH Aquatron®.

A la izquierda se encuentra el controlador que, en función del pH deseado y la lectura del electrodo de pH, manda la señal de activación a las bombas dosificadoras. A la derecha se encuentran las bombas dosificadoras de H_2SO_4 e $NaOH$.

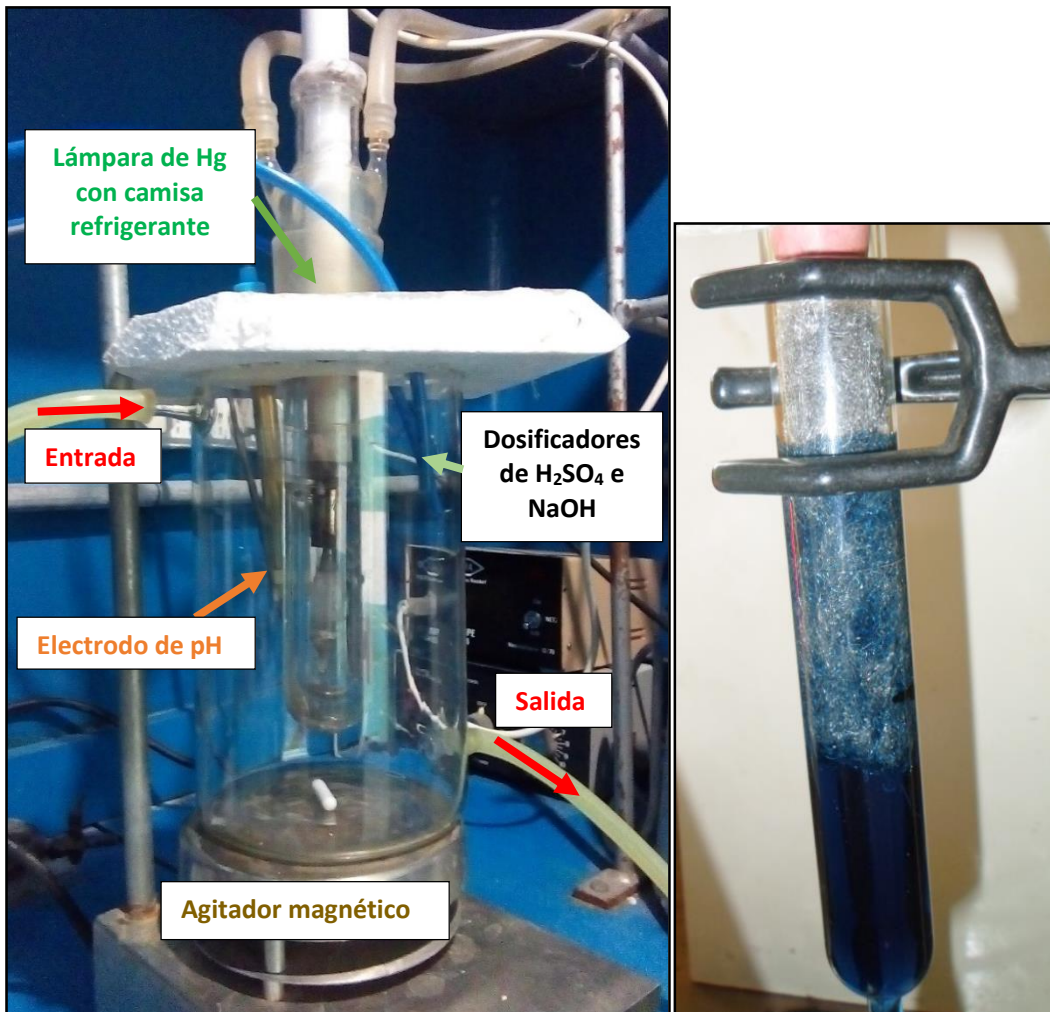


Figura 43: Detalle del reactor (izquierda) y detalle de la columna (derecha).

3.2.3 Características de la lámpara

El sistema de irradiación consiste en una lámpara de arco de Hg de media presión (Philips HPK 125), recubierta por una camisa de pyrex, por donde circula agua continuamente para refrigerar el sistema. Esta camisa actúa además como filtro de corte para el espectro de emisión de la lámpara, dejando pasar solo la luz visible/UV cercano (> 300 nm) para evitar la fotólisis directa del H_2O_2 . El espectro de la lámpara fue obtenido con un espectrómetro Ocean Optics Inc. Modelo SD2000, y se muestra en la Figura 44. El espectro de la lámpara posee varios picos de emisión a 303, 313, 335, 366, 405 y 406 nm. Debido a la forma del espectro del Fe(III), solo los dos primeros son de importancia ya que entre ambos representan el 97 % de los fotones absorbidos por el Fe(III) en ausencia de otras sustancias. La cantidad efectiva de luz aprovechada por el Fe(III) es difícil de calcular debido a que tanto su concentración como la cantidad de luz absorbida por la solución tratada son variables y altamente dependientes de las condiciones operativas.

Experimentos de control mostraron que la solución de AB1 y la solución reducida (C_{out}) en ausencia de H_2O_2 no presentan cambios espectrales indicativos de fotólisis en los tiempos estudiados.

La intensidad incidente de la lámpara fue determinada mediante una actinometría con ferrioxalato de potasio y es igual a 3.2×10^{-6} Eins. $s^{-1}.L^{-1}$. A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos fueron llevados a cabo bajo irradiación en el reactor ubicado a la salida de la columna rellena con ZVI.

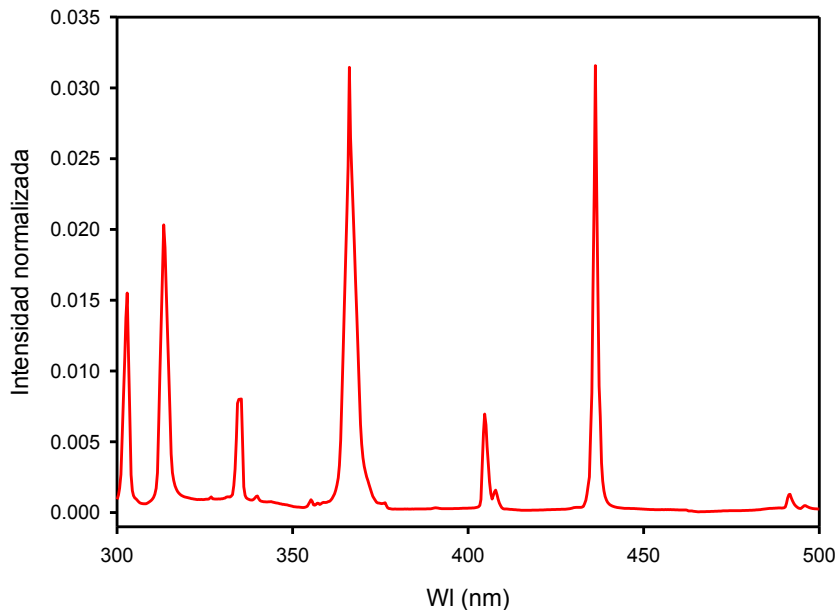


Figura 44: Espectro de irradiación de la lámpara utilizada.

3.2.4 Parámetros de funcionamiento

Como se discutió en el capítulo 2, la presencia de productos de reducción derivados del TAHNDS así como de productos de oxidación parcial del AB1 pueden dar lugar a soluciones coloreadas que, sin embargo, absorban poco a 620 nm. Debido a que en este capítulo se pretende encontrar condiciones que permitan decolorar completamente la solución y no solo a esa longitud de onda se eligió utilizar un parámetro más global, que

es la disminución del área debajo del espectro de absorción de la solución entre 400-700 nm.

$\text{Remoción color } \% = 100 * \left(1 - \frac{\int_{400}^{700} A_{\text{muestra}} \cdot d\lambda}{\int_{400}^{700} A_{\text{inicial}} \cdot d\lambda} \right)$	Ecuación 3
--	-------------------

Se siguieron los perfiles de Fe(II) y Fe(III) por los métodos colorimétricos ya descritos. Asimismo, para muestras seleccionadas se midieron los cambios del carbono orgánico total.

3.2.5 Análisis mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM)

Para evaluar la eficiencia del reactor en función de las variables operativas utilizadas, se decidió usar la estrategia de RSM (“Response Surface Methodology”). Hasta ahora el análisis de las variables estudiadas se hizo variando un parámetro a la vez, manteniendo el resto constante, y observando su efecto sobre la respuesta. Esta estrategia (llamada una variable por vez, u OVAT) es útil a la hora de analizar en detalle comportamientos simples, pero no permite realizar la optimización de varias variables simultáneamente, y posee dificultades para detectar interacciones entre ellas. Además requiere de un gran número de ensayos para obtener resultados de significancia estadística. Para poder sortear estos inconvenientes es necesario hacer un análisis multivariado, de los cuales la metodología RSM es el más popular.

El primer paso para realizar RSM consiste en realizar un screening para seleccionar las variables y los rangos a estudiar. Este screening puede a su vez realizarse mediante un método multivariado, con motivo de optimizar el número de ejecuciones a realizar. En esta tesis el screening se ha realizado mediante OVAT, debido a que resulta más intuitivo a la hora interpretar el origen del efecto de cada una de las variables.

El segundo paso consiste en plantear un diseño experimental que permita barrer esta región del espacio de variables. Este diseño debe de plantearse de manera de minimizar el número de ejecuciones y a la vez de ser lo suficientemente sensible como para detectar los efectos de estas variables en la región estudiada. Algunos de estos diseños son el diseño cúbico central o central compuesto (CCD), el diseño de Box-Behnken, el diseño factorial, el diseño de Dohelert y el diseño de Draper-Lin. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas, siendo el CCD el más utilizado [88] y el elegido en esta tesis.

El CCD consiste en:

- Un diseño factorial de 2 niveles, donde cada variable a estudiar se evalúa a un nivel alto y otro bajo, haciendo todas las combinaciones posibles de estos niveles para las distintas variables.
- La ejecución de varias repeticiones del punto central, correspondiente al valor medio de cada una de las variables anteriores. Estos valores se utilizarán para estimar el error aleatorio del diseño.
- La ejecución de puntos axiales o estrella, estudiando cada una de estas variables a 2 niveles adicionales (llamados usualmente $+\alpha$ y $-\alpha$) a la altura del punto central, lo cual me permite estudiar la curvatura del modelo. Este valor de α , llamado distancia axial,

puede ser elegido para otorgarle ortogonalidad y/o rotabilidad al diseño. Un diseño rotable posee la misma varianza para todos los puntos que se encuentran a igual distancia del punto central. Un diseño se denomina ortogonal si los efectos de un factor sobre los otros factores suman cero, eliminando la correlación entre los efectos principales y las interacciones. Ambas propiedades son deseables desde un punto de vista estadístico.

Una representación esquemática para un CCD aplicado al estudio de las 3 variables fue publicada por Cho et al (2007) [89] y se muestra en la Figura 45.

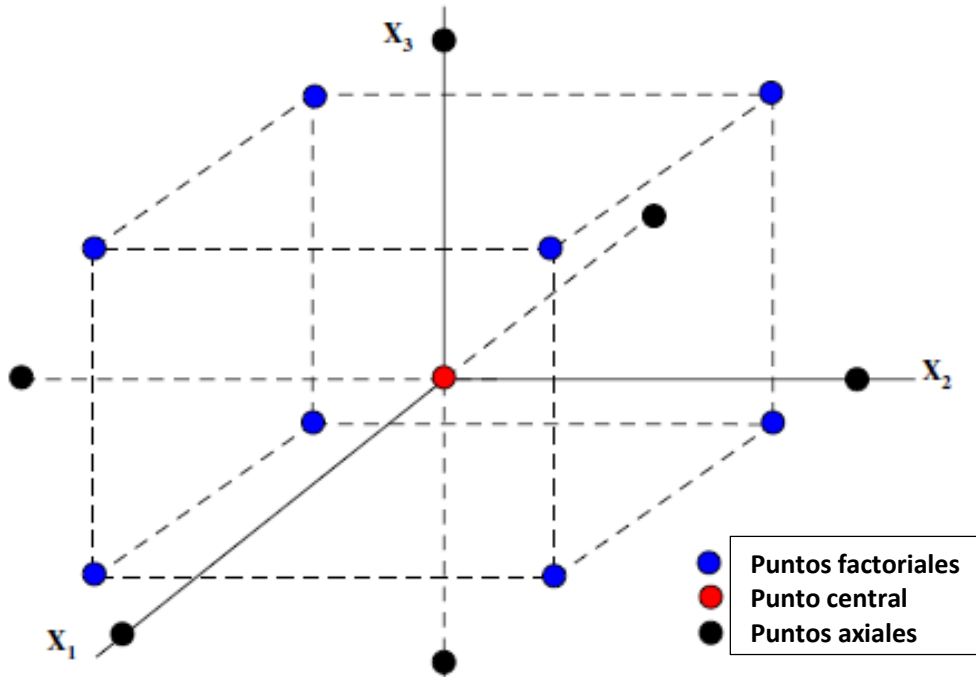


Figura 45: Esquema de las ejecuciones a realizar en un CCD aplicado a 3 variables.

En este capítulo se eligió la realización de un CCD para 4 factores, con 4 replicados del punto central y utilizando un valor de α de 2, lo que le otorga rotabilidad al diseño. El número total de ejecuciones con este diseño es de 28 (16 puntos factoriales, 4 puntos centrales y 8 puntos axiales).

El tercer paso consiste en plantear un modelo matemático que ajuste satisfactoriamente los resultados obtenidos en función de las variables. Si se pretende encontrar un máximo (o mínimo) en la respuesta, y además expresar la presencia de interacciones entre las variables, el modelo más sencillo a plantear consiste en un polinomio de grado 2 que incluya los términos lineales y cuadráticos de cada variable, así como también los términos cruzados de estas variables. Para 4 variables, representadas por A, B, C y D y una respuesta R este modelo sería:

$$R = k_1 + k_2 * A + k_3 * B + k_4 * C + k_5 * D + k_6 * A * B + k_7 * A * C + k_8 * A * D + k_9 * B * C + k_{10} * B * D + k_{11} * C * D + k_{13} * A^2 + k_{14} * B^2 + k_{15} * C^2 + k_{16} * D^2$$

Donde $k_1, k_2 \dots k_{16}$ son los parámetros a ajustar. Una vez construido el modelo puede resultar que algunos de sus términos resulten no tener significancia estadística. En este caso se considera que el sistema se encuentra sobrep parametrizado y debe ser refinado posteriormente mediante la eliminación, uno a la vez, de los términos no significativos.

Luego de realizar las ejecuciones, el cuarto paso consiste en ajustar por mínimos cuadrados los parámetros del modelo a los valores de respuesta obtenidos y realizar un análisis de varianza (ANOVA) del ajuste. Una vez refinado el modelo mediante eliminación de aquellos términos no significativos, se obtiene un polinomio que ajusta la respuesta (en nuestro caso la remoción de color) en función de las variables estudiadas. Este ajuste permite realizar representaciones gráficas de la dependencia de la respuesta con las variables (obteniendo las llamadas superficies que dan nombre a la metodología RSM), encontrar un conjunto de valores de variables que presenten una respuesta óptima en el rango estudiado y predecir la respuesta a obtener para un conjunto de variables dado.

El análisis de los resultados, así como la construcción de los gráficos y diagramas obtenidos fueron realizados con el software Sthathgraphics Centurion XVI®.

3.3 FAZ en continuo: Resultados y discusión

3.3.1 Efecto del H_2O_2 sobre el relleno de la columna

En el capítulo 2 se demostró que cuando se realizaba la FAZ con ZVI en forma de polvo electrolítico en ensayos en batch, la reacción directa entre el ZVI y el H_2O_2 no producía un aumento en la cantidad de Fe(II) soluble. En el caso de la virulana se observaron cantidades importantes de Fe(II) aún en presencia de H_2O_2 , aunque no se pudo discernir si este se producía durante la corrosión mediada por peróxido o por aquella mediada por H^+/O_2 (los experimentos en ausencia de H_2O_2 no resultan comparables debido a la diferencia entre los perfiles de pH).

Para evidenciar si existe una contribución por parte del H_2O_2 a la generación de Fe(II) a la salida de la columna cuando la solución es bombeada a través de un lecho relleno con lana de acero, se bombearon soluciones de distinta concentración de H_2O_2 a través de la columna, se esperó a que el sistema entre en régimen (40 minutos) y se midió la concentración de Fe(II) y H_2O_2 a la salida. Los resultados se muestran en la Figura 46. Como puede observarse, durante el pasaje de la solución el H_2O_2 es consumida completamente en la columna cuando se utilizan concentraciones iguales o menores a 0.1 mM, mientras que a concentraciones mayores una pequeña porción de esta (10-20 %) queda sin consumirse. En cuanto al Fe(II) a la salida puede observarse una clara disminución conforme se aumenta la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ a la entrada de la columna.

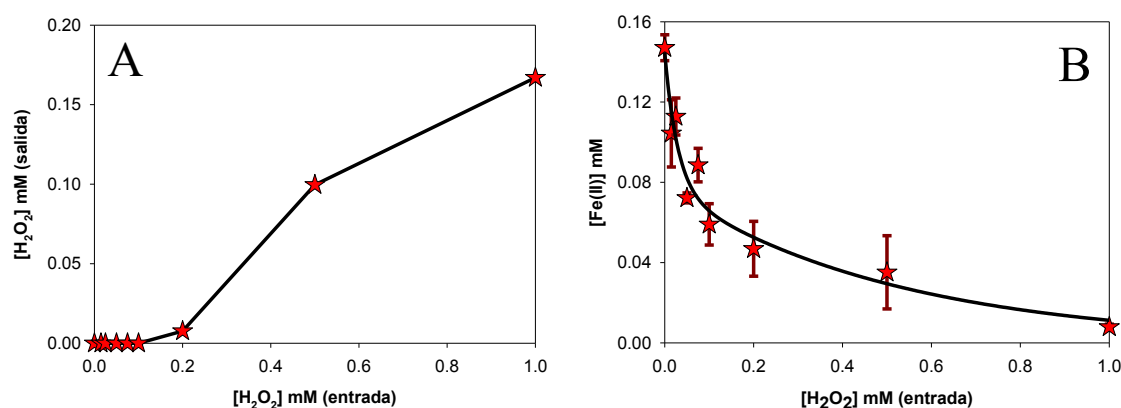


Figura 46: Medidas de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (A) y $[\text{Fe(II)}]$ (B) a la salida de la columna en función de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ a la entrada.

Condiciones: $\text{pH}_{\text{inicial}} = 7.00$, caudal = 15.0 mL/min, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0\text{-}1$ mM, Temp = 26 ± 2 °C. Las barras de error representan ± 2 DE, n=3.

El ataque del H_2O_2 al ZVI tiene otra desventaja en lo que concierne a la vida útil de la columna. Si bien un análisis de curvas de ruptura para calcular la duración de la columna en el sistema se encuentra fuera del alcance de este trabajo, el aumento de la corrosión de la columna debido a la presencia de H_2O_2 puede evidenciarse a simple vista. A modo de ejemplo la Figura 47 muestra las fotos de la columna antes y después del pasaje de una solución 15 mM de H_2O_2 a pH 5 con un caudal de 15 mL/min durante 1 hora. Nótese como la generación de oxohidróxidos debida al pasaje de la solución se observa a simple vista como una opalescencia amarillenta. Además se observa una importante oxidación del relleno en presencia de H_2O_2 , mucho mayor que la observada en ausencia de peróxido.

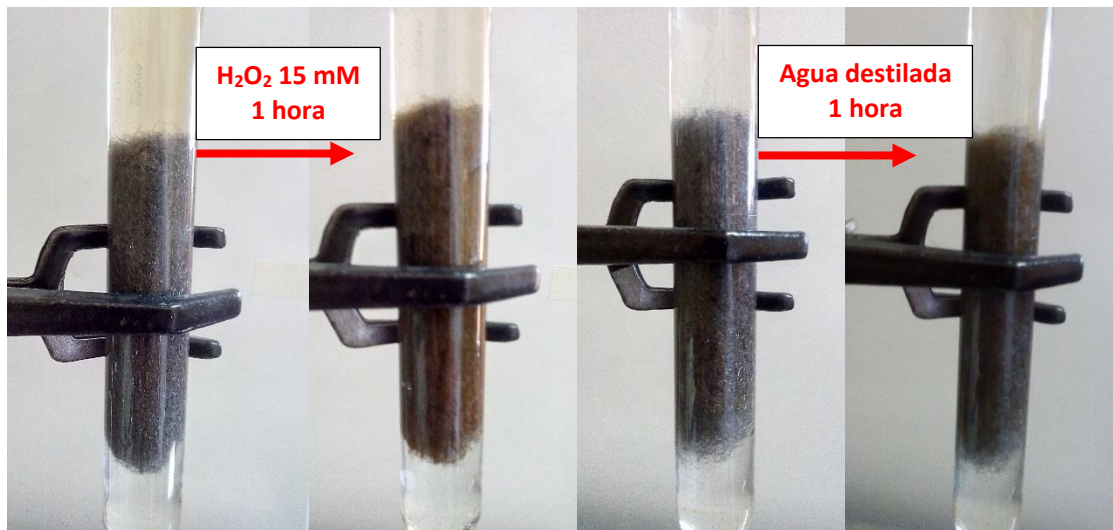


Figura 47: Fotos de la columna antes y después del pasaje de una solución de H_2O_2 con su respectivo control.

Condiciones: $\text{pH}_{\text{inicial}} = 7.00$, caudal = 15.0 mL/min, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0\text{-}1$ mM, Temp = 26 ± 2 °C.

Estos resultados confirman que el agregado del H_2O_2 a la entrada de la columna resulta contraproducente porque i) se consume oxidante, ii) se produce menos Fe(II) y iii) se pierde parte de la vida útil de la columna. Por estas razones es recomendable evitar el contacto entre el H_2O_2 y el ZVI.

3.3.2 Espectros obtenidos durante la degradación de AB1 en el sistema FAZ continuo

En la Figura 48 se muestran los espectros UV-visible de las muestras obtenidas durante uno de los tratamientos en el sistema FAZ continuo. En función de las discusiones del capítulo anterior, el espectro a la salida de la columna (C_{out}) está compuesto por una mezcla del espectro de AB1 que quedó sin reaccionar y el de sus productos de reducción, como es de esperarse para una reducción con ZVI incompleta. El espectro final de la solución tratada (R_{out}) está compuesto por una mezcla de productos orgánicos con un alto grado de oxidación, con poca absorción en el visible/UV cercano, además de cationes férricos solubles y H_2O_2 residual.

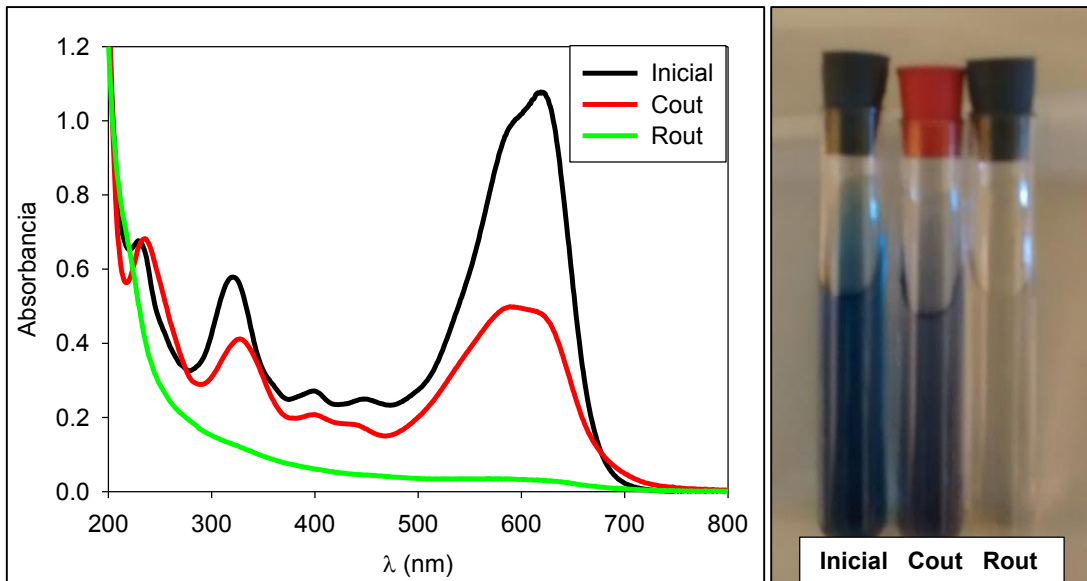


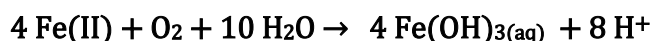
Figura 48: Espectro (izquierda) y fotografía (derecha) de una muestra de la solución inicial, la solución a la salida de la columna (Cout) y la solución a la salida del reactor (Rout) durante un tratamiento FAZ continuo.

Condiciones: $[AB1]_0 = 50 \text{ mg.L}^{-1}$, pH inicial = 5.00, pH del reactor = 4.0, HRT= 60 min, $[H_2O_2] = 8 \text{ mM}$, Temp = $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como primera aproximación para evaluar el funcionamiento del sistema se realizaron una serie de estudios preliminares que permitieron identificar las variables más importantes que afectan la eficiencia en la remoción de color del sistema, de manera de poder incluirlas en un diseño experimental. Asimismo estos ensayos permitieron seleccionar un rango adecuado para estudiar estas variables. Las variables evaluadas durante estos ensayos fueron el pH inicial, el pH del reactor, el tiempo de retención hidráulico (HRT por sus siglas en ingles), la concentración de H_2O_2 a la entrada del reactor, la concentración de colorante inicial y la presencia de radiación.

3.3.3 Efecto del pH inicial

Como se discutió en la sección 2.3.4, el pH de la solución varía en el tiempo en los sistemas FAZ por lo que es necesario hacer una diferencia entre el pH inicial (al cual se preparó originalmente la solución) y el pH del reactor (al cual se va a llevar a cabo la reacción de oxidación). La solución entrará a la columna con el $pH_{inicial}$ y por lo tanto es éste el que controlará los procesos de corrosión y reducción. Luego de su pasaje por la columna el pH se incrementa desde un valor inicial de 4.00-6.00 hasta un valor promedio de 6.5 ± 0.4 (valor que depende en parte de las variables operativas utilizadas). A este pH, el Fe (II) es inestable y tiende a oxidarse a Fe(III) e hidrolizarse rápidamente liberando H^+ en el proceso y estabilizando el pH en un valor cercano a 5.8 luego de la primera hora de funcionamiento. Este comportamiento de la columna es equivalente al observado en los ensayos en batch en la sección 2.3.4, si bien el valor exacto puede no coincidir por las diferencias entre los sistemas. La estequiometría global del proceso, que incluye la reacción de oxidación de Fe(II) a Fe(III) y la formación de $Fe(OH)_{3(aq)}$ se esquematiza en la Reacción 20.


Reacción 20

Por otro lado, en condiciones donde la oxidación es importante, el ataque de los radicales HO^{\bullet} a la materia orgánica genera ácidos orgánicos solubles como intermediarios que tienden a disminuir el pH de la solución, tal como se observó para la virulana en la sección 2.3.11.1. Debido a que todos estos procesos ocurren de manera simultánea y tienen cinéticas distintas, para poder estudiar correctamente el sistema y obtener buenas eficiencias de degradación es necesario ajustar y controlar el pH de la solución una vez que esta ingresa al reactor (función desempeñada por el sistema controlador de pH Aquatron). Es a este último pH al que nos referiremos como pH reactor. Para mantener este pH normalmente hace falta agregar H_2SO_4 al comienzo del funcionamiento, y luego corregir con NaOH en las últimas etapas.

El diseño experimental planteado es capaz de controlar ambos pHs de manera completamente independiente, lo que permitió sacar conclusiones sobre si para un tratamiento aplicado el ajuste de pH debe de realizarse únicamente en la etapa inicial, solo en la etapa oxidativa o si es imprescindible realizar un doble ajuste del pH.

En la Figura 49 se muestra el efecto del pH inicial sobre la remoción de color luego de la etapa reductiva (C_{out}) y luego del tratamiento completo (R_{out}). Con el objeto de evaluar el efecto de decoloración únicamente sobre la etapa oxidativa se muestran también los valores de la diferencia entre ambos ($R_{\text{out}} - C_{\text{out}}$).

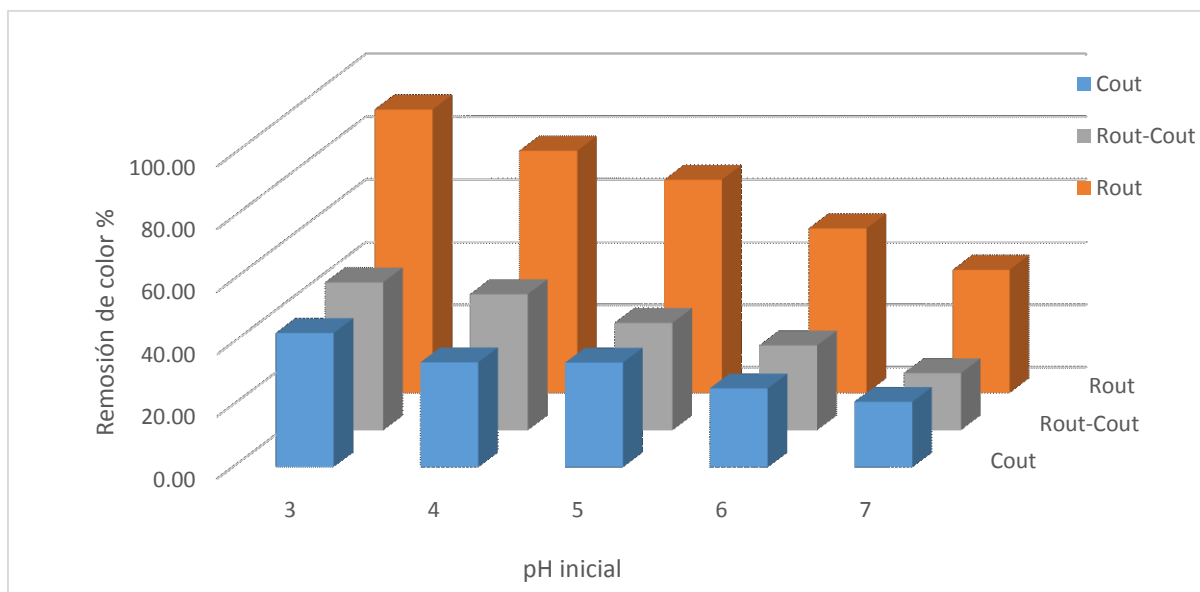


Figura 49: Efecto del pH inicial sobre la decoloración para C_{out} , R_{out} y $R_{\text{out}} - C_{\text{out}}$.
 Condiciones: $[\text{AB1}]_0 = 50 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{pH}_{\text{inicial}} = 3.00-7.00$, $\text{pH}_{\text{reactor}} = 5.0$, $\text{HRT} = 60 \text{ min}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8 \text{ mM}$, $\text{Temp} = 27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tal como se esperaba a partir de las discusiones del capítulo anterior sobre el sistema ZVI/ N_2 , la remoción de color durante la reducción (C_{out}) se ve favorecida por pH ácidos. Por otra parte, el hecho de que esto también ocurra para el proceso puramente oxidativo ($R_{\text{out}} - C_{\text{out}}$), a pesar de que la oxidación haya ocurrido en todas las condiciones a $\text{pH}_{\text{reactor}} = 5.0$, se debe fundamentalmente a que el $\text{pH}_{\text{inicial}}$ afecta la cantidad de cationes de hierro solubles que llegan al reactor y, por lo tanto, se encuentran disponibles para participar en la reacción de Fenton. Esto puede observarse en los perfiles de hierro

obtenidos (Figura 50), donde la $[Fe(II)]$ disminuye drásticamente conforme aumenta el $pH_{inicial}$. Esta disminución se origina en parte debido a una disminución de la corrosión del ZVI, y en parte debido a la oxidación del $Fe(II)$ mediada por O_2 (Reacción 1). Como consecuencia, es la concentración de $Fe(II)$ la que controla la efectividad del sistema.

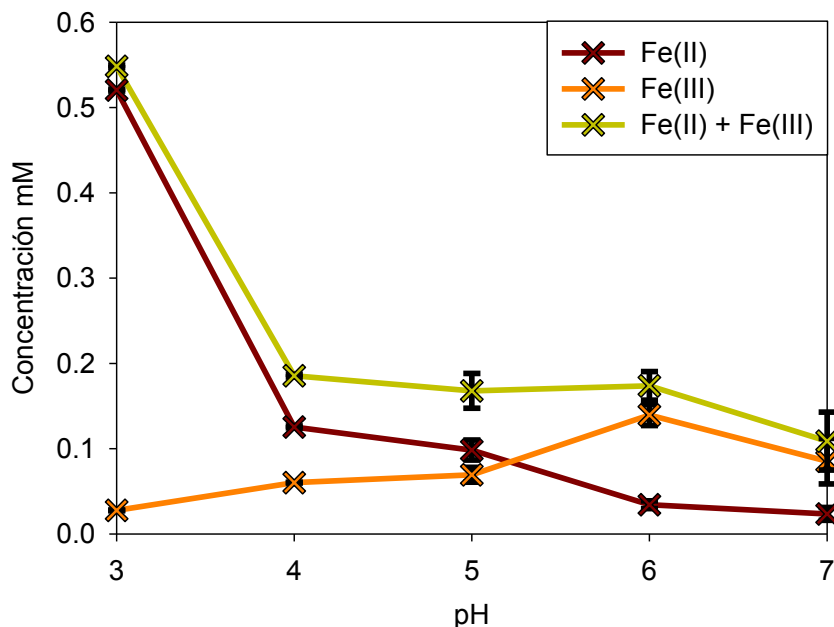


Figura 50: Efecto del pH inicial sobre los perfiles de cationes de hierro a la salida de la columna.

Condiciones: $[AB1]_0 = 50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $pH_{inicial} = 3.00-7.00$, $pH_{reactor} = 5.0$, $HRT = 60 \text{ min}$, $[H_2O_2] = 8 \text{ mM}$, $Temp = 27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Las barras de error corresponden a $\pm 2 \text{ DE}$ con $n = 3$.

Hay que señalar que, a pesar de que en principio el $Fe(III)$ es capaz de regenerar $Fe(II)$ a través de la Reacción 9 y la Reacción 10, el alto pH a la salida de la columna hace que el $Fe(III)$ se encuentre mayoritariamente en forma de polímeros metaestables que dificultan el proceso de reducción ya sea por la reacción con H_2O_2 o con la luz UV/Vis de la lámpara. Más aún, el relleno de ZVI favorece la polimerización/precipitación debido a las altas $[OH^-]$ locales generados cerca de la superficie del ZVI y a la presencia de óxidos. Si se usan cantidades similares de $Fe(III)$ a las producidas en la columna (0.09 mM) pero en forma de $Fe(ClO_4)_3$ para realizar la fotólisis, a los 60 minutos se logra la total remoción de color de la solución, con una disminución del TOC del 85 %. Este resultado es mejor incluso que el obtenido a $pH_{reactor} = 4.0$ para nuestro sistema (ver Figura 51A), y puede ser explicado por la mayor inestabilidad del $Fe(III)$ generado por la corrosión del ZVI comparado con el proveniente de la sal.

3.3.4 Efecto de la irradiación y del pH del reactor

En la Figura 51 se comparan los resultados del efecto de la irradiación sobre los valores de remoción de color y TOC, utilizando valores de pH en el reactor de 4.0 (A) y de 5.0 (B). A ambos pHs, la irradiación tiene un efecto positivo muy importante, sobre todo en lo concerniente a la disminución del TOC. Este comportamiento está asociado a las vías adicionales de generación de radicales y regeneración de $Fe(II)$ (Reacción 10), tal como fue discutido para los procesos Foto-Fenton en la introducción. Debido a esta mejora, se decidió realizar todos los experimentos en presencia de irradiación. No obstante es

necesario señalar que las eficiencias de degradación obtenidas con un pH en el reactor de 4.0 en ausencia de radiación también son muy buenas (76.7 % de remoción de color y 9.6 % de disminución de TOC con solo una hora de tiempo de tratamiento), por lo que la utilización de pH más ácidos en el reactor puede ser una buena alternativa para decolorar efluentes si la irradiación no es posible.

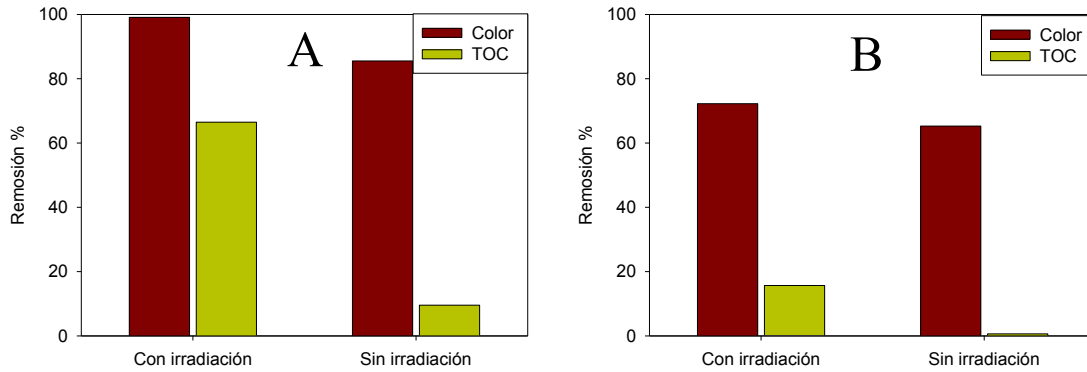


Figura 51: Efecto de la irradiación sobre la remoción de color y TOC utilizando un pH de reactor de 4.0 (A) y 5.0 (B).

Condiciones: $[AB1]_0 = 50 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$, $\text{HRT} = 60 \text{ min}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8.00 \text{ mM}$, $\text{Temp} = 27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.5 Efecto de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ y del HRT

La concentración real del H_2O_2 en el estado estacionario es difícil de controlar ya que depende tanto de la cantidad inicial agregada, del tiempo de residencia hidráulico (HRT) y de la velocidad de consumo (que es dependiente a su vez de todos los demás factores). En este capítulo cuando hablemos del efecto de la concentración de H_2O_2 nos referiremos a la concentración inicial de H_2O_2 luego del mezclado con la solución proveniente del pasaje por la columna (C_{out}). Este valor es fácil de calcular en función de los caudales utilizados y de la dosificación del H_2O_2 . En cuanto al tiempo de residencia hidráulico (HRT), este es el tiempo medio que el líquido pasa en el reactor donde se produce la oxidación y es regulado con el caudal de la bomba 1. Debido que este caudal también regula el pasaje del líquido a través de la columna donde se produce la reducción, el HRT está directamente relacionado con el tiempo de retención en la columna, siendo este último un 7 % del valor del primero (debido a la diferencia de volúmenes). El efecto del HRT y de la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ sobre la remoción de color y de TOC de muestran en la Figura 52.

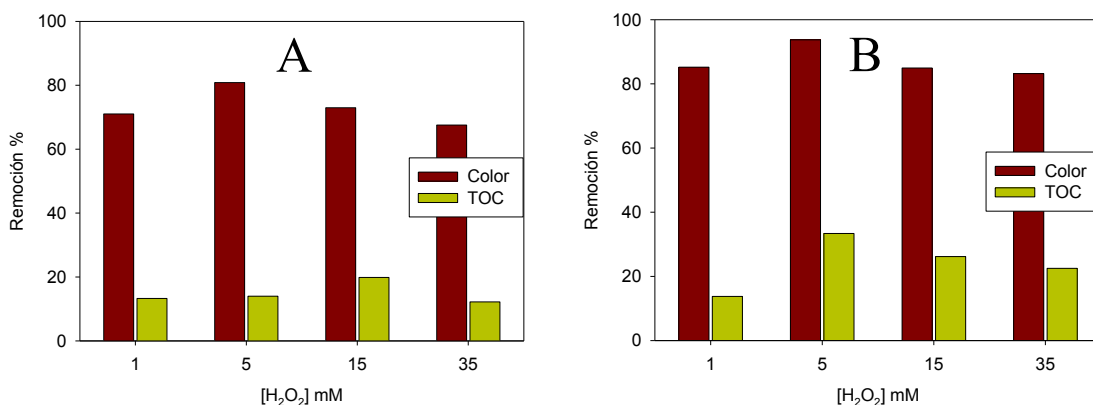


Figura 52: Efecto de la [H₂O₂] y del HRT sobre la remoción de color y el TOC luego del tratamiento (R_{out}).

Condiciones: HRT = 40 (A) y 100 (B) min, [AB1]₀ = 50 mg.L⁻¹, pH_{inicial} = 5.00, pH_{reactor} = 5.0, [H₂O₂] = 1-35 mM, Temp = 19 ± 2 °C.

Se encontró un máximo de eficiencia para concentraciones de H₂O₂ de entre 1-15 mM para ambos HRT evaluados. La presencia de un máximo se debe a que a altas concentraciones el H₂O₂ actúa como scavenger de los radicales generados (reacción R13). En ausencia de H₂O₂, los espectros obtenidos para C_{out} y R_{out} fueron los mismos, confirmando la ausencia de oxidación en ausencia de peróxido, la fotólisis directa del AB1 y la fotoreducción de Fe(III) como fuentes importantes de generación de OH[•]. El HRT también posee un efecto importante en la degradación, ya que un aumento de 40 a 100 minutos en el tiempo de residencia provoca un incremento considerable tanto en la remoción de color como en la disminución del TOC.

3.3.6 Efecto de la concentración de colorante

Como último ensayo preliminar se estudió el efecto de la concentración inicial de AB1 (Figura 53). Para bajas concentraciones (entre 25-100 mg/L) no se encontraron diferencias significativas en la remoción de color, encontrándose una disminución de la eficiencia a concentraciones más altas (250 mg/L). Esta disminución puede explicarse considerando que, debido a las altas absorciones en la región UV-visible de la muestra, es muy probable que ocurra un efecto de pantalla o de filtro interno; esto es una competencia entre el Fe(III) y los compuestos relacionados con el AB1 por los fotones de la lámpara. Esto se debe a la alta absorción de luz que posee el AB1 a bajas longitudes de onda (≈ 0.5 unidades de absorbancia a 300 nm para [AB1]=250 mg/L) que son las utilizadas por el Fe(III) para llevar a cabo la fotoreducción hacia Fe(II) (Reacción 10). Dado que el efecto de la [AB1]₀ fue poco importante en el rango de concentraciones usualmente estudiado para la degradación de colorantes, este factor no fue incluido en el diseño.

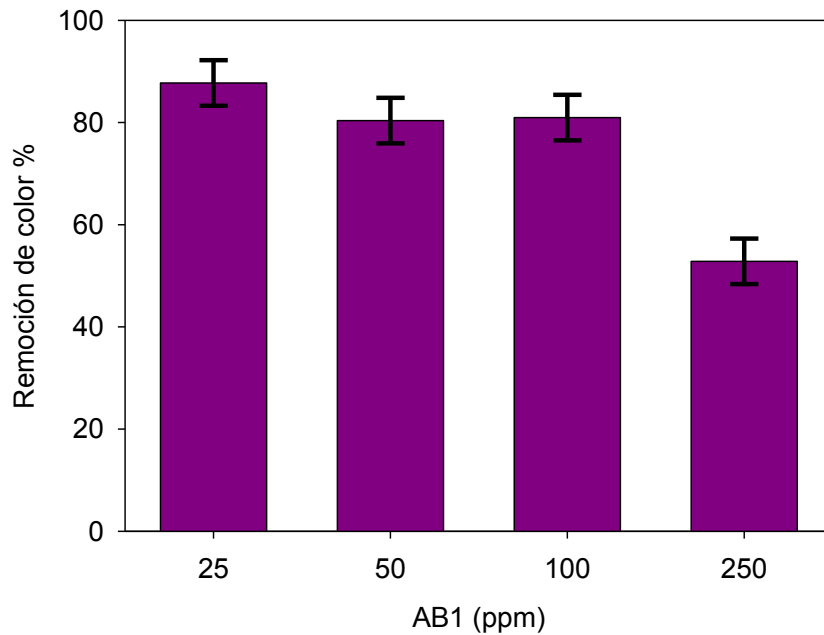


Figura 53: Efecto de la concentración inicial de AB1 sobre la remoción de color. Condiciones: $[AB1]_0 = 25-250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5.00$, $\text{pH}_{\text{reactor}} = 5.00$, $\text{HRT} = 60 \text{ min}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8.00 \text{ mM}$, $\text{Temp} = 27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Las barras de error representan $\pm 2 \text{ DE}$ de los ensayos hechos con 50 mg/L de colorante, $n = 4$

3.3.7 Estudio mediante superficies de respuesta (RSM)

Como se explicó en la introducción, con el objeto de optimizar las variables operativas se realizó un análisis de RSM a partir de un diseño cúbico central (CCD) rotatable con 4 replicados del punto central, ajustando los resultados a un modelo polinomial cuadrático que considera los productos lineales cruzados entre las variables. El error puro de los ensayos fue calculado a partir de los replicados del punto central.

Sobre la base de los estudios preliminares se decidió fijar la concentración inicial de AB1 a 50 mg/L y aplicar irradiación en todo el diseño. Las 4 variables seleccionadas fueron el pH inicial, el pH del reactor, la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ y el HRT. Los rangos de pH utilizados, tanto para el pH inicial como para el pH del reactor, se centraron alrededor de 5 debido a que uno de los objetivos es utilizar la menor cantidad de ácido posible y este valor es un valor de quiebre en la eficiencia de las FAZ, tal como fue discutido en el capítulo 2. Por esta razón, los valores de pH a utilizar (inicial y de reactor) fueron variados de manera independiente entre 4 y 6.

La concentración de H_2O_2 se varió entre $1-15 \text{ mM}$ y el HRT se varió entre $20-100 \text{ min}$. La remoción de color %, tal como fue definida en la sección 3.2.4 (Ecuación 3), fue tomada como variable de respuesta. Las condiciones de las corridas experimentales realizadas junto con las respuestas obtenidas en cada ensayo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Ejecuciones y respuestas obtenidas en el CCD.

Corrida experimental	Variables				Respuesta
	pH inicial	pH Reactor	HRT (min)	[H ₂ O ₂] mM	Remoción de color (%)
1	5.0	5.0	60	8.0	67.16
2	4.0	5.0	60	8.0	76.67
3	6.0	5.0	60	8.0	51.34
4	5.0	5.0	60	15.0	76.60
5	5.0	5.0	60	1.0	56.02
6	4.5	5.5	40	4.5	39.95
7	4.5	5.5	80	11.5	64.92
8	5.5	4.5	80	4.5	93.81
9	5.5	4.5	80	11.5	90.17
10	4.5	4.5	80	11.5	93.31
11	5.0	5.0	60	8.0	69.58
12	5.5	5.5	80	4.5	51.58
13	5.0	5.0	100	8.0	78.22
14	4.5	5.5	40	11.5	33.79
15	5.5	5.5	40	11.5	39.83
16	5.5	5.5	80	11.5	55.58
17	5.5	5.5	40	4.5	35.07
18	5.5	4.5	40	4.5	76.47
19	5.0	4.0	60	8.0	97.65
20	4.5	4.5	40	11.5	86.55
21	4.5	4.5	40	4.5	83.35
22	4.5	4.5	80	4.5	92.62
23	5.5	4.5	40	11.5	84.26
24	5.0	6.0	60	8.0	40.98
25	4.5	5.5	80	4.5	50.38
26	5.0	5.0	20	8.0	32.44
27	5.0	5.0	60	8.0	64.24
28	5.0	5.0	60	8.0	63.87

En una primera etapa se realizó un ajuste cuadrático completo (considerando todos los términos lineales, cruzados y cuadráticos) de los resultados. Algunos términos resultaron no tener significancia estadística (utilizando un valor de confianza del 95 %), por lo que se realizó una exclusión de estos términos uno por uno hasta que todos los factores utilizados resultaron significativos. Este procedimiento se denomina refinamiento del modelo y evita que se haga una sobreparametrización del sistema. Se utilizó la prueba de falta de ajuste ("lack of fit test") para testear el procedimiento. Esta prueba indica si, desde un punto de vista estadístico, el modelo es adecuado para describir los resultados o debe de reemplazarse por otro. El modelo refinado superó el test

mientras que el modelo sin refinar no lo superó. El análisis de los resultados se resume en la Tabla 3.

Tabla 3: Análisis de ANOVA del modelo de superficie de respuesta

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de los cuadrados	Razón-F	Valor-P	Significancia (95 %)
A: pH Inicial	186.986	1	186.986	24.23	0.0161	Significativo
B: pH Reactor	7900.7	1	7900.7	1023.98	0.0001	
C:HRT	1728.73	1	1728.73	224.05	0.0006	
D:[H ₂ O ₂]	175.771	1	175.771	22.78	0.0175	
BC	81.4055	1	81.4055	10.55	0.0476	
CC	117.274	1	117.274	15.20	0.0299	
AC	0.247506	1	0.247506	0.03	0.8693	No significativo (Excluidos)
AD	0.004556	1	0.004556	0.00	0.9821	
AB	0.936056	1	0.936056	0.12	0.7506	
AA	0.015888	1	0.015888	0.00	0.9667	
BD	5.70016	1	5.70016	0.74	0.4533	
BB	32.6842	1	32.6842	4.24	0.1317	
CD	2.10976	1	2.10976	0.27	0.6372	
DD	8.48173	1	8.48173	1.10	0.3714	
Falta de ajuste (modelo inicial)	721.222	10	72.1222	9.35	0.0459	Significativo
Falta de ajuste (modelo refinado)	768.095	18	42.6719	5.53	0.0920	No significativo
Error puro	23.1471	3	7.71569			
Total (corr.)	11037.4	27				

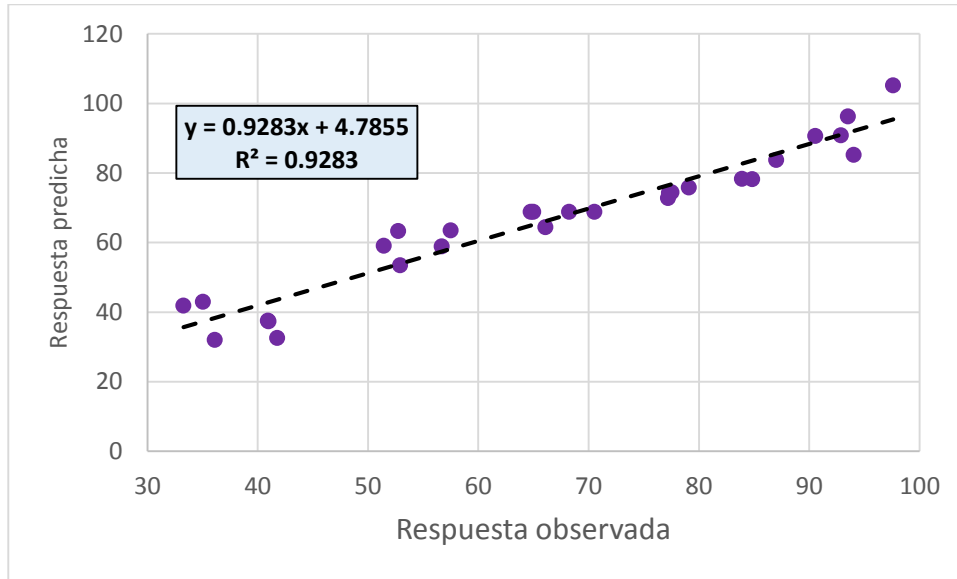
Debido a que, por problemas de índole práctica, no pudo realizarse una completa aleatorización de los ensayos, se efectuó un análisis de autocorrelación serial para testear si el orden de ejecución de los experimentos tuvo alguna influencia sobre la respuesta. Se obtuvo un valor para el estadístico de Durbin-Watson de 2.1152, mientras que el valor P fue de 0.6026. Dado que el valor p es mayor al 5 % del estadístico, se puede afirmar con un 95 % de confianza que no existe autocorrelación serial de los resultados.

La fórmula obtenida al ajustar con un modelo cuadrático refinado es la siguiente:

$$\text{Remoción \%} = 291.701 - 5.5825 * (\text{pH inicial}) - 49.8212 * (\text{pH reactor}) - 0.0490573 * (\text{HRT}) + 0.773214 * [\text{H}_2\text{O}_2] + 0.225562 * (\text{pH reactor}) * (\text{HRT}) - 0.00627096 * (\text{HRT})^2$$

La relación entre los valores predichos por esta ecuación y los valores obtenidos experimentales se muestran en la Figura 54. Existe una buena correlación entre ambos, con un R² de 0.9283, o de 0.9078 si se tienen en cuenta los grados de libertad del modelo. Esto implica que el modelo explica el 90.78 % de la variabilidad en la remoción de color,

que es un valor excelente considerando la simplicidad del modelo, un polinomio de orden 2, y la complejidad del sistema en cuanto a número de reacciones involucradas.



**Figura 54: Valores predichos de remoción de color % en función de los valores experimentales obtenidos.
La línea punteada corresponde al ajuste por regresión lineal entre ambos.**

Las superficies de respuesta obtenidas al graficar la respuesta en función de 2 variables, fijando las otras dos en sus niveles centrales, se muestran en la Figura 55. Como puede observarse, solo aquellas superficies que representen el HRT como una de sus variables presentarán curvatura, mientras que el resto serán representadas como planos, debido a la ausencia de otros términos cuadráticos. Nótese que existen regiones donde se predicen grados de decoloración mayores al 100 % (representadas en rojo en las superficies). Estas regiones no poseen un significado físico sino que corresponden un conjunto de valores para las variables donde puede alcanzarse una completa decoloración de la solución.

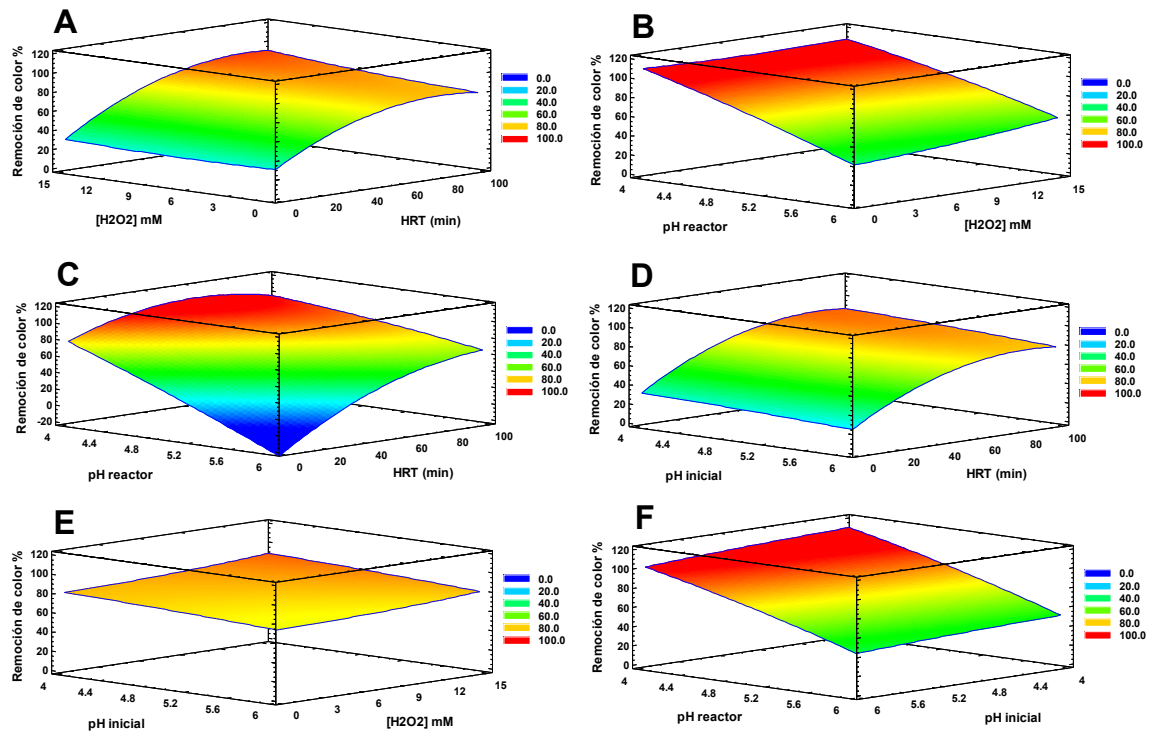


Figura 55: Superficies de respuesta obtenidas para la remoción de color en el sistema FAZ continuo.

Gráficos: Remoción de color en función de (A) la [H₂O₂] y el HRT, a pH inicial = 5.00 y pH reactor = 5.0; (B) el pH reactor y la [H₂O₂], a pH inicial = 5.00 y HRT = 60 min; (C) el pH reactor y el HRT, a pH inicial = 5.00 and [H₂O₂] = 8.0 mM; (D) el pH inicial y el HRT, a [H₂O₂] = 8.0 mM y pH reactor = 5.0; (E) el pH inicial y la [H₂O₂], a HRT= 60 min y pH reactor = 5.0; (F) el pH inicial y el pH reactor, a HRT= 60 min y [H₂O₂] = 8.0 mM.

Una forma gráfica sencilla para analizar la importancia relativa de cada término es el diagrama de Pareto, el cual se muestra en la Figura 56. La línea azul vertical marca el punto de corte utilizando una significancia estadística del 95%. Aquellos términos a la izquierda de la línea son aquellos no significativos que fueron excluidos durante el proceso de refinamiento. Como puede observarse, el pH del reactor es la variable medida más influyente sobre la remoción de color, siendo la influencia del pH inicial mucho menor en comparación. Desde un punto de vista tecnológico esto indica que resulta mucho más efectivo realizar un ajuste de pH luego del pasaje a través de la columna que en la solución inicial.

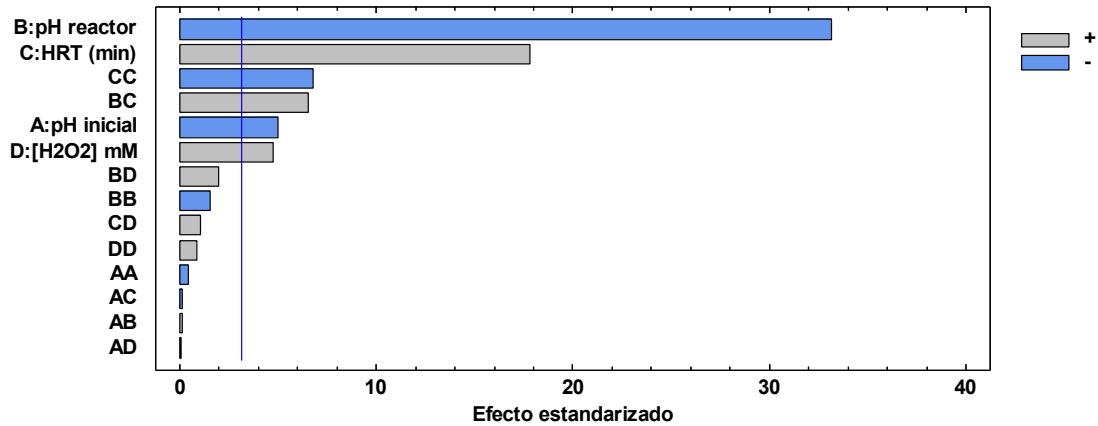


Figura 56: Diagrama de Pareto del modelo.

La línea azul vertical representa el punto de corte para un nivel de significancia del 95 %.

A pesar de lo observado durante el screening, no se encontró un valor máximo para la $[H_2O_2]$. Esto se debe a que su influencia sobre la respuesta es muy baja en el rango estudiado comparada con el efecto del pH del reactor y del HRT, lo que hace difícil observar curvaturas con respecto a la $[H_2O_2]$ que tengan significancia estadística. Desde un punto de vista práctico, esta pequeña dependencia indica que para mejorar la eficiencia es preferible disminuir un poco el pH del reactor en lugar de incrementar la cantidad de oxidante usado, al menos dentro del rango estudiado.

Es interesante el hecho de que el HRT presente un término cuadrático y un término cruzado, además de un término lineal, ya que esto implica la aparición de un tiempo de residencia de máxima efectividad en la región observada. En primera instancia podría suponerse que debido a que un mayor HRT significa un mayor tiempo para que la reducción, la corrosión y la oxidación se lleven a cabo, un aumento del HRT debería redundar en una mayor decoloración en todas condiciones. No obstante se debe considerar que a bajos caudales hay más tiempo para que una parte del Fe(II) generado sea oxidado por el O_2 a Fe(III) en el interior de la columna, lo que puede resultar en una menor disponibilidad de Fe(II) en el reactor donde se produce la oxidación. Este efecto de obtención de un máximo en la decoloración con respecto al HRT se debería ver reflejado como un máximo en la concentración de Fe(II) medida en el reactor a tiempos de residencia intermedios, tal como fue confirmado experimentalmente (Figura 57).

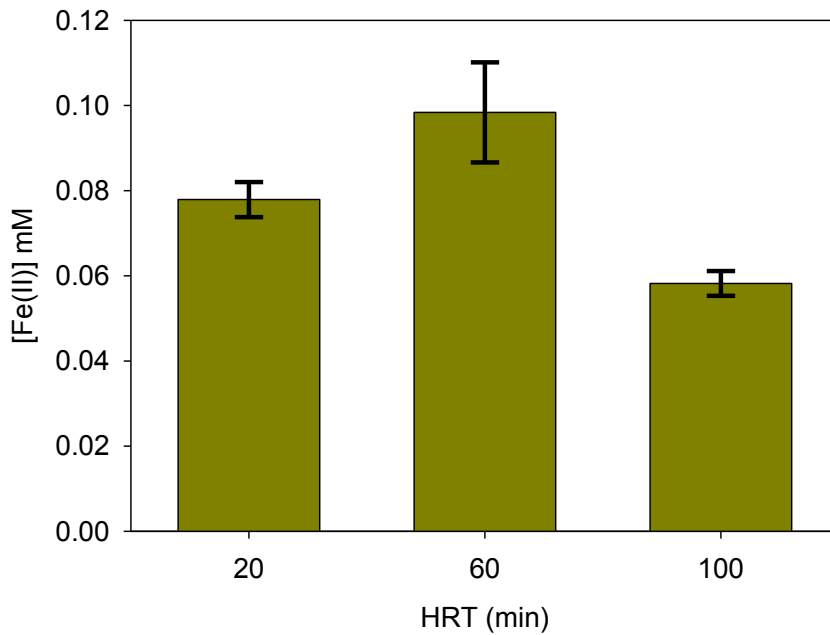


Figura 57: Dependencia de la concentración de Fe(II) en C_{out} en función del HRT. Condiciones: $[AB1]_0 = 50 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{pH}_{inicial} = 5.00$, $\text{pH}_{reactor} = 5.0$, $\text{HRT} = 20\text{-}100 \text{ min}$, $\text{Temp} = 27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Las barras de error corresponden a $\pm 2 \text{ DE}$ con $n = 2$.

3.4 FAZ en continuo: Conclusiones

En este capítulo se utilizaron los conocimientos fisicoquímicos obtenidos a partir de los ensayos en batch del Capítulo 2 para diseñar un sistema continuo que combina el uso de ZVI con un proceso foto-Fenton. El rango experimental fue definido de manera de utilizar la menor cantidad de ácido posible para las correcciones de pH. El funcionamiento del sistema en diferentes condiciones se evaluó con la ayuda del diseño de experimentos y la construcción de superficies de respuesta. El prototipo evaluado demostró ser muy efectivo en la degradación de AB1, lográndose la completa decoloración de la solución y una disminución del TOC mayor al 65 % para las siguientes condiciones operativas: reactor a pH 4 y solo 60 minutos de tratamiento (65 minutos considerando todo el proceso). El sistema planteado es una mejora sustancial a otros reportados (por ejemplo: FAZ en batch y FAZ en sistemas con recirculado) puesto que evita el consumo de H_2O_2 por reacción directa con el ZVI. Asimismo se verificó que el empleo de radiación produce una mejora muy significativa en los sistemas FAZ operados en reactores continuos.

A partir del análisis por RSM se encontró que el pH del reactor, el HRT, el pH inicial y la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ poseen un efecto significativo sobre la eficiencia del sistema, siendo los dos primeros parámetros los más importantes. Debido a que el pH del reactor es la variable de mayor peso y que la corrosión del ZVI aumenta el pH a la salida de la columna, para minimizar la cantidad de ácido agregado se concluyó que es preferible realizar la corrección de pH luego del pasaje por la columna.

El modelo matemático obtenido a partir del análisis por RSM es una ecuación cuadrática sencilla que permite predecir en buena medida las combinaciones de variables operativas en las que se puede lograr una decoloración completa de la solución.

La explicación concerniente al rol del tiempo de residencia y del pH inicial sobre la concentración de Fe(II) en el efluente de la columna es una interpretación alternativa

frente a la propuesta por otros autores [83] que centran el efecto de estas variables en la mayor tendencia a oxidarse de los productos de reducción. Este efecto, si bien no puede descartarse, debe de tener un rol secundario en los colorantes azoicos que por lo general tienen pocos grupos desactivantes como sustituyentes de los anillos, a diferencia de los compuestos nitroaromáticos (TNT, nitrobenceno).

Si bien existen publicaciones que acoplan etapas reductivas y oxidativas en un proceso continuo para obtener un tratamiento tipo FAZ, hasta donde sabemos este es el primer trabajo que utiliza un tratamiento FAZ operado en continuo para el tratamiento de colorantes en condiciones de pH cercanas a 5.00. Asimismo, posee la novedad de utilizar una fuente de irradiación para mejorar la eficiencia del proceso.

4- Peroxidasa de soja inmovilizada en nanomateriales magnéticos

4.1 SBP inmovilizada: Introducción

4.1.1 Uso de enzimas inmovilizadas para el tratamiento de efluentes

Los métodos biológicos son el grupo de técnicas más utilizadas para el tratamiento de efluentes industriales que contienen materia orgánica. El uso de microorganismos enteros ha mostrado ser muy eficiente para la mayoría de los casos, no obstante presenta ciertas dificultades para degradar compuestos aromáticos en bajas concentraciones tales como colorantes, pesticidas, fármacos y compuestos organoclorados. Estas dificultades se originan en parte por la toxicidad que presentan estas sustancias, inhibiendo el desarrollo de los organismos. Además, para que el desarrollo de biomasa resulte viable es necesario ajustar las condiciones del efluente tales como la masa, la temperatura y el suministro de nutrientes [90].

Una de las estrategias utilizadas para sortear estos inconvenientes consiste en el aislamiento de las enzimas encargadas de la degradación de los contaminantes, para utilizarlas como sustituto de los microorganismos. Estas enzimas suelen funcionar en un rango de condiciones más amplio que el necesario para un organismo vivo [91], y son efectivas a pH y temperaturas más suaves que muchos tratamientos químicos. Por ejemplo, a diferencia de los tratamientos tipo-Fenton, son capaces de actuar a pH cercanos a la neutralidad. El uso de enzimas aisladas como alternativa para el tratamiento de efluentes comenzó a principios de la década del 80 y existe actualmente gran cantidad de trabajos sobre el tema [92]. Recientemente, Steevenz ha aplicado esta tecnología a escala piloto para el tratamiento de efluentes reales de una planta de resinas alquílicas, alcanzando valores de remoción de fenol casi totales mediante el tratamiento con H_2O_2 y extractos crudos de peroxidasa de soja [93], demostrando así su viabilidad.

El principal inconveniente de utilizar enzimas solubles es que resulta en un tratamiento muy costoso debido al proceso extracción y purificación a partir de la materia prima. Para sortear este inconveniente una estrategia muy usada es la inmovilización de la enzima, de manera de poder separarla del efluente una vez tratado y reutilizarla durante varias ciclos de tratamiento. Incluso se ha reportado que la inmovilización puede aumentar la resistencia térmica y la actividad en solventes orgánicos [94]. Por esta razón en este capítulo estudiaremos el uso de enzimas inmovilizadas como un método alternativo para la oxidación de colorantes.

4.1.2 Estrategias de inmovilización

La técnica de inmovilización ideal debería permitir mantener la estabilidad de la enzima por largos periodos de tiempo, evitar el sangrado (lixiviación del catalizador), mantener la actividad al ser reutilizada y permitir la libre difusión de sustratos y productos de reacción [95]. Para lograr esto se han desarrollado varias estrategias de inmovilización,

cada una de las cuales presenta ciertas ventajas y desventajas, y han demostrado ser efectivas para un par determinado de enzima/sustrato.

La técnica más sencilla consiste en la adsorción directa la enzima sobre el material, vía uniones iónicas y/o de Van Der Waals. Esta técnica tiene la ventaja de que es la menos agresiva con la enzima, por lo que la pérdida de actividad debido a la desnaturalización de la enzima es baja. El principal problema consiste en la desorción de la proteína con el tiempo, un fenómeno conocido normalmente como “leaching” o sangrado [96].

Otra estrategia es el atrapamiento de la enzima dentro de una matriz polimérica. Esta estrategia soluciona el problema del sangrado, pero tiene el inconveniente de que el sustrato/producto deben difundir hacia/desde la enzima a través de la matriz polimérica, limitando la velocidad del proceso [97]. Además el microambiente generado por la matriz alrededor de la enzima puede no ser adecuado para el desarrollo de su actividad [96].

Por último se puede realizar una inmovilización covalente de la enzima. Para ello se requiere una activación del soporte con agentes bi- o multi- funcionales que formen un puente con la enzima. Como agentes activantes se han utilizado bisdiazobencidina, diisocianato de hexametileno y glutaraldehído, siendo este último el más empleado [98]. Por ejemplo, los grupos aldehído son capaces de reaccionar con los grupos amina de un soporte particular generando enlaces imina (base de Schiff)[99], dejando un grupo carbonilo libre para la formación de un nuevo enlace con los grupos amino terminales y los aminoácidos básicos de la enzima.

Si en lugar de agregarse el glutaraldehído de manera secuencial, se introduce al mismo tiempo con la enzima y el soporte se genera un entrecruzamiento o “cross-linking”, donde las enzimas se enlazan covalentemente tanto entre ellas como con el soporte. Incluso es posible generar agregados insolubles de enzimas (CLEAs) utilizando este entrecruzamiento en ausencia de soporte [96].

El hecho de que una estrategia sea apropiada o no, depende de las características del soporte, el sustrato y de la enzima a utilizar (mecanismo de acción, resistencia a la desnaturalización, disponibilidad de grupos para la inmovilización). En esta tesis utilizaremos el método de inmovilización covalente utilizando glutaraldehído como agente activante, realizando la activación del material antes del agregado de la enzima para evitar el entrecruzamiento.

4.1.3 Enzima utilizada

Entre las familias de proteínas utilizadas para el tratamiento de efluentes se encuentran las peroxidasas, las fenoloxidasas (que incluyen las tirocinasas y las lacasas), las catecol-dioxigenasas y los sideróforos [91]. De estas, una de las más estudiadas es la peroxidasa de rabanito picante (HRP por sus siglas en inglés). Las peroxidasas son enzimas que catalizan reacciones de oxidación inespecíficas, utilizando el peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones. La HRP pertenece al grupo de las hemoperoxidasas, que poseen ferri-protoporfirina IX (también llamado grupo hemo) como grupo prostético.

En los últimos años está ganando terreno otra enzima muy relacionada a la HRP, la peroxidasa de soja (SBP). Esta enzima pertenece a la misma subfamilia de enzimas (clase III dentro de las peroxidasas de planta), tiene una estructura tridimensional similar, una alta homología en la secuencia aminoacídica, el mismo grupo prostético y un idéntico mecanismo catalítico [100]. Está constituida por una única cadena de 326 aminoácidos, altamente glicosilada, y posee un peso molecular de 37 kDa [101]. En su estructura

secundaria posee 13 regiones con estructura de α -hélices y 2 regiones de láminas- β [102]. Un esquema de la SBP obtenido a partir de los datos cristalográficos del Protein Data Bank se muestra en la Figura 58.

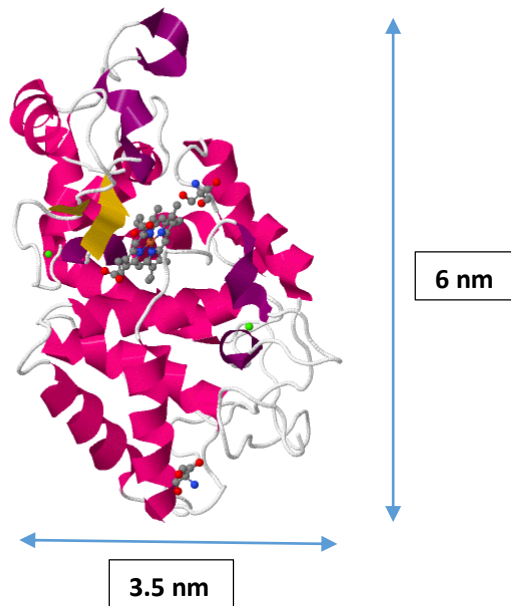


Figura 58: Estructura de la SBP.

Si bien la SBP posee una actividad específica menor que la HRP, tiene la ventaja de ser más resistente a la desnaturalización frente a la presencia del H_2O_2 y a la temperatura [103], debido a que su estructura resulta más estable tanto cinética como termodinámicamente [100]. Sumado a esto, la SBP puede extraerse por simple lavado de la cáscara de los porotos de soja usados para alimentación animal [92], por lo que puede obtenerse en mayores cantidades y a un menor costo [104]. Además el extracto crudo puede utilizarse sin pasos extras de purificación, llegando incluso a ser más eficiente que la enzima purificada [102]. Por estos motivos, se eligió a la SBP como biocatalizador de los materiales sintetizados en esta tesis.

4.1.4 Mecanismos de catálisis

Las hemoperoxidasas son capaces de oxidar sustancias que poseen estructuras fenólicas mediante un mecanismo Pin-Pong, en el cuál la enzima en su estado nativo E_0 es activada por el H_2O_2 pasando a su estado E_1 , en el cuál es capaz de captar electrones de dos sustratos consecutivos. En este mecanismo la enzima pasa primero por un estado E_2 y luego vuelve a regenerar el estado E_0 . Este es el mecanismo “normal”, el más eficiente en lo que respecta a la degradación de contaminantes.

Esta vía normal compite con otras vías en la cual el H_2O_2 puede actuar como donador de electrones generando O_2 (vías catalítica y pseudo-catalítica) las cuales resultan en ciclos fútiles en lo que respecta a la oxidación de sustrato. Por último, en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 tanto E_1 como E_3 son capaces de oxidarse a verdo-hemoproteína, con la pérdida irreversible de la actividad peroxidasa [105]. Estas vías alternativas son las responsables de la presencia de un máximo de actividad catalítica para una determinada relación H_2O_2 /sustrato, y provocan la pérdida de actividad enzimática

con el tiempo. Los mecanismos descritos anteriormente se esquematizan en la Figura 59.

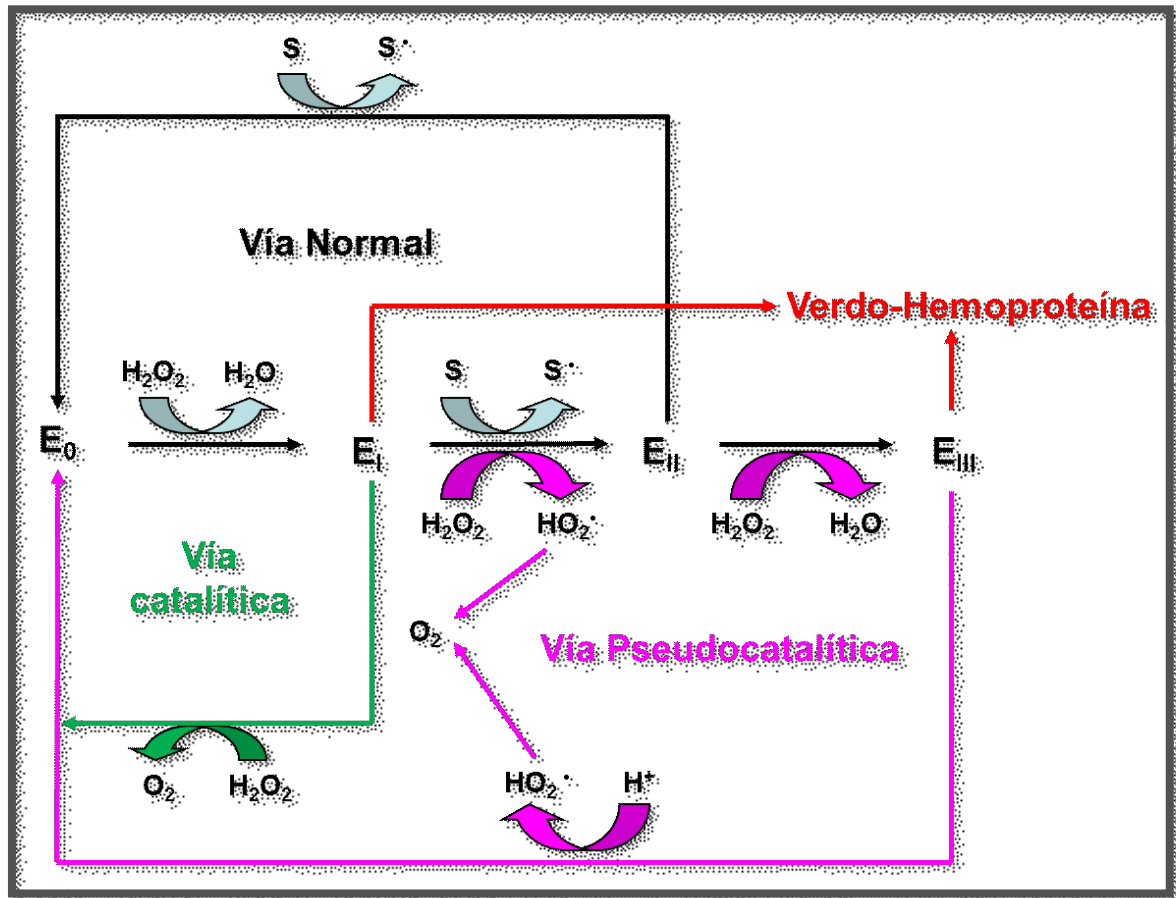


Figura 59: Mecanismos involucrados en la oxidación por peroxidasas.

El mecanismo de remoción más difundido plantea que la oxidación del sustrato comienza con la abstracción de hidrógeno de un grupo alcohol o amina, generando un radical orgánico capaz de reaccionar con otro sustrato para formar dímeros. Estos dímeros son a su vez susceptibles a otro paso de oxidación enzimática para formar un nuevo radical. La repetición de esta secuencia provoca la polimerización del sustrato hasta volverse insoluble, luego de lo cual puede ser separado por métodos físicos [92,106,107]. No obstante, se han reportado otros mecanismos de remoción. Marchis encontró que el tratamiento de una ftalocianina (Remazol Turquoise Blue G 133) con SBP, lleva a la decoloración por ruptura del macrociclo y liberación de iones amonio y $Cu(II)$ [108]. Kalsoom por su parte encontró que el tratamiento de un colorante azoico, el Trypan Blue, con SBP lleva a la oxidación del compuesto mediante una vía similar a los PAOs: ruptura de los enlaces azoicos seguida de apertura de los anillos y eventual mineralización [109].

Por lo tanto, es probable que el mecanismo esté relacionado con el tipo de molécula y las concentraciones utilizadas: las moléculas relativamente pequeñas que suelen usarse en concentraciones más altas (como fenol y anilina) tienden a polimerizar; las moléculas más complejas presentes en menor concentración (como la mayoría de los colorantes) tienden a seguir una vía oxidativa con pérdida de aromaticidad.

4.1.5 Soportes

Se han estudiado distintos soportes para la inmovilización de peroxidasa, tales como vidrio [104,110], sílice mesoporosa [95], polímeros a base de metacrilato [111] y polvo de mazorca de maíz [112]. Asimismo, existen numerosos autores que han estudiado el uso de soportes a base de nanopartículas magnéticas [97,107,113–115] para la inmovilización de HRP. Este enfoque tiene la ventaja de poder separar el material del efluente a tratar por la simple aplicación de un campo magnético, permitiendo así un mecanismo sencillo para recuperar el material y reutilizarlo. Su alta superficie específica permite soportar una gran cantidad de enzima por unidad de masa del material, a la vez que disminuye los problemas asociados al transporte de materia [116]. La escala nanométrica de las partículas es indispensable para que posean propiedades paramagnéticas, lo cual es una característica deseable para evitar aglomeraciones luego de ser separadas magnéticamente [97]. Entre estas, las nanopartículas magnéticas a base de óxidos de hierro (llamadas SPIONs, siglas de “superparamagnetic iron-oxide nanoparticles”) son las más usadas debido a su baja toxicidad [117], y a que pueden producirse fácilmente a bajo costo [116].

Para el caso del a HRP se han utilizado distintos enfoques, ligando directamente la enzima a la nanopartícula desnuda [115], o usando coberturas de sílice [113]. El empleo de coberturas ha demostrado proteger al núcleo magnético de la oxidación y la disolución en medio ácido [118], a la vez que estabiliza la suspensión [119]. Además se ha reportado para otras enzimas que la realización de un recubrimiento con polisiloxano con posterior funcionalización con grupos metilo o amino mejora tanto la cantidad de enzima inmovilizada como la actividad retenida en comparación con la nanopartícula desnuda, probablemente por la mayor semejanza con el ambiente intracelular [120].

Con estos antecedentes, en este trabajo se propone investigar la factibilidad de la inmovilización de bajas concentraciones de SBP sobre nanopartículas magnéticas recubiertas con sílice funcionalizada para el tratamiento de colorantes.

4.1.6 Objetivos

- Sintetizar materiales conformados por peroxidasa de soja inmovilizada sobre soportes a base de nanopartículas magnéticas. Los materiales sintetizados deben de tener buenos niveles de magnetización y tener propiedades superparamagnéticas.

- Estudiar el efecto de la capa de sílice sobre distintas propiedades de estos materiales: magnetización, morfología, área expuesta, porosidad, cantidad de enzima inmovilizada, actividad enzimática retenida y resistencia a la desnaturalización por reuso y temperatura.

- Evaluar la eficiencia de los biocatalizadores obtenidos para el tratamiento de colorantes.

4.2 SBP inmovilizada: Material y métodos

4.2.1 Reactivos

La peroxidasa de soja utilizada (SBP, EC 1.11.1.7) tiene un RZ de 2.0 y fue usada tal como fue provista por Bioresearch Products Inc. (Iowa, USA, actividad 1269 U/mg, lote #SBP-B275P154). El glutaraldehído (25 %), el tetraetilortosilicato (TEOS, 98 %), el 3-

aminopropiltriethoxisilano (APTES, 98 %), el NH_4OH (33 %) y el FeCl_3 (97 %) fueron comprados a Sigma-Aldrich, el etanol anhidro (99.8 %) y el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99.5 %) provienen de Fiuka, y los colorantes (Negro ácido 1, Rojo de alizarina S y Verde de malaquita) son de Anedra. El resto de los reactivos son los mismos que los descritos en la sección 2.2.1.

4.2.2 Síntesis de los materiales

Síntesis de nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro (NP): Las nanopartículas magnéticas desnudas (NP) fueron sintetizadas por el método de coprecipitación [121], solubilizando 5.13 g de FeCl_3 y 2.67 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (una relación molar de 1:2) en 100 mL de agua destilada y calentando hasta 90 °C bajo agitación. A esa temperatura se agregaron 10 mL de NH_4OH 30 % y 50 mL de agua destilada, se mantuvo el calentamiento durante 30 minutos y luego se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. La alcalinización con NH_4OH desencadena la precipitación de nanopartículas magnéticas compuestas por óxidos mixtos de hierro.

Síntesis de NP funcionalizadas con grupos amino (NPA): La funcionalización de nanopartículas con APTES fue realizada siguiendo el trabajo de Keziban [99]. 3.00 g de las nanopartículas magnéticas obtenidas por el procedimiento anterior fueron resuspendidas en 150 mL de una solución de etanol y agua en iguales proporciones. La solución fue purgada con N_2 , sonicada durante 10 minutos y calentada a 40 °C bajo agitación. En ese momento se agregaron 11.12 mL de APTES para funcionalizarlas con grupos amino, manteniéndolas a esa temperatura durante 4 horas. Se las llamó NPA con motivo de indicar la presencia de grupos aminos en la superficie.

Síntesis de NP recubiertas con sílice y funcionalizadas con grupos amino (NPSA2 y NPSA5): Esta síntesis se basó en el método de Ranjbakhsh [121]. 2.00 gramos de NP fueron resuspendidas en 400 mL de etanol sonicando durante 10 minutos. Luego se agregaron secuencialmente 60 mL de agua, 30 mL de NH_4OH 30 % y 2.0 o 5.5 mL de TEOS (según corresponda a NPSA2 o NPSA5 respectivamente). Se mantuvo la mezcla bajo agitación a durante 5 horas a temperatura ambiente. En estas condiciones se produce la hidrólisis del TEOS generando una red de polisiloxano (SiO_2) alrededor de las nanopartículas. Estas nanopartículas fueron purificadas y secadas como se ha descrito para NPA. Para funcionalizar con APTES, se tomaron 2.00 gramos de las nanopartículas anteriores, se resuspendieron en 100 mL de etanol mediante sonicación durante 10 minutos y se agregaron 60 mL de APTES, manteniendo el sistema bajo agitación 2 horas a 25 °C y 2 horas a 50 °C. Las nanopartículas así obtenidas, recubiertas con SiO_2 y funcionalizadas con grupos amino, se las denominaron NPSA2 o NPSA5, donde la "S" representa la capa de sílice, la letra "A" la funcionalización con grupos amino y el número "2"/"5" el volumen de TEOS agregado durante su síntesis.

Todas las nanopartículas fueron purificadas magnéticamente usando imanes de neodimio, eliminando el sobrenadante y resuspendiéndolas en agua destilada. El proceso se repitió 3 veces para eliminar el NH_4OH remanente. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en atmósfera de N_2 para minimizar el contacto con oxígeno. Por último las nanopartículas fueron secadas con un rotavapor a 80 °C y guardadas bajo atmósfera de N_2 hasta el momento de su uso. Las síntesis realizadas son esquematizadas en la Figura 60.

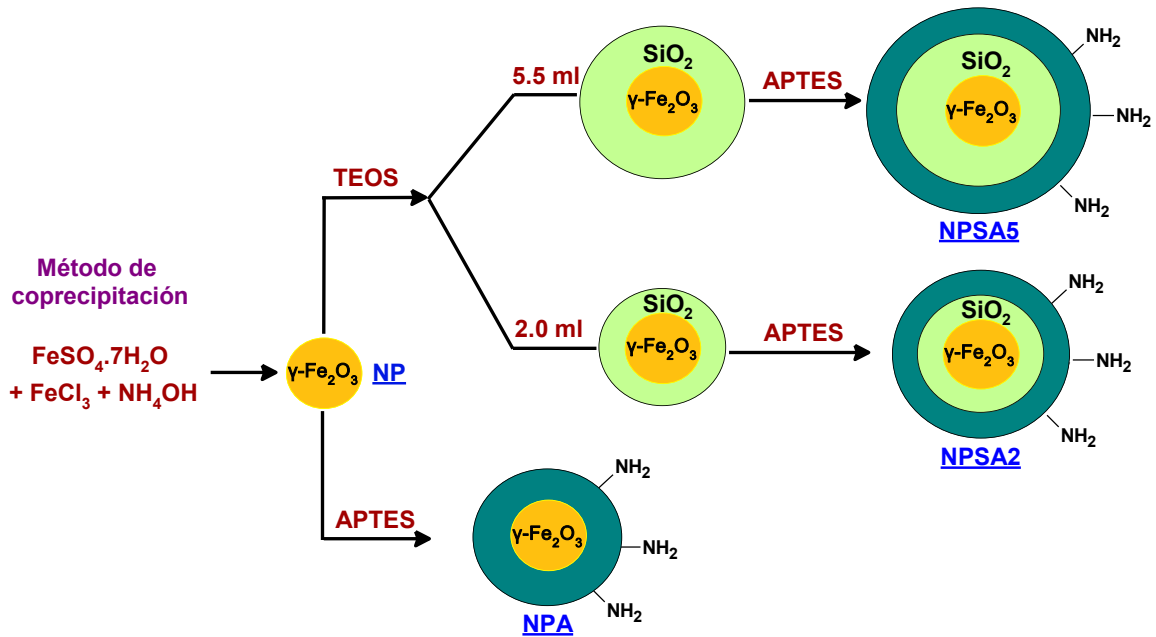


Figura 60: Esquema de las síntesis realizadas.

Inmovilización de SBP. La peroxidasa de soja fue inmovilizada sobre los materiales sintetizados usando glutaraldehído como espaciador [122]. A 1.00 gramo de las nanopartículas obtenidas anteriormente se le agregó 100 mL de una solución de glutaraldehído al 2.5 % en buffer fosfato 0.1 M a pH 7.0. La muestra fue agitada 1 hora en la oscuridad, luego los materiales fueron separados magnéticamente y lavados con el mismo buffer tres veces. De esta manera se logra activar con grupos carbonilo la superficie.

Posteriormente se agregaron 40 mL de solución de SBP 4.96×10^{-6} M en buffer fosfato 0.1 M a pH 7.4, manteniendo 15 horas bajo agitación a 4 °C. De esta manera los grupos amino libre de la proteína, proveniente de los aminoácidos básicos y del grupo amino terminal, reaccionan con los grupos carbonilo para formar un enlace imina, fijando covalentemente la enzima. El proceso de inmovilización se ilustra en la Figura 61.

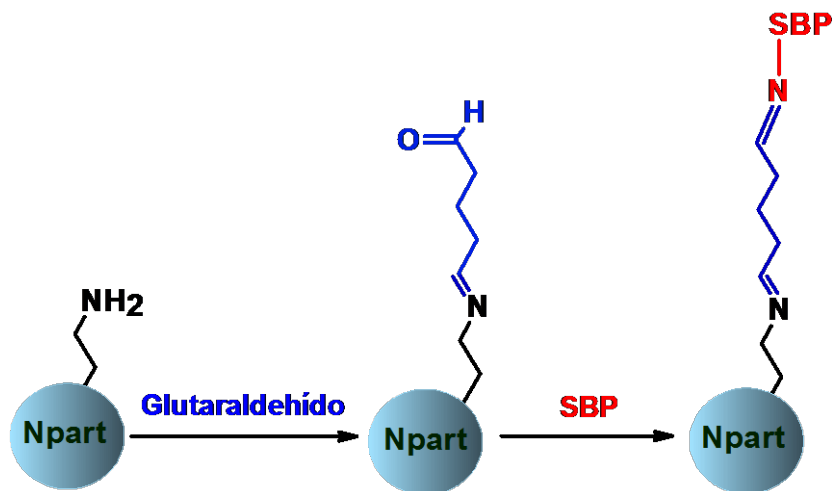


Figura 61: Esquema del proceso de inmovilización.

La cantidad de SBP inmovilizada fue calculada por diferencia de la absorbancia a 403 nm ($\epsilon_{403 \text{ nm}} = 96,400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [122]) de la solución en contacto con el material antes y

después del tratamiento tal como fue descrito por Kamal et al. [103]. El polvo obtenido fue lavado con 4 mL de buffer fosfato 2 veces, midiendo el espectro del sobrenadante para detectar pérdidas por sangrado. En todos los casos esta pérdida fue despreciable, sugiriendo que la enzima se encuentra firmemente unida al soporte.

4.2.3 Caracterización de los materiales

4.2.3.1 Medidas de magnetización

Las medidas de magnetización fueron realizadas con un magnetómetro de muestra vibrante Lakeshore 7404, midiendo los ciclos de histéresis a temperatura ambiente ciclando el campo magnético entre -20000 y 20000 gauss.

4.2.3.2 Medidas de área superficial y porosidad

Estas medidas fueron realizadas por el método de adsorción de N₂ a 77 K utilizando un equipo ASAP2010 (Micromeritics). El área superficial específica fue estimada a partir del modelo BET y la porosidad del material fue determinada aplicando el modelo BJH a las isothermas. Todos los materiales fueron desgasados durante 12 horas a temperatura ambiente hasta una presión residual del orden de 10⁻² mbar previamente a la medida para remover contaminantes atmosféricos. El equipo utilizado se muestra en la

Figura 62.



Figura 62: Equipo utilizado para las medidas de adsorción de N₂ a 77 K.

4.2.3.3 Medidas de HRTEM

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) fueron llevadas a cabo con un microscopio JEOL 3010-UHR utilizando

un potencial de aceleración de 300 kV. Para su medida las muestras fueron soportadas en una grilla de cobre revestida con carbón perforado por deposición en seco. El equipo utilizado se muestra en la Figura 63.



Figura 63: Microscopio electrónico de transmisión utilizado.

4.2.3.4 Medidas de difracción de rayos X (DRX)

Estas medidas fueron realizadas con un difractómetro PW3040/60 X'Pert PRO MPD (PANalytical) usando una fuente de irradiación de Cu e introduciendo la muestra en un soporte plano con una geometría de Bragg–Brentano. Las medidas fueron realizadas variando el ángulo 2θ entre 5° - 100° , con un paso de 0.16° . Se utilizó el software MAUD para realizar el refinamiento de Rietveld de los difractogramas. El equipo utilizado se muestra en la

Figura 64.



Figura 64: Equipo utilizado para las medidas de DRX.

4.2.3.5 Medidas de FTIR y potencial- ζ

Las medidas de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier fueron obtenidas con un equipo VECTOR22 (Bruker), trabajando en un rango de 4000-400 cm^{-1} , con 128 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} . Se utilizó una lámpara Globar y un detector DTGS. La preparación de la muestra se realizó dispersando las muestras en un pellet de KBr. El equipo utilizado se muestra en la Figura 65.



Figura 65: Equipo utilizado para las lecturas de FTIR

Las medidas de potencial- ζ fueron realizadas con un equipo Litesizer TM500 Anton-Paar sobre una suspensión acuosa de los materiales a pH = 7.00.

Las medidas de magnetización fueron realizadas como servicios por parte del LAEMM (Laboratorio de Aplicaciones del Efecto Mössbauer y Magnetismo), Depto de física, FCE/UNLP. Las otras medidas fueron realizadas en la Universidad de Turín (Italia) por el autor de la presente tesis con la ayuda de la Dra Giuliana Magnacca (HR-TEM, potencial- ζ).

4.2.4 Evaluación de la capacidad para la remoción de colorantes

Para las medidas de decoloración se incubaron 5.00 mL de una solución de colorante 0.0811 mM en buffer acetato 0.1 M a pH 5.50 con 0.0100 gramos de material durante una hora a la temperatura deseada, luego de lo cual se agregó el H_2O_2 a la concentración deseada (0.811 mM a menos que se indique lo contrario) para dar comienzo a la cinética. Durante el periodo de incubación y durante la realización de la cinética, se mantuvo el sistema bajo agitación magnética usando un buzo de núcleo metálico sin magnetismo propio para evitar aglomeraciones.

Al momento del muestreo se tomaron 3.00 mL de la solución y se filtraron con un filtro de acetato de celulosa de 0.45 μm (Sartorius). Por último se midieron los espectros UV-Vis con un espectrofotómetro Cary-60. Se evaluó la decoloración a partir de la disminución del máximo de absorbancia del colorante. Como comparación, algunos ensayos se realizaron utilizando SBP libre en una concentración 9.02×10^{-9} M en lugar de la enzima soportada.

4.3 SBP inmovilizada: Resultados y discusión

4.3.1 Cantidad de SBP inmovilizada

El % SBP inmovilizada y la cantidad de enzima inmovilizada por gramo de material fueron calculados a partir de las medidas UV-Vis de la banda con máximo a 403 nm correspondiente al grupo hemo de la peroxidasa, conocida como banda de Soret. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados de inmovilización de SBP sobre los distintos soportes utilizados.

<i>Material</i>	<i>% SBP inmovilizada</i>	<i>gr SBP/ gr material</i>
<i>NP-SBP</i>	No detectable	-
<i>NPA-SBP</i>	89.5	0.1641
<i>NPSA2-SBP</i>	98.0	0.1798
<i>NPSA5-SBP</i>	74.3	0.1364

Se obtuvieron buenos % SBP inmovilizada para todos los materiales funcionalizados con grupos amina (lo cual se logró mediante el uso de APTES en su formulación), mientras que no se detectó inmovilización sobre las nanopartículas desnudas. Esto tiene sentido considerando que para que el glutaraldehído se una a la nanopartícula es necesario un grupo amino para la generación de un enlace imina. Saidman et al [107] logró inmovilizar covalentemente HRP sobre nanopartículas de magnetita desnudas incubando en condiciones más energéticas (80 °C por 3.5 h), bajo las cuales el glutaraldehído es capaz de unirse directamente a la superficie del óxido [123]. Aparentemente, la esta reacción no ocurre cuando la síntesis es realizada a temperatura ambiente.

Debido a que las nanopartículas desnudas no fijaron la enzima, enfocamos el análisis en los otros materiales obtenidos.

4.3.2 Microscopía de transmisión electrónica (HRTEM)

En la Figura 66 se muestran las imágenes obtenidas por HRTEM de los soportes. Las imágenes correspondientes a los materiales con enzima inmovilizada no muestran diferencias con respecto a las de los soportes. Las partículas cristalinas presentan distintas formas (hexagonales, cilíndricas y esféricas), con una distribución de tamaños de los núcleos cristalinos magnéticos centrada alrededor de los 10 nm (Figura 67). La cobertura de sílice ronda los 1-2 nm para NPSA2 y los 4-5 nm para NPSA5, en concordancia con la cantidad de TEOS utilizada en la síntesis. Esta capa no es uniforme y pueden encontrarse zonas donde se observan “burbujas” de sílice amorfa. Esta cobertura parece incorporar varios núcleos magnéticos dentro de una estructura de mayor tamaño (de alrededor de 200 nm). La formación de estos agregados como consecuencia de la formación de polisiloxanos ha sido observada por otros autores [120].

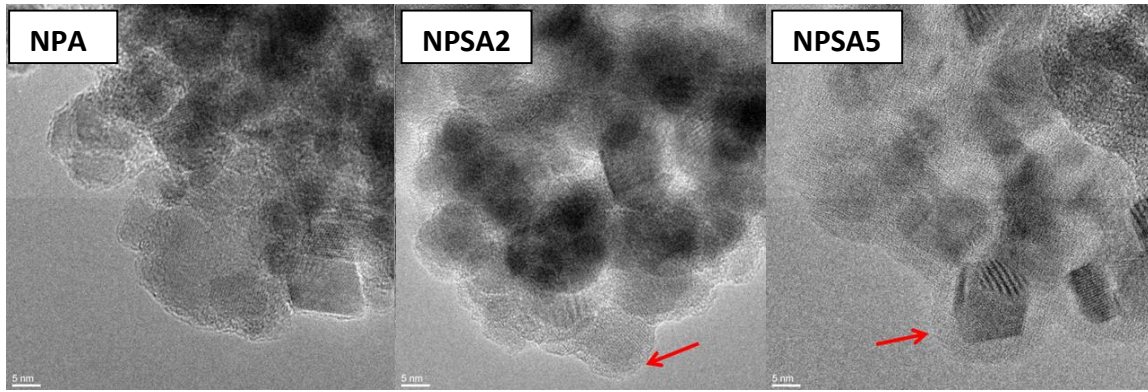


Figura 66: Imágenes de HRTEM obtenidas para los soportes (NPA, NPSA5, NPSA2). La flecha roja señala la zona donde puede apreciarse la capa de sílice.

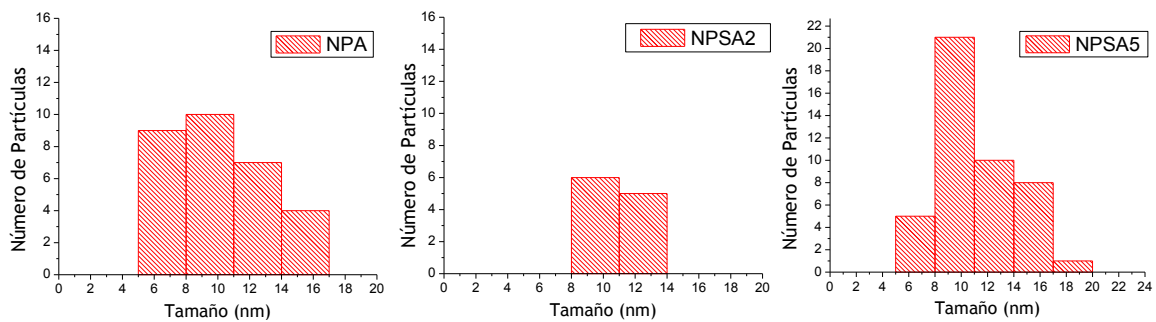


Figura 67: Distribución de tamaños de los núcleos de maghemita.

El análisis de los patrones de interferencia del TEM obtenidos coinciden con las fases cristalinas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) cúbica y tetragonal (ICCD card# 00-025-1402 y 00-039-1346 respectivamente). En particular los patrones observados a 4.32, 3.77, 3.21, 2.73, 2.65, 2.29 y 2.23 Å no son asignables a la fase de magnetita (ICCD card# 01-075-1610). Los patrones mencionados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Espaciamientos interplanares (dhkl) observada en las imágenes de HRTEM y los patrones de difracción relativos para la maghemita tetragonal y cubica.

Dhkl observados	4.32 Å	3.77 Å	3.21 Å	2.73 Å	2.65 Å	2.29 Å	2.23 Å
t-maghemita	(105)	(203)	(205)	(216)	(109)	(209)	(316)
c-maghemita		(210)		(221)	(310)	(320)	(321)

4.3.3 Difractogramas

El análisis de los materiales por DRX se muestra en la Figura 68. Se observa en todos los casos un patrón muy similar, independientemente del material, con máximos a $2\theta = 18.3^\circ, 30.2^\circ, 35.6^\circ, 43.3^\circ, 53.8^\circ, 57.3^\circ, 62.9^\circ$ y 90.2° que pueden asociarse a los planos de la maghemita (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440) y (731) respectivamente (ICCD card# 00-039-1346). El pequeño pico que aparece a $2\theta = 32^\circ$ se debe a sales de amonio generadas durante la síntesis. El resto de los componentes de las muestras (SBP, sílice, glutaraldehído, APTES) no se observan dado que poseen una estructura no cristalina.

Es importante mencionar que el DRX no permite diferenciar inequívocamente la magnetita (Fe_3O_4) de la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ya que poseen patrones de difracción muy similares (la magnetita posee máximos en 18.4° , 30.2° , 35.6° , 37.3° , 43.2° , 47.3° , 53.8° , 57.2° , 62.9° , 66.2° , 71.4° , 74.4° , 75.5° , 79.5° , 82.2° , 87.4° y 90.0° , RRUFF ID: R061111.9). Sin embargo, a partir de los datos obtenidos de los patrones de interferencia de las imágenes de HR-TEM podemos asignar que la fase cristalina mayoritaria es la $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, por ende en el resto de la tesis mencionaremos a la $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ como el fase hierro magnético presente en nuestros materiales.

Se evaluó el tamaño de los núcleos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ usando el software MAUD. Los resultados muestran tamaños de 15 nm para NPA y NPSA5 y valores de 19 nm para NPSA2. Estos valores son levemente mayores a los obtenidos por TEM que mostraron un tamaño medio de 10 nm para todas las muestras.

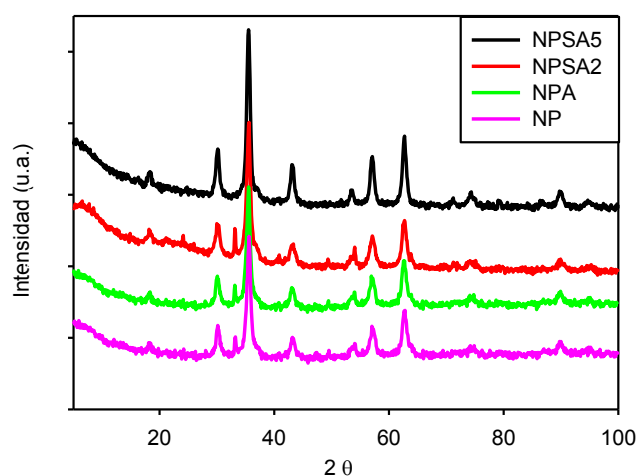


Figura 68: Diffractogramas obtenidos por DRX para NP, NPA, NPSA2 y NPSA5

4.3.4 Análisis por FTIR

Los espectros de FTIR de los soportes se muestran en Figura 69. La banda a 580 cm^{-1} con un hombro a 630 cm^{-1} (E) es característica la vibración de los enlaces Fe-O que se encuentran formando parte del núcleo magnético [124]. Las nanopartículas en cuya síntesis se utilizó TEOS presentan un pico muy importante alrededor de los 1100 cm^{-1} (B) usualmente atribuida al modo vibracional de los tetraedros de SiO_4 que conforman la red de sílice [125]. Este pico tiene una altura relativa mucho mayor para NPSA5 que para NPSA2, como es de esperar considerando la mayor cantidad de TEOS utilizada. La banda alrededor de los 800 cm^{-1} (D) corresponde a la vibración simétrica de los enlaces Si-O-Si [125]. Existe además una débil banda cercana a los 977 cm^{-1} (C) que puede adjudicarse a los enlaces Si-OH originados por la hidrólisis y condensación incompleta tanto del TEOS como del APTES [126]. La banda a 1630 cm^{-1} (A) puede adjudicarse a los enlaces N-H introducidos a partir del APTES [99], aunque también puede haber cierta contribución por parte de la vibración O-H del agua.

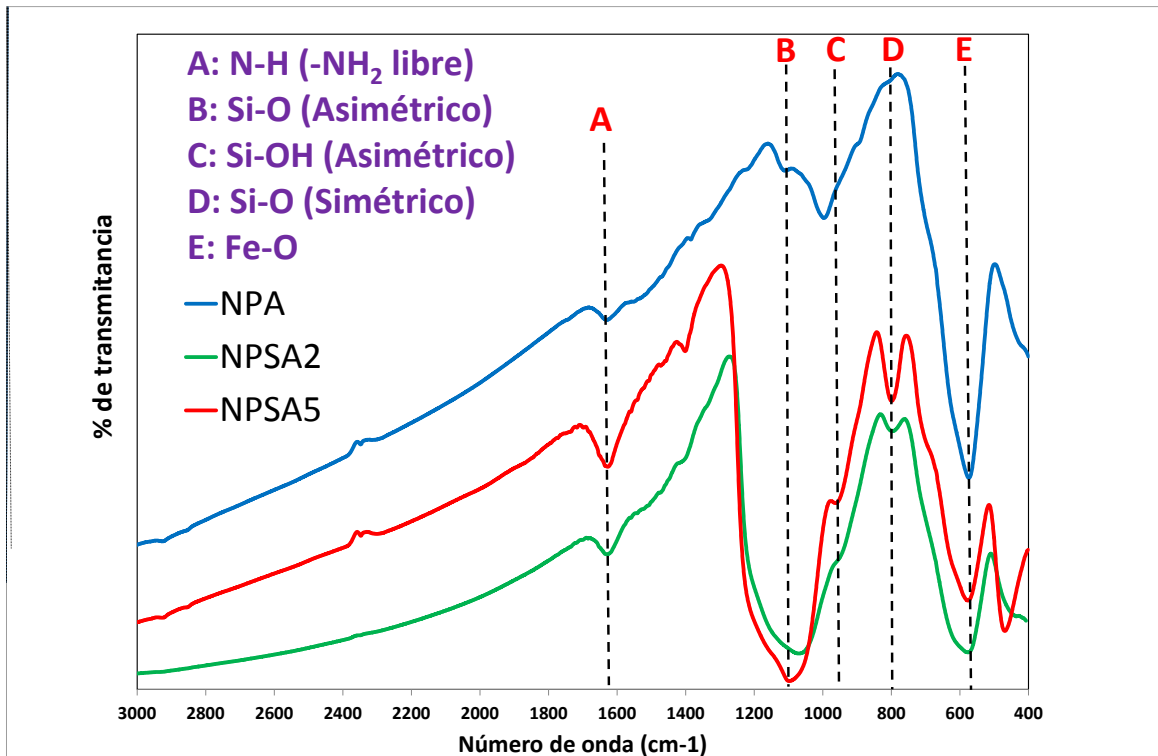


Figura 69: Espectros de FTIR obtenidos para los distintos soportes.

Para evaluar posibles cambios conformacionales de la enzima asociados al proceso de inmovilización, se realizó un FTIR para los distintos materiales con la enzima inmovilizada (Figura 70). El análisis se centró en la región espectral entre 1750–1550 cm⁻¹, donde se encuentran las señales relacionadas con los enlaces amida I y amida II. Los espectros fueron normalizados con respecto al pico de mayor intensidad de manera de evidenciar el cambio relativo de las señales. La banda amida I se origina de los enlaces peptídicos de la proteína y es muy sensible a los cambios en la estructura secundaria de esta [127]. Normalmente la presencia de estructuras tipo α -hélice presentan un máximo a los 1650 cm⁻¹. La SBP en particular es una enzima que posee un contenido alto de estas estructuras en su conformación nativa, cercano al 50 % [128]. Como puede observarse en la Figura 70, cuanto menor es el recubrimiento de sílice de los materiales soporte, menor es la banda a 1650 cm⁻¹. Este cambio sugiere que existe un mayor cambio conformacional de la enzima durante el proceso de inmovilización cuanto menor sea el espesor de la capa de sílice, el cual puede provocar una pérdida de la estructura nativa de la enzima y de la actividad enzimática.

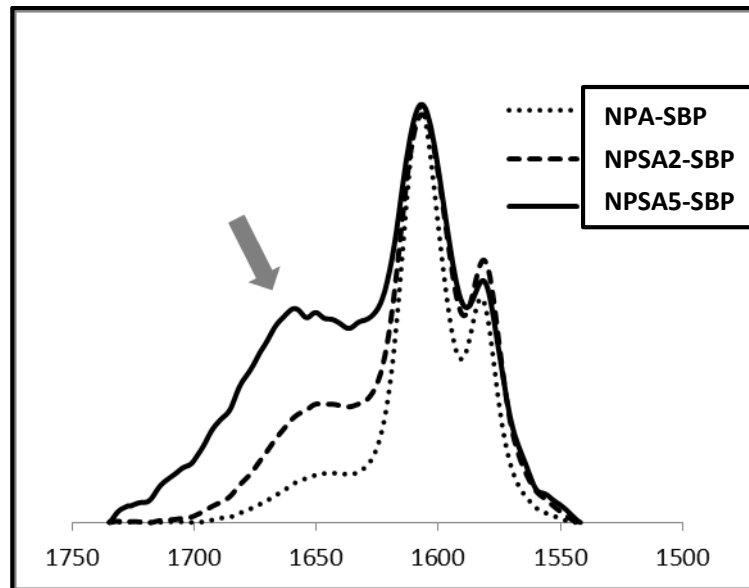


Figura 70: Espectro FTIR de los materiales en la región de la banda amida I. La línea gris señala la posición esperada para los enlaces amida en configuración de α -hélice.

4.3.5 Medidas de potencial- ζ

Las medidas de potencial- ζ a pH = 7.00 para las nanopartículas NPA, NPSA2 y NPSA5 fueron 43.2 mV, 26 mV y 38.4 mV respectivamente. Cabe destacar que, a pH 7, los valores reportados para las nanopartículas de maghemita tanto desnudas como recubiertas con sílice poseen potenciales negativos [129,130], por lo que los potenciales positivos obtenidos sugieren la presencia de grupos amino en la superficie de los nanomateriales como resultado de la funcionalización con APTES [130]. Para el caso de los materiales con enzima inmovilizada se encontraron valores de potencial negativos de -15 mV y -9 mV para NPA-SBP y NPSA5-SBP, respectivamente. La SBP tiene un punto isoeléctrico de 4.1 [131], por lo que al pH de trabajo posee una carga negativa. Este cambio de signo del potencial- ζ se debe a las contribuciones de i) la pérdida de grupos amino superficiales (cargados positivamente) por unión al glutaraldehído y a ii) la carga negativa de la enzima a pH 7. Este cambio de signo sugiere la presencia de SBP en la superficie de los nanomateriales y sustenta la hipótesis de que la inmovilización se produce covalentemente a partir de la activación con glutaraldehído de los grupos amino superficiales.

4.3.6 Isotermas de adsorción de N_2 a 77 K

Las isotermas gas-volumétricas para los materiales se muestran en la Figura 71. En todos los casos las isotermas de adsorción son de tipo IV de acuerdo a la clasificación IUPAC, indicando un comportamiento de material mesoporoso. Es importante aclarar que esto no implica que las nanopartículas sean “porosas”, sino que el comportamiento mesoporoso se debe a la adsorción de N_2 en los espacios intersticiales de los agregados de nanopartículas. Los ciclos de histéresis son de tipo H2 para NP y NPA al igual que el que se obtiene para poros del tipo bote de tinta, y del tipo H3 para NPSA2 y NPSA5 equivalente a lo que se obtiene para poros de placas paralelas. El primer caso es típico de nanopartículas individuales agregadas, mientras que el segundo caso sugiere que al

agregar el TEOS se forma una red de SiO_2 que tiende a cubrir e incorporar varias nanopartículas desnudas, conectando varios poros entre sí. Estas estructuras que incorporan varios núcleos de maghemita dentro de una red de sílice fueron observadas en las medidas de TEM.

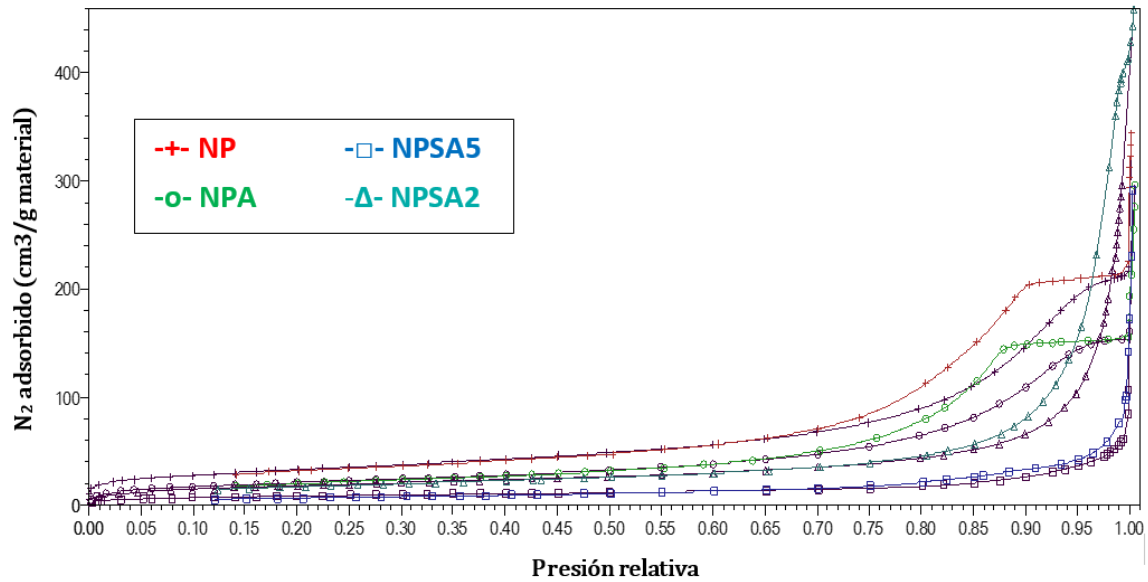


Figura 71: Isothermas de adsorción/desorción de N_2 a 77 K para NP, NPA, NPSA2 y NPSA5.

A partir de las isothermas se calculó el área superficial por el modelo BET [132] y la distribución de tamaños de poro por el modelo BJH [133]. La distribución de tamaños de poro se muestra en la Figura 72, mientras que los valores de las áreas superficiales y las características de los poros obtenidos se muestran en la Tabla 6.

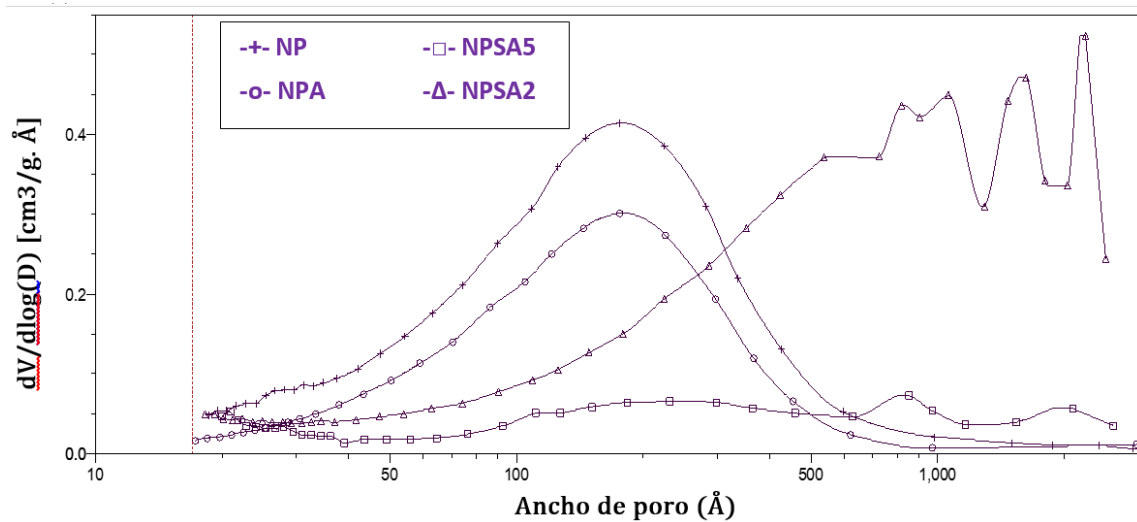


Figura 72: Distribución de los tamaño de poros obtenidas por el modelo BJH a partir de las ramas de adsorción de las isothermas. La línea vertical muestra el límite entre microporos y mesoporos (1.8 nm).

Tabla 6: Datos del área específica superficial (BET) y de la porosidad (BJH) para los materiales.

<i>Muestra</i>	Área superficial específica (m ² /g)	Porosidad total (cm ³ /g)	Ancho de poro (Å)
<i>NP</i>	118	0.33	180
<i>NPA</i>	77	0.23	180
<i>NPSA2</i>	67	0.46	>500
<i>NPSA5</i>	~31	~0.09	Muy ancho

El tamaño de poro de 18 nm obtenido para NP y NPA sugiere que gran parte de la adsorción es producida por el espacio intersticial vacío entre las partículas. El agregado de TEOS (y en menor medida también el agregado de APTES) provocan una disminución importante del área superficial de los materiales. En el caso del TEOS, se observa además un importante aumento en el tamaño de poro. La adición de la enzima no afecta significativamente ni el área específica ni la porosidad, por lo que sus valores no son reportados.

4.3.7 Propiedades magnéticas

Las curvas de magnetización de los materiales se muestran en la Figura 73. Puede observarse que todos los materiales estudiados son superparamagnéticos (es decir poseen remanencia y coercividad cero) y presentan un alto grado de magnetización. Ambas características son indispensables para lograr una buena separación y redispersión del material en respuesta a la aplicación de un campo magnético.

Los valores de magnetización de saturación obtenidos de la Figura 73 siguen el orden NPSA5 (30.0 emu/g) < NPSA2 (39.0 emu/g) < NPA (47.9 emu/g), concordando con la proporción de óxido de hierro esperada por gramo de material. Esta diferencia entre los materiales es muy notoria y se ve reflejada en los tiempos necesarios para la separación necesarios al utilizar los imanes, siendo en nuestras condiciones del orden de segundos para NPA y de minutos para NPSA5.

Es lógico suponer que esta disminución se deba a la mayor proporción de material no magnético (sílice principalmente) con respecto a la cantidad de óxidos magnéticos. Esto también explica el menor magnetismo de los materiales con respecto a los óxidos sin recubrimiento, que es de alrededor de 73.5 emu/g para la maghemita [134] en su estado “bulk”, y algo más chica para el caso de las nanopartículas (aprox. 60 emu/g [135,136]).

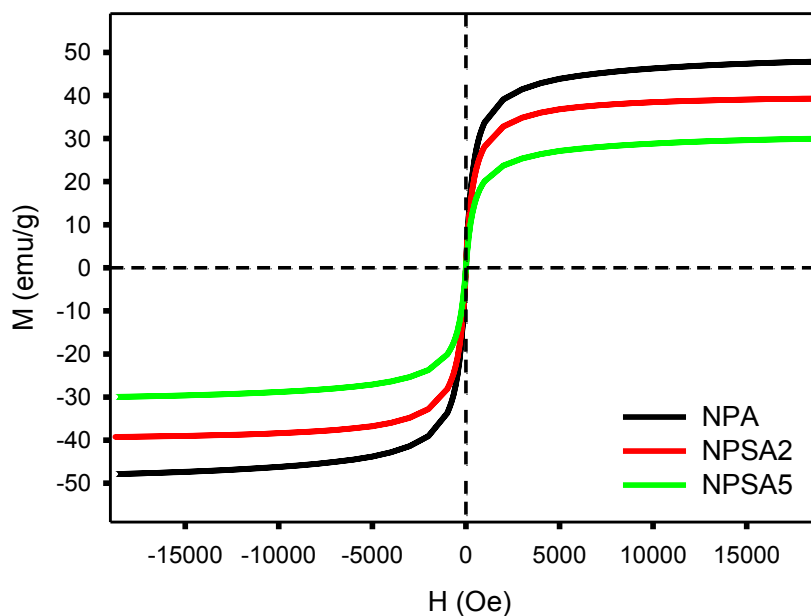


Figura 73: Curvas de magnetización para NPA, NPSA2 and NPSA5.

4.3.8 Remoción de colorantes

La efectividad de la SBP libre y de la enzima soportada sobre NPSA5 para catalizar la oxidación de contaminantes por el H_2O_2 fue testada con tres colorantes modelo: el AB1 (un colorante azoico), la Alizarina roja S (un colorante antraquinónico) y el Verde de malaquita (un colorante derivado del trifenilmetano). La estructura de los colorantes ensayados se muestra en la Figura 74. La elección de estos colorantes fue realizada para tener un representante de 3 de las familias más usadas en la industria textil. La remoción de cada uno de estos contaminantes fue evaluada a partir de la disminución de la absorbancia en los máximos de cada colorante (620, 260 y 614 nm respectivamente). Para evaluar el posible rol de la adsorción del colorante por el material se realizaron blancos en ausencia de peróxido. Los resultados correspondientes a la degradación en presencia de la enzima libre y NPSA5-SBP en presencia de peróxido, así como los controles sin H_2O_2 se muestran en la Tabla 7. Se hicieron controles en ausencia de biocatalizador y en presencia de peróxido donde no se observó decoloración para ninguno de los colorantes, descartando la presencia de oxidación directa a temperatura ambiente.

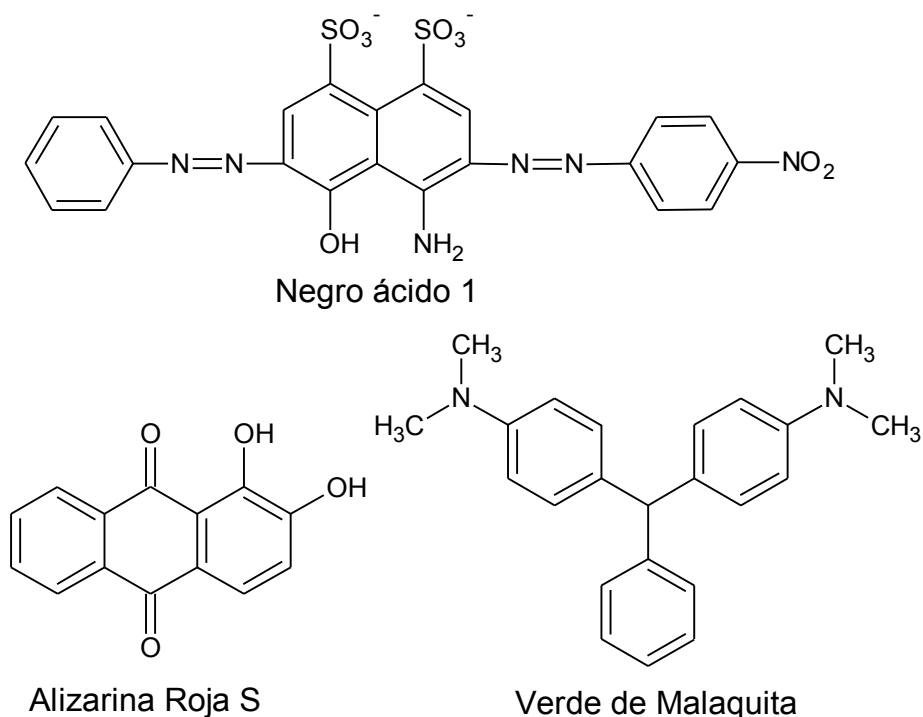


Figura 74: Estructura de los colorantes ensayados

Tabla 7: Decoloración luego de 2 hs de tratamiento con SBP libre (9.02×10^{-9} M) o NPSA5 ($2.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).
 Condiciones: $[\text{Colorante}]_0 = 0.0811 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 0.120 \text{ mM}$, Buffer acetato 0.1 M pH = 5.50, Temperatura = $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Colorante	% Decoloración (SBP libre + H ₂ O ₂)	% Decoloración (NPSA5-SBP)	% Decoloración (NPSA5-SBP + H ₂ O ₂)
Negro ácido 1	50.8	75.7	85.1
Rojo de Alizarina S	41.6	76.0	82.2
Verde de Malaquita	43.0	0.0	38.7

Como puede observarse la peroxidasa de soja es capaz de catalizar la oxidación de los tres sustratos ensayados. Debido a que el material NPSA5 es capaz de remover el AB1 y la Alizarina en ausencia de oxidante mediante procesos adsorptivos, independientes de la actividad peroxidasa, se eligió el Verde de malaquita (VM) como contaminante modelo para estudiar la actividad enzimática. El VM tampoco mostró una adsorción apreciable sobre el resto de los materiales sintetizados.

Si bien el estudio del mecanismo de oxidación por parte de la SBP no es uno de los objetivos de la tesis, es importante señalar que en ninguno de los casos se observó la generación de polímeros insolubles, sugiriendo que en las condiciones de trabajo empleadas la decoloración se debe a la oxidación de las moléculas y no a la polimerización/precipitación.

Gran parte de la bibliografía menciona que existe una relación óptima de sustrato/H₂O₂ para las peroxidasas de alrededor de 1, debido a que a altas concentraciones de H₂O₂ las vías catalíticas y pseudocatalíticas comienzan a tomar importancia y disminuyen la actividad observada. Por ejemplo, Gómez et al [110] encontraron un máximo para esta relación de entre 0.75 y 1.5 (dependiendo de la cantidad de sustrato y de la peroxidasa utilizada) para la degradación de fenol, mientras

que Bodalo encontró una relación óptima de 1 para la degradación de 4-Clorofenol [104]. En general, para la mayoría de los derivados del benceno esta relación se encuentra entre 0.6 y 3 [102]. Sin embargo, algunos autores [106] han encontrado que esta proporción no se mantiene, y que bajo determinadas condiciones de trabajo es necesario utilizar una relación mayor. Bassi [106] reportó que la concentración de H_2O_2 tiene una mayor dependencia de la concentración de SBP utilizada que de la de sustrato. Debido a esto, se estudiaron las cinéticas de degradación de AB1 y VM empleando la SBP libre a distintas relaciones de H_2O_2 para encontrar la relación óptima para los ensayos. Los resultados se muestran en la Figura 75.

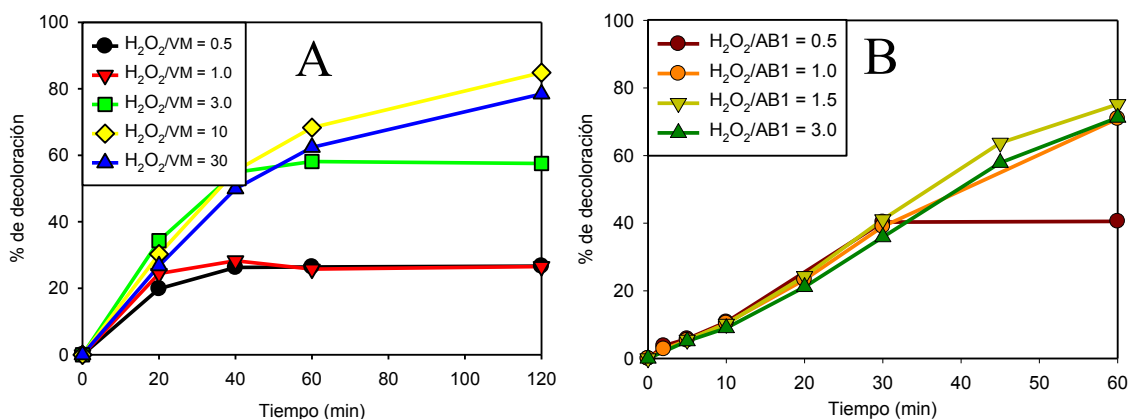


Figura 75: Dependencia del grado de decoloración utilizando SBP libre (9.02×10^{-9} M) con la relación H_2O_2 /sustrato para el VM (A) y el AB1 (B). Condiciones: $[Colorante]_0 = 0.0811$ mM, Buffer acetato 0.1 M pH = 5.50, Temperatura = 28 ± 1 °C.

Como puede observarse se encontró una relación óptima para la degradación de 1.5 para AB1 y de 10 para el VM, concentraciones distintas a pesar de usar las mismas concentraciones de SBP. Es posible de que la relación óptima dependa de la afinidad relativa de la enzima en su estado E_1 por el sustrato con respecto al H_2O_2 . Cuando la afinidad por el sustrato es muy alta, la enzima en el estado E_1 aceptará electrones principalmente provenientes del sustrato (vía normal), por lo que el uso del H_2O_2 será más eficiente y se requerirá una menor proporción de H_2O_2 con respecto al sustrato. Si en cambio la afinidad por el sustrato es más baja, una cantidad mayor de H_2O_2 actuará como dadora de electrones a la enzima en su estado E_1 (vías catalíticas y pseudocatalíticas) por lo que será necesario una mayor cantidad de H_2O_2 .

De acuerdo a esta hipótesis la mayor proporción óptima de H_2O_2 /colorante por parte del VM con respecto al AB1, es consecuencia de que la enzima en su estado E_1 posee una menor afinidad por el VM que por el AB1. No obstante estos resultados son preliminares y es necesario que en un futuro se haga un estudio más profundo sobre la cuestión.

4.3.9 Medidas de actividad para la degradación de verde de Malaquita

Conociendo la relación óptima de H_2O_2 a utilizar con la enzima libre, se evaluó la actividad peroxidasa de los distintos materiales (NPA-SBP, NPSA2-SBP y NPSA5-SBP) para degradar VM. Con fines comparativos se realizó la cinética para la SBP libre. Los resultados se muestran en la Figura 76.

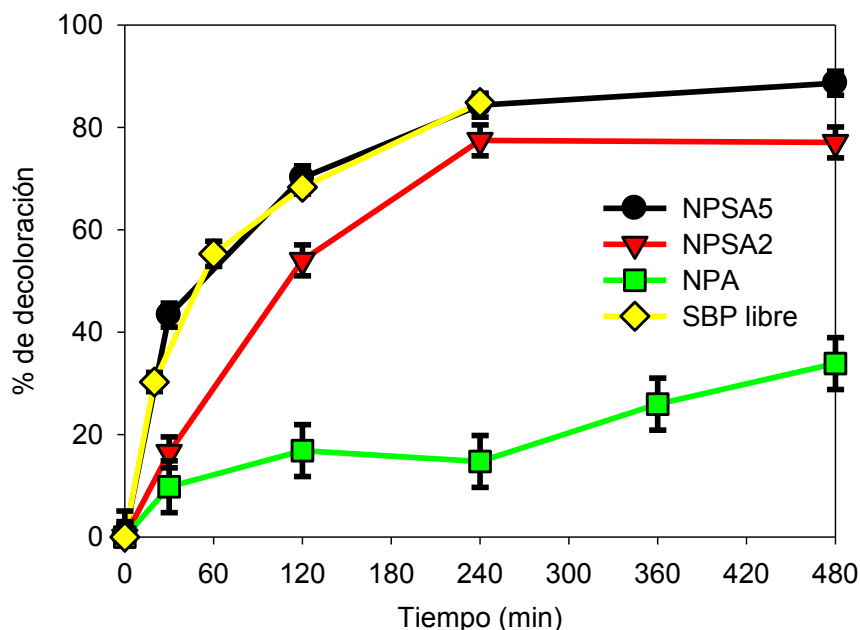


Figura 76: Decoloración del VM utilizando SBP inmovilizada en los materiales magnéticos NPA, NPSA2 y NPSA5 (2.00 g. L⁻¹) y para SBP libre (9.02x10⁻⁹ M). Condiciones: Medidas realizadas en buffer acetato 0.1 M pH 5.50. Temperatura 28 ± 1 °C, [VM] = 0.0811 mM, [H₂O₂] = 0.811 mM. Las reacciones fueron llevadas a cabo por triplicado, las barras de error corresponden a ± 2 DE, n = 3.

Se encontró una buena eficiencia de remoción con NPSA5-SBP y NPSA2-SBP (de 88% y 77% respectivamente luego de 4 hs de reacción), mientras que NPA-SBP solo alcanzó un valor de 43% en ese tiempo. La enzima libre presenta, en las condiciones utilizadas, una degradación similar a NPSA5-SBP. No obstante hay que considerar que la cantidad de SBP utilizada en los ensayos con enzima libre es mucho menor.

Para poder comparar la actividad enzimática de la SBP libre con la de los materiales inmovilizados, es necesario calcular un parámetro que normalice la cantidad de colorante oxidado en un intervalo de tiempo por cantidad de enzima presente. En ese contexto vamos a definir la actividad enzimática como la velocidad inicial de degradación (en moles de VM/min, a partir de la pendiente inicial) por mol de SBP presente (calculados a partir de la Tabla 6 y del peso molecular de SBP).

$ \textit{Actividad enzimática} = \frac{\text{Moles de VM degradados}}{\text{Tiempo (mins)} \cdot \text{Mol de SBP}} $	Ecuación 4
--	-------------------

La inmovilización enzimática conlleva por lo general (aunque no siempre) a una pérdida de actividad debido a cambios conformacionales y/o a una menor accesibilidad por parte del sustrato al centro catalítico. En la mayor parte de los casos son los cambios en la estructura nativa de la proteína los responsables de esta pérdida. Para poder cuantificar esto definiremos como rendimiento de inmovilización (R_{im}) al porcentaje de actividad enzimática retenido por la SBP inmovilizada con respecto a la SBP libre.

$R_{inm} = \frac{\text{Actividad enzimática SBP inmovilizada}}{\text{Actividad enzimática SBP libre}} * 100$	Ecuación 5
--	-------------------

Por último, para poder evaluar la capacidad catalítica del material usaremos un parámetro que llamaremos Actividad del material que definiremos como:

$\text{Actividad del material} = \frac{\mu\text{moles de VM degradados}}{\text{Tiempo (min)} * \text{g de material}}$	Ecuación 6
---	-------------------

La actividad del material es un parámetro que depende tanto de la cantidad de enzima inmovilizada como de la actividad enzimática del material. Los resultados de actividad enzimática, actividad del material y rendimiento de inmovilización se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Actividad enzimática de los distintos materiales

Muestra	Actividad del material ($\mu\text{moles de VM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g de material}^{-1}$)	Actividad enzimática (moles de VM $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol de SBP}^{-1}$)	Rendimiento de inmovilización (%)
SBP libre	--	9.10	--
NPA	0.066	0.37	4.11
NPSA2	0.223	1.15	12.63
NPSA5	0.586	3.97	43.68

Como puede observarse, existe un aumento de la actividad del material conforme aumenta la cantidad de TEOS utilizada en la síntesis, y por consiguiente el grosor la capa de sílice. Este efecto no se relaciona con la cantidad de enzima inmovilizada (ver Tabla 6), sino a un aumento en el rendimiento de inmovilización.

Existen varias razones por la cual la inmovilización sobre materiales a base de óxidos de hierro puede llevar a la desnaturalización de la enzima. Una de estas se debe a que los óxidos polares de tamaño nanométrico producen un fuerte campo eléctrico sobre las enzimas inmovilizadas sobre su superficie, cambiando su conformación. Este efecto se ve disminuido al utilizar una capa de sílice como espaciador.

4.3.10 Ensayos en presencia de metanol y 2-propanol

Existen factores que podrían explicar la degradación del VM observada mediante vías no enzimáticas. Peng Sung [137] demostró que las nanopartículas de magnetita son capaces de oxidar sustratos orgánicos a través de una reacción tipo-Fenton heterogénea, la cual puede ser inhibida por un scavenger de radicales OH^{\bullet} tal como el 2-propanol. Además Lehman [138] demostró que las nanopartículas de sílice son capaces de generar pequeñas cantidades de OH^{\bullet} . Para descartar estas vías no enzimáticas de oxidación se realizaron experimentos de degradación de VM con los materiales preparados y la enzima libre en presencia de scavengers (metanol o 2-propanol) en una relación 1000:1 con el VM. Como se observa en la Tabla 9, ninguno de los scavengers mostró inhibición de la

degradación del VM, por lo que la oxidación mediada por radicales OH• puede considerarse no significativa. El hecho de que esta vía no contribuya significativamente a la degradación del VM no necesariamente significa que no haya generación de radicales, ya que estos podrían generarse y reaccionar con algún otro sustrato tal como el anión acetato presente en el buffer o la SBP inmovilizada.

Tabla 9: Velocidad inicial de degradación para la enzima inmovilizada en los materiales magnéticos NPA, NPSA2 y NPSA5 (2.00 g.L⁻¹) y para la enzima libre (9.02x10⁻⁹ M). Buffer acetato 0.1 M pH 5.50, Temperatura 24 ± 1 °C, [VM] = 0.0811 mM, [H₂O₂] = 0.811 mM, [Scavenger] = 0.811 M. Los resultados son presentados con ± 2 DE, n=3.

	Velocidad inicial (μM VM removido.min ⁻¹)			
	SBP libre	NPA	NPSA2	NPSA5
Sin scavenger	0.76 ± 0.03	0.16 ± 0.07	0.19 ± 0.11	0.85 ± 0.08
2-propanol	0.76 ± 0.03	0.16 ± 0.07	0.27 ± 0.11	0.96 ± 0.08
Metanol	0.76 ± 0.03	0.15 ± 0.07	0.41 ± 0.11	0.93 ± 0.08

4.3.11 Efecto de la temperatura

Es sabido que la inmovilización de una enzima puede cambiar la estabilidad térmica de esta. Por este motivo se estudió la actividad de los materiales en función de la temperatura entre 25-93 °C. Los resultados se muestran en la Figura 77. NPSA2-SBP y NPSA5-SBP muestran un gran incremento de actividad con la temperatura, típico de las reacciones enzimáticas, hasta alcanzar un máximo a una temperatura cercana a los 60 °C. A temperaturas mayores se observa una brusca caída de la actividad debido a la desnaturalización de la enzima. Este valor máximo de actividad ocurre a temperaturas menores que el reportado para la SBP libre, que es de 80 °C [106]. En el caso de NPA, se observa un muy pequeño aumento en la degradación de VM con la temperatura, sin embargo los valores de actividad se encuentran a todas las temperaturas muy por debajo de los valores obtenidos para los otros dos materiales.

A ninguna temperatura se observó degradación del VM en ausencia de H₂O₂. A altas temperaturas (mayores a 60 °C) se observa una pequeña oxidación directa por parte del H₂O₂ en ausencia de catalizador, similar a la observada en presencia de NPA, lo que podría explicar el pequeño aumento en la oxidación a altas temperaturas.

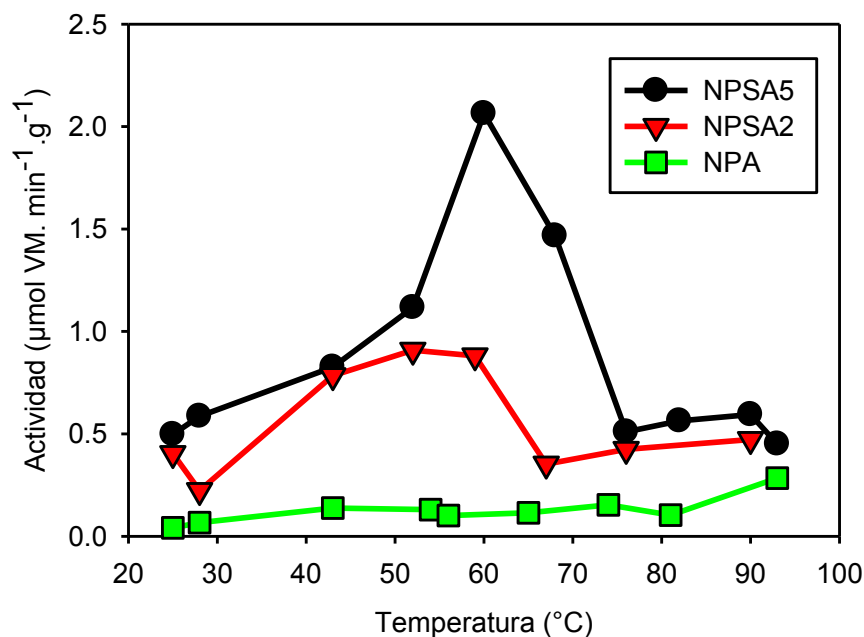


Figura 77: Efecto de la temperatura sobre la actividad de los materiales.
 Condiciones: $[VM]_0 = 0.0811 \text{ mM}$, $[H_2O_2]_0 = 0.811 \text{ mM}$, buffer acetato 0.1 M , $\text{pH} = 5.50$.

4.3.12 Reutilización del material

Una de las motivaciones para la inmovilización de la enzima consiste en la posibilidad de reutilizarla durante varios ciclos de reacción. Esta reutilización del biocatalizador es una de las características más importantes para sus prometedoras aplicaciones en el tratamiento de aguas. Para evaluar este punto se sometieron los materiales a varios ciclos de tratamiento. Para ello se realizaron ensayos de degradación tal como fue descrito en la sección 4.2.4, luego se separó el material magnéticamente, se lavó con buffer y se volvió a evaluar su actividad en un nuevo ciclo frente a una nueva solución de VM y H_2O_2 . Los resultados se muestran en la Figura 78. Durante los primeros 4 ciclos no se observa una pérdida significativa de la actividad. A partir del cuarto ciclo la actividad peroxidasa empieza a disminuir. Al final del décimo ciclo NPSA5-SBP retiene un 42 % de la actividad inicial, mientras que NPSA2-SBP solo posee una actividad del 3%. NPA-SBP presenta una baja actividad que se mantiene constante en todos los ciclos. Los resultados de las secciones 4.3.11 y 4.3.12 parecen sugerir que la enzima se encuentra completamente desnaturalizada en este material y lo que se observa es la actividad residual.

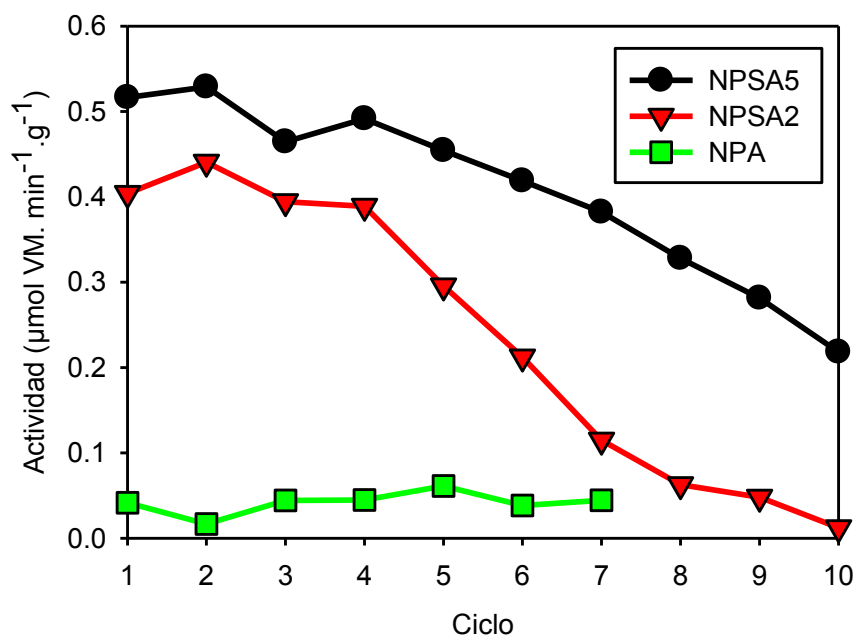


Figura 78: Evolución de la actividad de los materiales en función de los ciclos de reacción. Condiciones: $[VM]_0 = 0.0811$ mM, $[H_2O_2]_0 = 0.811$ mM, buffer acetato 0.1M pH = 5.50, Temperatura 28 ± 1 °C.

Los resultados de la Figura 78 demuestran que NPSA5 es el mejor de los materiales sintetizados también en términos de reutilización. La presencia de sílice parece tener un efecto protector frente a la desnaturalización de la enzima. Los valores de recuperación obtenidos son buenos comparados con los reportados por otros autores: Galárraga et al [112] obtuvo un 40 % de pérdida de actividad luego de solo 4 ciclos de reacción al inmovilizar SBP sobre polvo de maíz, mientras que Prokopijevic et al. [111] obtuvo un 78% de pérdida al sexto ciclo usando metacrilato de glicidilo como soporte.

Existen varias explicaciones sobre la pérdida de actividad de la peroxidasa soportada conforme aumentan los ciclos de reacción [92,139]. A continuación se describe cada uno de ellos:

- i. **Acumulación de polímeros.** Si el producto de oxidación del sustrato es un polímero, este puede llegar a acumularse sobre la superficie del material, limitando el acceso de nuevo sustrato a la enzima. Debido a que las concentraciones de colorante y de catalizador utilizadas fueron bajas, las reacciones de segundo orden entre radicales que dan lugar a este tipo de productos son poco probables. Si bien no pueden descartarse sin un análisis de productos de reacción, en ningún momento se observó la formación de polímeros a partir del VM.
- ii. **Pérdida de enzima por sangrado durante el uso del material.** En nuestro caso no se observó actividad residual de la enzima ni aparición de la banda de Soret en el sobrenadante, por lo que de existir sangrado este es pequeño y no explica las importantes pérdidas de actividad observadas.
- iii. **Autoxidación de la SBP a verde de hemoproteína.** Como discutimos en la sección 4.1.4 las peroxidasas son capaces de autooxidarse irreversiblemente con pérdida de actividad durante su ciclo de funcionamiento. Esta vía puede ocurrir

en nuestro sistema, y puede que la diferencia en la conformación de la enzima en los distintos materiales afecte su autooxidación.

- iv. **Ataque por parte de radicales generados por la SBP.** Debido a que el mecanismo de la enzima involucra la formación de radicales, existe la posibilidad de que parte de estos radicales ataquen a la misma enzima inactivándola. Es posible que la inmovilización de la enzima afecte su resistencia a la desnaturalización por el ataque de radicales.
- v. **Ataque por parte de radicales generados por el soporte magnético.** Como mencionamos en la sección 4.3.10, las nanopartículas utilizadas con capaces de generar radicales OH^{\bullet} , lo cual es particularmente cierto para el caso de los óxidos de hierro. Si bien demostramos que esta vía no contribuye significativamente a la oxidación del colorante, esto no quiere decir que la enzima no pueda verse afectada. De hecho, la cercanía de la SBP inmovilizada al soporte la hace particularmente propicia a este ataque. Es razonable suponer que el recubrimiento de la maghemita por la sílice, un óxido mucho menos activo en la generación de radicales a partir del H_2O_2 , protege a la enzima de esta vía de degradación.

Es difícil definir cuál o cuáles de estos mecanismos son los responsables de la pérdida de actividad, pero en principio el mecanismo v es el que explicaría más directamente el efecto protector de la sílice observado.

4.4 SBP inmovilizada: Conclusiones

Se sintetizaron distintos materiales a partir de la inmovilización de SBP de forma covalente usando glutaraldehído sobre distintos soportes. Los soportes utilizados consistieron en nanopartículas de maghemita desnudas, funcionalizadas directamente con APTES y recubiertas con distintas cantidades de sílice funcionalizada con grupos amino. De esta manera se pretendía estudiar el efecto de la capa de sílice sobre las características del material.

Se observó a simple vista una progresiva disminución de la magnetización de los materiales obtenidos al aumentar la capa de cobertura. En este sentido el aumento de la capa de sílice va en detrimento de uno de los objetivos planteados para el material, que es poseer la mayor magnetización posible. En cuanto a la morfología, los estudios de DRX y HRTEM corroboraron la presencia de núcleos de maghemita de tamaño nanométrico. La escala nanométrica de estos núcleos era uno de los objetivos propuestos, ya que resulta indispensable para la presencia de superparamagnetismo. Es el tamaño de los núcleos el responsable de las propiedades magnéticas, independientemente de que las estructuras obtenidas al recubrir la maghemita sean de una escala mayor. Tanto la disminución de la magnetización con el aumento de la capa de sílice como el comportamiento superparamagnético de los materiales fue confirmado por las medidas de magnetización.

La técnica de coprecipitación utilizada para la síntesis de los núcleos es una técnica estándar para la síntesis de magnetita (Fe_3O_4), a pesar de ello el análisis de los patrones de difracción del HRTEM reveló la formación de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). En general se prefiere que la fase sea magnetita, ya que ésta posee una mayor saturación magnética. Estudios realizados por Maity y Agrawal (2007) [134] sugieren que la obtención de maghemita es muy común ya que la magnetita se oxida muy fácilmente, y en gran parte

de la bibliografía existe una confusión entre ambas debido a la similitud de sus patrones de DRX. De todas maneras, la saturación magnética de todos los materiales obtenidos fue suficiente como para poder hacer una recuperación magnética de los catalizadores.

La funcionalización con grupos amino provenientes del APTES resultó indispensable para la inmovilización de la enzima, no encontrándose cantidades apreciables de enzima inmovilizada sobre la nanopartícula desnuda y obteniéndose porcentajes de inmovilización mayores al 74 % para las otras. La adición de TEOS en la formulación produce una aglomeración de varias partículas, disminuyendo el área expuesta, en particular para el caso de NPSA5.

La capa de TEOS tiene un efecto protector sobre la estructura nativa de la proteína, como fue demostrado por FTIR, lo que se ve reflejado en la actividad retenida luego de la inmovilización. Asimismo esta capa le confiere al material una menor pérdida de actividad con los sucesivos ciclos de reutilización. Estos efectos de protección son mayores al aumentar la cantidad de TEOS utilizada, al menos con las cantidades ensayadas. Si bien existen varios trabajos que proponen la utilización de una capa de sílice sobre las partículas magnéticas [97,139], poco se ha estudiado sobre el efecto de su espesor.

Este trabajo es una primera aproximación al estudio de este fenómeno, y sería interesante en un futuro investigar en mayor detalle el aumento de la actividad y la estabilidad enzimática conforme aumenta la cantidad de TEOS utilizada. Es importante evaluar conjuntamente las ventajas asociadas a la utilización de la cobertura de sílice con la desventaja que involucra la menor saturación magnética de los materiales. De esta manera se podría realizar un diseño racional del material en función de la saturación magnética y la actividad requerida. Con estos conocimientos se podría avanzar en el objetivo de diseñar un sistema efectivo y económicamente viable que permita el uso de estos materiales para el tratamiento de efluentes. Además de esta aplicación, materiales similares pueden poseer otros usos, tales como el desarrollo de sensores o de procesos productivos enzimáticos.

5- Reflexiones finales y perspectivas

En esta tesis se estudiaron dos métodos que permiten la oxidación de contaminantes orgánicos con H_2O_2 : un sistema FAZ continuo y un sistema de peroxidasas inmovilizadas en batch. Con ambos sistemas se obtuvieron excelentes resultados, por lo que resultan alternativas de tratamiento prometedoras.

En el caso del sistema que utiliza SBP inmovilizada en nanopartículas magnéticas recubiertas con sílice, el trabajo realizado fue una primera aproximación que demuestra la factibilidad del uso de estos materiales como catalizadores en la oxidación de contaminantes. Sin embargo, antes de la aplicación de esta estrategia en efluentes reales es necesario realizar una mayor cantidad de estudios básicos para evaluar distintas opciones de síntesis y así mejorar la actividad de los materiales obtenidos. Una vez hecho esto, sería conveniente estudiar el comportamiento de extractos crudos de enzima (o con purificaciones más sencillas) con el objetivo de disminuir el costo asociado al proceso de purificación, que resulta uno de los principales limitantes a la hora de pensar en su factibilidad como tratamiento.

En cuanto al sistema FAZ continuo, éste se diseñó de manera racional basándose en los conocimientos obtenidos a partir de los ensayos en batch. El diseño obtenido permitió solucionar gran parte de las problemáticas asociadas al uso simultáneo de H_2O_2 y ZVI. El prototipo de laboratorio evaluado es relativamente fácil de escalar y el próximo paso consistiría en armar un reactor a escala piloto que permita realizar una estimación del costo operativo del sistema. Tanto en este caso como en el sistema enzimático es necesario evaluar la eficiencia en el tratamiento de efluentes textiles reales, que pueden diferir bastante de los efluentes modelos utilizados en este trabajo.

Esta tesis no es el primer estudio realizado sobre los procesos FAZ o el uso de peroxidasas inmovilizadas, pero el enfoque que se ha utilizado es novedoso y echa luz sobre los procesos involucrados en los tratamientos. Las hipótesis desarrolladas tienen poder predictivo y permiten entender, por ejemplo, las diferencias en los resultados obtenidos al cambiar la fuente de ZVI (sección 2.3.11). Los conocimientos obtenidos pueden servir como base para la interpretación de otros sistemas, tales como aquellos que utilizan persulfato de sodio como oxidante en lugar de H_2O_2 .

Una aproximación habitual en el estudio de los sistemas FAZ es el considerarlos como variantes de alguna técnica ya establecida: ya sea el tratamiento con ZVI en lechos reactivos o los procesos Tipo-Fenton. Este enfoque tiende a despreciar algunos efectos (tales como el aumento del pH durante la corrosión o la reacción directa del H_2O_2 con el ZVI) y sobrevalorar otros (como el rol del O_2 como fuente de H_2O_2). En este sentido, es importante tener en cuenta que una valoración equivocada del peso relativo de estos efectos puede llevar a conclusiones erróneas sobre sus ventajas frente a otros tratamientos. Para poder estimar correctamente el peso relativo es necesario realizar medidas cuantitativas sobre las especies químicas involucradas (tales como $[\text{H}_2\text{O}_2]$, perfiles de hierro y actividad de H^+), además de las medidas habituales de parámetros de degradación (TOC y absorbancia principalmente). Esto evita realizar especulaciones acerca de reacciones químicas que si bien pueden ocurrir en los sistemas bajo estudio, pueden carecer de relevancia práctica.

El enfoque de esta tesis ha sido considerar para los tratamientos FAZ dos vías de degradación simultáneas que compiten entre sí y cuyo peso relativo es ampliamente

dependiente de las condiciones operativas. Este enfoque, más crítico, que revela al sistema FAZ como una alternativa relativamente ineficiente de utilización de ZVI y H_2O_2 , permite pensar nuevas formas de implementación para optimizar la metodología y mejorar su viabilidad. Un ejemplo de esto es el diseño del reactor propuesto en el capítulo 3. Para este tipo de enfoque fue indispensable realizar una evaluación cuantitativa de los procesos que compiten en la utilización de oxidante y del poder reductor del ZVI. En este sentido, los resultados del capítulo 2 realizan un aporte sustancial al entendimiento de los sistemas FAZ.

Los métodos estudiados en este trabajo se utilizaron en la degradación de colorantes, con vistas a su uso para el tratamiento de efluentes textiles. En este sentido, la elección de un contaminante específico y complejo como modelo (el AB1 y el VM en este caso), puede dificultar la comparación de la eficiencia del sistema frente a otros tratamientos existentes. Sería interesante que, para favorecer el avance en el área de nuevos tratamientos de contaminantes, existiera un sustrato modelo (equivalente a *Drosophila melanogaster* en los estudios genéticos o a *Arabidopsis thaliana* en los estudios fisiológicos de plantas) para poder comparar directamente los nuevos desarrollos. Esto facilitaría la elección de un tratamiento en término de costos, condiciones operativas y tiempos de tratamiento para un determinado efluente.

De todas maneras, las técnicas involucradas en estos sistemas resultan poco selectivas debido a la inespecificidad de las reacciones involucradas, y a la baja influencia del sustrato sobre los parámetros que determinan el funcionamiento del sistema (pH, [Fe(II)], consumo de H_2O_2). Esto permite aplicar los conocimientos obtenidos al tratamiento de efluentes textiles que contengan colorantes distintos a los estudiados y a efluentes que contengan xenobióticos de distinta naturaleza.

Espero que la lectura este trabajo le haya resultado instructivo y placentero, tal como para mi resultó haberlo realizado durante estos 5 años.

Agradecimientos

Al CONICET y al sistema científico argentino por haber financiado este trabajo. Es un orgullo pertenecer a una de las mejores instituciones del país.

A la Universidad Nacional de la Plata por haberme dado la oportunidad de estudiar, enseñar y ser parte de ella.

Al sistema de educación argentino por permitir que una persona pueda estudiar desde el jardín de infantes hasta terminar su doctorado de manera pública, gratuita y con alto nivel educativo.

Al grupo de microbiología del ILPLA y a Andrea por ayudar con la redistribución interna de recursos, indispensable para seguir haciendo experimentos cuando la burocracia retiene aquellos del grupo.

A mi “sensei” Sebastián por haberme acompañado durante el doctorado en todo sentido. Es el principal responsable de que este trabajo haya sido posible, por infinitas razones.

A mi “sempai” Lucho por haberme guiado a pesar de la distancia. Muchas discusiones no hubieran sido posibles sin sus consejos e ideas.

A “mamá” Marian por ser la madre del grupo, aún después de haber olvidado su día.

A Eliana tanto por ser mi amiga como por ayudarme a construir el reactor. Hubiera sido muy difícil sin ella.

A Brunin por estar al lado mío acompañando estos 5 años.

A Sofi por tantas cervezas que hemos tomado. Y a Fede por tantos mates.

A la gente del LEAR y “del chino” por compartir material, conocimientos, cerveza y comidas.

Al resto del INIFTA y de la cátedra de fisicoquímica por generar un ambiente donde se disfruta trabajar.

A la gente de Torino, Alcoy y Ioannina por haberme recibido en sus laboratorios y compartido su cultura y amistad. En particular, a Enzo y a Giuliana sin los cuales el capítulo 4 no hubiera sido posible.

Referencias

- [1] R. Maas, S. Chaudhari, Adsorption and biological decolourization of azo dye Reactive Red 2 in semicontinuous anaerobic reactors, *Process Biochem.* 40 (2005) 699–705. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.038.
- [2] V.M. Correia, T. Stephenson, S.J. Judd, Characterisation of textile wastewaters - a review, *Environ. Technol.* 15 (1994) 917–929.
- [3] A.B. dos Santos, F.J. Cervantes, J.B. van Lier, Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2369–2385. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.013.
- [4] C. Zaharia, D. Suteu, Textile organic dyes -characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents - A critical overview, in: *Org. Pollut. Ten Years After Stock. Conv. Anal. Updat.*, 2012: pp. 55–81.
- [5] O.J. Hao, H. Kim, P.-C. Chiang, Decolorization of Wastewater, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 30 (2000) 449–505. doi:10.1080/10643380091184237.
- [6] C. Fernández, M.S. Larrechi, M.P. Callao, An analytical overview of processes for removing organic dyes from wastewater effluents, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1202–1211. doi:10.1016/j.trac.2010.07.011.
- [7] B.G. Petri, R.J. Watts, A.L. Teel, S.G. Huling, R.A. Brown, Fundamentals Of ISCO Using Hydrogen Peroxide, in: R.L. Siegrist et. al. (Ed.), *Situ Chem. Oxid. Groundw. Remediat.*, Springer, New York, 2011: p. 678. doi:10.1007/978-1-4419-7826-4.
- [8] P. Fernández-Castro, M. Vallejo, M.F. San Román, I. Ortiz, Insight on the fundamentals of advanced oxidation processes: Role and review of the determination methods of reactive oxygen species, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (2015) 796–820. doi:10.1002/jctb.4634.
- [9] L. Wojnárovits, E. Takács, Irradiation treatment of azo dye containing wastewater: An overview, *Radiat. Phys. Chem.* 77 (2008) 225–244. doi:10.1016/j.radphyschem.2007.05.003.
- [10] B. Beverskog, I. Puigdomenech, Revised Diagrams for Iron At 25-300 ° C, *Corros. Sci.* 38 (1996) 2121–2135. doi:10.1038/NMETH.1311.
- [11] J.D. Hem, W.H. Cropper, Chemistry of iron in natural waters, in: *United States department of the interior (Ed.), Rep. US Geol. Surv., First edit, United States government printing office, Washington, 1962: pp. 1–31.*
- [12] W. Sung, J.J. Morgan, Kinetics and product of ferrous iron oxygenation in aqueous systems, *Environ. Sci. Technol.* 14 (1980) 561–568. doi:10.1021/es60165a006.
- [13] B. Morgan, O. Lahav, The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution - basic principles and a simple heuristic description, *Chemosphere.* 68 (2007) 2080–2084. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.02.015.
- [14] R.M. Cornell, R. Giovanoli, W. Schneider, Review of the Hydrolysis of Iron (III) and the Crystallization of Amorphous Iron (III) Hydroxide Hydrate ", *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 46 (1989) 115–134.
- [15] T.C. Zhang, Y.H. Huang, Profiling iron corrosion coating on iron grains in a zerovalent iron system under the influence of dissolved oxygen, *Water Res.* 40 (2006) 2311–2320. doi:10.1016/j.watres.2006.04.026.
- [16] Y.H. Huang, T.C. Zhang, Effects of dissolved oxygen on formation of corrosion products and concomitant oxygen and nitrate reduction in zero-valent iron systems with or without aqueous Fe²⁺, *Water Res.* 39 (2005) 1751–1760. doi:10.1016/j.watres.2005.03.002.
- [17] C. Noubactep, A critical review on the process of contaminant removal in Fe⁰–H₂O systems, *Environ. Technol.* 29 (2008) 909–920. doi:10.1080/09593330802131602.
- [18] D.A. Nichela, J.A. Donadelli, B.F. Caram, M.M. Haddou, F.J. Rodriguez, E. Oliveros, F.S. García, F.J. Rodriguez Nieto, E. Oliveros, F.S. Garcia Einschlag, Iron cycling during the autocatalytic decomposition of benzoic acid derivatives by Fenton-like and photo-Fenton techniques, *Appl. Catal. B, Environ.* 170–171 (2015) 312–321. doi:10.1016/j.apcatb.2015.01.028.
- [19] J. Guzmán, R. Mosteo, J. Sarasa, J.A. Alba, J.L. Ovelleiro, Evaluation of solar photo-Fenton and ozone based processes as citrus wastewater pre-treatments, *Sep. Purif. Technol.* 164 (2016) 155–162. doi:10.1016/j.seppur.2016.03.025.
- [20] P. Bautista, A.F. Mohedano, J.A. Casas, J.A. Zazo, J.J. Rodriguez, An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008)

- 1.323-1338. doi:10.1002/jctb.
- [21] D. Nichela, L. Carlos, F.G. Einschlag, Autocatalytic oxidation of nitrobenzene using hydrogen peroxide and Fe(III), *Appl. Catal. B Environ.* 82 (2008) 11–18. doi:10.1016/j.apcatb.2008.01.005.
- [22] F.S.G. Einschlag, A.M. Braun, E. Oliveros, Fundamentals and Applications of the Photo-Fenton Process to Water Treatment, in: D. Bahnemann, P. Robertson (Eds.), *Environ. Photochem. Part III*, 2013. doi:10.1007/698.
- [23] J.A. Bergendahl, T.P. Thies, Fenton's oxidation of MTBE with zero-valent iron, *Water Res.* 38 (2004) 327–334. doi:10.1016/j.watres.2003.10.003.
- [24] L.J. Matheson, P.G. Tratnyek, Reductive Dehalogenation of Chlorinated Methanes by Iron Metal, *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 2045–2053. doi:10.1021/es00061a012.
- [25] T.M. Florence, Polarography of aromatic azo compounds. I. Effect of substituents on the electroreduction of azo compounds, *Aust. J. Chem.* 18 (1965) 609–618. doi:10.1071/CH9650609.
- [26] A. Agrawal, P.G. Tratnyek, Reduction of nitro aromatic compounds by zero-valent iron metal, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 153–160. doi:10.1021/es950211h.
- [27] E.J. Weber, Iron-mediated reductive transformations: Investigation of reaction mechanism, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 716–719. doi:10.1021/es9505210.
- [28] Y.-M. Chen, C.-W. Li, S.-S. Chen, Fluidized zero valent iron bed reactor for nitrate removal, *Chemosphere.* 59 (2005) 753–759. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.020.
- [29] P. Westerhoff, J. James, Nitrate removal in zero-valent iron packed columns, *Water Res.* 37 (2003) 1818–1830. doi:10.1016/S0043-1354(02)00539-0.
- [30] Y. Mu, H.Q. Yu, J.C. Zheng, S.J. Zhang, G.P. Sheng, Reductive degradation of nitrobenzene in aqueous solution by zero-valent iron, *Chemosphere.* 54 (2004) 789–794. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.10.023.
- [31] S.-H. Chang, S.-H. Chuang, H.-C. Li, H.-H. Liang, L.-C. Huang, Comparative study on the degradation of I.C. Remazol Brilliant Blue R and I.C. Acid Black 1 by Fenton oxidation and Fe₀/air process and toxicity evaluation, *J. Hazard. Mater.* 166 (2009) 1279–1288. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.12.042.
- [32] S. Nam, P.G. Tratnyek, Reduction of azo dyes with zero-valent iron, *Water Res.* 34 (2000) 1837–1845. doi:10.1016/S0043-1354(99)00331-0.
- [33] A.S. Fjordbøge, A. Baun, T. Vastrup, P. Kjeldsen, Zero valent iron reduces toxicity and concentrations of organophosphate pesticides in contaminated groundwater, *Chemosphere.* 90 (2013) 627–633. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.08.058.
- [34] B. Gu, L. Liang, J. Dickey, X. Yin, S. Dai, Reductive Precipitation of Uranium (VI) by Zero-Valent Iron, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3366–3373.
- [35] D.W. Blowes, C.J. Ptacek, J.L. Jambor, In-situ remediation of Cr(VI)-contaminated groundwater using permeable reactive walls: Laboratory studies, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 3348–3357. doi:10.1021/es960844b.
- [36] M. Biterna, L. Antonoglou, E. Lazou, D. Voutsas, Arsenite removal from waters by zero valent iron : Batch and column tests, *Chemosphere.* 78 (2010) 7–12. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.007.
- [37] R. Boussahel, D. Harik, M. Mammari, S. Lamara-Mohamed, Degradation of obsolete DDT by Fenton oxidation with zero-valent iron, *Desalination.* 206 (2007) 369–372. doi:10.1016/j.desal.2006.04.059.
- [38] D.H. Bremner, A.E. Burgess, D. Houllémare, K.-C. Namkung, Phenol degradation using hydroxyl radicals generated from zero-valent iron and hydrogen peroxide, *Appl. Catal. B Environ.* 63 (2006) 15–19. doi:10.1016/j.apcatb.2005.09.005.
- [39] G.D. López, Nanotecnología aplicada a remediación ambiental: cuatro estudios de caso, in: S. Aspromonte, A. Boix, L. Bosko, L. Gómez (Eds.), *Libr. Resúmenes Del III Congr. Nac. Cienc. Y Tecnol. Ambient. Argentina Y Ambient. 2017*, Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2017: p. 225.
- [40] M. Barreto-Rodrigues, F.T. Silva, T.C.B. Paiva, Combined zero-valent iron and fenton processes for the treatment of Brazilian TNT industrywastewater, *J. Hazard. Mater.* 165 (2009) 1224–1228. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.02.172.
- [41] S. Oh, P.C. Chiu, B.J. Kim, D.K. Cha, Enhancing Fenton oxidation of TNT and RDX through pretreatment with zero-valent iron, *Water Res.* 37 (2003) 4275–4283. doi:10.1016/S0043-1354(03)00343-9.
- [42] C. Le, J. Liang, J. Wu, P. Li, X. Wang, N. Zhu, P. Wu, B. Yang, Effective degradation of para-chloronitrobenzene through a sequential treatment using zero-valent iron reduction and Fenton oxidation, *Water Sci. Technol.* 64 (2011) 2126–2131. doi:10.2166/wst.2011.803.
- [43] L. Santos-juanés, F.S.G. Einschlag, A.M. Amat, A. Arques, Combining ZVI reduction with photo-

- Fenton process for the removal of persistent pollutants, *Chem. Eng. J.* 310 (2016) 484–490. doi:10.1016/j.cej.2016.04.114.
- [44] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*, 1992.
- [45] J. Ashworth, E. Nijenhuis, B. Glowacka, L. Tran, L. Schenck-Watt, Turbidity and Color Correction in the Microto Bioassay, *Open Environ. Pollut. Toxicol. J.* 2 (2010) 1–7. doi:10.2174/1876397901002010001.
- [46] F.A.O. Rasse-Suriani, F.S. García-Einschlag, M. Rafti, T. Schmidt De León, P.M. David Gara, R. Erra-Balsells, F.M. Cabrerizo, Photophysical and Photochemical Properties of Naturally Occurring normelinonine F and Melinonine F Alkaloids and Structurally Related N(2)- and/or N(9)-methyl- β -carboline Derivatives, *Photochem. Photobiol.* (2017) 36–51. doi:10.1111/php.12811.
- [47] U.S. Epa, *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*, EPA/600/4-, Cincinnati OH, 1983. doi:EPA/600/4-79/020.
- [48] American Public Health Association, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd ed., Washington DC, 2012.
- [49] J. Wu, M.A. Eiteman, S.E. Law, Evaluation of Membrane Filtration and Ozonation, *J. Environ. Eng.* (1998) 272–277.
- [50] J. Sun, S. Sun, G. Wang, L. Qiao, Degradation of azo dye Amido black 10B in aqueous solution by Fenton oxidation process, *Dye. Pigment.* 74 (2007) 647–652. doi:10.1016/j.dyepig.2006.04.006.
- [51] H. Zhao, Y. Sun, L. Xu, J. Ni, Removal of Acid Orange 7 in simulated wastewater using a three-dimensional electrode reactor: Removal mechanisms and dye degradation pathway, *Chemosphere.* 78 (2010) 46–51. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.034.
- [52] M.A. Meetani, S.M. Hisaindee, F. Abdullah, S.S. Ashraf, M.A. Rauf, Liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of photodegradation of a diazo compound: A mechanistic study, *Chemosphere.* 80 (2010) 422–427. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.065.
- [53] S. Wang, A Comparative study of Fenton and Fenton-like reaction kinetics in decolourisation of wastewater, *Dye. Pigment.* 76 (2008) 714–720. doi:10.1016/j.dyepig.2007.01.012.
- [54] J.M. Triszcz, A. Porta, F.S. García Einschlag, Effect of operating conditions on iron corrosion rates in zero-valent iron systems for arsenic removal, *Chem. Eng. J.* 150 (2009) 431–439. doi:10.1016/j.cej.2009.01.029.
- [55] G. Le Truong, J. De Laat, B. Legube, Effects of chloride and sulfate on the rate of oxidation of ferrous ion by H₂O₂, *Water Res.* 38 (2004) 2383–2393. doi:10.1016/j.watres.2004.01.033.
- [56] Y. fan Su, C.Y. Hsu, Y. hsin Shih, Effects of various ions on the dechlorination kinetics of hexachlorobenzene by nanoscale zero-valent iron, *Chemosphere.* 88 (2012) 1346–1352. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.05.036.
- [57] C.H. Weng, Y.T. Lin, H.M. Yuan, Rapid decoloration of Reactive Black 5 by an advanced Fenton process in conjunction with ultrasound, *Sep. Purif. Technol.* 117 (2013) 75–82. doi:10.1016/j.seppur.2013.03.047.
- [58] C.H. Weng, Y.T. Lin, C.K. Chang, N. Liu, Decolourization of direct blue 15 by Fenton/ultrasonic process using a zero-valent iron aggregate catalyst, *Ultrason. Sonochem.* 20 (2013) 970–977. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.09.014.
- [59] J. Fan, Y. Guo, J. Wang, M. Fan, Rapid decolorization of azo dye methyl orange in aqueous solution by nanoscale zerovalent iron particles, *J. Hazard. Mater.* 166 (2009) 904–910. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.11.091.
- [60] J. De Laat, G. Truong Le, B. Legube, G.T. Le, B. Legube, A comparative study of the effects of chloride, sulfate and nitrate ions on the rates of decomposition of H₂O₂ and organic compounds by Fe(II)/H₂O₂ and Fe(III)/H₂O₂, *Chemosphere.* 55 (2004) 715–723. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.11.021.
- [61] D.M. Cwiertny, A.L. Roberts, On the nonlinear relationship between kobs and reductant mass loading in iron batch systems, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8948–8957. doi:10.1021/es050472j.
- [62] Y. He, J.F. Gao, F.Q. Feng, C. Liu, Y.Z. Peng, S.Y. Wang, The comparative study on the rapid decolorization of azo, anthraquinone and triphenylmethane dyes by zero-valent iron, *Chem. Eng. J.* 179 (2012) 8–18. doi:10.1016/j.cej.2011.05.107.
- [63] M. Kallel, C. Belaid, R. Boussahel, M. Ksibi, Olive mill wastewater degradation by Fenton oxidation with zero-valent iron and hydrogen peroxide, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 550–554. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.07.006.
- [64] S. Rodriguez, L. Vasquez, A. Romero, A. Santos, Dye Oxidation in Aqueous Phase by Using Zero-

- Valent Iron as Persulfate Activator: Kinetic Model and Effect of Particle Size, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 12288–12294. doi:10.1021/ie501632e.
- [65] B.R. Helland, P.J.J. Alvarez, J.L. Schnoor, Reductive dechlorination of carbon tetrachloride with elemental iron, *J. Hazard. Mater.* 41 (1995) 205–216. doi:10.1016/0304-3894(94)00111-S.
- [66] X. Guo, Z. Yang, H. Liu, X. Lv, Q. Tu, Q. Ren, X. Xia, C. Jing, Common oxidants activate the reactivity of zero-valent iron (ZVI) and hence remarkably enhance nitrate reduction from water, *Sep. Purif. Technol.* 146 (2015) 227–234. doi:10.1016/j.seppur.2015.03.059.
- [67] L.G. Devi, K.E. Rajashekhar, K.S.A. Raju, S.G. Kumar, Kinetic modeling based on the non-linear regression analysis for the degradation of Alizarin Red S by advanced photo Fenton process using zero valent metallic iron as the catalyst, *J. Mol. Catal. A Chem.* 314 (2009) 88–94. doi:10.1016/j.molcata.2009.08.021.
- [68] J. Gomis, A.B. Prevot, E. Montoneri, M.C. González, A.M. Amat, D.O. Mártire, A. Arques, L. Carlos, Waste sourced bio-based substances for solar-driven wastewater remediation : Photodegradation of emerging pollutants, *Chem. Eng. J.* 235 (2014) 236–243. doi:10.1016/j.cej.2013.09.009.
- [69] G.A. Loraine, Effects of alcohols, anionic and nonionic surfactants on the reduction of PCE and TCE by zero-valent iron, *Water Res.* 35 (2001) 1453–1460. doi:10.1016/S0043-1354(00)00422-X.
- [70] R.K. Adhikamsetty, N.R. Gollapalli, S.B. Jonnalagadda, Complexation kinetics of Fe²⁺ with 1,10-phenanthroline forming ferriox in acidic solutions, *Int. J. Chem. Kinet.* 40 (2008) 515–523. doi:10.1002/kin.20336.
- [71] M. Kudlich, M.J. Hetheridge, Autoxidation Reactions of Different Aromatic o-Aminohydroxynaphthalenes That Are Formed during the Anaerobic Reduction of Sulfonated Azo Dyes, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 896–901. doi:10.1021/ES9808346.
- [72] M. Zhou, J. He, Degradation of azo dye by three clean advanced oxidation processes: Wet oxidation, electrochemical oxidation and wet electrochemical oxidation-A comparative study, *Electrochim. Acta.* 53 (2007) 1902–1910. doi:10.1016/j.electacta.2007.08.056.
- [73] S. Hisaindee, M.A. Meetani, M.A. Rauf, Application of LC-MS to the analysis of advanced oxidation process (AOP) degradation of dye products and reaction mechanisms, *Trends Anal. Chem.* 49 (2013) 31–44. doi:10.1016/j.trac.2013.03.011.
- [74] H.M. Pinheiro, E. Touraud, O. Thomas, Aromatic amines from azo dye reduction: Status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters, *Dye. Pigment.* 61 (2004) 121–139. doi:10.1016/j.dyepig.2003.10.009.
- [75] B. Girit, D. Dursun, T. Olmez-Hanci, I. Arslan-Alaton, Treatment of aqueous bisphenol A using nano-sized zero-valent iron in the presence of hydrogen peroxide and persulfate oxidants, *Water Sci. Technol.* 71 (2015) 1859–1868. doi:10.2166/wst.2015.175.
- [76] P. Bardos, B. Bone, D. Elliott, N. Hartog, J. Henstock, A Risk / Benefit Approach to the Application of Iron Nanoparticles for the Remediation of Contaminated Sites in the Environment, 2011.
- [77] S. Choe, Y.Y. Chang, K.Y. Hwang, J. Khim, Kinetics of reductive denitrification by nanoscale zero-valent iron, *Chemosphere.* 41 (2000) 1307–1311. doi:10.1016/S0045-6535(99)00506-8.
- [78] T. Shahwan, S. Abu Sirriah, M. Nairat, E. Boyaci, A.E. Eroğlu, T.B. Scott, K.R. Hallam, Green synthesis of iron nanoparticles and their application as a Fenton-like catalyst for the degradation of aqueous cationic and anionic dyes, *Chem. Eng. J.* 172 (2011) 258–266. doi:10.1016/j.cej.2011.05.103.
- [79] S. Nazari, A.R. Yari, M.H. Mahmodian, M.T. Reshvanloo, S.A. Matboo, G. Majidi, M. Emamian, Application of H₂O₂ and H₂O₂/Fe⁰ in removal of Acid Red 18 dye from aqueous solutions, *Arch. Hyg. Sci.* 2 (2013) 114–120.
- [80] C. Noubactep, Metallic iron for environmental remediation: A review of reviews, *Water Res.* 85 (2015) 114–123. doi:10.1016/j.watres.2015.08.023.
- [81] H.-L. Lien, D.W. Elliott, Y.-P. Sun, W.-X. Zhang, Recent Progress in Zero-Valent Iron Nanoparticles for Groundwater Remediation, *J. Environ. Eng. Manag.* 16 (2006) 371–380.
- [82] J. Cao, L. Wei, Q. Huang, L. Wang, S. Han, Reducing degradation of azo dye by zero-valent iron in aqueous solution, *Chemosphere.* 38 (1999) 565–571. doi:10.1016/S0045-6535(98)00201-X.
- [83] B.H. Moon, Y.B. Park, K.H. Park, Fenton oxidation of Orange II by pre-reduction using nanoscale zero-valent iron, *Desalination.* 268 (2011) 249–252. doi:10.1016/j.desal.2010.10.036.
- [84] B.C. Jiang, Z.Y. Lu, F.Q. Liu, A.M. Li, J.J. Dai, L. Xu, L.M. Chu, Inhibiting 1,3-dinitrobenzene formation in Fenton oxidation of nitrobenzene through a controllable reductive pretreatment with zero-valent iron, *Chem. Eng. J.* 174 (2011) 258–265. doi:10.1016/j.cej.2011.09.014.
- [85] K.C. Namkung, A.E. Burgess, D.H. Bremner, H. Staines, Advanced Fenton processing of aqueous phenol solutions: A continuous system study including sonication effects, *Ultrason. Sonochem.* 15

- (2008) 171–176. doi:10.1016/j.ultsonch.2007.02.009.
- [86] A.G. Chakinala, P.R. Gogate, A.E. Burgess, D.H. Bremner, Industrial wastewater treatment using hydrodynamic cavitation and heterogeneous advanced Fenton processing, *Chem. Eng. J.* 152 (2009) 498–502. doi:10.1016/j.cej.2009.05.018.
- [87] J. Shen, C. Ou, Z. Zhou, J. Chen, K. Fang, X. Sun, J. Li, L. Zhou, L. Wang, Pretreatment of 2,4-dinitroanisole (DNAN) producing wastewater using a combined zero-valent iron (ZVI) reduction and Fenton oxidation process, *J. Hazard. Mater.* 260 (2013) 993–1000. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.07.003.
- [88] M.P. Callao, Multivariate experimental design in environmental analysis, *Trends Anal. Chem.* 62 (2014) 86–92. doi:10.1016/j.trac.2014.07.009.
- [89] I. Cho, K. Zoh, Photocatalytic degradation of azo dye (Reactive Red 120) in TiO₂/UV system : Optimization and modeling using a response surface methodology (RSM) based on the central composite design, *Dye. Pigment.* 75 (2007) 533–543. doi:10.1016/j.dyepig.2006.06.041.
- [90] J. Forss, U. Welander, Biodegradation of azo and anthraquinone dyes in continuous systems, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65 (2011) 227–237. doi:10.1016/j.ibiod.2010.11.006.
- [91] N. Durán, E. Esposito, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review, *Appl. Catal. B Environ.* 28 (2000) 83–99. doi:10.1016/S0926-3373(00)00168-5.
- [92] A. Steevensz, L.G.C. Villegas, W. Feng, K.E. Taylor, J.K. Bewtra, N. Biswas, Soybean peroxidase for industrial wastewater treatment : a mini review, *J. Environ. Eng. Sci.* 9 (2014) 181–186. doi:10.1680/jees.13.00013.
- [93] A. Steevensz, S. Madur, W. Feng, K.E. Taylor, J.K. Bewtra, N. Biswas, Crude soybean hull peroxidase treatment of phenol in synthetic and real wastewater: Enzyme economy enhanced by Triton X-100, *Enzyme Microb. Technol.* 55 (2014) 65–71. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.12.005.
- [94] H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica, *Chem. Mater.* 12 (2000) 3301–3305. doi:10.1021/cm000487a.
- [95] C. Ispas, I. Sokolov, S. Andreescu, Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 543–554. doi:10.1007/s00216-008-2250-2.
- [96] R.A. Sheldon, Enzyme immobilization: The quest for optimum performance, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007) 1289–1307. doi:10.1002/adsc.200700082.
- [97] H.H. Yang, S.Q. Zhang, X.L. Chen, Z.X. Zhuang, J.G. Xu, X.R. Wang, Magnetite-Containing Spherical Silica Nanoparticles for Biocatalysis and Bioseparations, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1316–1321. doi:10.1021/ac034920m.
- [98] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech.* 3 (2013) 1–9. doi:10.1007/s13205-012-0071-7.
- [99] K. Can, M. Ozmen, M. Ersoz, Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 71 (2009) 154–159. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.01.021.
- [100] J.K.A. Kamal, D. V. Behere, Kinetic stabilities of soybean and horseradish peroxidases, *Biochem. Eng. J.* 38 (2008) 110–114. doi:10.1016/j.bej.2007.07.019.
- [101] B. Boscolo, E. Laurenti, E. Ghibaudi, ESR spectroscopy investigation of the denaturation process of soybean peroxidase induced by guanidine hydrochloride, DMSO or heat, *Protein J.* 25 (2006) 379–390. doi:10.1007/s10930-006-9024-5.
- [102] M.M. Al-Ansari, B. Saha, S. Mazloum, K.E. Taylor, J.K. Bewtra, N. Biswas, Soybean peroxidase applications in wastewater treatment, in: J.E. Maxwell (Ed.), *Soybeans Cultiv. Uses Nutr.*, 1st ed., Nova Science Publishers, 2011: pp. 189–221.
- [103] J.K.A. Kamal, D. V. Behere, Thermal and conformational stability of seed coat soybean peroxidase, *Biochemistry.* 41 (2002) 9034–9042. doi:10.1021/bi025621e.
- [104] A. Bódalo, J. Bastida, M.F. Máximo, M.C. Montiel, M. Gómez, M.D. Murcia, A comparative study of free and immobilized soybean and horseradish peroxidases for 4-chlorophenol removal: Protective effects of immobilization, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31 (2008) 587–593. doi:10.1007/s00449-008-0207-7.
- [105] A.N.P. Hiner, J. Hernández-Ruiz, J.N. Rodríguez-López, M.B. Arnao, R. Varón, F. García-Cánovas, M. Acosta, The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: An example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 504–516. doi:10.1007/s007750100219.

- [106] A. Bassi, Z. Geng, M. Gijzen, Enzymatic Removal of Phenol and Chlorophenols Using Soybean Seed Hulls, *Eng. Life Sci.* 4 (2004) 125–130. doi:10.1002/elsc.200420021.
- [107] S. Saidman, E.H. Rueda, M.L. Ferreira, Activity of free peroxidases, hematin, magnetite-supported peroxidases and magnetite-supported hematin in the aniline elimination from water-UV-vis analysis, *Biochem. Eng. J.* 28 (2006) 177–186. doi:10.1016/j.bej.2005.11.001.
- [108] T. Marchis, P. Avetta, A. Bianco-Prevot, D. Fabbri, G. Viscardi, E. Laurenti, Oxidative degradation of Remazol Turquoise Blue G 133 by soybean peroxidase, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 321–327. doi:10.1016/j.jinorgbio.2010.11.009.
- [109] U. Kalsoom, S.S. Ashraf, M. a Meetani, M. a Rauf, H.N. Bhatti, Mechanistic study of a diazo dye degradation by Soybean Peroxidase., *Chem. Cent. J.* 7 (2013) 93. doi:10.1186/1752-153X-7-93.
- [110] J.L. Gómez, A. Bódalo, E. Gómez, J. Bastida, A.M. Hidalgo, M. Gómez, Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 1016–1022. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.02.008.
- [111] M. Prokopijevic, O. Prodanovic, D. Spasojevic, Z. Stojanovic, K. Radotic, R. Prodanovic, Soybean hull peroxidase immobilization on macroporous glycidyl methacrylates with different surface characteristics, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37 (2014) 799–804. doi:10.1007/s00449-013-1050-z.
- [112] J.C.V. Galárraga, A. Francisco dos Santos, J.C. Bassan, A.J. Goulart, R. Monti, Bromophenol blue discoloration using peroxidase immobilized on highly activated corncob powder, *J. Basic Appl. Pharm. Sci.* 34 (2013) 321–326.
- [113] Q. Chang, L. Zhu, G. Jiang, H. Tang, Sensitive fluorescent probes for determination of hydrogen peroxide and glucose based on enzyme-immobilized magnetite/silica nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 2377–2385. doi:10.1007/s00216-009-3118-9.
- [114] M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H.Y. Shen, H.Q. Zhang, N. Gu, Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 212 (2003) 219–226. doi:10.1016/S0927-7757(02)00305-9.
- [115] K. Tatsumi, S. Wada, Communication to the Editor Removal of Chlorophenols from Wastewater, *Biotechnol. Bioeng.* 51 (1996) 126–130.
- [116] R.P. Pogorilyi, I. V. Melnyk, Y.L. Zub, G.A. Seisenbaeva, V.G. Kessler, Immobilization of urease on magnetic nanoparticles coated by polysiloxane layers bearing thiol- or thiol- and alkyl-functions, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 2694–2702. doi:10.1039/C4TB00018H.
- [117] B.I. Kharisov, H. V. Rasika Dias, O. V. Kharissova, V. Manuel Jiménez-Pérez, B. Olvera Pérez, B. Muñoz Flores, Iron-containing nanomaterials: synthesis, properties, and environmental applications, *RSC Adv.* 2 (2012) 9325–9358. doi:10.1039/c2ra20812a.
- [118] R. Pogorilyi, I. Pylpchuk, I. Melnyk, Y. Zub, G. Seisenbaeva, V. Kessler, Sol-Gel Derived Adsorbents with Enzymatic and Complexonate Functions for Complex Water Remediation, *Nanomaterials.* 7 (2017) 298. doi:10.3390/nano7100298.
- [119] F. Dang, N. Enomoto, J. Hojo, K. Enpuku, Ultrasonics Sonochemistry Sonochemical coating of magnetite nanoparticles with silica, *Ultrason. - Sonochemistry.* 17 (2010) 193–199. doi:10.1016/j.ultsonch.2009.05.013.
- [120] R.P. Pogorilyi, I. V. Melnyk, Y.L. Zub, G.A. Seisenbaeva, V.G. Kessler, M.M. Shcherbatyik, A. Kořak, A. Lobnik, Urease adsorption and activity on magnetite nanoparticles functionalized with monofunctional and bifunctional surface layers, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 68 (2013) 447–454. doi:10.1007/s10971-013-2991-z.
- [121] E. Ranjbakhsh, A.K. Bordbar, M. Abbasi, A.R. Khosropour, E. Shams, Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles, *Chem. Eng. J.* 179 (2012) 272–276. doi:10.1016/j.cej.2011.10.097.
- [122] T. Marchis, G. Cerrato, G. Magnacca, V. Crocellà, E. Laurenti, Immobilization of soybean peroxidase on aminopropyl glass beads: Structural and kinetic studies, *Biochem. Eng. J.* 67 (2012) 28–34. doi:10.1016/j.bej.2012.05.002.
- [123] F. Horst, E.H. Rueda, M.L. Ferreira, Activity of magnetite-immobilized catalase in hydrogen peroxide decomposition, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 1005–1012. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.08.035.
- [124] S. Alibeigi, M.R. Vaezi, Phase transformation of iron oxide nanoparticles by varying the molar ratio of Fe²⁺:Fe³⁺, *Chem. Eng. Technol.* 31 (2008) 1591–1596. doi:10.1002/ceat.200800093.
- [125] M.P.S. De Almeida, K.L. Caiado, P.P.C. Sartoratto, D.O. Cintra E Silva, A.R. Pereira, P.C. Morais, Preparation and size-modulation of silica-coated maghemite nanoparticles, *J. Alloys Compd.* 500 (2010) 149–152. doi:10.1016/j.jallcom.2009.10.245.

- [126] A. Beganskienė, V. Sirutkaitis, M. Kurtinaitienė, R. Juškėnas, A. Kareiva, FTIR, TEM and NMR Investigations of Stöber Silica Nanoparticles, *J. Non. Cryst. Solids*. 10 (2004) 287–290. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2012.11.006.
- [127] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767 (2007) 1073–1101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
- [128] L. Li, W. Feng, P. Ji, Protein Adsorption on Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes with Amino-Cyclodextrin, *AIChE J.* 57 (2011) 3507–3513. doi:10.1002/aic.12543.
- [129] C.J. Serna, M.P. Morales, Maghemite (γ -Fe₂O₃): a versatile Magnetic Colloidal Material, in: E. Matijević, M. Borkovec (Eds.), *Surf. Colloid Sci.*, Springer US, Boston, 2004: pp. 27–81. doi:10.1007/978-1-4419-9122-5_2.
- [130] V. Maurice, T. Georgelin, J.M. Siaugue, V. Cabuil, Synthesis and characterization of functionalized core-shell γ Fe₂O₃-SiO₂ nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.* 321 (2009) 1408–1413. doi:10.1016/j.jmmm.2009.02.051.
- [131] J.S.S. Gray, B.Y. Yang, S.R. Hull, D.P. Venzke, R. Montgomery, The glycans of soybean peroxidase, *Glycobiology*. 6 (1996) 23–32.
- [132] S.; Brunauer, P.H.; Emmett, E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309–19. doi:citeulike-article-id:4074706\rdoid: 10.1021/ja01269a023.
- [133] E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373–380. doi:10.1021/ja01145a126.
- [134] D. Maity, D.C. Agrawal, Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media, *J. Magn. Magn. Mater.* 308 (2007) 46–55. doi:10.1016/j.jmmm.2006.05.001.
- [135] R.L. Rebodos, P.J. Vikesland, Effects of oxidation on the magnetization of nanoparticulate magnetite, *Langmuir*. 26 (2010) 16745–16753. doi:10.1021/la102461z.
- [136] J.A.R. Guivar, A.I. Martínez, A.O. Anaya, L.D.L.S. Valladares, L.L. Félix, A.B. Dominguez, Structural and Magnetic Properties of Monophasic Maghemite (γ -Fe₂O₃) Nanocrystalline Powder, *Adv. Nanoparticles*. 3 (2014) 114–121. doi:http://dx.doi.org/10.4236/anp.2014.33016.
- [137] S.P. Sun, A.T. Lemley, P-Nitrophenol degradation by a heterogeneous Fenton-like reaction on nano-magnetite: Process optimization, kinetics, and degradation pathways, *J. Mol. Catal. A Chem.* 349 (2011) 71–79. doi:10.1016/j.molcata.2011.08.022.
- [138] S.E. Lehman, A.S. Morris, P.S. Mueller, A.K. Salem, V.H. Grassian, S.C. Larsen, Silica nanoparticle-generated ROS as a predictor of cellular toxicity: mechanistic insights and safety by design, *Environ. Sci. Nano*. 3 (2015) 56–66. doi:10.1039/C5EN00179J.
- [139] M.C. Silva, J.A. Torres, F.G.E. Nogueira, T.S. TAVARES, A.D. Corrêa, L. Oliveira, T.C. Ramalho, Immobilization of soybean peroxidase on silica-coated magnetic particles: a magnetically recoverable biocatalyst for pollutants removal., *RSC Adv.* 6 (2016) 83856–83863. doi:10.1039/C6RA17167B.