



DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES NITROAROMÁTICOS Y ESTUDIO DE EFICIENCIA EN EL MARCO DE LAS TÉCNICAS AOT

**Carlos Luciano¹, Fernando García Einschlag¹, Jorge López^{1,2},
Laura Villata¹ y Alberto L. Capparelli¹**

INIFTA

- 1.- Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas
UNLP-CONICET,**
- 2.- Autoridad del Agua, Provincia de Buenos Aires**

RESEARCH ACTIVITIES

- **CHEMICAL KINETICS:**

- Study of complexation reactions involving metal ions -particularly transition metal ions and organic ligands of biological interest
- Homogeneous catalysis.
- Thermal redox reactions involving coordination complexes
- Study of thermal processes involving coordination compounds of transition metal ions

- **PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOPHYSICS**

BASIC STUDIES.

- Evaluation of fundamental parameters associated to the studied process and analysis of the factors that influence their photochemical behavior.
- Photochemistry and photophysics of organic molecules with biological activity;
- Photosensitized reactions involving organic molecules as well as inorganic coordination complexes;
- Evaluation of the rate constants involving radicals and organic molecules

PHOTOCHEMICAL APPLIED STUDIES

- Photochemical and photoinduced degradation of organic compounds in the frame of the advanced oxidation processes (AOP): mainly UV; UV/H₂O₂, Fenton and enhanced Fenton.

- **DEVELOPMENT OF SOFTWARES** For analyzing complex systems and for the treatment of the experimental data

ESTRUCTURA GENERAL DE LA PRESENTACIÓN

- Descripción sucinta de métodos numéricos para el procesamiento de la información obtenida de la aplicación de técnicas espectrofotométricas
 - ✓ Determinación de propiedades fisicoquímicas sencillas
 - ✓ Tipos de métodos empleados
 - ✓ Caracterización de los espectros de intermediarios y predicción de la evolución temporal de los perfiles de concentración
 - ✓ Estimación de la "eficiencia" del proceso empleado (por ej., UV/H₂O₂)
- Efecto de inhibición de crecimiento sobre el protozoo *Tetrahymena pyriformis* de soluciones de un contaminante y de sus productos de fotólisis.
- Degradación en nitroaromáticos empleando radiación UV en presencia de iones nitrato y en presencia de iones nitrito. Comparación con la técnica UV/H₂O₂.
- Fenton térmica.
- Fotólisis UV y fotocatalisis.
- Aplicaciones

MÉTODOS DE APROXIMACIÓN NUMÉRICA

- ***Naturaleza del problema***

- ✓ El uso del análisis de regresión requiere de un conjunto mínimo de información experimental para la evaluación de propiedades fisicoquímicas y cinéticas,
- ✓ En las AOT (o TAO) este conocimiento no se tiene a priori,
- ✓ Se plantea el problema de trabajar con parámetros interrelacionados,
- ✓ Para el análisis cinético se plantea la dificultad de trabajar con ecuaciones en las que se deben incluir un número de intermediarios muchas veces no conocidos a priori y cuyas propiedades fisicoquímicas pueden no ser conocidas,
- ✓ El error experimental en las medidas puede influir la obtención de información relevante de un mecanismo de reacción,
- ✓ Los métodos matemáticos, combinados con métodos numéricos y estadísticos son una herramienta válida para la obtención de información relevante, tanto de las propiedades fisicoquímicas y la caracterización de los intermediarios.

- ***Objetivo***

- ✓ Aplicar este tipo de métodos matemáticos a resultados experimentales obtenidos de los cambios de absorbancia de soluciones con el fin extraer la máxima información asociada a los procesos en estudio.

DESCRIPCIÓN SUSCINTA DE LOS MÉTODOS EMPLEADOS

- *Algoritmos para mejorar la relación señal/ruido en registros individuales obtenidos en experimentos independientes*
- Se combinan procedimientos de interpolación asociados a un expansión de Taylor en el entorno de cada punto de una traza o perfil resultante de una medida
- Por ejemplo, sea z un valor experimental descrito como una función de dos variables x e y .
- En el entorno de un punto experimental $P_0(x_0, y_0)$ puede aplicarse la expansión

$$f(x, y) = a_{00} + a_{10} \Delta x + a_{01} \Delta y + a_{20} \Delta x^2 + a_{02} \Delta y^2 + a_{11} \Delta x \Delta y + \dots + R_n$$

- **Con** $\Delta x = (x - x_0)$, $\Delta y = (y - y_0)$ y los coeficientes de la expansión son.

$$a_{00} = f(x, y) \quad a_{10} = \frac{\partial f(x, y)}{\partial x} \quad a_{20} = \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial x^2} \quad a_{01} = \frac{\partial f(x, y)}{\partial y} \quad a_{11} = \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial x \partial y} \quad a_{21} = \frac{\partial^3 f(x, y)}{\partial x^2 \partial y}$$

- *Los coeficientes que mejor describirán la traza deben cumplir con*

$$S^2 = \sum [z - f(x, y)]^2$$

Figure 1

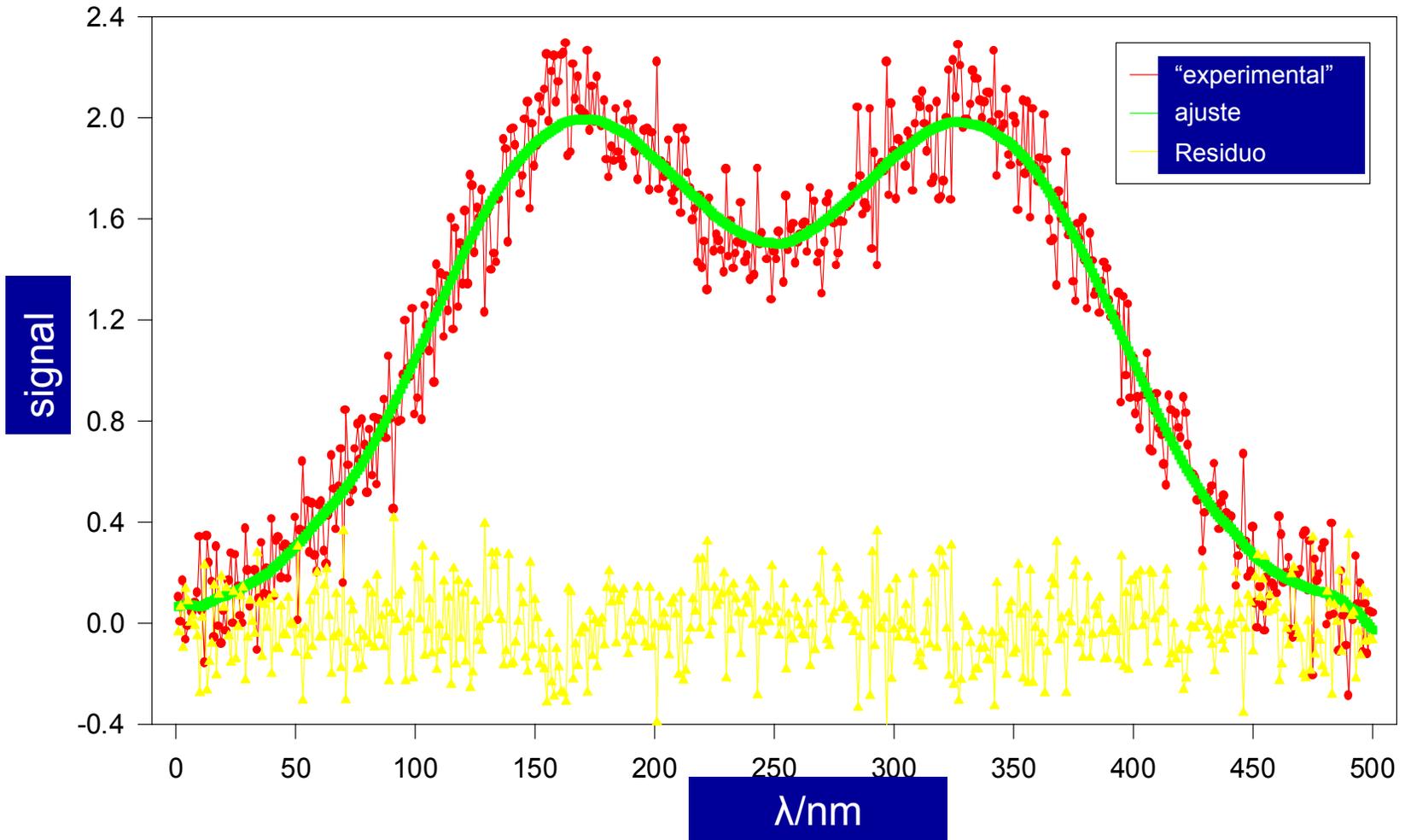


Figure 1: Espectro "registrado", espectro ajustado y residuos

DESCRIPCIÓN SUSCINTA DE LOS MÉTODOS EMPLEADOS

- *Análisis de Factores*

Este procedimiento permite determinar:

- ✓ El número de factores que contribuyen a una dada matriz experimental de datos
- ✓ Aplicárselo al estudio de espectros resueltos en el tiempo

- La aplicación de este formalismo a este estudio es de utilidad para:

- ✓ **a.** Evaluar el número mínimo de especies presentes en el sistema en estudio,
- ✓ **b.** Estimar las características espectrales de los intermediarios que contribuyen a la absorbancia registrada a un dado tiempo y el intervalo de longitudes de onda donde se toma el espectro,

Esto permite obtener una estimación de los perfiles de concentración de los intermediarios potenciales en experimentos resueltos en el tiempo. Luego, una vez que se obtiene la matriz experimental puede proponerse un modelo cinético,

- ✓ **c.** Integrar las ecuaciones de velocidad para las distintas especies (reactivos, intermediarios y productos) presentes en los estudios de fotodegradación.

DESCRIPCIÓN SUSCINTA DE LOS MÉTODOS EMPLEADOS

- EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS ASOCIADOS A UN MECANISMO DE REACCIÓN COMPLEJO
- CONTRASTACIÓN ENTRE PREDICCIÓN Y EXPERIENCIA
- EXPRESIÓN MATRICIAL DE LA LEY DE LAMBERT-BEER

$$A(\lambda) = l \cdot \sum \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i,$$

- donde, $\varepsilon_i(\lambda)$ es el coeficiente de absorción molar de la i-ésima especie, c_i es su concentración y l el paso óptico. Si c_i cambia en el tiempo, entonces, la ley conviene escribirla de la siguiente forma general:

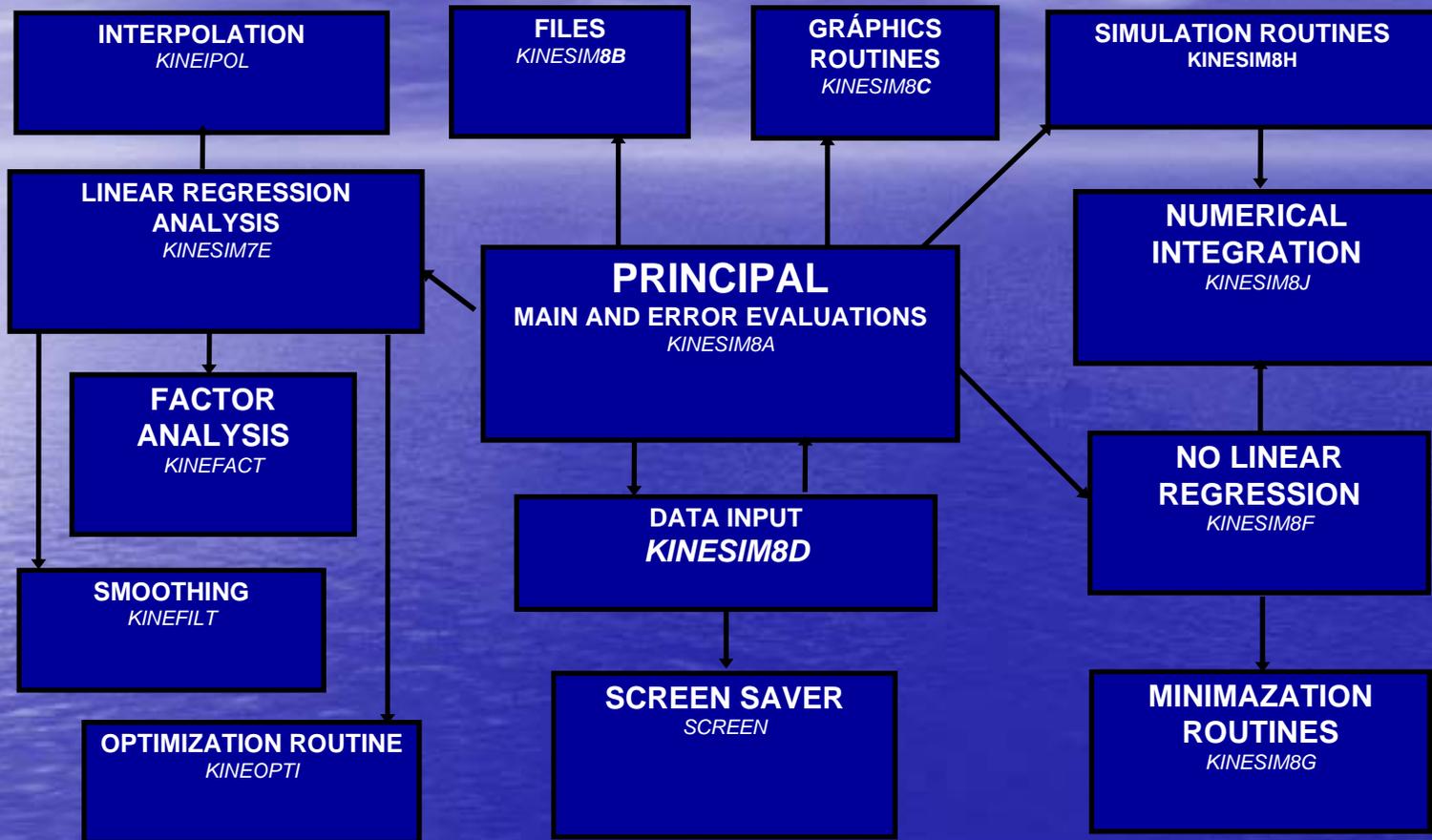
$$A(t, \lambda) = l \cdot \sum \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i(t),$$

- En forma matricial, si se consideran el número de espectros registrados a distintos tiempo (N_t), el número de longitudes de onda registradas (N_λ) y el número de especies

$$[\mathbf{A}] = [\mathbf{c}] \cdot [\boldsymbol{\varepsilon}]$$

- Las dimensiones de $[\mathbf{c}]$ y $[\boldsymbol{\varepsilon}]$ son $N_t \times N_s$ and $N_s \times N_\lambda$ respectivamente.
- N_s , es el número de especies que contribuyen a la absorbancia en un tiempo t y en la región del espectro estudiado no es conocida a priori.
- La integración de las ecuaciones de velocidad se realiza con el método de Runge-Kutta (4to orden)

TRATAMIENTO DE DATOS



PROCESOS DE OXIDACIÓN INICIADOS POR EL RADICAL HIDROXILO

• TECNOLOGÍAS DE OXIDACIÓN AVANZADAS (UV/H₂O₂, VUV, etc)

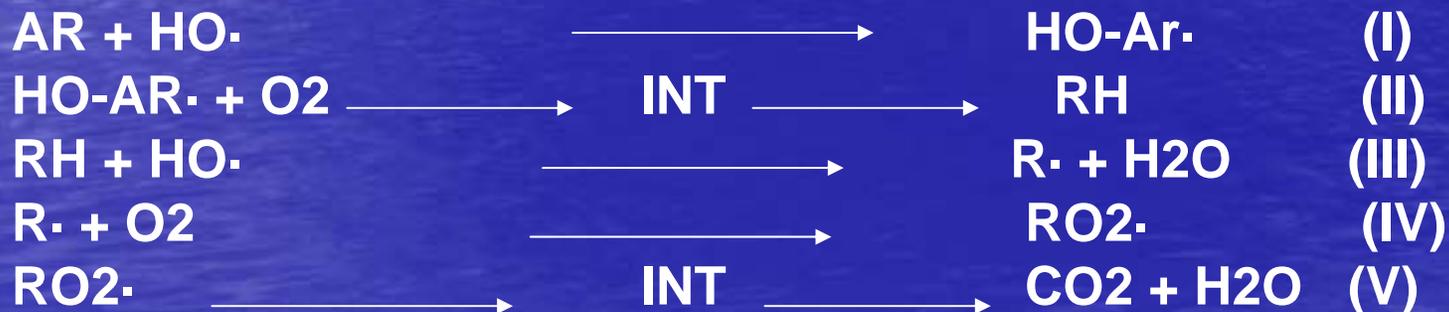
• OBJETIVOS

⇒ Evaluar la eficiencia de la fotodegradación de un dado sustrato (contaminante) S en función de la relación $R = [S]/[H_2O_2]$

⇒ Establacer una correlación entre la eficiencia del proceso y la reactividad de los radicales OH•

⇒ Comparar diferentes herramientas analíticas en el marco de la técnica UV/H₂O₂

⇒ Investigar la influencia de la fuente de radiación policromática en la eficiencia de la fotodegradación



- **SUSTRATOS**

- 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (99%, *Aldrich*);
- 2,4-dinitrofenol (99%, *Riedel de Haën*) 99%);
- 4-nitrofenol (99%, *Fluka and Riedel de Haën*)
- Nitrobenzeno (95%, *May&Baker*)
- Ácido 4-Chloro 2,5-dinitrobenzoico

- **CONDICIONES EXPERIMENTALES**

- Concentraciones: entre 15 ppm y 200 ppm.
- pH entre 2.45-2.55 ;
- [H₂O₂] (*30% perhydrol, Merck*) entre 5.5x10⁻³ a 0.6 mol.L⁻¹;

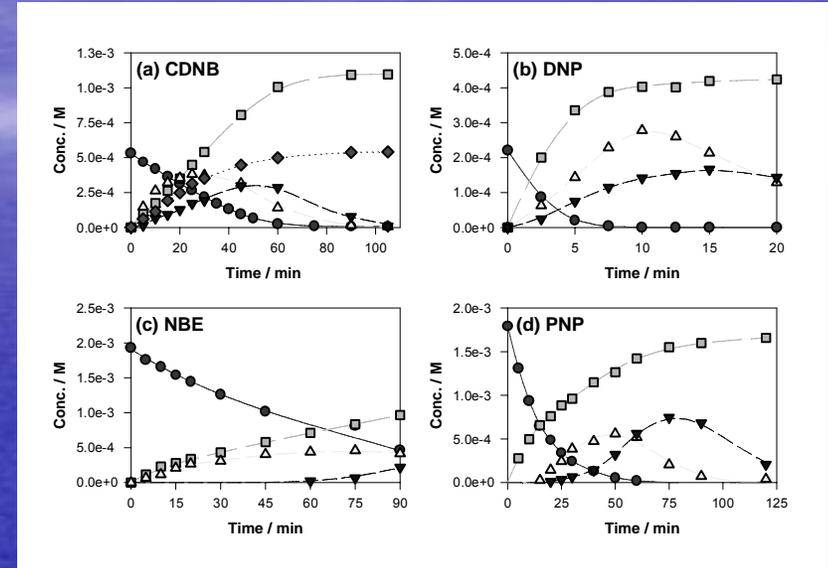
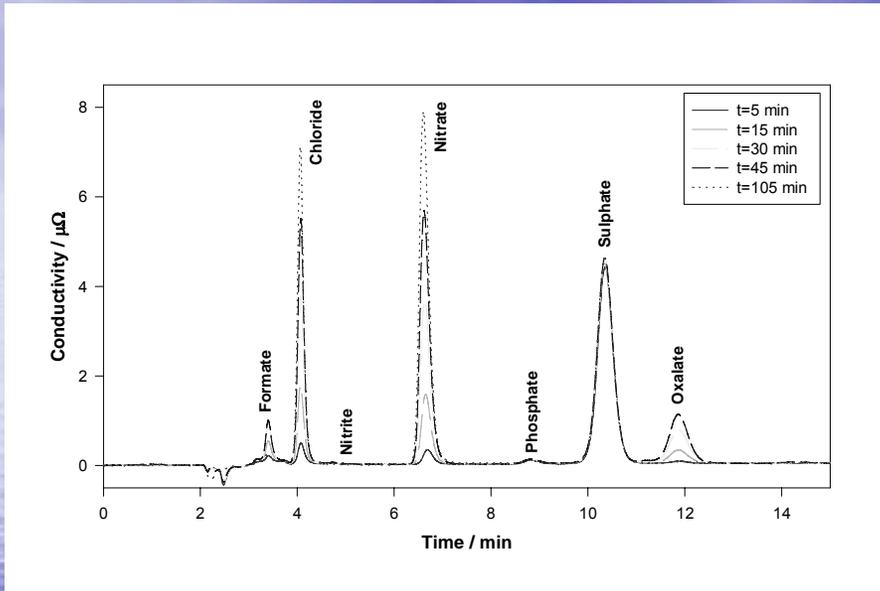
- **TÉCNICAS ANALÍTICAS**

- Espectroscopía UV-vis, HPLC, IC, TOC
- Fotoreactores (DEMA) de 750 y 850 mL de capacidad
- Lámparas de Hg de media presión Philips HPK 125 W y Heraus Nobelight TIQ of 150 W
- Actinometría – Ferrioxalato de potasio [K₃Fe(C₂O₄)₃.3H₂O] y 1-10 fenantrolina como complejante del Fe(II)
- I₀ = 8.9x10⁻⁶ Einsteins por segundo (HPK 125 W), con I₀ = número de fotones que inciden sobre la solución

ESTUDIOS PREVIOS EN NUESTRO
LABORATORIO

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA UV/H₂O₂ SOBRE
DERIVADOS NITROAROMÁTICOS

RESULTADOS PREVIOS OBTENIDOS SOBRE ALGUNOS NITRODERIVADOS EMPLEANDO LA TÉCNICA UV/H₂O₂



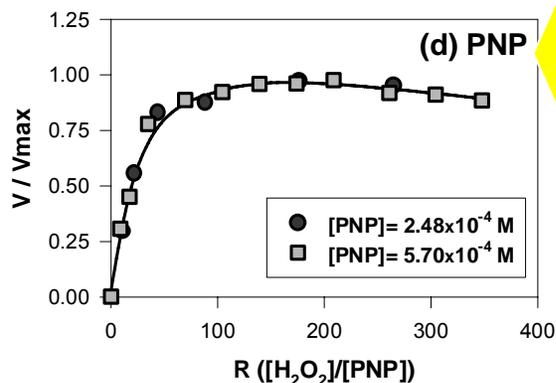
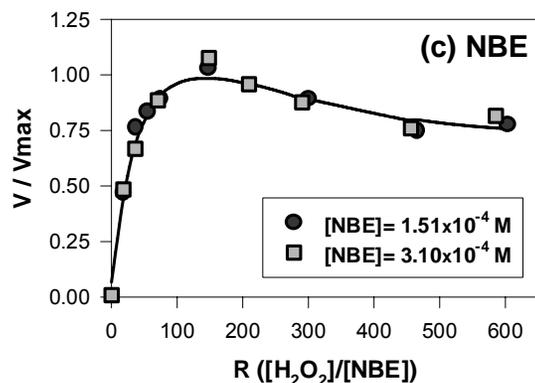
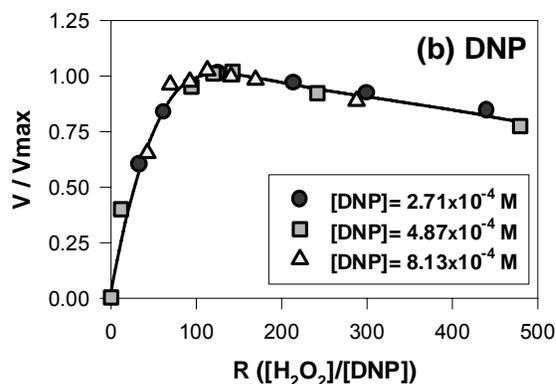
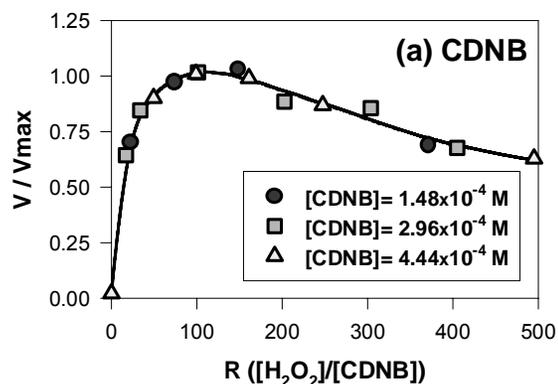
\bullet = sustrato, \square = NO_3^- , \blacktriangle = formiato,
 \blacktriangledown = oxalato, \blacklozenge = cloruro

- **RESULTADOS COMUNES**

- Durante la fotólisis se forman aniones orgánicos (formiato, oxalato) e inorgánicos (nitrato y nitrito -en pequeñas concentraciones-) como intermediarios y productos;
- El balance de nitrógeno es estequiométrico al final de la reacción;
- La concentración de SUSTRATO desaparece pero se observa la formación de otras especies orgánicas a tiempos mayores de irradiación;
- La concentración de formiato alcanza su máximo cuando todo el SUSTRATO ORIGINAL no está presente en la solución. ESTE COMPORTAMIENTO ES COMÚN A TODOS LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS;
- Los perfiles cinéticos de formiato y oxalato son similares para los distintos sustratos investigados;
- El ácido oxálico alcanza su máximo cuando todo el SUSTRATO ORIGINAL ha sido completamente eliminado de la solución, sugiriendo que la fuente de este anión es un intermediario.
- En algunos sistemas (NBE), se detectan 2-nitrofenol, 3-nitrofenol y 4-nitrofenol se detectan por HPLC

- **EFICIENCIA DE LA FOTODEGRADACIÓN EN EL CONTEXTO DE LA TÉCNICA UV/H₂O₂**
- El efecto de la [H₂O₂]₀ fue analizada en experimentos donde la misma se varió entre 15 mg/L y 100 mg/L;
- La [H₂O₂]₀ dependió del tipo de sustrato (por ejemplo, en el caso de CDNB, entre 3.3x10⁻³ hasta 3.5x10⁻¹ M);
- El pH inicial se ajustó con H₂SO₄ (pH=2.50);
- Las soluciones fueron fotolizadas en el fotoreactor DEMA empleando la lámpara HPK 125 W;
- Se midieron las velocidades iniciales (-dC/dt) y las eficiencias ($\eta_{\text{SUBS}} > \underline{20-30 \text{ veces}}$ a las medidas en la fotólisis directa);

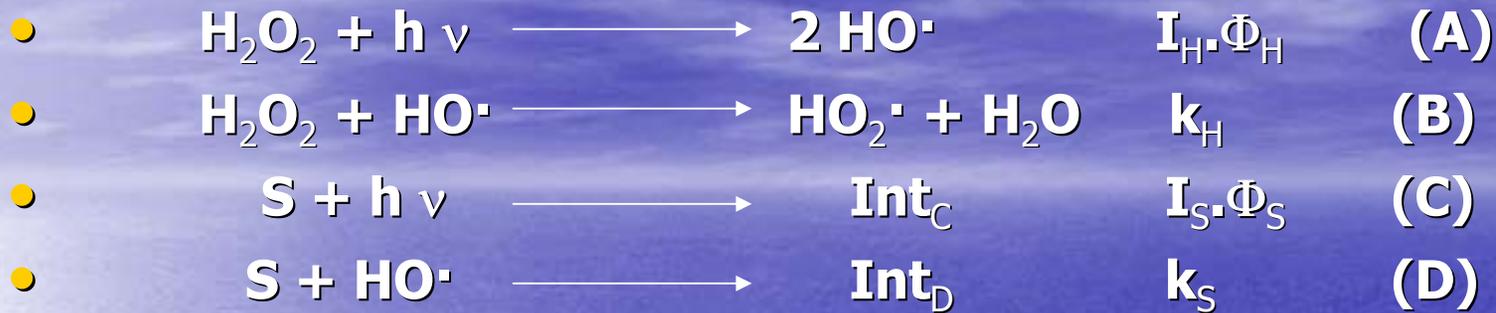
Velocidades de degradación normalizadas para los sustratos indicados versus la relación $R = [S]/[H_2O_2]$.



• En todos los casos se registra un máximo en la velocidad inicial de degradación que es independiente de la concentración inicial de sustrato y del volumen del reactor empleado;

• Implicancias económica para el uso de esta técnica con fines aplicados.

MECANISMO SIMPLIFICADO:



- I_{H} e I_{S} corresponden a la cantidad de luz absorbida por unidad de tiempo por el H_2O_2 y el sustrato respectivamente.
- Φ_{H} y Φ_{S} son las eficiencias cuánticas de la fotólisis;
- k_{H} y k_{S} son las constantes de reacciones bimoleculares en las que participan los radicales hidroxilos;
- No se consideraron otras especies radicales tales como HO_2^\bullet , O_2^- o $\text{SO}_4^{\bullet-}$

Velocidad de degradación del sustrato

$$d[S]/dt = I_S \cdot \Phi_S + k_S \cdot [S] \cdot [HO^\bullet] \quad (1)$$

Cantidad de luz absorbida por el sustrato S

$$I_S = I_0 \cdot [1 - \exp(-A)] \cdot \epsilon_S \cdot C_S / (\epsilon_H \cdot C_H + \epsilon_S \cdot C_S)$$

- **Estado estacionario para los radicales HO[•]**
- Admitiendo que las reacciones (B) y (D) siguen una ley de pseudo primer orden para la desaparición de los radicales HO[•] puede hallarse la siguiente constante aparente
- $k_{app} = k_S \cdot [S] + k_H \cdot [H_2O_2]$

STATIONARY CONCENTRATION OF HO[·]
RADICALS (Equation (3)):

$$[\text{HO}\cdot]_{\text{EE}} = \frac{v p_{\text{HO}}}{k_{\text{H}} \cdot c_{\text{H}} + k_{\text{S}} \cdot c_{\text{S}}} \quad (3)$$

where $v p_{\text{HO}}$ is the HO[·] production rate.

✓ The quantum efficiency of photolysis of H₂O₂ is around 0.5 in the wavelength range from 200 to 300 nm.

✓ Both H₂O₂ and the substrates are able to absorb the incident photons

✓ The production rate $v p_{\text{HO}}$ can be now expressed as

$$v p_{\text{HO}} = \frac{2 \cdot I_0 \cdot \Phi_{\text{H}} \cdot (1 - 10^{-A_{\text{bs}}}) \cdot \epsilon_{\text{H}} \cdot c_{\text{H}}}{\epsilon_{\text{H}} \cdot c_{\text{H}} + \epsilon_{\text{S}} \cdot c_{\text{S}}} \quad (4)$$

DEGRADATION RATE FOR THE SUBSTRATES

The degradation rate of the substrate is now given by

$$V_S = \frac{I_0}{\epsilon_H \cdot R + \epsilon_S} \left\{ \Phi_S \cdot \epsilon_S + \frac{2 \cdot \Phi_H \cdot k_S \cdot \epsilon_H \cdot R}{k_H \cdot R + k_S} \right\} \quad (5)$$

The optimal ratio R (R_{OPT}) for the highest degradation rate can be obtained after differentiation of equation 5. Then:

$$R_{OPT} = \frac{\sqrt{4 \cdot \Phi_H^2 \cdot \epsilon \cdot k + 2 \cdot \Phi_H \cdot \Phi_S \cdot (k^2 - \epsilon \cdot k)} - 2 \cdot \Phi_S \cdot k}{k \cdot (2 \cdot \Phi_H \cdot \epsilon + \Phi_S \cdot k)} \quad (6)$$

$$\epsilon = \epsilon_S / \epsilon_H \quad \text{y} \quad k = k_S / k_H$$

- ✓ Neglecting the UV photolysis of the substrate, a quite simple equation can be obtained:

$$R_{\text{OPT}} = \sqrt{\frac{1}{k \cdot \varepsilon}} = \sqrt{\frac{k_S \cdot \varepsilon_S}{k_H \cdot \varepsilon_H}} \quad (7)$$

- ✓ Equation (7) can be used either to evaluate the optimal hydrogen peroxide concentration if k_S and ε_S are known at a given λ , or to estimate k_S if the optimal H_2O_2 concentration is measured.

ESTIMATION OF R_{OPT}

The evaluation of the rate constants between the substrate and HO· radicals requires the precise determination of the maximum of the experimental curves.

Two different methods have been developed to estimate

first method is an algorithm that combines a Taylor series and each experimental point with polynomial regression analysis. The function obtained represents the behavior of the data in the experimental domain and the determination of the value of R_{OPT} is made taking its numerical derivative.

second method uses the expression for the substrate oxidation rate:

$$\frac{R}{v_s} = a.R^2 + b.R + c \quad (9)$$

;

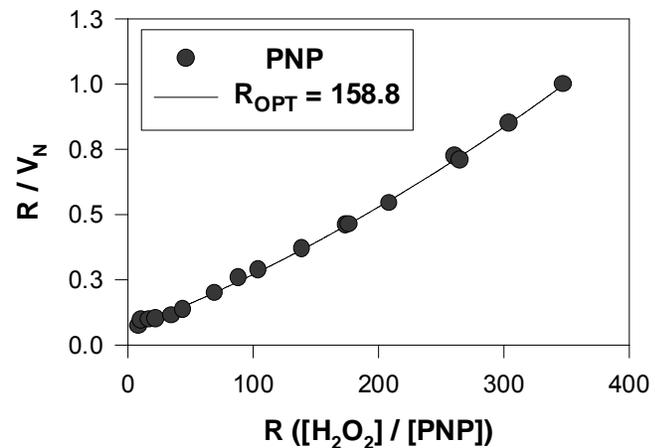
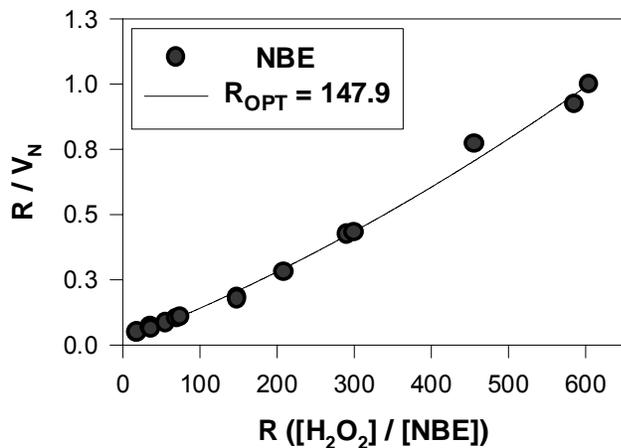
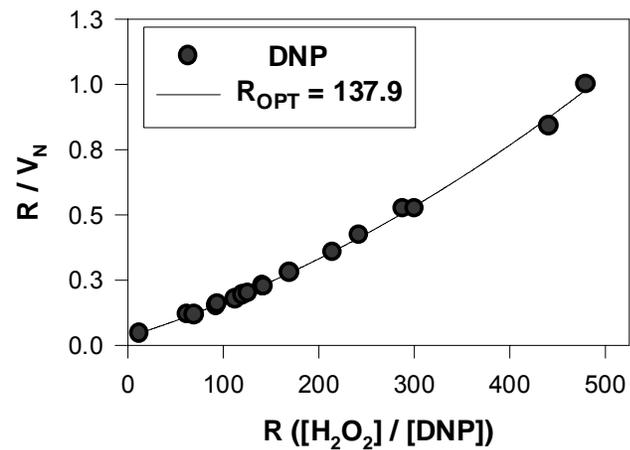
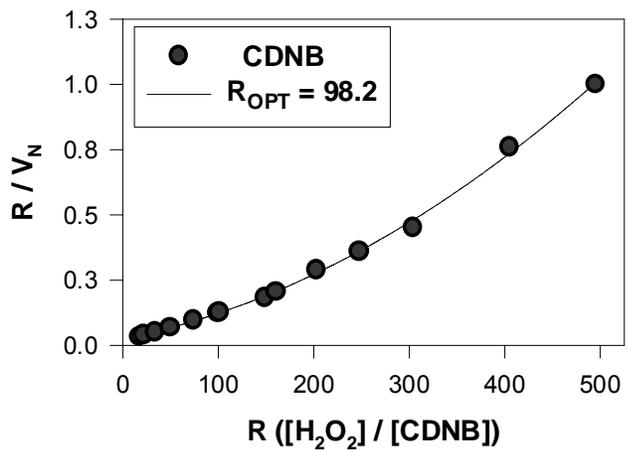
$$a = \varepsilon.k/(2I_0\Phi_H\varepsilon),$$

$$b = (\varepsilon + k)/(2I_0\Phi_H\varepsilon) \text{ and}$$

$$c = 1/(2I_0\Phi_H\varepsilon)$$

Therefore $R_{OPT}^2 = c/a = 1/(\varepsilon.k)$

experimental behavior of R/v_s against R follows the behavior predicted by equation (9)



Substrate	R_{OPT}
DNP	138 ± 9
CDNBA	61 ± 7
CDNB	98 ± 15
NBE	148 ± 12
PNP	159 ± 10
MNP	188 ± 17

Compound	Method A / M⁻¹.s⁻¹	Method B / M⁻¹.s⁻¹
DNP	2.1 ± 0.4 x 10 ⁹	2.4 ± 0.2 x 10 ⁹
CDNBA	2.9 ± 1.1 x 10 ⁸	3.2 ± 0.2 x 10 ⁸
DNCB	1.0 ± 0.4 x 10 ⁹	8.7 ± 0.5 x 10 ⁸
NBE	4.4 ± 1.3 x 10 ⁹	4.3 ± 0.4 x 10 ⁹
PNP	6.5 ± 1.1 x 10 ⁹	5.8 ± 0.5 x 10 ⁹
MNP	5.4 ± 1.5 x 10 ⁹	5.0 ± 0.4 x 10 ⁹

F. S. García Einschlag, L. Carlos and A. L. Capparelli, Chemosphere, **53**, (2003), 1-7

- MEDIDA DEL pK_a DE COMPUESTOS
- MONITOREO DEL CURSO DE LA DEGRADACIÓN POR EXTRACCIÓN A FASE ORGÁNICA
- ANÁLISIS DE ESPECTROS DIFERENCIAS
- ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE ESPECIES QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE ABSORCIÓN

MEDIDA DEL pK_a

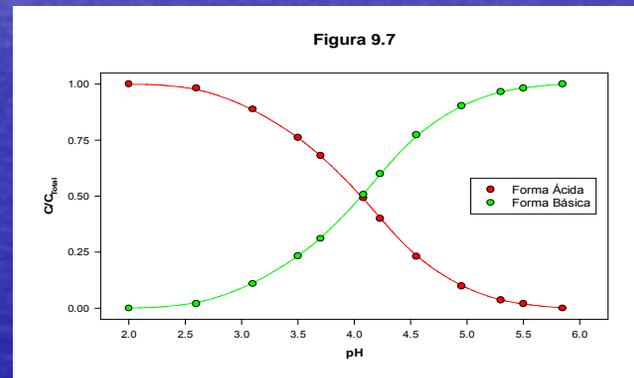
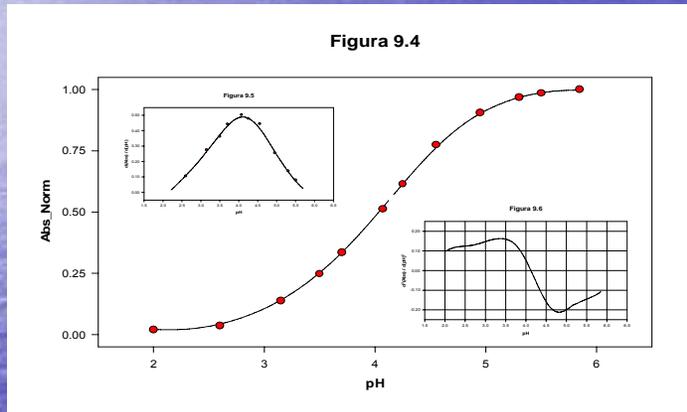
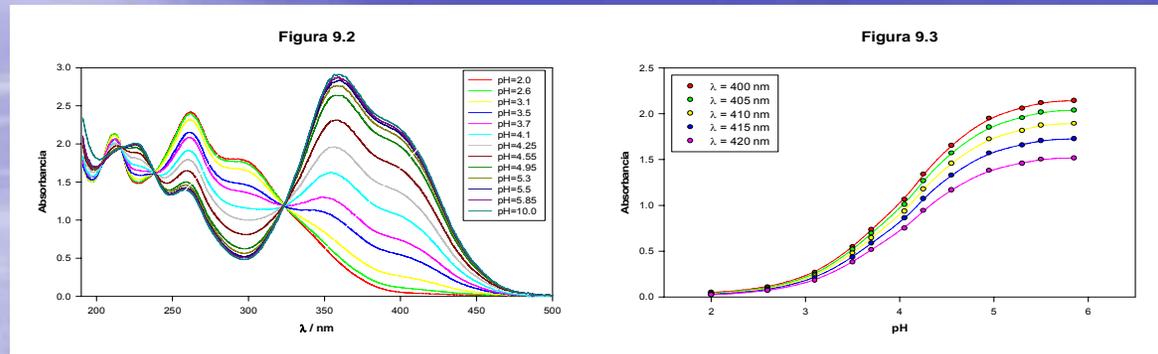
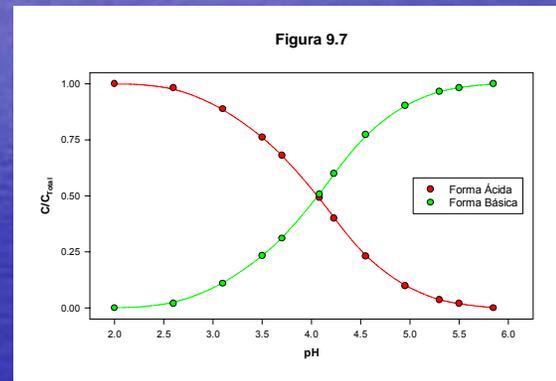
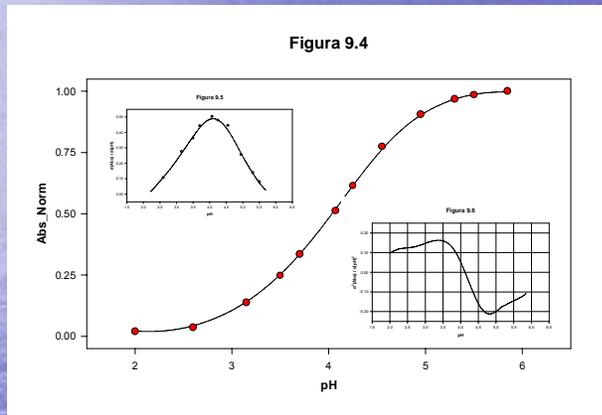
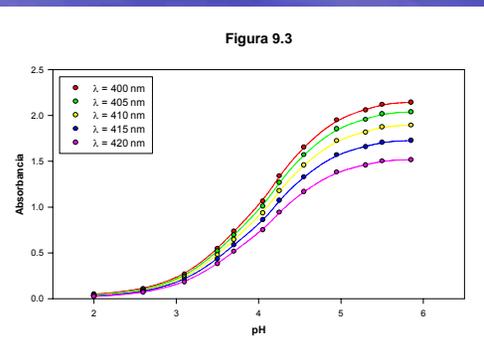
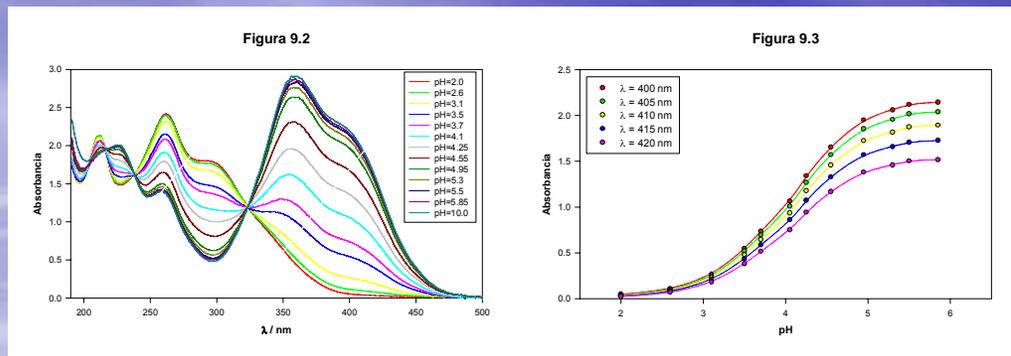
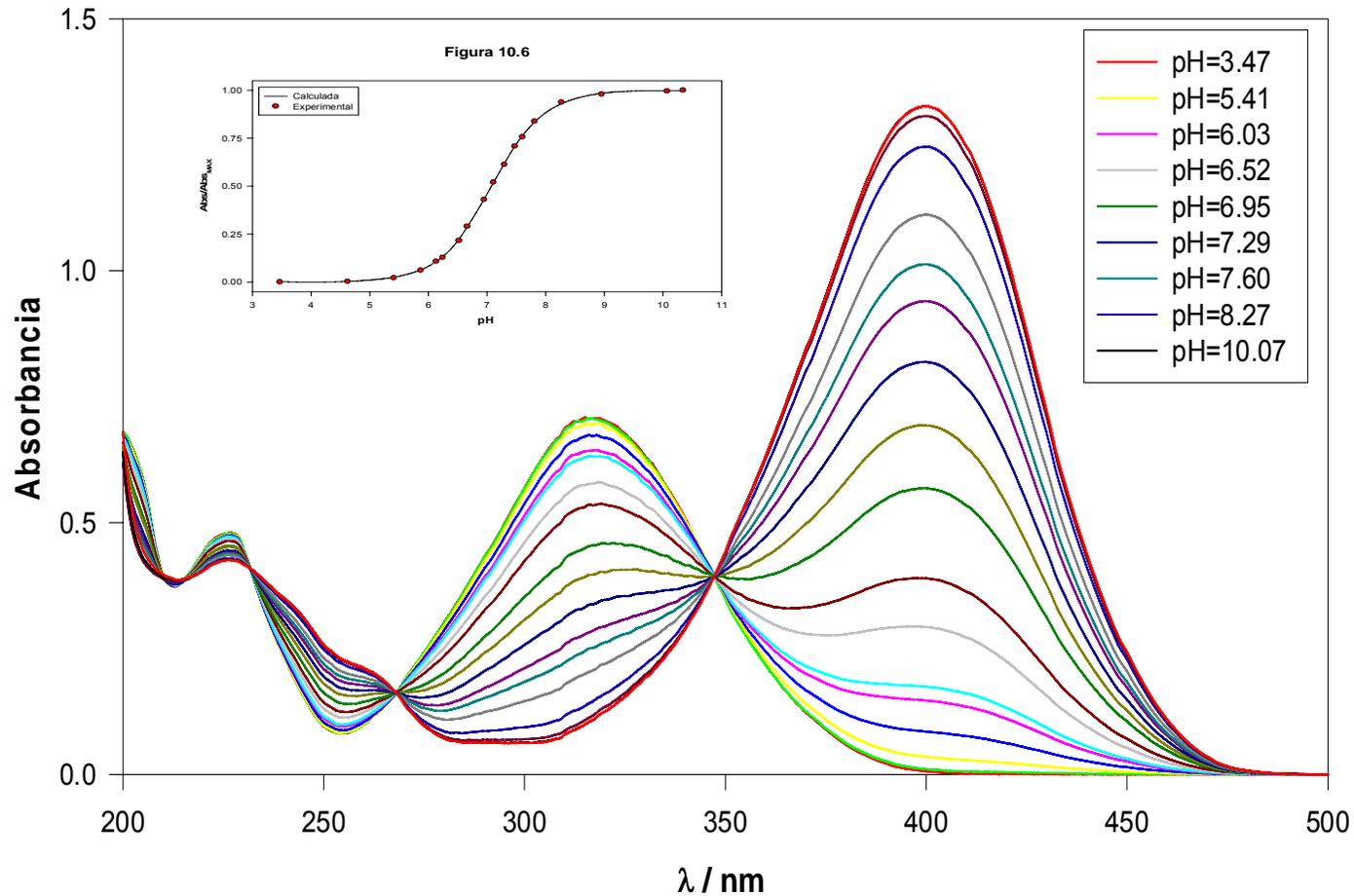


Figura 7: (a) Espectro de absorción de soluciones de DNP a diferentes pH ($[DNP] = 90$ ppm) (b) Curvas de titulación a distintas λ (c) Curvas de titulación normalizadas empleando la información contenida en todos los espectros a diferentes pH. El sistema muestra un único punto de inflexión. El pK_a a $25^\circ C$ vale 4.04 (d) Curvas de distribución de las formas ácidas y básicas del DNP,



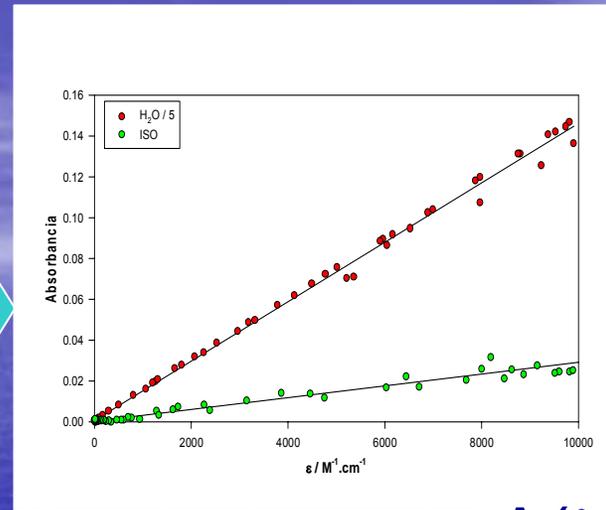
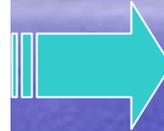
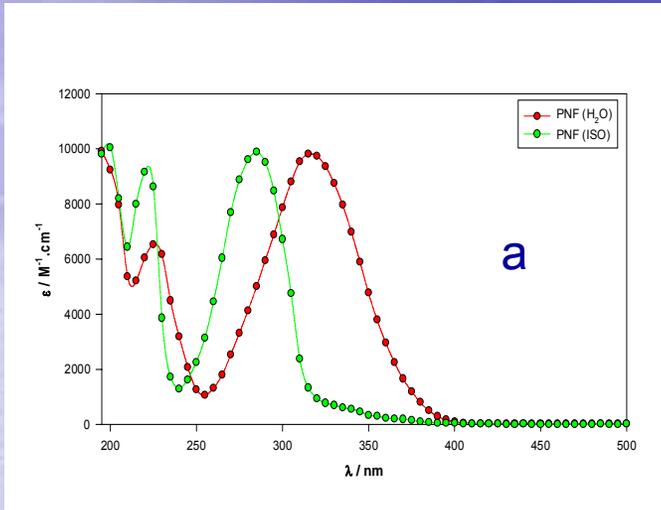
(a) Espectro de absorción de soluciones de DNP a diferentes pH ($[DNP] = 90 \text{ ppm}$) (b) Curvas de titulación a distintas λ (c) Curvas de titulación normalizadas empleando la información contenida en todos los espectros a diferentes pH. El sistema muestra un único punto de inflexión. El pK_a a 25°C vale 4.04 (d) Curvas de distribución de las formas ácidas y básicas del DNP,

Figura 10.5

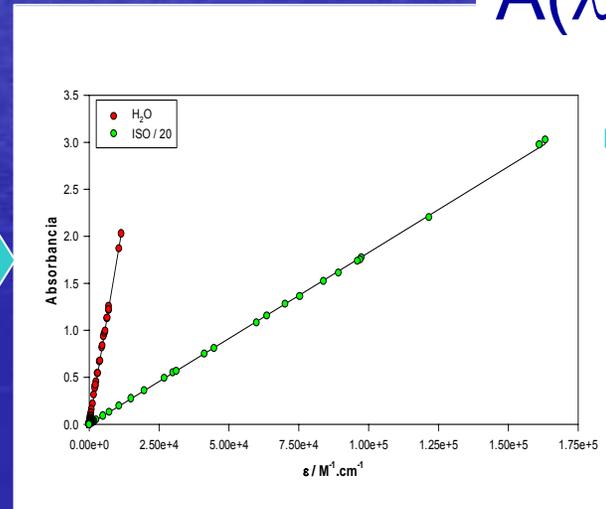
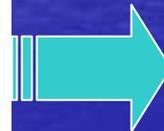
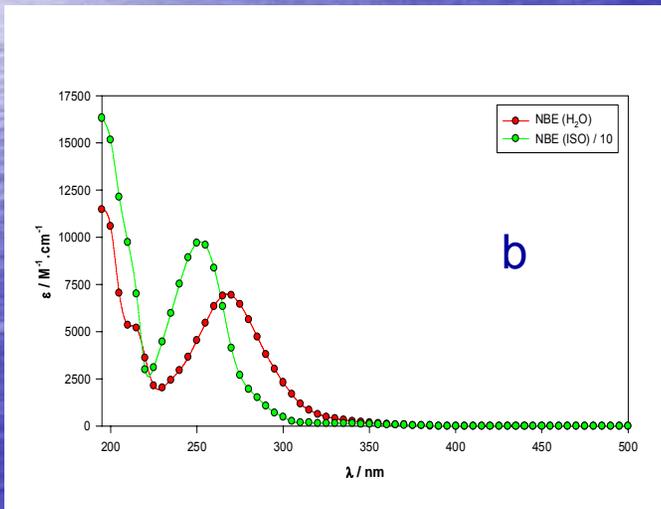


Espectro de soluciones de PNP a diferentes pH. $[\text{PNP}]_0 = 50 \text{ mg.L}^{-1}$. La curva de titulación se muestra en el recuadro a la izquierda. Los ajustes se realizaron empleando las rutinas del programa KINESIM.

EXTRACCIÓN EN FASE ORGÁNICA

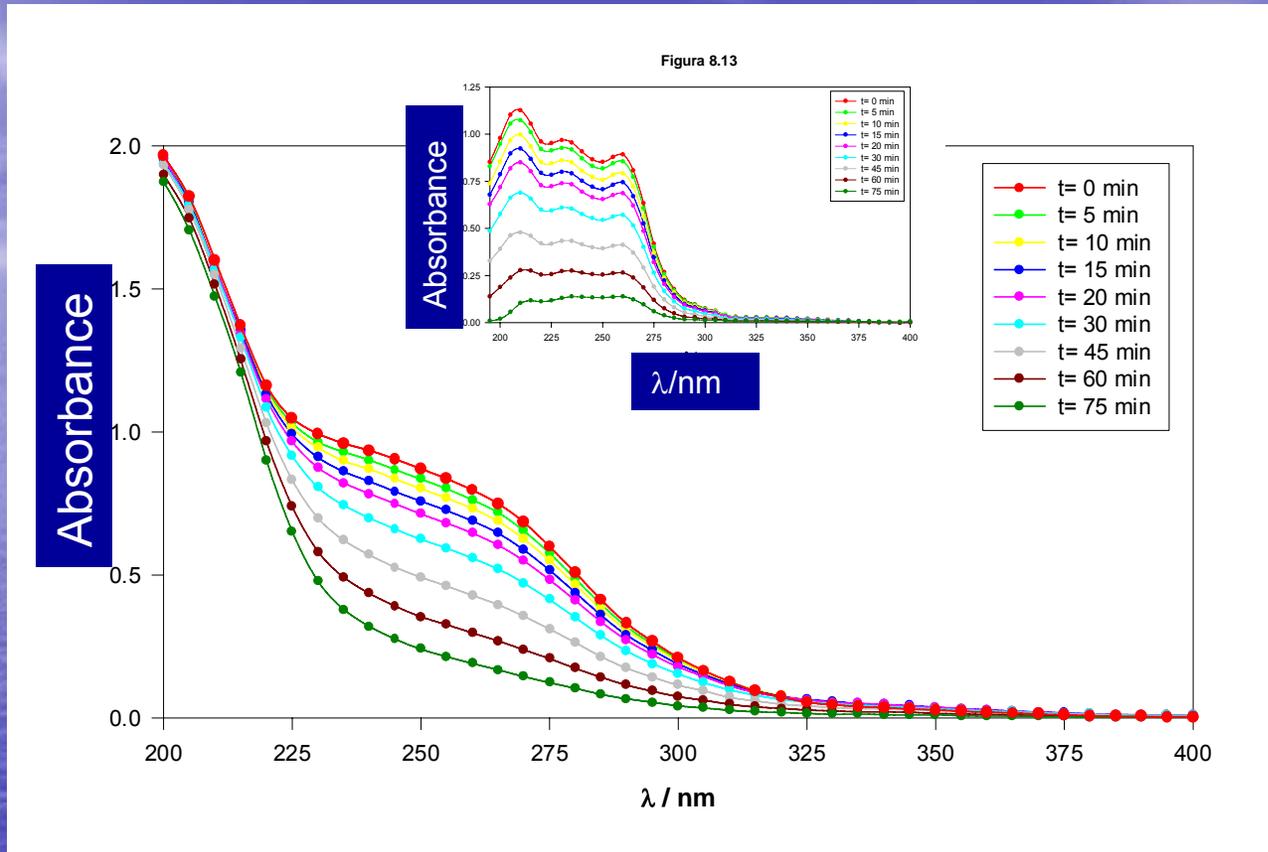


$$A(\lambda) = l \cdot c \cdot \epsilon(\lambda)$$



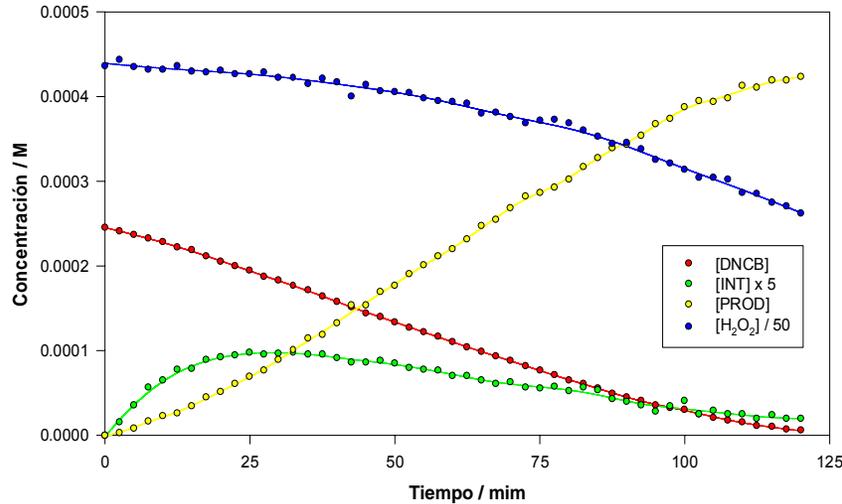
Espectros de soluciones de PNP (a) y NBE (b) en fases acuosa y orgánica. Se observa un comportamiento lineal entre la absorbancia experimental y el coeficiente de extinción ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$)

Figura 2



Espectro experimental como función del tiempo de irradiación empleando la técnica UV/H₂O₂ technique **(b)**: Comportamiento de la sustancia extraída en la fase orgánica como función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas. Condiciones: Soluciones: 60 mg/l de DNCB; 0,034 M de H₂O₂ y pH 2.50.

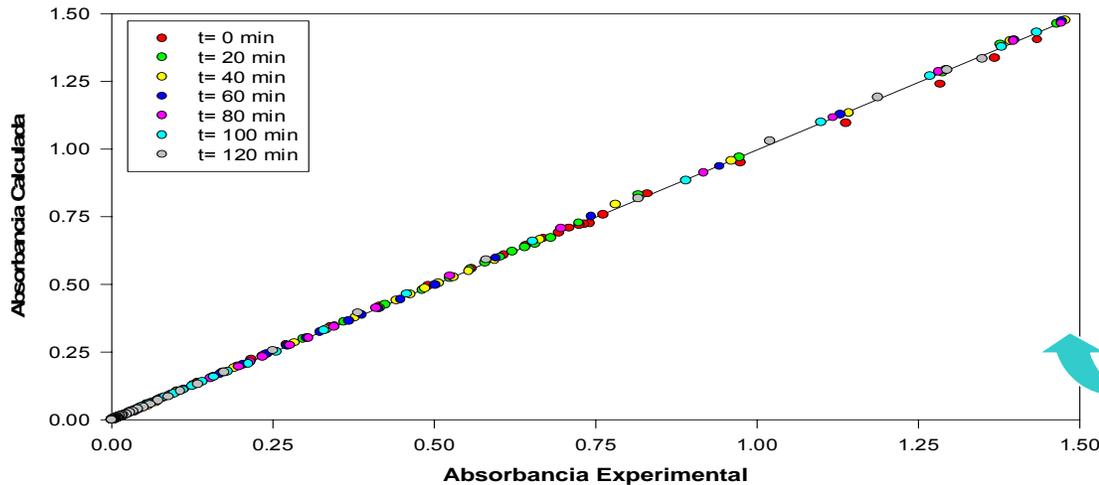
Figura 8.25



(a) Perfil cinético de las concentraciones calculadas según el modelo de cuatro especies para DNCB.



Figura 8.26



(b) Comportamiento de las absorbancias calculadas a partir del modelo cinético de cuatro especies y la experimental



CONCENTRACIÓN "ÓPTIMA" DE H₂O₂ PARA DNBE ([DNBE]₀ =)

H ₂ O ₂ / M	Method I -dC/dt (M/min)	Method II -dC/dt (M/min)	Method III -dC/dt (M/min)
5.7x10 ⁻³	6.07x10 ⁻⁶	6.60x10 ⁻⁶	6.77x10 ⁻⁶
4.6x10 ⁻²	1.45x10 ⁻⁵	1.62x10 ⁻⁵	1.52x10 ⁻⁵
5.9x10 ⁻²	1.65x10 ⁻⁵	1.76x10 ⁻⁵	1.69x10 ⁻⁵
6.9x10 ⁻²	1.49x10 ⁻⁵	1.63x10 ⁻⁵	1.60x10 ⁻⁵
1.2x10 ⁻¹	1.38x10 ⁻⁵	1.56x10 ⁻⁵	1.44x10 ⁻⁵
2.3x10 ⁻¹	1.13x10 ⁻⁵	1.23x10 ⁻⁵	1.26x10 ⁻⁵



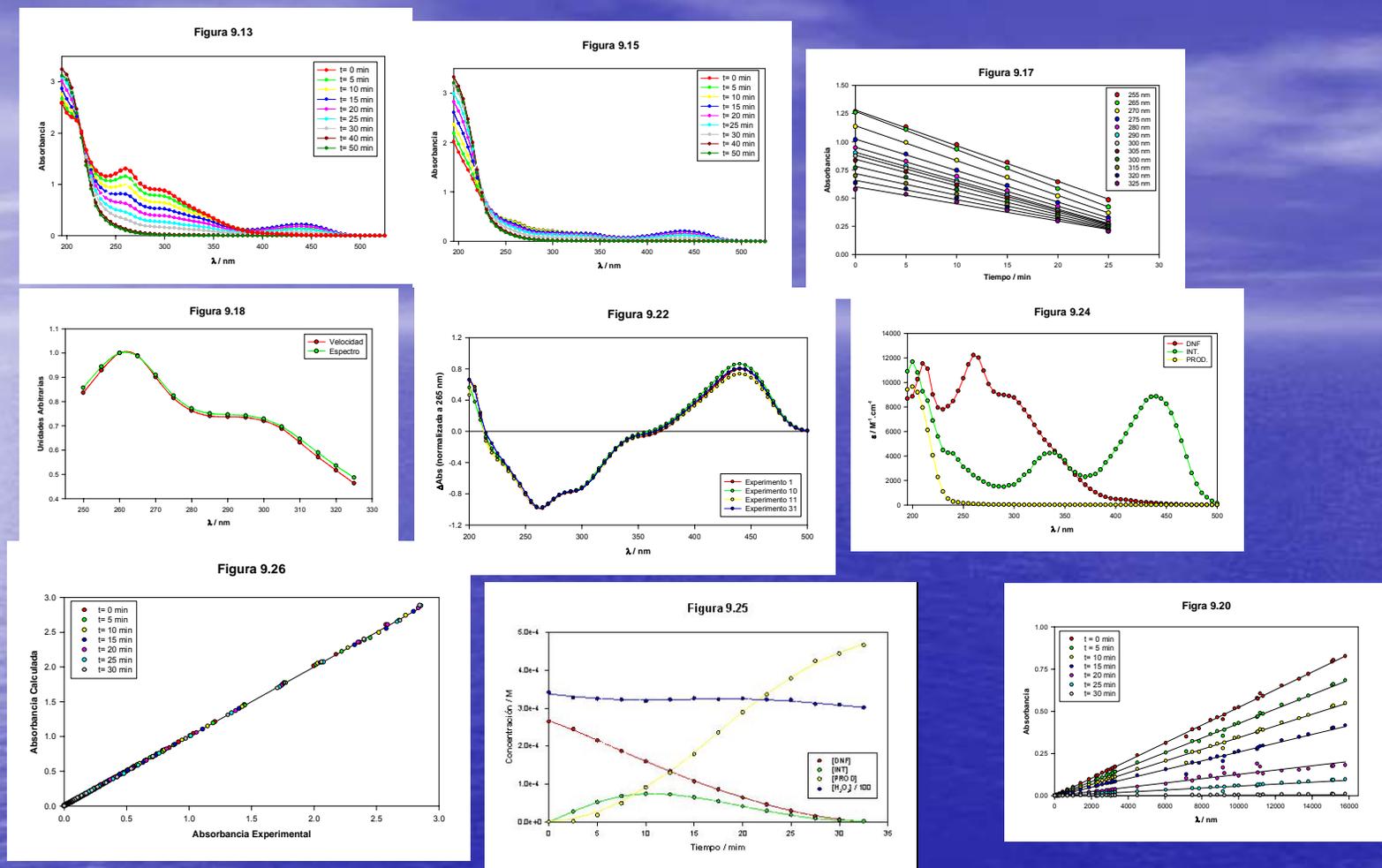


Figura 8: (a) Espectros de soluciones de DNP (90 ppm), 0,054 M en H_2O_2 y pH 2,5 (b) Espectro tomado de las extracciones realizadas en fase orgánica (n-pentano) (c) Evolución temporal de la concentración de DNP a diferentes I (d) Velocidades iniciales superpuestas sobre el espectro experimental (e) Comportamiento de los espectros diferencia (f) Espectro teórico de los intermediarios (g) Absorbancias teóricas versus las experimentales (h) Comportamiento de los perfiles de concentración del sustrato, intermediarios y productos como función del tiempo de irradiación (i) absorbancia experimental de la fase orgánica como función ϵ_{DNP} . Este comportamiento indica que los intermediarios y productos son de naturaleza iónica o polar y en consecuencia no pueden ser extraídos a la fase orgánica.

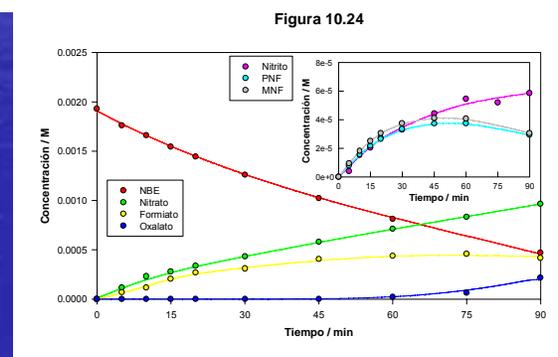
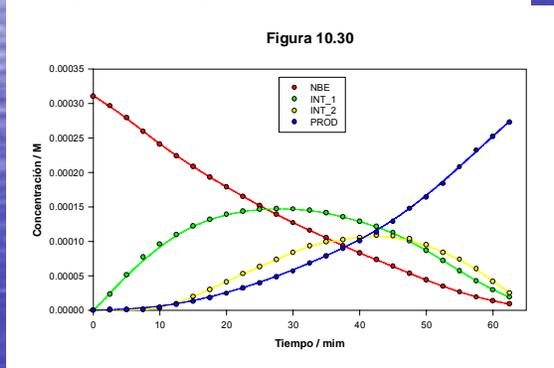
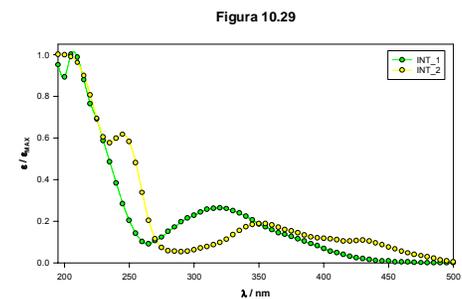
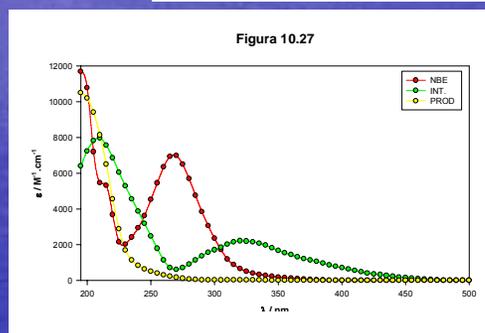
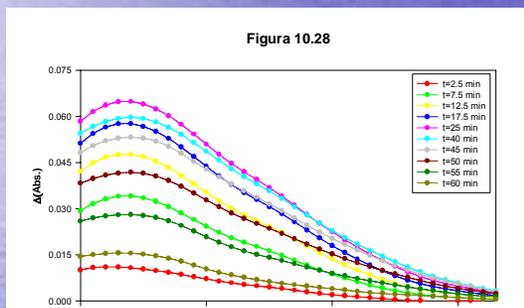
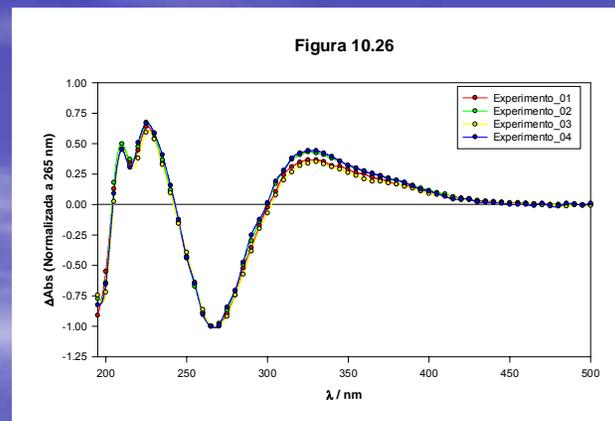
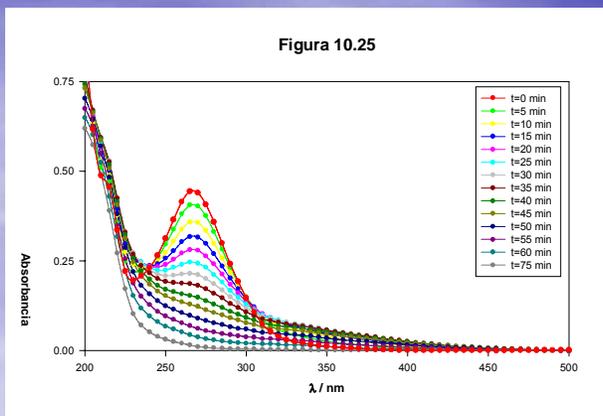


Figure 13: (a) Recorded spectra in solutions after different irradiation times (b) Recorded difference spectra (c) residual spectra of the intermediates at $\lambda > 300$ nm (d) spectra of the intermediate using a system of 5 species (e) calculated spectra of the intermediates (f) estimated kinetic profiles (g) experimental kinetic profiles with the identified species. Experimental conditions for this set of experiments 32 mg/l of NBE; $5.5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ of H₂O₂ and pH 2.50, adjusted with H₂SO₄.

Figura 10.20

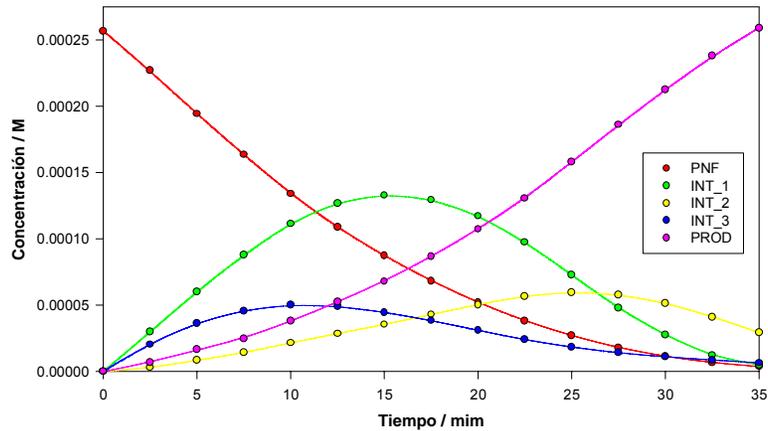
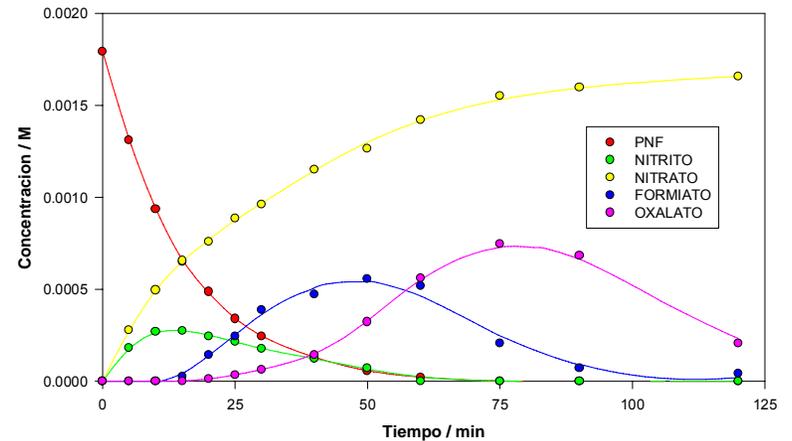


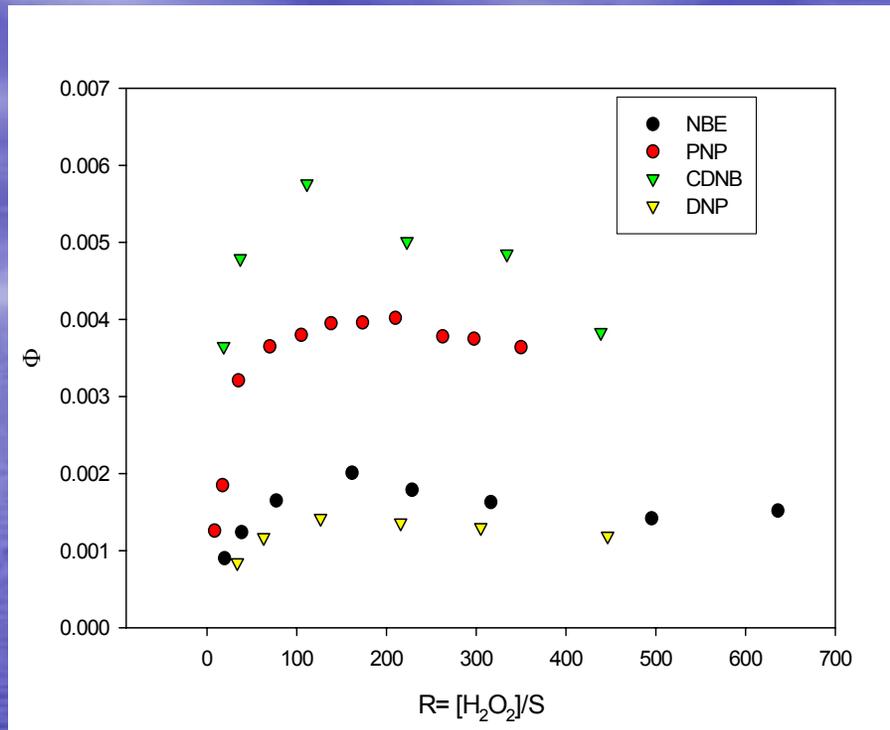
Figura 10.14



PNP

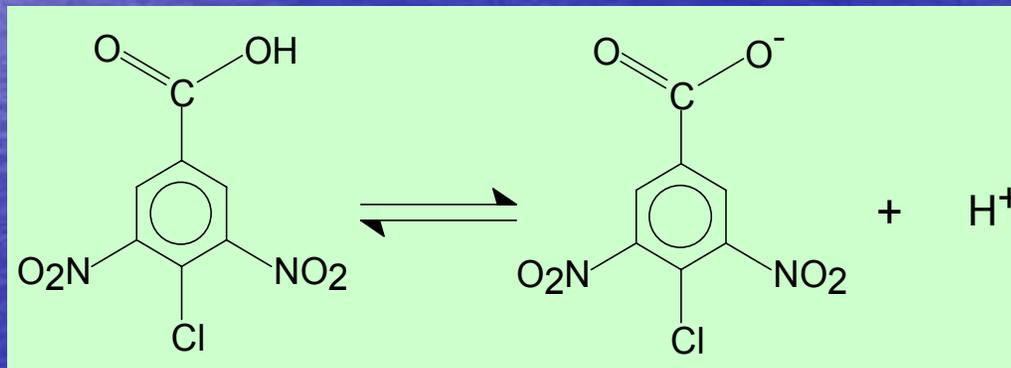
PERFILES DE CONCENTRACIÓN CALCULADOS POR MÉTODOS NUMÉRICOS Y EVALUADOS EXPERIMENTALMENTE.

EL ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS MUESTRA LAS TENDENCIAS Y PERMITE ESTIMAR LA EFICIENCIA DEL PROCESO DE MANERA SIMPLE.



COMPORTAMIENTO DE LA VELOCIDAD INICIAL DE
 DEGRADACIÓN DEL PROCESO ESTIMADO A
 PARTIR DEL COMPORTAMIENTO DE LAS
 ABSORBANCIAS.

ENSAYOS DE TOXICIDAD



CARACTERÍSTICAS DEL ORGANISMO ELEGIDO

- Los ensayos se realizaron sobre *Tetrahymena pyriformis* GL (Universidad Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand, Francia),
- Se trata de un protozoo ciliado, cosmopolita, presente en casi todo tipo de cursos de agua dulce y capaz de adaptarse a una amplia gama de ambientes,
- “In vitro” se adapta muy bien a cultivos axénicos (sin presencia de otros organismos) con medios de cultivo en base a 2% en proteosa peptona y extracto de levadura con adición de sales, glucosa,
- Su tamaño medio es de 60 μ , y su tiempo generacional (el que media entre dos divisiones sucesivas de la célula) en condiciones óptimas de cultivo, (28° C, medio de cultivo 2% proteosa peptona, extracto de levadura y sales inorgánicas), ronda las 3 horas,
- *Tetrahymena pyriformis* GL no posee micronúcleo, por lo que no posee reproducción sexual, basándose esta en la división transversa de la célula, característica propia de los ciliados,
- Su núcleo posee membrana nuclear al igual que los organismos superiores –eucariota-, su biología y sus respuestas a distintos medios son bien conocidas, su manejo en el laboratorio es relativamente simple, y tiene un corto tiempo generacional,
- Además ha sido empleado desde hace más de 40 años en la evaluación de efectos carcinogénicos, en la acción de insecticidas, funguicidas, micotoxinas, productos químicos, metales pesados, y drogas farmacéuticas.

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

- Se trabajó con [CDNBA]₀ entre 25.3 y 1014 µM.
- Se realizaron experimentos con control de pH y ajustando el mismo a pH 6.0 en NaOH,
 - ✓ En ambos protocolos, 1.3 mL de soluciones de CDNBA se inocularon a 0.2 mL of *Tetrahymena pyriformis* precultivada (48 h).
 - ✓ Concentración inicial del de la *Tetrahymena* fue $2,4 \times 10^6$ células/mL.
- La movilidad de los organismos se observó bajo lupa estereoscópica (10-50X) a los 1, 30, 60 minutos, 24 y 48 horas.
- Los organismos inmóviles fueron trasladados a una cubeta con agua destilada y fueron observados a los 10 minutos y a las 24 horas.
 - ✓ Los mismos se consideran muertos ante la persistencia de su inmovilidad (normalmente 24 h). En consecuencia, para considerar mortalidad de una determinada dilución, todos los organismos de las 5 cubetas debían estar inmóviles.
- Los experimentos en blanco se realizaron con agua.

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO

- Para los ensayos de inhibición de crecimiento, se utilizó el protocolo de Y. Yoshioka (1985). Se trabajó con tubos bacteriológicos de 15 ml. conteniendo 8 ml de medio PPYS 0.2% previamente autoclavados a los cuales se le adicionaron 0.2 ml de un cultivo de *Tetrahymena* en medio PPYS 0.2% en su fase de crecimiento exponencial (entre 24 y 48 horas), y 1.8 ml de solución del sustrato,
- La concentración de CDNBA se varió entre 18,3 y 292,7 μM . Los tubos fueron incubados durante 24 h en posición vertical a 28° C,
- Los organismos se fijaron con una solución de ácido pícrico saturada. Luego se contaron bajo un microscopio óptico a 100X en una cámara de recuento de Fuchs-Rosenthal contándose 3 alícuotas por tubo, y calculándose la media de los tres tubos para cada concentración. El número de organismos iniciales se calculó del cultivo del cual se obtuvieron las células para los ensayos,
- Los resultados se compararon empleando el análisis de varianza (ANOVA), entre los tratamientos y dentro de cada tratamiento. El mismo fue verificada empleando el test F_c . El valor de EC_{50} (concentración del CDNBA en que la inhibición del crecimiento poblacional es del 50% con respecto al testigo) fue obtenido utilizando el programa *Inhibition Concentration Approach* (ICp) Versión 2.0. Para ello se representó el $\log[\text{CDNBA}]$ empleando el Icp.

EFECTO DEL pH DE LAS SOLUCIONES DE CDNBA

Concentración (mol.L ⁻¹)	pH	10 minutos	30 minutos	60 minutos	24 horas	48 horas
1.014 x 10 ⁻³	3.5	+	+	+	+	+
5.07 x 10 ⁻⁴	3.7	+	+	+	+	+
1.014 x 10 ⁻⁴	4.3	√	√	+	+	+
5.06 x 10 ⁻⁵	4.9	√	√	√*	√**	√**
2.53 x 10 ⁻⁵	5.0	√	√	√*	√	√
TESTIGO	5.9	√	√	√	√	√

√ *Ensayo de letalidad para el CDNBA. pH dado por el compuesto.* √ Organismos vivos; + Organismos muertos; √* Organismos con muy poca movilidad; √** Muy pocos organismos vivos.

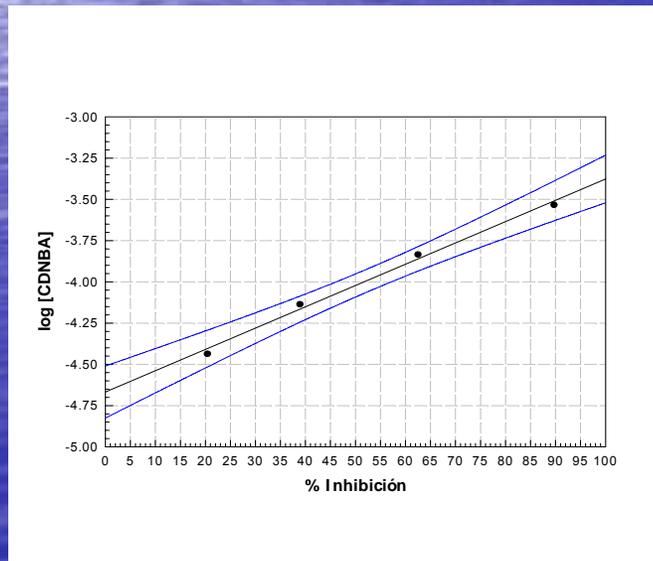
✓ Ensayos en agua destilada sin regulación del pH muestran que el 100% de los organismos muere luego de 60 minutos de exposición a una concentración de 1.10⁻⁴ mol.L⁻¹. A mayores concentraciones la mortalidad fue instantánea.

✓ Bajo control del pH, ([CDNBA] entre 9.9x10⁻⁴ mol.L⁻¹ y 4.94 x 10⁻⁵ mol.L⁻¹ los organismos sufren un shock y disminuye su movilidad durante las primeras 24 horas. Pasadas las 48 horas estos se recobran y adquieren la misma movilidad que la observada en el blanco

INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO

- ***Muestras no irradiadas***

- La EC50, definida como la concentración del CDNBA en que la inhibición del crecimiento poblacional es del 50% con respecto al testigo, fue de $1.04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.
- Para el cálculo se utilizó el método Icp. El pH de los cultivos estuvo comprendido entre 6.5 y 6.6 unidades de pH debido a la capacidad buffer del medio PPYS.
- En la Figura 1 se muestra el logaritmo de la concentración del reactivo versus el porcentaje de inhibición del crecimiento poblacional de las células.



- $\log [\text{DNCBA}] = -4.668 + 0.0129 (\% I)$
 - I: Inhibición del crecimiento.
 - $r^2 = 0.9930$

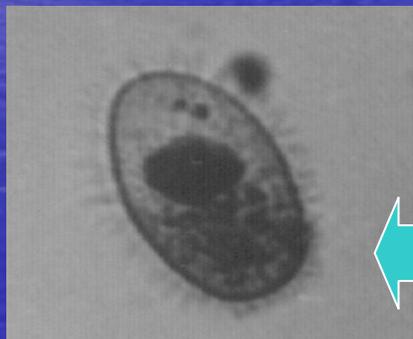
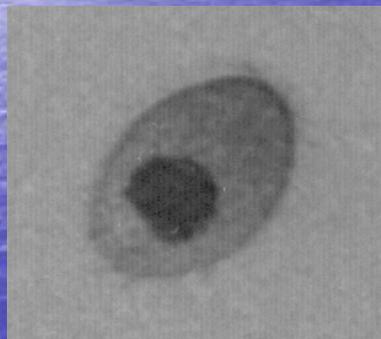
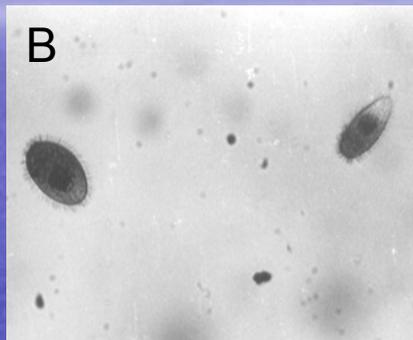
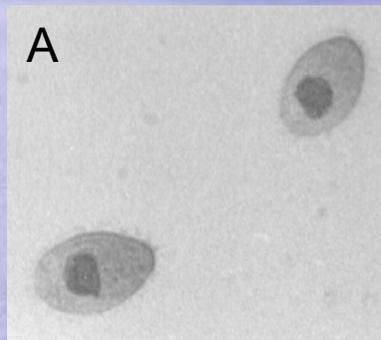
RESULTADOS EXPERIMENTALES*

[CDNBA]/ μ M	cell growth < cell/mL >	% inhibition
0	57390	0
36.6	45694	20.4
73.2	35069	38.9
146.3	21493	62.5
292.7	5902	89.7

*J. López, F. García Einschlag, L. Villata and A.L. Capparelli, Environmental Toxicology and Chemistry . **23** (2004) 1129-1135

CAMBIOS MORFOLÓGICOS SOBRE EL PROTOZOO

- En las Fotos A y B se observa el aspecto de las células de una población expuesta durante 96 horas a una concentración subletal del compuesto en estudio y una población testigo respectivamente. Se observa en las células sometidas al tóxico una zona de material más denso ubicada entre la zona oral y el núcleo. Esta zona no se observa en el blanco.



Células expuestas durante 96 horas al Blanco (A) y, al CDNBA (B).

Ambas fotos en campo claro 160X, [CDNBA]= 2.19×10^{-4} mol.L⁻¹, pH= 5.9

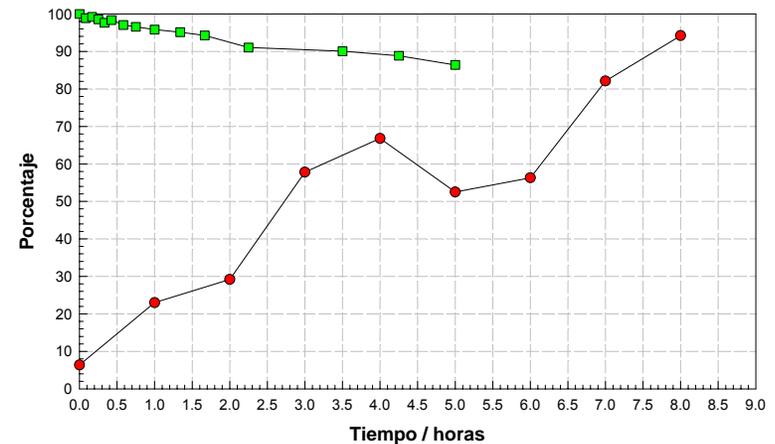
Las zonas de material granular más denso se observan en células expuestas a estrés (Por ejemplo: metales pesados, drogas, pH inadecuado, cambios de temperatura, etc.).

Estos gránulos se asemejan a los que se acumulan en las células de organismos superiores como respuesta a una exposición a metales pesados. Se conoce que estos gránulos están comprometidos en el secuestro de los tóxicos. La naturaleza de la matriz es aún discutida.

RESULTADOS EXPERIMENTALES SOBRE MUESTRAS IRRADIADAS

- Los ensayos de inhibición con los productos generados durante la fotólisis UV muestran un incremento en la toxicidad de las soluciones con el tiempo de irradiación.
- Los productos generados durante la irradiación afectan de manera importante el crecimiento de las células.

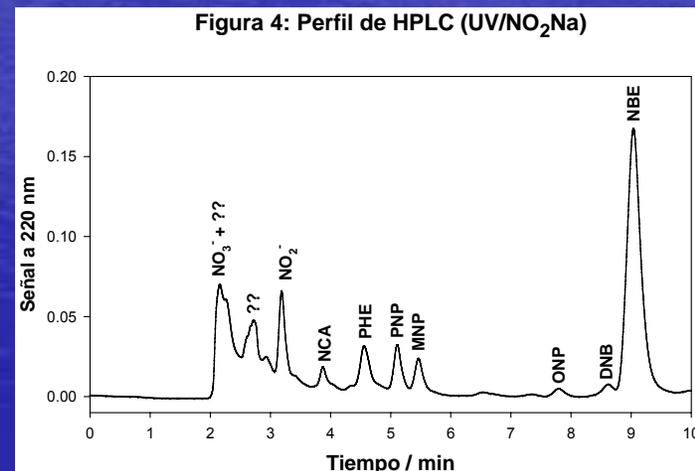
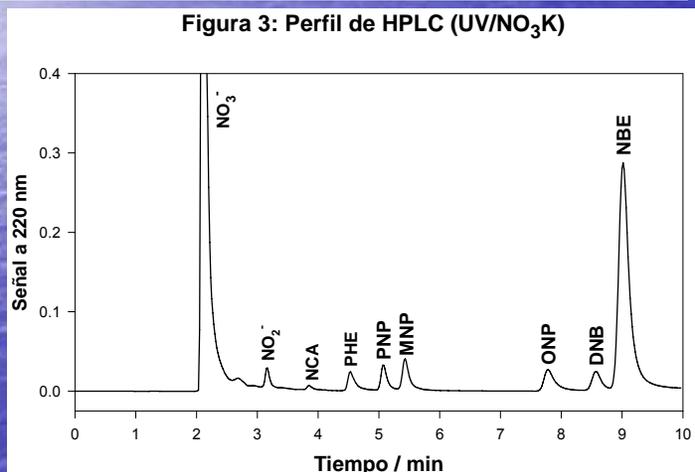
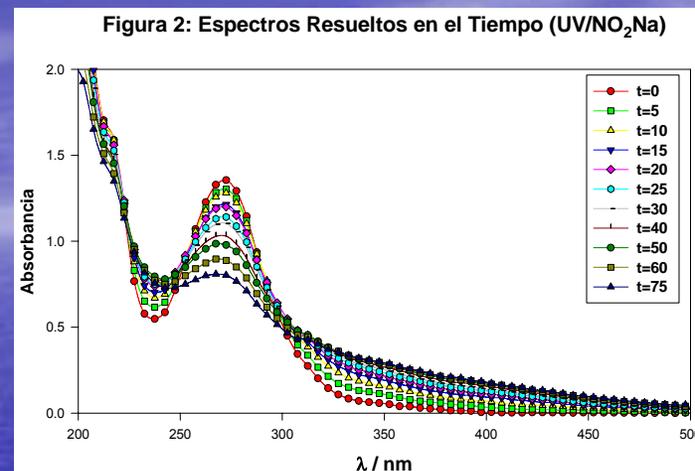
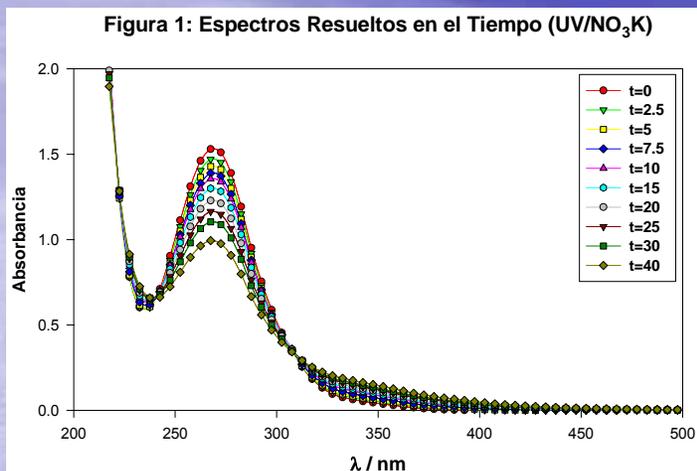
Tiempo de fotólisis	%Inhibición
0	64
1	23
2	29.2
3	57.8
4	66.8
5	52.5
6	56.3
7	82.1
8	94.2



Porcentaje de inhibición de crecimiento versus el tiempo de irradiación (t/hs) de soluciones de CDNBA ($3.65 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).

- FOTODEGRADACIÓN EN PRESENCIA DE NITRATO Y EN PRESENCIA DE NITRITO

RESULTADOS UV/ NO_3^- vs UV/ NO_2^- .



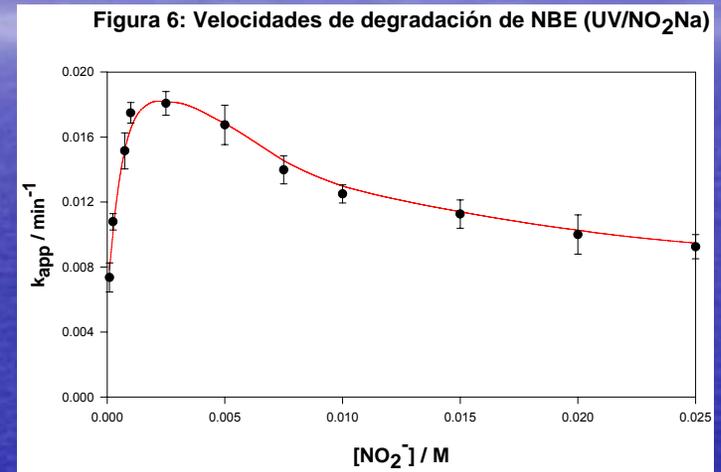
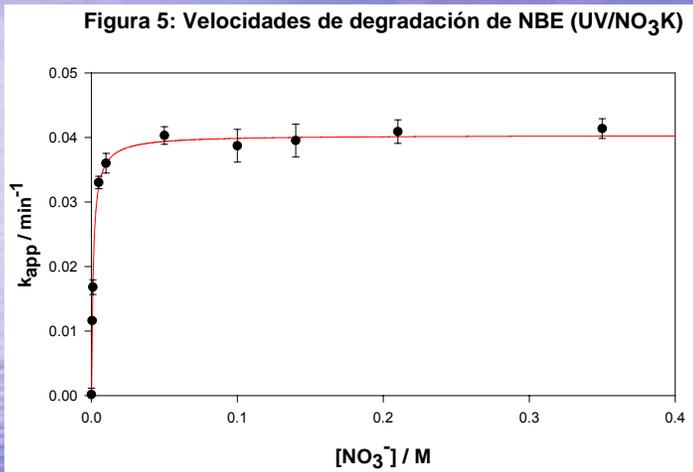
Condiciones experimentales

Aniones: NO_2^- , entre 1×10^{-4} y 2.5×10^{-2} M, - NO_3^- entre 5×10^{-4} y 0.5 M.

Orgánicos: PNP entre 1×10^{-4} y 1×10^{-3} M, NBE como sustrato su concentración fue 1.0×10^{-3} M.

RESULTADOS UV/NO₃⁻ vs UV/NO₂⁻.

● Velocidades de degradación



Velocidad de degradación del NBE (UV/H₂O₂)

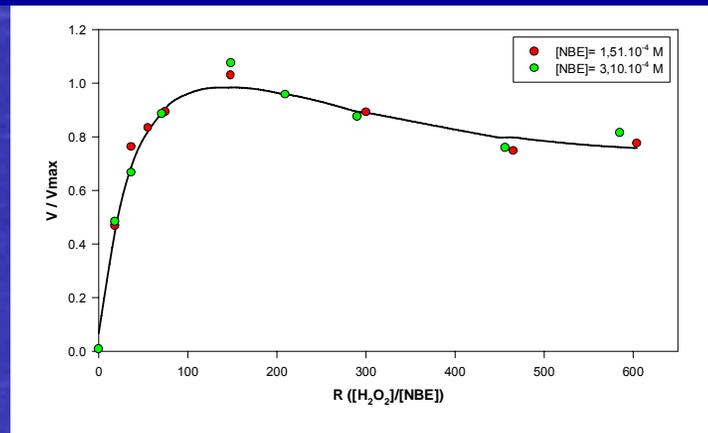
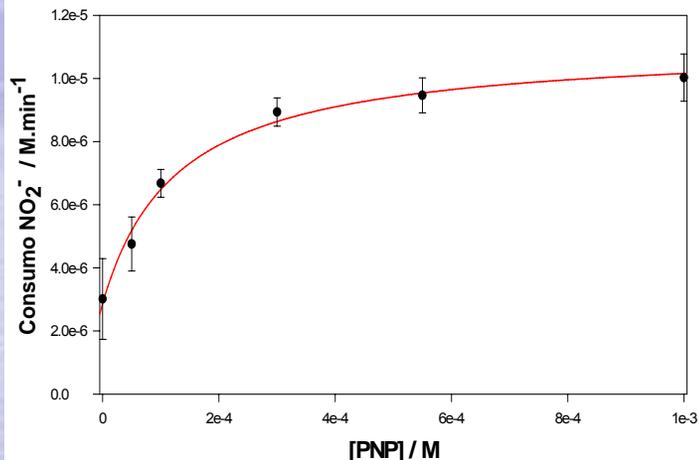


Figura 7: Velocidad de Consumo de NO_2^- vs. [PNP]



Mecanismo simplificado': UV/ H_2O_2



Mecanismo Simplificado para estos sistemas:

- 1) $\text{NO}_3^- + h\nu + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^\bullet + \text{HO}^\bullet$
- 2) $\text{NO}_2^- + h\nu + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}^\bullet + \text{HO}^\bullet$
- 3) $\text{NO}_2^- + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{NO}_2^\bullet + \text{HO}^-$
- 4) $2\text{NO}_2^\bullet + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$
- 5) $\text{NO}_2^\bullet + \text{NO}^\bullet + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+$
- 6) $\text{S} + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{Productos de Oxidación}$
- 7) $\text{S} + \text{NO}^\bullet / \text{NO}_2^\bullet \rightarrow \text{Nitroso / Nitro Derivados}$

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

- Las fotólisis UV/NO₃⁻ y UV/NO₂⁻ en presencia de material orgánica son procesos muy complejos.
- El mecanismo simplificado propuesto resume solamente las reacciones directamente involucradas con los radicales hidroxilo y la conversión de sustrato.
- A bajas concentraciones, la velocidad de degradación debiera estar asociado con el aumento en la producción de radicales HO[•] (Reacciones 1 y 2).
- A altas concentraciones de iones NO₃⁻ se alcanza una velocidad de degradación prácticamente constante, mientras que en presencia de iones NO₂⁻ la velocidad de consumo de sustrato pasa por un máximo y decae a concentraciones mayores. Este fenómeno puede explicarse considerando el secuestro de radicales HO[•] por parte de los iones NO₂⁻ (Reacción 3).
- Finalmente el comportamiento observado en la Figura 7 podría estar relacionado con el consumo de radicales nitrogenados por parte del sustrato orgánico (Reacción 7) y, como consecuencia de ello, *la inhibición de las reacciones de regeneración de iones NO₂⁻* (Reacciones 4 y 5).

FENTON TÉRMICO

FENTON

- REACCIONES SIGNIFICATIVAS ASOCIADAS AL FENTON TÉRMICO



- En estas reacciones, Fe(II) e Fe(III) representan a todas las especies presentes en la solución en sus respectivos estados de oxidación.

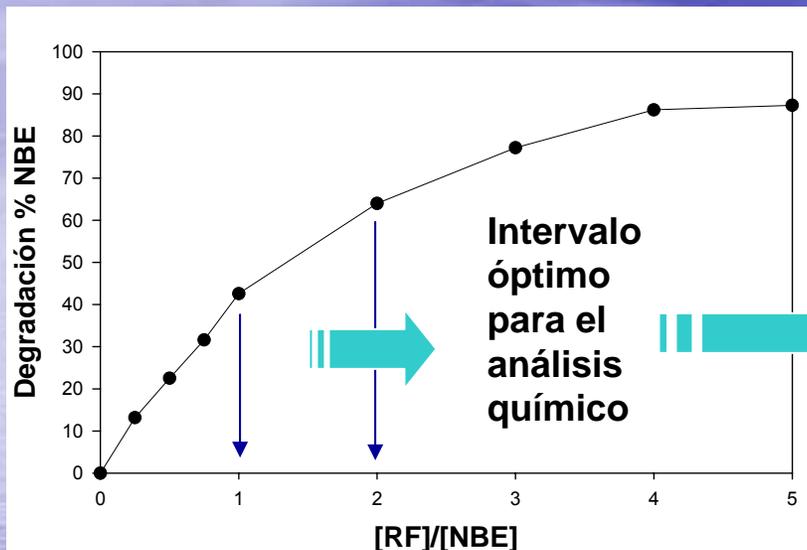
ESTUDIO DE LA REACCIÓN FENTON TÉRMICA - DEGRADACIÓN DE NITROBENCENO

Condiciones experimentales:

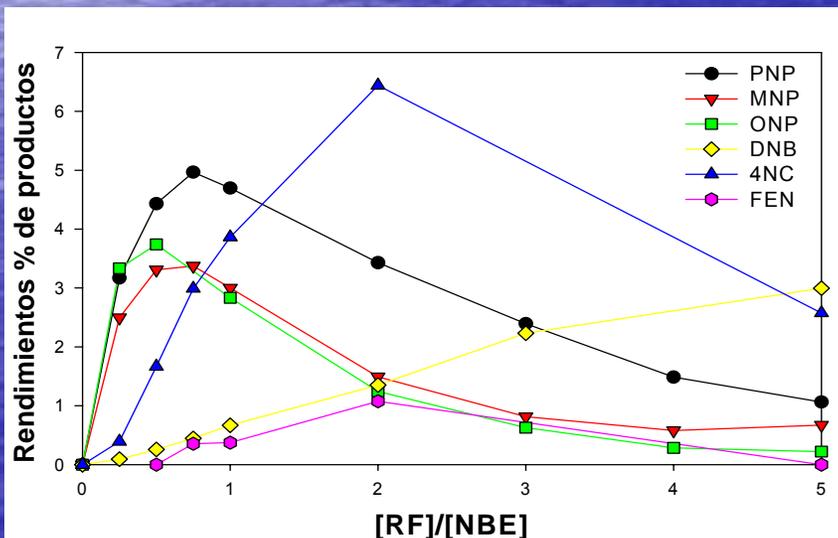
- Los experimentos se realizaron en la oscuridad, a pH 3.0 y temperatura ambiente.
- Las relación de concentraciones $\text{Fe}^{+2} / \text{H}_2\text{O}_2$ en todos los experimentos fue igual a 1.
- La concentración del reactivo de Fenton se varió entre 2.5×10^{-4} y 5×10^{-3} M, mientras que $[\text{NBE}]_0$ se mantuvo en un valor constante de 1×10^{-3} M.
- A los 30 min. de reacción se analizaron los productos empleando las técnicas HPLC/UV, CG/MS, LC/MS e IC(*).

(*) En el marco de la cooperación con el Prof. Dr. E. Pramauro de la Universidad de Turín, Italia

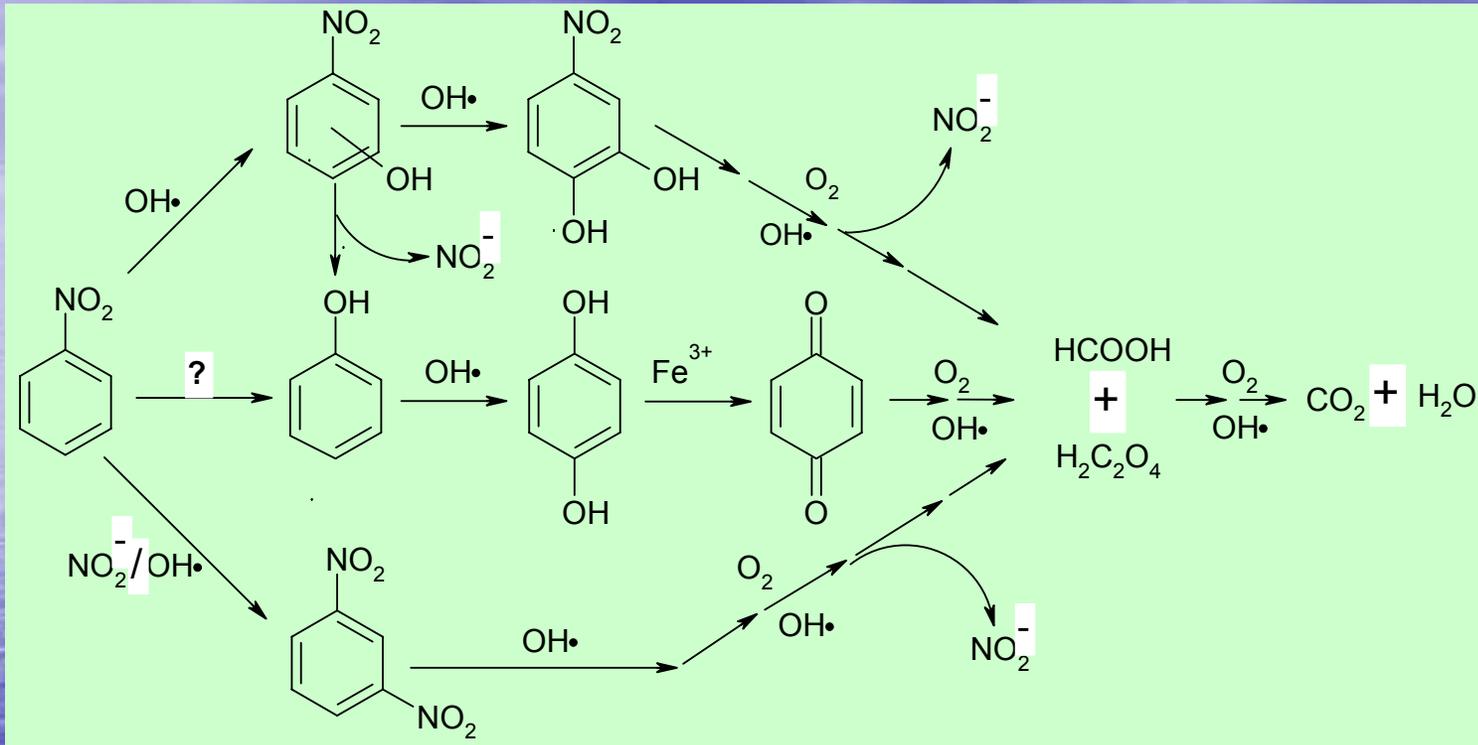
RESULTADOS EXPERIMENTALES



Productos	Técnicas
2-Nitrofenol (ONP)	HPLC-UV, LC-MS, CG-MS
3-Nitrofenol (MNP)	HPLC-UV, LC-MS, CG-MS
4-Nitrofenol (PNP)	HPLC-UV, LC-MS, CG-MS
Fenol (FEN)	HPLC-UV, CG-MS
Hidroquinona (HQ)	CG-MS
Benzoquinona (BQ)	HPLC-UV, CG-MS
4-Nitrocatecol (4NC)	HPLC-UV, LC-MS
1,3-dinitrobenzenceno (DNB)	HPLC-UV, LC-MS, CG-MS
Isómeros de nitrobifenilos	CG-MS
3,5-dinitrofenol e isómero del mismo	LC-MS
NO_2^-	IC, HPLC-UV
NO_3^-	IC
Ac. Oxálico ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$)	IC
Ac. Fórmico (HCOOH)	IC



Comportamiento experimental



$k/\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

$$k_1 = 60$$

$$k_2 = 2.5 \times 10^8$$

$$k_3 = 3.0 \times 10^7$$

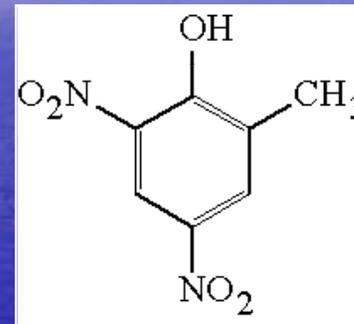
$$k_4 = 1.0 \times 10^4$$

$$k_5 = 5.0 \times 10^9$$

$$k_6 = 2.0 \times 10^6$$

DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA Y FOTOCATALÍTICA DEL 4,6-DINITRO ORTOCRESOL

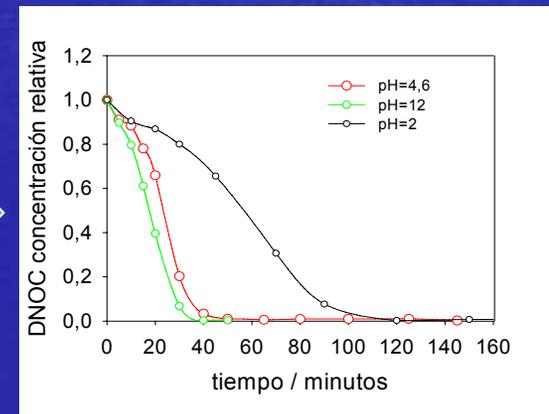
- Los dinitro ortocresoles pertenecen a una familia de sustancias utilizadas en la agricultura como plaguicidas. Presentan diversos usos: herbicidas (matamalezas y defoliantes), acaricidas, nematocidas, ovcidas y fungicidas. Dado que estas sustancias cuentan con una elevada capacidad biocida son extremadamente tóxicos.



pKa = 4,31

INFLUENCIA DEL pH

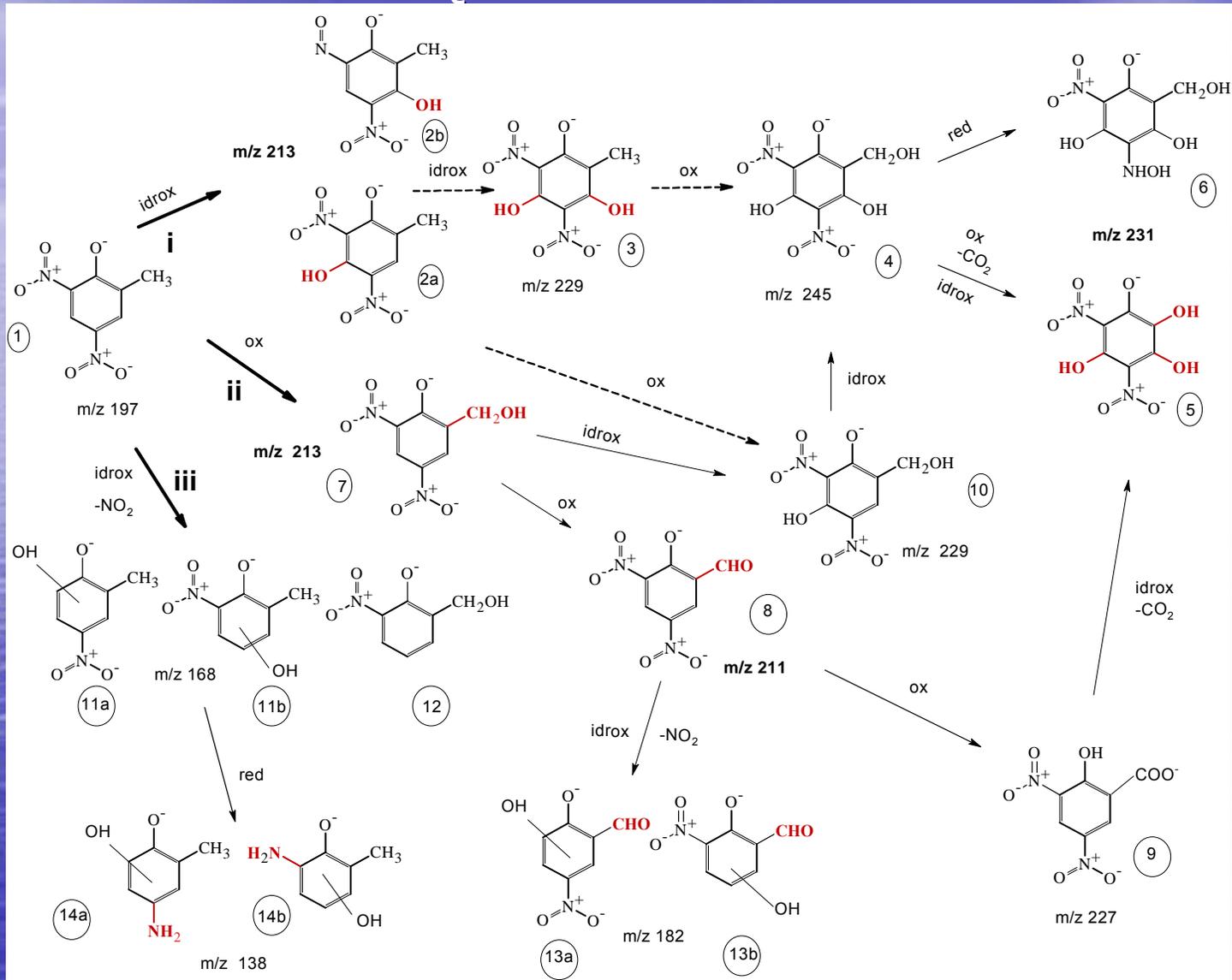
En la degradación fotoquímica se trabajó en condiciones por debajo y por encima del pKa y a pH aproximadamente igual a este valor. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la degradación es más eficiente cuanto mayor es el pH de la muestra, y por lo tanto mayor la proporción de la forma disociada.



Fotocatálisis del 4,6-dinitro-o-cresol

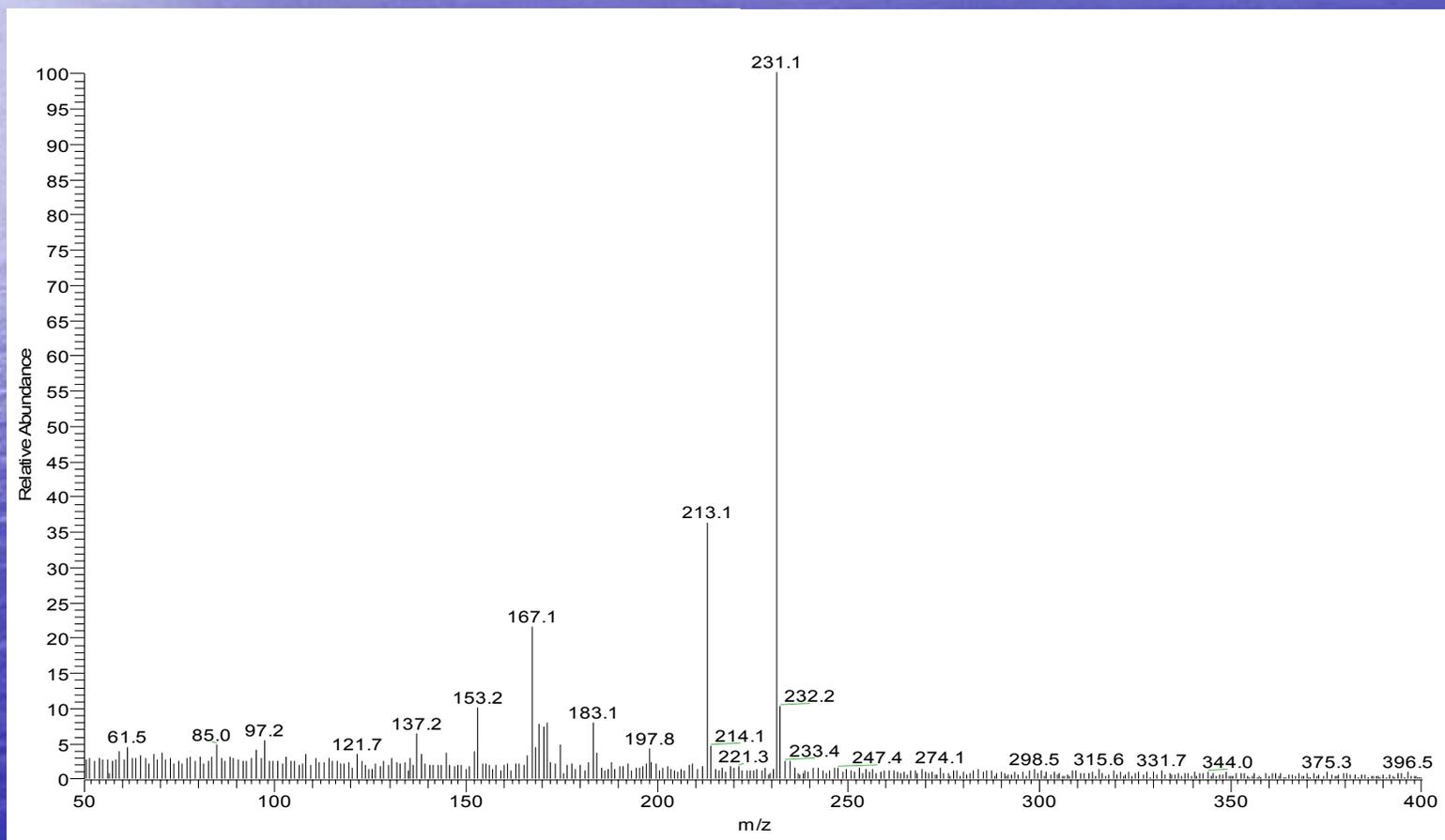
- **La transformación fotocatalítica del pesticida DNOC (4,6-dinitro-o-cresol) en presencia de suspensiones de TiO_2 fue estudiada en soluciones acuosas aireadas.**
- **La degradación rápida y completa del sustrato se alcanzó bajo irradiación con luz solar simulada (50-90 minutos),**
- **La mineralización es lenta y se alcanza después de más de 180 minutos de irradiación. El proceso va acompañado de la formación de productos nitrogenados inorgánicos,**
- **La degradación fotocatalizada se realizó en celdas cilíndricas Pyrex (diámetro: 4 cm, altura: 2,5 cm), en Solarbox, sistema equipado con una lámpara de Xe de 1500 W y filtro de 340 nm (1.4×10^{-5} einstein min^{-1}). Tal sistema permite poder operar sobre cantidades reducidas de muestra y sobre más muestras simultáneamente. Condiciones: 0.1 mM en DNOC y 200 mg L^{-1} de TiO_2**
- **La velocidad de reacción es dependiente del pH inicial.**
- **Tanto el análisis de los productos finales de reacción como el de los intermediarios mediante HPLC-MS es consistente con un mecanismo de reacción basado en el ataque del sustrato por radicales HO^\bullet , dando lugar a la hidroxilación del anillo aromático y la oxidación del grupo CH_3 a velocidades comparables, siendo determinantes para los primeros estadios de la reacción.**
- **La reducción directa de los grupo nitro sobre la superficie del semiconductor para formar iones amonios, de la presencia de intermediarios en menor concentración pareciera ser un paso de reacción viable.**

ESQUEMA DE REACCIÓN



ANÁLISIS

Espectro de masas asignado a uno de los intermediarios de reacción (5)



AGRADECIMIENTOS

Dr. FERNANDO S. GARCIA EINSCHLAG
Dra. LAURA S. VILLATA
Lic. JORGE LUIS LOPEZ*
Lic. LUCIANO CARLOS
Lic. CARINA V. RIVES

Sr. JUAN M. TRISZCZ
Sr. JUAN M. FELICE
Srta. MARÍA D. PEREDA
Srta. YÉSSICA BRUNI

***INIFTA (Universidad de La Plata y
Dirección del Agua (Pcia de Bs. As.)***

Prof. Dr. ANDRÉ BRAUN
Dr. ESTHER OLIVEROS
y Colaboradores

***Engler-Bunte Institut
Universität Karlsruhe - Alemania***

Prof. Dr. EDMONDO PRAMAURO
Dra. ALESSANDRA BIANCO PREVOT
Dra. DEBORA FABBRI

***Dipartimento di Chimica Analitica
Università di Torino - Italia***

APOYOS

ANPCyT
CONICET
UNLP
SECyT-BMFB
Acuerdo UNLP-Universidad de Turín
FUNDACIÓN ANTORCHAS