

**DIPLOMA DE ESTUDIOS**  
**AVANZADOS**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA  
QUÍMICA**

**Universidad de Almería**

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INGENIERÍA DE**  
***BIOPROCESOS Y BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL***

**Profesor Responsable:**

**José Antonio Sánchez Pérez**

**Alumna:**

**Ana Zapata Sierra**

# **MEMORIA RESUMEN DEL PERÍODO**

## **DOCENTE**

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INGENIERÍA DE**  
**BIOPROCESOS Y BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**



**Departamento:** Ingeniería Química.

**Curso:** 2007 – 2008.

**Profesor Responsable:** José Antonio Sánchez Pérez.

**Alumna:** Ana Zapata Sierra.

Becaria FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación

(ref: BES-2007-17204). Beca asociada al proyecto nacional con

ref: CTQ2006-14743-C03-01.

### **ÍNDICE: PERÍODO DOCENTE**

<b>1. Daño celular en biorreactores .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Cinética del Crecimiento de Microorganismos .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Diseño y Análisis de Biorreactores .....</b>	<b>9</b>
<b>4. Evaluación Económica de Bioprocesos .....</b>	<b>11</b>
<b>5. Metodología y Técnicas del Trabajo de Investigación científico .....</b>	<b>14</b>
<b>6. Genética Aplicada a la Biotecnología .....</b>	<b>17</b>
<b>7. Fármacos y Bioproductos de origen marino.....</b>	<b>21</b>

## **1. DAÑO CELULAR EN BIORREACTORES**

**Programa:** Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología Industrial.

**Profesores:** Asterio Sánchez Mirón.

**Duración:** 30 horas.

**Evaluación:**

La evaluación se llevó a cabo teniendo en cuenta tanto la asistencia a clase como la realización de una exposición en clase sobre un artículo incluido en la bibliografía del temario.

**Guión de contenidos:**

1. Introducción
2. Definición de esfuerzo cortante
  - 2.1. Reactores con agitación neumática
  - 2.2. Reactores agitados mecánicamente
  - 2.3. Reactores agitados mecánica y neumáticamente
3. Mecanismos de daño
  - 3.1. Cultivos agitados mecánicamente
  - 3.2. Daño asociado a las burbujas
  - 3.3. Cultivos agitados mecánicamente
4. Alivio del estrés
  - 4.1. Uso de distintos diseños de reactor
  - 4.2. Inmovilización celular
  - 4.3. Agentes protectores
5. Ejemplos
  - 5.1. Respuesta celular en cultivos de microalgas
  - 5.2. Células animales
  - 5.3. Bacterias
  - 5.4. Hongos

## 5.5. Células de plantas

### **Resumen:**

El cultivo de microorganismos, plantas o células animales en reactores precisa de la agitación y aireación del líquido para asegurar la transferencia de oxígeno y nutrientes presentes en el medio, y para mantener a las células en una suspensión homogénea. La optimización de un sistema de cultivo (elevada velocidad de crecimiento o de producción de metabolitos) requiere el conocimiento y control de todas las variables que sobre él influyen. En este contexto la mezcla y la aireación son dos factores imprescindibles en la mayoría de los biorreactores. No obstante, la agitación lleva asociada la creación de un campo diferencial de velocidades del fluido que genera esfuerzos de corte, que además de afectar sobre la hidrodinámica del sistema, pueden causar daños en las células, disminuyendo así el rendimiento de los cultivos. Por ello el estudio de las causas que provocan daño celular así como de la respuesta celular ante este daño y las posibles soluciones se considera de gran interés.

En la primera parte se definió el concepto de *esfuerzo cortante*, y se proporcionaron herramientas matemáticas para la evaluación del esfuerzo cortante en diferentes tipos de biorreactores. Entre ellos se evaluaron los esfuerzos cortantes en reactores con agitación neumática (columnas de burbujeo), con agitación mecánica (tanque con agitadores que generan flujo radial) y con agitación combinada neumática y mecánica (para reducir la potencia de agitación necesaria).

Otro punto desarrollado fue la descripción de los mecanismos de daño sufridos por las células en presencia de aireación y/o agitación, analizados de nuevos en cultivos agitados mecánicamente, neumáticamente o mediante combinación de ambos. En este apartado se describen los procesos que pueden ocasionar el daño celular. Algunos de estos procesos son: choques entre partículas, choques entre células y partes sólidas, esfuerzo laminar en el fluido en contacto con partes sólidas, choque de las células con los remolinos turbulentos, explosión de burbujas, etc. En este contexto, se intentan definir modelos y correlaciones capaces de predecir el daño celular a partir del cálculo de la velocidad de muerte de los cultivos en relación a la concentración celular, al tipo de agitador y/o aireador y a la velocidad de agitación y/o aireación.

El siguiente paso fue el estudio de las posibles medidas para aliviar el estrés que sufren las células en cultivos agitados con el fin de minimizar el daño. Entre estas medidas podemos destacar:

- mejora del diseño del biorreactor (elección del tipo de agitador, uso de tabiques deflectores, etc).
- inmovilización de las células en soportes para ofrecer una mayor protección.
- adición de agentes protectores (aditivos químicos) capaces de modificar las características físicas del fluido o producir cambios fisiológicos en las células. Algunos ejemplos son: carboximetil celulosa, polivinil pirrolidona o colesterol.

Por último se describieron algunos ejemplos concretos de daño celular en biorreactores ya que la sensibilidad a los esfuerzos generados en la agitación depende de la naturaleza del microorganismo (presencia de pared celular o no, crecimiento individual o aglomerado) y de su tamaño. Se analizó así la respuesta celular de distintas especies ante el estrés generado por agitación y/o aireación a través de una revisión bibliográfica de casos concretos estudiados por diferentes autores (cultivos de microalgas, bacterias, hongos, células animales y vegetales).

## **2. CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS**

**Programa:** Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología Industrial.

**Profesores:** Antonio Contreras Gómez/ Francisco García Camacho.

**Duración:** 30 horas.

### **Evaluación:**

La evaluación se llevó a cabo en función tanto de la asistencia y participación en clase, como de la realización de un resumen de la segunda parte de la asignatura (Parte B).

### **Guión de contenidos:**

Parte A: Modelo mecanístico para la fotosíntesis en microalgas. Fotoinhibición: mecanismos de reparación y protección.

Parte B: Crecimiento homogéneo de microorganismos:

1. Estequiometría del crecimiento de microorganismos
2. Modelos para el crecimiento de microorganismos
3. Cultivo de poblaciones aisladas de microorganismos
4. Interacción entre especies. Cultivo de poblaciones mezcladas
5. Fermentación continua con recirculación de biomasa

### **Resumen:**

En la primera parte se analizó un modelo mecanístico que representa el comportamiento de ciertas microalgas que realizan el proceso de fotosíntesis. El interés del modelo desarrollado radica en que la capacidad de predecir la cinética de crecimiento de las microalgas permite un adecuado diseño del fotobiorreactor y por tanto una optimización del proceso.

La importancia de los cultivos de microalgas ha aumentado en las últimas décadas debido a que las algas se han adaptado al ambiente acuático desarrollando un mecanismo de concentración de CO<sub>2</sub> que aumenta su fijación y fotosíntesis. Dentro de éstas, el fitoplancton marino (microalgas), es uno de los principales sumideros de CO<sub>2</sub>. No obstante, los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico se han incrementado de 260 a 360 ppm durante el último siglo. Por esta razón, el cultivo de microalgas en biorreactores está

siendo investigado como medida propuesta para reducir la contaminación por CO<sub>2</sub> y sus efectos en el cambio climático.

Antes de profundizar en el modelo se introdujeron unas nociones básicas acerca del mecanismo de la fotosíntesis, incluyendo la descripción de tipos de fotosistemas, la chemiosmosis (mecanismo por el cual generan ATP los cloroplastos y la mitocondria), y las diferentes fases del ciclo de Calvin (formado por reacciones independientes de la luz).

El modelo está descrito en una publicación titulada “ *A Mechanistic Model of Photosynthesis in Microalgae*” (Fernando Camacho Rubio y cols., 2003), comentada y discutida en clase. El modelo plantea una cinética simplificada, que asume que la fotosíntesis en una microalga solamente puede ocurrir en una “unidad fotosintética (PSU)”. Durante la fotosíntesis un PSU no activado es activado por absorción de un fotón, y en etapas posteriores será lentamente desactivado mediante reacciones catalizadas por enzimas, suministrando energía para el mantenimiento y producción de biomasa. El modelo también considera los efectos descritos a continuación:

- la fotoinhibición como un proceso que engloba el daño por irradiancias elevadas en el fotosistema del PSU
- los mecanismos de reparación por parte de las células cuando baja el nivel de irradiancia
- los procesos fotoprotectivos

Por último se consideraron algunos casos específicos que interpretan este modelo. Tras la realización de diferentes ensayos se demostró que la iluminación continua de las células no es necesaria para hacerlas crecer a la máxima velocidad fotosintética correspondiente a esa intensidad de iluminación; lo que importa es la frecuencia de los ciclos luz-oscuridad.

En la segunda parte del curso se estudió de manera más general la cinética del crecimiento, describiendo diferentes tipos de modelos capaces de predecir el comportamiento cinético de los microorganismos. Inicialmente se definieron una serie de parámetros tales como el coeficiente de rendimiento, el requerimiento, el requerimiento de transmisión de calor, la velocidad de crecimiento, la velocidad específica de crecimiento, la velocidad de reproducción y la velocidad específica de reproducción. A continuación se analizaron los modelos cinéticos más comunes que



predicen la cinética de microorganismos. La curva del crecimiento microbiano en el tiempo se divide en cuatro fases: la fase *lag*, en la que se produce la adaptación del microorganismo, la fase *exponencial*, en la que la velocidad específica de crecimiento va aumentando hasta alcanzar su valor máximo, la fase *estacionaria*, en la que la velocidad específica de crecimiento permanece constante y la fase *muerte*, en la que se produce la muerte de los microorganismos.

En cuanto a los modelos cinéticos se clasifican en:

- *modelos no estructurados*: Consideran la velocidad específica de crecimiento como función de las condiciones del microorganismo (sólo variables externas a la célula). Entre estos modelos se encuentran el de Monod, Teissier, Moser, el modelo de inhibición por sustrato para Monod y el modelo de inhibición por producto para Monod
- *modelos estructurados*: Se trata de modelos más complejos en los que la velocidad específica se encuentra influenciada tanto por la fase abiótica como por la biótica
- *modelos segregados*: Consideran a la célula como un reactor, teniendo en cuenta la transferencia de los nutrientes a través de la membrana celular

También se estudiaron distintos tipos de reactores en modo continuo y discontinuo, así como sus ecuaciones cinéticas correspondientes capaces de calcular la concentración de biomasa, sustrato y producto generado por las células en función del tiempo. También se realizó una comparación entre estos dos reactores en función de la producción de biomasa.

Se analizaron además dos posibles modificaciones a escala industrial del reactor en continuo: el empleo de reactores en serie o la operación con reactores con recirculación (interna: spin-filter y reactores en columna; o externa: recirculación y purga).

Por último se abordó el estudio de biorreactores teniendo en cuenta las interacciones entre diferentes especies. Estas interacciones pueden ser indirectas (competición o comensalismo) o directas (prelación o parasitismo).

### **3. DISEÑO Y ANÁLISIS DE BIORREACTORES**

**Programa:** Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología Industrial-

**Profesores:** José Luis García Sánchez.

**Duración:** 30 horas.

**Evaluación:**

La evaluación se realizó atendiendo a criterios de asistencia a clase y participación, así como la satisfactoria simulación de un proceso conocido, mediante el software Super-Pro Designer.

**Guión de contenidos:**

1. Fundamentos teóricos del software Super-Pro Designer y ejemplos prácticos
2. Simulación de un ejemplo práctico mediante Super-Pro Designer

**Resumen:**

En primer lugar se proporcionaron las bases teóricas necesarias para el manejo del software Super-Pro Designer; programa computacional capaz de realizar simulaciones de procesos complejos. Se trata de una potente herramienta ingenieril que permite el modelado, evaluación y optimización de procesos integrados relacionados con la industria farmacéutica, biotecnológica, química, alimentaria, de tratamiento de aguas, etc. Además incluye la opción de realizar evaluaciones económicas y de impacto ambiental. Otra herramienta interesante es la combinación de los modelos de fabricación y medioambiente en el mismo paquete, ya que permite diseñar y evaluar los procesos de fabricación minimizando los residuos con objeto de prevenir y controlar la posible contaminación ambiental.

A continuación se realizaron algunos ejemplos sencillos con el software a partir de tutoriales. Los pasos generales a seguir a la hora de simular un proceso con Super-Pro Designer son:

- especificación del modo de operación: continuo o batch
- definición de los componentes que intervienen
- construcción del diagrama de flujo incluyendo las unidades de proceso que intervienen y las conexiones entre ellas

- definición de las operaciones incluidas en cada unidad de proceso suministrando los datos necesarios para el cálculo. En las operaciones que incluyen reacciones químicas será necesario añadir las ecuaciones correspondientes y seleccionar el paquete termodinámico adecuado
- ejecución de la simulación del proceso

Para finalizar el curso y como parte de la evaluación del mismo, se realizó la simulación del proceso de obtención del *'activador del tejido plasminógeno'*, tPA (en inglés *'tissue plasminogen activator'*), sustancia de alto valor añadido para uso médico.

Se plantearon las condiciones iniciales del proceso y todas las etapas necesarias desde el cultivo de las células bacterianas modificadas genéticamente capaces de producir tPA hasta la obtención del producto final purificado.

El proceso completo de fabricación es bastante complejo e incluye numerosos procesos unitarios consecutivos como biorreactores en serie, varias etapas de micro filtración, centrifugación, varias separaciones cromatográficas, esterilización y liofilización del producto final.

El objetivo del ejercicio es adquirir la capacidad para resolver un caso práctico complejo utilizando el software descrito. Este ejemplo debe requerir el empleo de varias operaciones unitarias combinadas, la definición de las corrientes y los procesos físicos o químicos empleados, y la resolución del proceso integrado.

#### **4. EVALUACIÓN ECONÓMICA DE BIOPROCESOS**

**Programa:** Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología Industrial.

**Profesores:** Francisco Gabriel Acién Fernández/ José María Fernández Sevilla.

**Duración:** 30 horas.

**Evaluación:**

La evaluación se llevó a cabo en base a la asistencia y participación en clase. También se realizó un ejercicio práctico consistente en la evaluación económica de un bioproceso escogido por el alumno.

**Guión de contenidos:**

1. Factores económicos de los procesos
  - 1.1. Inversión
  - 1.2. Costos de producción
  - 1.3. Costos de inmovilizado
  - 1.4. Rentabilidad
2. Estimación de los costos de producción
  - 2.1. Costos directos de operación
  - 2.2. Costos fijos.
  - 2.3. Costos adicionales: previsiones, contingencias
3. Estimación de los costos de inmovilizado
  - 3.1. Elementos del capital inmovilizado
  - 3.2. Técnicas de estimación
  - 3.3. Coste específico de equipos
4. Ejemplo: Estimación económica de un proceso real de producción
  - 4.1. Diseño del proceso
  - 4.2. Estimación económica
5. Utilización del análisis de costos en la toma de decisiones
6. Estimación económica mediante simuladores (Super-Pro Designer)

## 7. Ejercicio práctico

### **Resumen:**

El objetivo del curso es por un lado dar una visión general de la importancia que un análisis económico supone a la hora de llevar a cabo cualquier proceso industrial, y por otro proporcionar las herramientas básicas que permitan al ingeniero realizar un análisis económico de manera aproximada pero fiable.

En el primer tema se definieron varios conceptos básicos necesarios para realizar cualquier análisis económico de un proceso. Entre ellos destacan los términos *capital e inversión*, y algunos parámetros económicos tales como el *capital (inmovilizado y circulante)*, los *costes (de fabricación, de administración y ventas)*, las *ventas*, el *mercado*, etc. Otras variables de interés que se mencionan son: la *amortización o depreciación*, los *impuestos sobre beneficios*, la *vida útil* del proceso y el *valor residual*.

A continuación se abordó el tema del análisis de inversiones así como los métodos de valoración y selección de las mismas, introduciendo conceptos como *rentabilidad neta porcentual*, *método del plazo de recuperación o Pay-Back*, *Criterio del Valor Capital (VC) o Valor Actualizado Neto (VAN)*, *Criterio de la Tasa de Retorno o Tipo de Rendimiento Interno (TIR)*. De la definición de estos métodos se deriva que el análisis económico de todo proceso industrial debe dar una respuesta a la rentabilidad de un proyecto nuevo o sobre la competitividad de una instalación en funcionamiento.

El segundo tema se centró en la estimación de los costos de producción, diferenciándose entre la estimación de los costos directos de fabricación (materias primas y suministros, mano de obra y supervisión y utilidades), la estimación de los costos generales de fabricación (amortización e interés, impuestos, seguros y alquileres), y la correspondiente a los gastos generales (normalmente estimados como 50-70% de la mano de obra, supervisión y mantenimiento).

Para terminar con la parte teórica del curso se analizaron los métodos aplicados a la estimación de los costos de inmovilizado. En primer lugar se definió el capital inmovilizado como el capital requerido para diseñar, construir, y poner en marcha una instalación industrial, y se divide en capital fijo y capital circulante. En cuanto a los tipos y técnicas empleadas para la estimación, se distinguen las siguientes:

- *estimación de orden de magnitud*: estimación del capital de una instalación nueva a partir del costo de una previa

- *estimaciones preliminares*: estimación del capital fijo a partir de una multiplicación de los costos de los materiales y equipos empleados por unos factores específicos
- *estimación de diseño final*: estimación detallada partiendo de una estimación preliminar que requiere conocimiento preciso y concreto de ubicación, distribución, equipamiento del proceso a analizar, así como los recursos necesarios para su ejecución real
- *nuevos métodos*: programas de ordenador para unificar las etapas del diseño; software de simulación de procesos en conjunción con software detallado de evaluación económica. Algunos ejemplos son: BioPro designer, Process evaluator, Aspen Plus, Rapad Access Cost Estimating Spread sheet System.

Finalmente, todo este conocimiento se puso en práctica de manera conjunta al realizar un ejemplo sobre la evaluación económica de un proceso real consistente en la producción de ácidos grasos poliinsaturados a partir de microalgas. En primer lugar se abordó el diseño del proceso y finalmente se llevaron a cabo una serie de estimaciones económicas.

Por último se explicó de forma práctica el manejo del software Super-Pro Designer empleado como simulador para estimación económica de bioprocesos, y se desarrolló un ejemplo.

## **5. METODOLOGÍA Y TÉCNICAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICO**

**Programa:** Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología Industrial.

**Profesores:** José Antonio Sánchez Pérez.

**Duración:** 30 horas.

**Evaluación:**

La evaluación se llevó a cabo según criterios de asistencia y participación en clase.

**Guión de contenidos:**

1. El conocimiento científico
2. Objetivos y fines de la ciencia
3. Investigación científica
4. Rasgos del método de investigación científico
5. Teleología del doctorado
6. Aptitudes y valores del investigador
7. Fases del proceso de investigación científica
8. Aspectos del proceso de investigación
  - a. Aspecto metodológico
  - b. Aspecto lógico. Noción y elementos
9. La investigación científica. Actividad multitécnica
10. Técnicas generales y específicas de investigación científica

**Resumen:**

En primer lugar se definieron algunos conceptos básicos tales como *ciencia* y *conocimiento científico*. Se analizaron también los objetivos de la ciencia, que pueden resumirse en analizar, explicar, prever o predecir y actuar. De lo que se deriva que el conocimiento científico debe de ser exacto, elaborado y cualificado.

La investigación se emplea con el fin de aumentar los conocimientos científicos, aunque es importante saber que la clave del éxito de cualquier investigación científica orientada al conocimiento radica en el método de investigación aplicado. Un método consistente debe incluir:

- planteamiento de un objetivo
- formulación de una hipótesis y un consecuente modelo
- disposición de herramientas y técnicas analíticas validadas
- diseño y ejecución de un plan experimental
- discusión y conclusiones

El método científico debe ser siempre teórico tanto en su origen como en su fin, debe basarse en la duda científica y ser empírico, inductivo y deductivo, crítico, analítico-sintético y finalmente, debe de ser selectivo y preciso.

A continuación se describieron los objetivos del doctorado, que son:

- alcanzar el máximo grado académico que puede conferir la Universidad
- realizar un trabajo de investigación original que aporte algo nuevo a la ciencia
- formación del investigador que culmina con la defensa de la tesis doctoral

En cuanto al perfil del investigador, se hace hincapié en que además de poseer una serie de aptitudes o capacidades, éste debe manifestar ciertas actitudes ante la ciencia. Las aptitudes son fomentables, ejercitables, desarrollables y consolidables. El investigador debe adquirir una serie de hábitos durante su formación que deben convertir las aptitudes iniciales en actitudes que guiarán siempre su actividad científica. Entre estas aptitudes se encuentran: la aptitud para pensar, la aptitud imaginativa, la aptitud de curiosidad científica, la aptitud administrativa, la aptitud de exigencia o rigor, la aptitud de laboriosidad, la aptitud de constancia, la aptitud de orden, la aptitud para el optimismo y la aptitud de servicio.

Las fases que conforman el proceso de investigación científica son las siguientes:

- *documentación*: búsqueda de fuentes de información sobre conocimientos precedentes al tema investigado



- *investigación empírica*: observación directa de la realidad estudiada y obtención de datos experimentales
- *exposición*: ordenación de los datos recogidos en la investigación y exposición de resultados y conclusiones

El proceso de investigación comprende los dos aspectos descritos a continuación:

- *aspecto metodológico*: enfoca la investigación desde el punto de vista del método a seguir para buscar la solución o respuesta al problema. Las etapas de este proceso son:
  - o planteamiento del problema como un interrogante sobre la realidad
  - o búsqueda de documentación y estudio profundo de antecedentes
  - o formulación y contraste de las hipótesis
  - o planificación ordenada de un diseño experimental y tratamiento de resultados
  - o verificación de las hipótesis planteadas a partir de los datos experimentales
  - o formulación de conclusiones o generalización de los resultados
- *aspecto lógico*: enfoca la investigación desde el punto de vista de los elementos conceptuales o lógicos que intervienen. Estos elementos son la teoría, los modelos, las hipótesis, las unidades de observación (verificación) y el proceso de teorización (variables que representan los hechos, los datos y las leyes científicas).

Como conclusión se considera la investigación científica como una actividad multitécnica, considerando no sólo el carácter intelectual de la investigación científica sino su carácter empírico, que se manifiesta con el empleo de técnicas específicas de investigación y observación.

Para finalizar el curso se dieron algunas nociones sobre las técnicas generales y específicas empleadas en la investigación científica, y se realizó un análisis crítico de un artículo de investigación teniendo en cuenta todos los conceptos anteriores con el fin de valorar la ejecución del proceso de investigación y del método científico empleado.

## **6. GENÉTICA APLICADA A LA BIOTECNOLOGÍA**

**Programa:** Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología Industrial.

**Profesores:** Diego López Alonso.

**Duración:** 30 horas.

**Evaluación:**

La evaluación se llevó a cabo en función tanto de la asistencia a clase como de la realización de una presentación oral acerca de una aplicación práctica de la genética a la biotecnología.

**Guión de contenidos:**

1. De la genética clásica a la molecular: genes y ácidos nucleicos
2. Replicación
3. Transcripción
4. Traducción
5. Genes eucarióticos
6. Regulación de la expresión génica
7. Sistemas genéticos en los microorganismos industriales
8. Ingeniería genética: Las herramientas
9. Clonación de un inserto
10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
11. Genotecas
12. Identificación de un inserto clonado
13. Aplicaciones de la ingeniería genética

**Resumen:**

En primer lugar se definieron una serie de conceptos básicos necesarios para profundizar en las aplicaciones de la genética en el campo de la biotecnología como son *genes* y *ácidos nucleicos* (ADN y ARN), estudiándose tanto su composición química como su estructura.

A continuación se describieron las distintas formas de procesamiento de la información almacenada en el genoma hasta llegar a la síntesis de las proteínas, estudiándose en detalle sus mecanismos bioquímicos, las distintas fases que se diferencian y las enzimas que intervienen en cada proceso.

- *replicación* del ADN: Síntesis de ADN llevada a cabo por las enzimas ADN polimerasas
- *transcripción del ADN*: Síntesis de ARN a partir de una cadena molde de ADN. La realizan las ARN polimerasas (I, II o III)
- *traducción* del ARN: Síntesis de proteínas a partir de la información genética contenida en el ARN mensajero (ARNm) según el código genético.

Se describió también el procesamiento del ARN en genes eucarióticos que se realiza antes de la traducción. Éste proceso, realizado también por las ARN polimerasas, consiste en la eliminación de los intrones o secuencias no codificantes.

El control de la expresión génica necesario para la diferenciación y especificación de las células se puede llevar a cabo en diferentes niveles actuando sobre los siguientes procesos: la transcripción, el procesamiento del ARN, el transporte del ARNm, la traducción o el control de la degradación del ARNm. El control de la expresión génica en procariontes se lleva a cabo a través del modelo Operón (unidad genética funcional que consta de genes estructurales). Por otro lado, en sistemas eucariotas este control se lleva a cabo mediante mecanismos más complejos que incluyen secuencias reguladoras y factores transcripcionales (activadores o represores).

La ingeniería genética incluye todas las técnicas de manipulación del ADN (aislamiento, secuenciación y amplificación) y la transferencia de material genético de unos organismos a otros. Los objetivos fundamentales de la ingeniería genética son el estudio básico de un gen, la terapia génica, la producción comercial de alguna sustancia o la mejora genética de una especie. Esta tecnología implica la construcción de un ADN

recombinante para lo que se precisa de un organismo donante y un fragmento de ADN de interés o inserto capaz de replicarse de manera autónoma en un vector. Las etapas para la construcción de un ADN recombinante son: el *aislamiento*, *digestión* y *ligación* del ADN, y la *amplificación* del fragmento recombinante. En este contexto, los sistemas genéticos de microorganismos procariotas cobran gran interés, ya que poseen mecanismos naturales de intercambio genético (transformación, conjugación y transducción) a través de vectores con capacidad autoreplicativa (plásmidos, secuencias de inserción, transposones, integrones, fagos transductores o ADN desnudo). Las principales herramientas empleadas en la ingeniería genética son estos vectores y determinadas enzimas como las enzimas de restricción (capaces de cortar el ADN en determinados puntos) y las ADN ligasas (que unen los fragmentos del ADN) entre otras. Los vectores pueden emplearse tanto para clonación (amplificación de fragmentos de ADN) como para la expresión de un gen en un hospedador determinado, lo que requiere un promotor, una estructura del gen y un terminador adecuados.

Otro punto a desarrollar fue la descripción del proceso de clonación de un inserto (ADN genómico, sintético, ADNc o fragmento de PCR). Las etapas que comprende son: la preparación del inserto y del vector, la ligación de ambos fragmentos (síntesis del fragmento recombinante), la introducción del ADN recombinante en células para la clonación, la clonación en sí misma, la selección de las cepas clonadas y la posible amplificación adicional del inserto. Una técnica interesante para amplificar secuencias de ADN conocidas es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR a partir del diseño específico de cebadores o *primers* (conjunto de nucleótidos).

Se presentaron también otras potentes herramientas de la ingeniería genética como:

- *genotecas*: colecciones de genes que poseen el genoma de un determinado microorganismo
- *identificación de un fragmento clonado*: en función de la secuencia nucleotídica o estructura (análisis de restricción de un inserto, amplificación por PCR, sondas específicas de ADN, secuenciación) o en función del producto de su expresión o función (complemento funcional o sondas específicas de proteínas).

Por último se describieron algunas aplicaciones de la ingeniería genética en diferentes sectores como la investigación básica, la medicina (terapia génica,

fabricación de vacunas, anticuerpos antitumorales, producción de hormonas), la agricultura (plantas transgénicas para mejora genética), la industria (modificación de microorganismos), etc.

En cuanto a la parte práctica del curso, se planteó como objetivo la descripción detallada de un proceso de producción de ácido estearidónico (SDA) mediante ingeniería genética empleando todos los conocimientos adquiridos. Para ello es necesaria la construcción de un ADN recombinante y a cada alumno se le asignó abordar el problema empleando un organismo receptor diferente para llevar a cabo la clonación. En mi caso el organismo planteado fue *Escherichia Coli*.

A continuación se presenta un resumen del procedimiento propuesto:

- Enzima responsable de la síntesis:  $\Delta 6$ -desaturasa. Organismo donante: *Echium plantagineum*. Organismo receptor: *Escherichia coli*. Secuencia del gen conocida: genbank ncbi (gen sin intrones)

**- Construcción del ADN recombinante**

i) Extracción del ADN

ii) Digestión del ADN con enzimas de restricción

iii) Amplificación del ADN: selectivamente por PCR. Diseño de cebadores en base a la secuencia del gen.

iv) Construcción del vector: Plásmido de expresión, pET21a. Corte con enzimas de restricción y ligación con ADN ligasas.

- Promotor y terminador de *E.Coli*

- Sitios de clonación múltiples

- Gen marcador de selección: resistencia a ampicilina, lacZ

- Origen de replicación

- Gen de la delta6-desaturasa

v) Inserción de los plásmidos recombinantes en *E.coli* y crecimiento de colonias

vi) Selección de los organismos transformados: Ganancia o ausencia de función.

Viabilidad del procedimiento: Opción poco viable ya que el organismo receptor (*E. Coli*) no produce ácido alfa linolénico (ALA, precursor del SDA) y habría que aportarlo (sustrato caro). Mayor ventaja en organismos vegetales que produzcan de manera natural el ALA.

## **7. FÁRMACOS Y BIOPRODUCTOS DE ORIGEN MARINO**

**Programa:** Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología Industrial.

**Profesores:** El Hassan Belarbi Haftallaoui / Carles Fabrellas

**Duración:** 30 horas

**Evaluación:**

La evaluación se llevó a cabo teniendo en cuenta la asistencia a clase.

**Guión de contenidos:**

1. Fármacos y bioproductos
2. Descubrimiento de nuevos fármacos y bioproductos
3. Alimentos funcionales
4. Futuro de la biotecnología marina
5. Invertebrados como fuente de fármacos
6. Microorganismos como fuente de fármacos
7. Algas y microalgas como fuente de fármacos y bioproductos
8. La biotecnología marina en España (PharmaMar, Ebiotec, etc)
9. Esponjas como fuente de fármacos

**Resumen:**

En la primera parte se describieron algunos conceptos generales necesarios para el desarrollo del curso tales como *fármaco*, *medicamento* o *bioproducto*. Se describieron también las ramas de la farmacología y se realizó una clasificación de los distintos tipos de fármacos (analgésico, antibiótico, antineoplástico, quimioterápico, etc.). Por su importancia se hizo especial mención al problema del cáncer y se dio una visión general acerca de la quimioterapia (objetivo, formas de uso, mecanismo de acción y efectos secundarios). En este contexto se definieron los fármacos antineoplásticos (para combatir el cáncer) y las dianas terapéuticas contra el cáncer.

A continuación se describieron con detalle el método de *ensayos clínicos*, necesario para la evaluación de cualquier fármaco nuevo que quiera introducirse en el mercado. Este método consta de cuatro fases que deben superarse antes de la aceptación

de un nuevo producto. Debido a este duro proceso el tiempo estimado para presentar un nuevo fármaco es de 12 años, y el coste aproximado 900 millones de dólares. Sin embargo, por cada fármaco exitoso han de analizarse cerca de un millón de posibles moléculas activas. El mercado farmacéutico es pues muy costoso y poco accesible, ya que requiere un trabajo muy específico, una inversión muy elevada y poca garantía de éxito.

En el siguiente módulo se planteó el descubrimiento de nuevos fármacos y bioproductos de origen natural, y se presentó el ecosistema marino como una fuente muy interesante de nuevas sustancias con efectos terapéuticos debido a su gran quimiodiversidad, ya que menos del 10 % de la biodiversidad mundial ha sido investigada en búsqueda de actividad biológica. Concretamente, en el ámbito de la oncología los fármacos recientes más eficaces se han desarrollado a partir de productos naturales. El procedimiento consiste en escoger determinadas muestras ambientales y someterlas a un proceso de selección mediante técnicas de *screening* de alta eficacia (bioinformática).

El tercer capítulo se centró en el estudio de los llamados *alimentos funcionales*, que son componentes diversos (nutrientes o no nutrientes) que afectan a ciertas funciones corporales relacionadas con el estado de bienestar o salud, la reducción del riesgo de enfermedad o ambas cosas. Algunos ejemplos son probióticos, vitaminas, antioxidantes, ácidos grasos, etc. En este apartado se definieron también conceptos como nutraceuticos (productos biológicos naturales con efecto terapéutico) y nutrigenómica (combinación de genómica, proteómica y metabolómica); campos prometedores en la biotecnología.

En el cuarto apartado se revisó el futuro de la biotecnología marina ya que el mar contiene el 95 % de la biosfera, lo que supone la existencia de una gran diversidad, tanto biológica como química. Al estar sometidos a condiciones de estrés, los organismos marinos han desarrollado sofisticados mecanismos de defensa y supervivencia produciendo una amplia gama de metabolitos secundarios. Se han encontrado numerosas sustancias tanto nutraceuticos (carotenoides, ácidos grasos, polisacáridos, etc) como productos de interés farmacológico (antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios, etc). En este apartado se hizo una revisión detallada de los principales fármacos de origen marino que actualmente están en alguna de las fases

de ensayos clínicos, y de los productos marinos (principalmente nutraceúticos) ya comercializados.

A continuación se analizó el papel de las microalgas como fuente de fármacos y bioproductos. Para ello se realizó una descripción general sobre las microalgas, una clasificación de especies y un estudio sobre su composición bioquímica. Se repasaron también los usos y aplicaciones de las microalgas tanto en el campo de la industria alimentaria como en el de la salud. Los principales productos de interés generados a partir de microalgas son ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides. Las microalgas se han descrito como antifúngicas, antibióticas, antivirales, antioxidantes y anticoagulantes. Se prestó especial interés a los dinoflagelados, algas microscópicas capaces de producir toxinas.

Para finalizar este bloque se hizo una revisión de la situación de la biotecnología marina en España, describiendo las implicaciones económicas actuales y las perspectivas del sector en los próximos años. Se mencionaron las empresas españolas más influyentes en esta área como son Marine Biotechnology, Puleva Biotech, Grupo Zeitia, Pharmamar, Bioaqua, Ebiotec y Bioalgal Marine. Se prestó especial atención a Pharmamar ya que se recibió la visita de un representante de la empresa con el fin de presentar su experiencia en el sector biotecnológico.

Por último se estudió la importancia de las esponjas marinas como fuente de fármacos. En primer lugar se describió de manera general la estructura y fisiología de las esponjas marinas, así como su clasificación. Además se dieron nociones básicas acerca del cultivo de las esponjas, y de los factores que afectan a su crecimiento como son los nutrientes, el oxígeno, el silicio, la luz, la salinidad, la temperatura, los residuos nitrogenados, las toxinas y contaminantes, el pH y calidad de agua, etc. Además se describió el cultivo de explantes de esponjas marinas *in vitro*.



# **MEMORIA DEL PERÍODO DE** **INVESTIGACIÓN TUTELADA**

**Descontaminación de aguas contaminadas con  
plaguicidas comerciales mediante foto-Fenton solar**

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INGENIERÍA DE**  
***BIOPROCESOS Y BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL***



**Departamento:** Ingeniería Química.

**Curso:** 2008 – 2009.

**Profesor Responsable:** José Antonio Sánchez Pérez.

**Alumna:** Ana Zapata Sierra.

**Becaria FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación**

**(ref: BES-2007-17204). Beca asociada al proyecto nacional con**

**ref: CTQ2006-14743-C03-01.**

**ÍNDICE: PERÍODO INVESTIGACIÓN TUTELADA**

<b>1. Introducción</b>	<b>26</b>
<b>2. Materiales y Métodos</b>	<b>29</b>
<b>3. Resultados y Discusión</b>	<b>39</b>
<b>4. Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>5. Referencias</b>	<b>55</b>
<b>ANEJO I: Artículo de investigación</b>	<b>60</b>

El presente trabajo de investigación se ha desarrollado de manera íntegra en la Plataforma Solar de Almería (PSA) enmarcado dentro del proyecto nacional: *Desarrollo de Sistemas Acoplados de Oxidación (Fotocatálisis Solar y Oxidación Biológica) para la Depuración de Efluentes Acuáticos Contaminados con Plaguicidas no Biodegradables (FOTOBIOX)* (CTQ2006-14743-C03-01, IP Dr. Sixto Malato Rodríguez), del que la alumna ha sido becaria FPI (BES-2007-17204).

## **1. INTRODUCCIÓN**

La situación actual relacionada con la gestión y suministro del agua es uno de los principales temas de interés a nivel mundial ya que la calidad del agua se está viendo muy deteriorada como consecuencia del crecimiento económico e industrial en los países desarrollados. En los últimos años, se han identificado un elevado número de compuestos recalcitrantes en el agua relacionados con la actividad humana; tales como metales pesados, disolventes, fármacos, plaguicidas y otros microcontaminantes [Suárez y col., 2008].

La política de la Unión Europea referente a la protección del medio ambiente ha ido ganando especial importancia desde los años 80. En este contexto, se han desarrollado nuevas estrategias para la defensa del medioambiente, entre las que el agua forma parte de las principales líneas de acción prioritarias. La política del agua comunitaria está basada en los objetivos de una serie de Directivas que normalizan el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales, entre las que destaca la Directiva Marco del Agua (WFD siglas en inglés, 2000/60/EC) adoptada en octubre del año 2000. La legislación europea avanza de manera continua con el objetivo de proteger y mejorar la calidad de los recursos naturales de agua de que se dispone en Europa. La directiva más reciente [Directiva 2008/105/EC] contiene el marco legal y las bases metodológicas para la priorización de sustancias contaminantes. En ella se incluye una lista de “Sustancias Contaminantes Prioritarias” (PS), entre las que se encuentran plaguicidas, metales pesados, hidrocarburos, hidrocarburos clorados, etc. presentes en agua y cuya procedencia es generalmente aguas residuales industriales. Por ello, la Directiva IPPC (Control y Prevención de la Contaminación Integrados, 96/61/EC) obliga al desarrollo de tecnologías y prácticas de gestión para sectores industriales específicos, para la minimización de la polución y para el desarrollo del reciclado de agua.

El reciente crecimiento de la agricultura intensiva en la costa Mediterránea (especialmente en el sureste de España) ha dado lugar tanto a un mayor consumo de los recursos hídricos limitados como a la aparición de una fuerte contaminación de las aguas debido a la presencia de plaguicidas. Debido a su solubilidad en agua y por tanto a su facilidad de propagación, constituyen un gran riesgo para los ecosistemas acuáticos y los recursos hídricos, siendo capaces de contaminar tanto las aguas superficiales como las subterráneas. Estos compuestos son generalmente tóxicos, persistentes y consecuentemente resistentes a los métodos de tratamiento convencionales como la degradación biológica. Esto supone que su tiempo de vida media en el ambiente puede ser elevado, constituyendo un riesgo potencial para la salud pública.

En este contexto, la investigación en este campo se ha centrado en el desarrollo de nuevos métodos y tecnologías alternativos a los procesos convencionales y capaces de lograr la descontaminación de aguas residuales contaminadas con sustancias persistentes. Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs) han cobrado un especial interés en los últimos años, ya que se ha demostrado que son métodos oxidativos muy efectivos con una alta capacidad para eliminar de manera inespecífica un amplio espectro de contaminantes persistentes [Klavarioti y col., 2009; Cogate y col., 2004]. Algunos ejemplos de estos procesos que han sido ampliamente investigados son  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ , foto-Fenton y ozono ( $\text{O}_3$ ,  $\text{O}_3/\text{UV}$ ,  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ). Estos procesos se caracterizan por la producción de radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), especie oxidante muy efectiva con un elevado potencial de oxidación ( $E_0$ : 2.8 V). Una característica a destacar es que se trata de oxidantes no selectivos, siendo capaces de mineralizar cualquier molécula orgánica produciendo como resultado  $\text{CO}_2$  e iones inorgánicos. No obstante, tienen la gran desventaja de ser métodos con unos costes elevados al precisar de reactores sofisticados, consumo energético y reactivos [Bressan y col., 2004]. Entre las medidas adoptadas para conseguir una reducción en los costes energéticos se encuentra la utilización de PAOs que sean compatibles con el uso de la energía solar como son la fotocatalisis heterogénea mediante sólidos semiconductores (siendo el más habitual  $\text{TiO}_2$ ) y la fotocatalisis homogénea mediante el proceso de foto-Fenton [Herrmann, 2005; Sagawe y col., 2001].

De entre todos los PAOs, el proceso de foto-Fenton se ha descrito como uno de los más efectivos para tratar contaminantes prioritarios contenidos en aguas [Pignatello y col., 2006]. El proceso de foto-Fenton se basa en la combinación del proceso Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{2+}$ ) con luz UV-VIS. En estas condiciones, la fotólisis de complejos de  $\text{Fe}^{3+}$

permite la regeneración de  $\text{Fe}^{2+}$  y, por tanto, la subsiguiente continuación del proceso Fenton. De esta forma el proceso es catalítico [Pignatello y col., 2006]. Entre los parámetros operacionales más relevantes que intervienen en el proceso de foto-Fenton se encuentran la concentración de hierro empleado (catalizador), la temperatura y la concentración inicial de contaminante. Todas estas variables influyen en la cinética del proceso global, y su efecto sobre la eficiencia de la reacción ha sido ampliamente estudiado [Farias y col., 2009; Changa Lee y col., 2004; Sawage y col., 2001].

Otra de las medidas para conseguir una reducción en los costes se centra en el desarrollo de sistemas integrados entre PAOs y tratamiento biológico. En este caso, el proceso fotocatalítico actúa como pretratamiento capaz de convertir los compuestos persistentes en intermedios de reacción biodegradables, susceptibles de ser eliminados en un proceso biológico convencional [González y col., 2008; Mosteo y col., 2008; Ballesteros y col., 2008]. A pesar de que se han propuesto diferentes sistemas que combinan foto-Fenton y tratamiento biológico adaptados a aguas industriales contaminadas con sustancias persistentes [Gernjak y col., 2007; Augugliaro y col., 2007; Moraes y col., 2004; Sarria y col., 2003], las aplicaciones industriales de estas tecnologías son realmente escasas. Por tanto, la optimización tanto de los procesos individuales (foto-Fenton/tratamiento biológico), como del sistema integrado abre un campo de investigación muy atractivo. Es preciso aclarar que el proceso de foto-Fenton será más eficiente (menor coste de operación) cuanto menor sea el tiempo de tratamiento requerido y el consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reactivo de mayor coste. El fin último del estudio es proponer las condiciones adecuadas para el diseño de un sistema combinado (foto-Fenton/tratamiento biológico) para la descontaminación de aguas contaminadas con plaguicidas, que pueda servir como base para una posible aplicación real de la tecnología propuesta. Es en este contexto dónde se encuadra el trabajo presentado, que incluye diferentes aspectos susceptibles de ser estudiados en detalle:

- Degradación mediante foto-Fenton solar de un agua contaminada con cinco plaguicidas comerciales.
- Estudio de la influencia de la especie de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ ) y su concentración con el fin de seleccionar la combinación que maximice la eficiencia de la reacción.
- Comparación de la eficiencia de degradación de los procesos de Fenton y foto-Fenton en las mismas condiciones de operación.

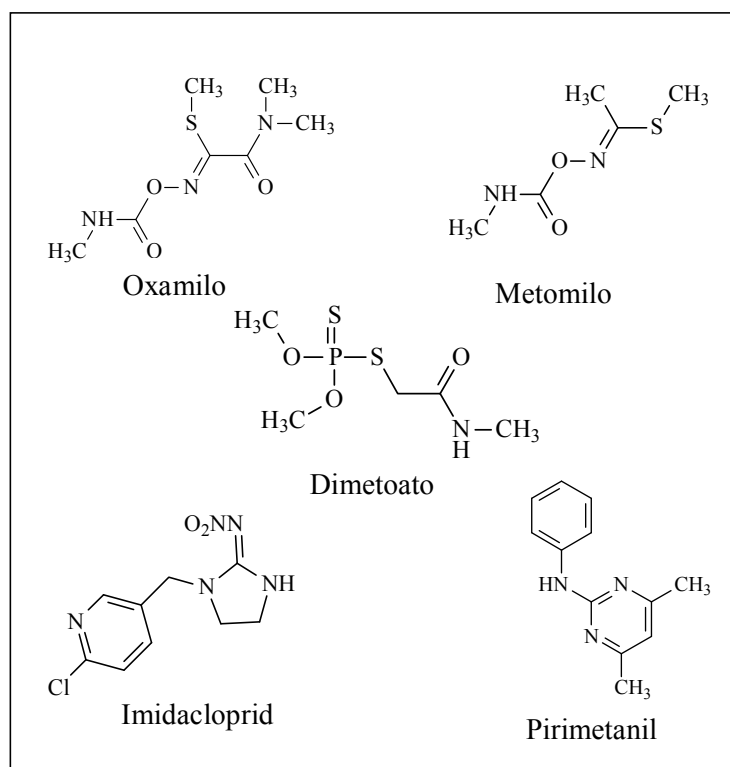
- Evaluación de la biodegradabilidad del agua pre-tratada mediante foto-Fenton en las condiciones determinadas como óptimas en el estudio anterior.

Los resultados obtenidos han sido publicados en la revista científica *Applied Catalysis B: Environmental* (2009), con un índice de impacto de 4.853. El documento se adjunta como Anejo de esta memoria.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos**

Las formulaciones comerciales de los plaguicidas empleados son: Vydate® (10% p/v oxamilo,  $C_7H_{13}N_3O_3S$ ), Metomur®, (20% p/v metomilo,  $C_5H_{10}N_2O_2S$ ), Couraze® (20% p/v imidacloprid,  $C_{16}H_{22}ClN_3O$ ), Ditimur-40® (40% p/v dimetoato,  $C_5H_{12}NO_3PS_2$ ) y Scala® (40% p/v pirimetanil,  $C_{12}H_{13}N_3$ ). En la figura 1 se muestra la estructura química de las materias activas contenidas en los plaguicidas comerciales. Los estándares analíticos para el análisis cromatográfico (>98 %) proceden de Sigma-Aldrich. La solubilidad en agua de estos compuestos es 280 g/L, 25°C (oxamilo); 57.9 g/L, 25°C (metomilo); 0.61 g/L, 20°C (imidacloprid); 23.8 g/L, 25°C (dimetoato) y 0.121 g/L, 25°C (pirimetanil).

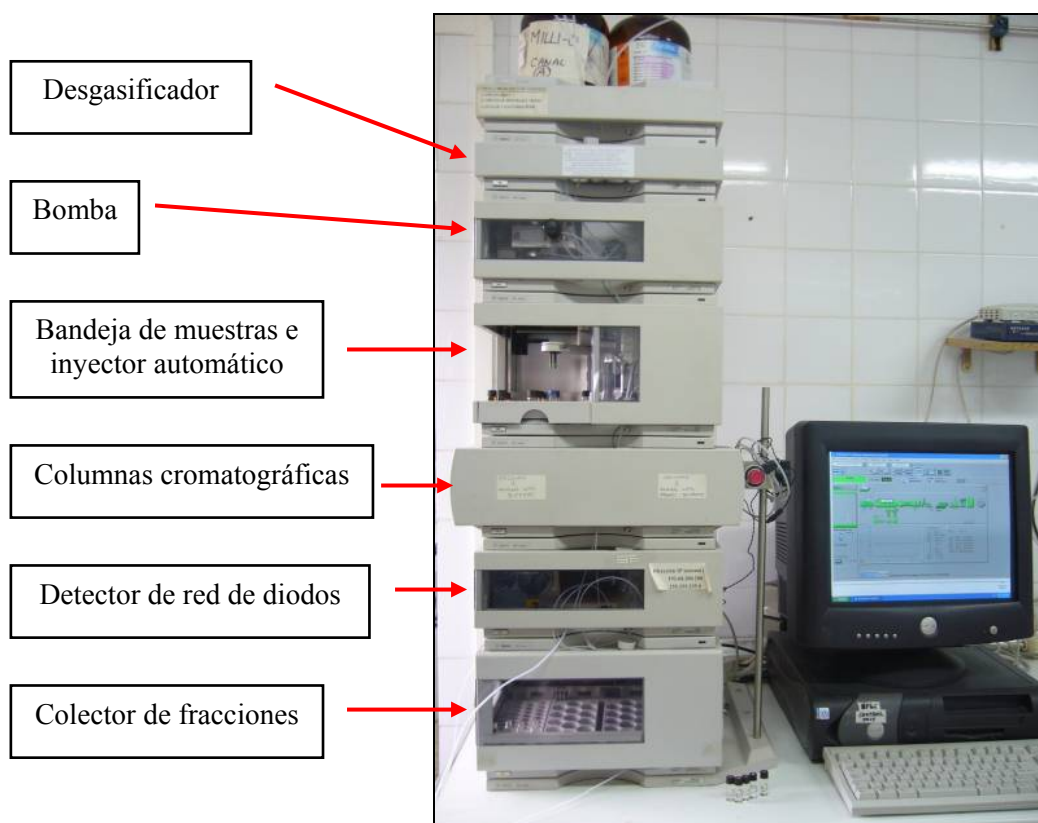


**Figura 1.** Estructura química de los plaguicidas

El agua desmineralizada empleada en la planta piloto procede de una planta de destilación situada en la Plataforma Solar de Almería (conductividad  $< 10 \mu\text{S}/\text{cm}$ ;  $\text{Cl}^- = 0.2\text{-}0.3 \text{ mg/L}$ ,  $\text{NO}_3^- < 0.2 \text{ mg/L}$ , carbono orgánico total  $< 0.5 \text{ mg/L}$ ). Los experimentos de foto-Fenton se realizaron empleando  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , peróxido de hidrógeno (30 % p/v) y ácido sulfúrico (ajuste de pH alrededor de 2.7-2.8), todos provenientes de Panreac S.A.

## 2.2. Determinaciones Analíticas

Las concentraciones de los plaguicidas en los experimentos de degradación se determinaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa con Detector Ultravioleta con Red de Diodos (HPLC/UV-DAD, Agilent Technologies, series 1100, (figura 2), con una columna C-18 (LUNA  $5\mu\text{m}$ ,  $3\text{mm} \times 150\text{mm}$  de Phenomenex). La fase móvil empleada fue una mezcla de 15 % acetonitrilo y 85 % agua ultrapura; y el caudal  $0.5 \text{ mL}/\text{min}$ . La detección se realizó a tres longitudes de onda diferentes, de acuerdo con el máximo de absorción de cada plaguicida empleado: 210 nm (Dimetoato y Pirimetanil), 234 nm (Oxamilo y Metomilo) y 270 nm (Imidacloprid). La preparación de la muestra consistió en su dilución 4:1 (4 de muestra y 1 de acetonitrilo), y en la filtración de la misma a través de filtros de  $0.22 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Mediante este procedimiento se consiguen diferentes ventajas: (i) el efecto “quenching”, que se refiere a la paralización de una reacción por desnaturalización (en este caso al añadir acetonitrilo) del medio de reacción (especialmente importante en experimentos con foto-Fenton, en los que podría continuar la reacción en la oscuridad después de tomar la muestra del reactor), (ii) se inyecta la muestra en condiciones ideales (composición similar a la fase móvil en el método cromatográfico) para su análisis y (iii) se evita adsorción de los plaguicidas en el filtro.



**Figura 2.** Fotografía del HPLC (Agilent Technologies serie 1100) en el laboratorio de la PSA

La evaluación del grado de mineralización durante la degradación de la mezcla de plaguicidas se realizó mediante la determinación del Carbono Orgánico Disuelto (COD). Para ello las muestras filtradas son inyectadas directamente en un Analizador Shimadzu modelo TOC-V<sub>CSN</sub> con detector IRND (figura 3), que realiza mediciones de Carbono Total (CT) y Carbono Inorgánico Total (CIT) en agua, obteniendo el valor del COT por diferencia entre el CT y el CIT. El funcionamiento de este equipo está basado en la combustión de las muestras en un reactor catalítico (temperatura de combustión de 680°C), que contiene un catalizador de platino inmovilizado sobre esferas de alúmina, y el posterior análisis del gas resultante (CO<sub>2</sub>), mediante un detector de infrarrojos no dispersivo. En cuanto a las mediciones de CIT, el sistema añade automáticamente a las muestras ácido fosfórico y las purga con aire de alta pureza a un flujo de 150 mL/min. De esta manera, al disminuir el pH y burbujear aire se provoca la generación de CO<sub>2</sub> a partir de los carbonatos y bicarbonatos de la muestra, el cual es arrastrado por el aire directamente al detector de IR. El rango de medida es de 50µg/L a 4000mg/L para el CT y de 50µg/L a 5000mg/L para el CIT. La desviación estándar es del 1% sobre el rango del fondo de escala.





**Figura 3.** Fotografía del Analizador de Carbono Orgánico Total Shimadzu 5050A instalado en el laboratorio de la PSA

La demanda química de oxígeno (DQO) se determinó utilizando kits comerciales de Merck Spectroquant® (ref: 1.14541.0001), y la absorbancia se midió en un fotómetro NOVA 30 de Merck usando una curva de calibrado externa.

El hierro total disuelto se determinó mediante determinación colorimétrica con 1,10-fenantrolina, de acuerdo con la norma ISO 6332, en un espectrofotómetro Unicam-2 a 510 nm.

Para la determinación del peróxido de hidrógeno se empleó un sencillo método espectrofotométrico con metavanadato de amonio. La reacción del  $H_2O_2$  con el metavanadato de amonio genera un catión peroxovanadio de color rojo-anaranjado, que tiene un máximo de absorción a 450 nm. La concentración de  $H_2O_2$  se calcula a partir de medidas de absorbancia. El método está detallado en un estudio publicado por Nogueira et al [Nogueira y col., 2005].

### **2.3. Evaluación de la toxicidad y biodegradabilidad**

La determinación de la toxicidad se ha llevado a cabo utilizando un bioensayo conocido comercialmente como Microtox®, basado en la actividad luminiscente de la bacteria *Vibrio fischeri*. Esta bacteria es una especie perteneciente al grupo de bacterias

anaerobias facultativas, bacilos y gram negativas. Se engloba en la familia Vibrionaceae, género *Vibrio*, especie *Vibrio fischeri*. Las especies pertenecientes a esta familia se encuentran en ambientes marinos y de agua dulce en asociación con otros organismos. Algunas especies del género *Vibrio* tienen la capacidad de emitir luz de forma natural como la especie *Vibrio fischeri*, gracias a una reacción bioquímica que se conoce como bioluminiscencia. Esta energía en forma de luz visible es generada como consecuencia de una reacción de oxido-reducción, catalizada por una enzima oxido-reductasa, conocida como luciferasa. La actividad bioluminiscente de *Vibrio fischeri* puede ser mermada debido a la acción bloqueante o inhibidora de compuestos tóxicos como pueden ser los contaminantes objetivo de este trabajo o bien los posibles intermedios generados durante los procesos de degradación (PAOs). Se ha demostrado que los ensayos con la bacteria *Vibrio fischeri* suelen ser más sensibles que los llevados a cabo con fangos activados [Dalzell y col., 2002, Ricco y col., 2004], lo que podría resultar muy útil a la hora de garantizar el vertido seguro de las aguas residuales en una planta de tratamiento biológico.

El bioensayo llevado a cabo en este trabajo utiliza como reactivo una preparación liofilizada de una cepa especialmente seleccionada correspondiente a la bacteria marina *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*, NRRL B-11177). Una vez activadas las bacterias (que se comercializan liofilizadas y congeladas) por hidratación con una solución salina esterilizada de cloruro sódico, el seguimiento del efecto inhibitorio se llevó a cabo preparando diferentes diluciones de cada muestra con una solución salina no tóxica de cloruro sódico al 2%, y mezclándolas con la suspensión bacteriana. El descenso en la emisión de luz por parte de la bacteria, se midió después de mantenerla en contacto con la muestra durante 30 minutos a 15 ° C. El control de la temperatura en la ejecución de este bioensayo es esencial, debido a que la emisión natural de luz por parte de la bacteria es muy sensible a los cambios de temperatura. El equipo empleado para la medición de la producción de luz por parte de la bacteria fue el analizador BioFix® Lumi-10 de Macerey-Nagel. En cuanto al peróxido de hidrógeno presente en las muestras que procedían de experimentos de foto-Fenton, se eliminó, previamente a los ensayos de toxicidad, por adición de catalasa (2500 U/mg de hígado de bovino; 100 mg/L) procedente de Fluka Chemie AG (Buchs, Suiza), después de ajustar el pH de las muestras a 7. En el presente trabajo, la toxicidad de diferentes

muestras parcialmente degradadas mediante foto-Fenton se evaluó en las disoluciones sin diluir y diluidas 1:9.

La biodegradabilidad de la mezcla de plaguicidas foto tratada se evaluó mediante una adaptación del test de Zahn-Wellens, descrito en la Directiva 88/303/EEC y el protocolo OCDE TG 302 B. En este ensayo, las muestras se mezclaron con medio mineral y con una cantidad relativamente alta de fangos activos (procedentes de la EDAR municipal de Almería) en recipientes de 0.25 litros en una solución acuosa agitada y aireada (para asegurar una concentración de oxígeno disuelto nunca inferior a 2 mg/L), a 20-25° C en la oscuridad o bajo luz difusa durante un período de 28 días. En paralelo se prepararon varios blancos (dependiendo de las diferentes cantidades de biomasa adicionada) conteniendo sólo fangos activos y medio mineral en agua destilada. La degradación biológica se siguió mediante la medición del COD a intervalos periódicos de tiempo. La primera medida de COD correspondiente a cada frasco se toma siempre después de 3 horas y 30 minutos de haber iniciado el ensayo, de forma que se pueda detectar la posible adsorción de las sustancias químicas sobre los fangos activos. La razón del COD después de cada intervalo de tiempo con respecto al valor tomado tres horas después del comienzo del ensayo, se expresa en forma de porcentaje de biodegradabilidad [ecuación 1].

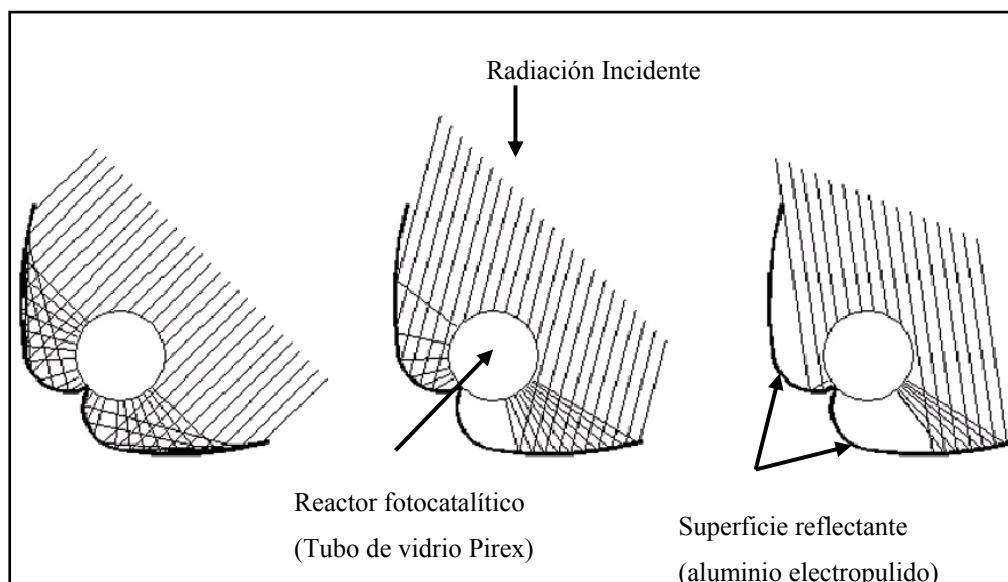
$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_B}{C_A - C_{BA}} \right] \times 100 \quad [\text{ec. 1}]$$

Una muestra se considera biodegradable cuando el porcentaje de degradación supera el 70 % [EPA, 1996]. El control del buen funcionamiento de este método se lleva a cabo mediante la evaluación de la biodegradabilidad de un compuesto referencia, glucosa en este caso. Si se elimina al menos el 70% del COD procedente de esta sustancia en menos de 14 días, se demuestra que la actividad de los fangos es la correcta, con lo que se puede asegurar la buena calidad del ensayo.

## 2.4. Procedimiento experimental

### 2.4.1 Concentradores Parabólicos Compuestos (CPC)

Todos los experimentos que se presentan en este trabajo han sido desarrollados en la Plataforma Solar de Almería (PSA, latitud 37° norte y longitud 2.4° oeste), en planta piloto basada en un sistema de captadores solares del tipo cilindro parabólico compuestos (CPC). Los CPCs suponen una de las mejores opciones para las aplicaciones fotocatalíticas solares [Malato y col., 2009]. Son captadores estáticos con una superficie reflectante enfocada hacia un fotorreactor cilíndrico (figura 4), pueden ser diseñados con un factor de concentración 1 y, además, pueden capturar tanto la radiación UV directa como la difusa. Estos sistemas solares son sencillos de instalar, fáciles de operar y requieren un bajo capital de inversión [Malato y col., 2002b].

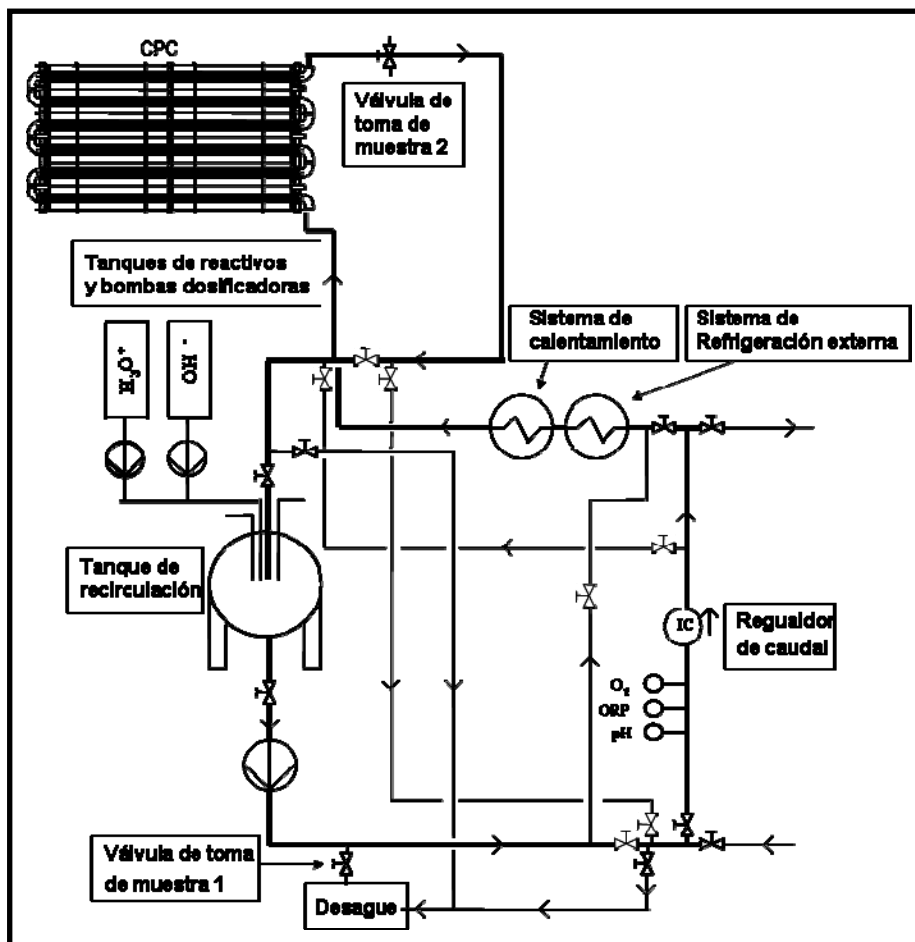


**Figura 4.** Radiación solar reflejada en un Colector Cilindro-Parabólico Compuesto (factor de concentración 1).

### 2.4.2. Reactor solar

Este prototipo ha sido especialmente diseñado y construido para aplicaciones de tratamiento de aguas residuales mediante foto-Fenton. El circuito hidráulico del reactor está formado por un tanque de recirculación esférico de vidrio borosilicatado de 20 L, una bomba centrífuga (Bominox SIM-1051, 370 W, 400V AC), cuatro módulos de concentradores CPC con una superficie total irradiada de 4.16 m<sup>2</sup>, tubos de vidrio borosilicatado, tuberías de conexión y válvulas de PP de 3/4" de diámetro interno. En la

tubería de conexión del tanque con los concentradores se han insertado tres sensores en línea (pH, potencial redox (ORP) y oxígeno disuelto ( $O_2$ ), de WTW), un sistema de calefacción formado por cuatro grupos de resistencias, y un sistema de refrigeración externo. El sistema se completa con un cuadro eléctrico que contiene toda la instrumentación de la planta, y un ordenador que adquiere los datos en línea generados por los sensores y transmite las decisiones de control al cuadro. La figura 5 muestra un diagrama de flujo del foto-reactor.



**Figura 5.** Diagrama de flujo del foto-reactor construido en la PSA para aplicaciones de fotocatalisis homogénea

Esta planta piloto opera en modo discontinuo y tiene un volumen total máximo de 82 L. Los cuatro módulos de concentradores CPC están montados sobre una estructura metálica inclinados  $37^\circ$  (latitud de la PSA) y orientados hacia el sur. Cada módulo consta de cinco tubos de vidrio borosilicatado de 1.5 m de longitud, 46.4 mm de diámetro interno y 50 mm de diámetro externo. El sistema completo consta de 20 tubos conectados en serie (figura 6). La bomba centrífuga impulsa el fluido a través del

sistema a un caudal que puede ser regulado gracias a un caudalímetro insertado en la tubería. Sin embargo, todos los experimentos se han llevado a cabo a un caudal constante de 25 L/min, proporcionando flujo turbulento dentro del circuito.



**Figura 6.** Fotografía de los cuatro módulos de concentradores CPC durante un ensayo de foto-Fenton (izda.) e interior de la caseta que protege al tanque de recirculación, los sensores, el sistema de calefacción y refrigeración y el cuadro eléctrico (dcha.).

En cuanto a los valores de temperatura, se toman directamente de la medida proporcionada por las sondas de temperatura integradas en cada una de los sensores WTW.

Los instrumentos de adquisición de datos en línea transmiten la señal que les llega de las sondas WTW de forma analógica a sus respectivos módulos controladores (“FieldPoint I/O, Advantech ADAM®4000 series”). Estos módulos transmiten los datos conforme al protocolo RS485, y se conectan a una interfaz desarrollada en un ordenador mediante la aplicación de un convertidor intermedio de señal RS485/RS232. El software SCADA (“Supervisory Control And Data Acquisition”) ha sido programado en LabVIEW®7.0 (“National Instruments”) para llevar a cabo tanto la adquisición de los datos como las acciones de control necesarias en cada experimento. Existen diversas opciones de control, por ejemplo es posible controlar la temperatura del sistema mediante el encendido o apagado de los grupos de resistencias eléctricas insertadas en la tubería, o la apertura o cierre de las electroválvulas que permiten la entrada del fluido externo refrigerante.

La medida de la radiación UV solar se realizó mediante un radiómetro de UV global (KIPP&ZONEN, modelo CUV3), montado sobre una plataforma inclinada 37° sobre la superficie, al igual que los CPCs. Este radiómetro proporciona datos en

términos de radiación UV incidente,  $W_{UV} m^{-2}$ , que es la cantidad de energía, en forma de radiación UV, que recibe una unidad de superficie ubicada en las mismas condiciones que el radiómetro. Los datos obtenidos en los experimentos fotocatalíticos se representan en función de un tiempo de iluminación corregido ( $t_{30W}$ ), de manera que es posible comparar datos de experimentos de diferentes días sin que influya la variación de radiación UV que se produce. Para ello, se asume como referencia que la radiación UV solar media en un día perfectamente soleado durante 2 horas alrededor del mediodía es aproximadamente de  $30 W_{UV} m^{-2}$ . Por lo tanto, con la ecuación 2, es posible combinar los datos de experimentos realizados en distintos días, y además, compararlos con otros experimentos fotocatalíticos.

$$t_{30W,n} = t_{30W,n-1} + \Delta t_n \frac{UV}{30} \frac{V_i}{V_T}; \quad \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad [\text{ec. 2}]$$

En la ecuación 2  $t_n$  es el tiempo experimental correspondiente a cada muestra, UV es la radiación ultravioleta solar media medida durante el intervalo de muestreo  $\Delta t_n$ , y  $t_{30W}$  es el “tiempo de iluminación normalizado”, que se encuentra referido a la antes mencionada, irradiancia ultravioleta solar constante de  $30 W m^{-2}$ .

### 2.4.3. Procedimiento experimental

Todos los ensayos se realizaron con la mezcla de los 5 plaguicidas comerciales a una concentración inicial de 200 mg/L de carbono orgánico disuelto (COD) inicial (40 mg/L proveniente de cada plaguicida individual) en una matriz de agua destilada, y a un pH ajustado a 2.7-2.9 con  $H_2SO_4$ . La concentración de  $H_2O_2$  se mantuvo entre 100 y 500 mg/L durante todo el proceso y la temperatura a  $35^\circ C$ , haciendo uso del control de temperatura descrito anteriormente. La mezcla de plaguicidas se añadía directamente a la planta piloto, y se mantenía en recirculación en régimen turbulento durante 30 minutos una vez alcanzada la temperatura deseada ( $35^\circ C$ ) con el fin de conseguir una completa homogeneización del sistema. Con los captadores tapados, se procedía al ajuste de pH a 2.7-2.9. La sal de hierro se añadía una vez que el pH era el deseado. A continuación se adicionaba cierta cantidad de  $H_2O_2$  (400 mg/L) y los captadores se descubrían, momento en el cual se considera el comienzo de la reacción de foto-Fenton ( $t_{30W} = 0$ ). La concentración de peróxido de hidrógeno se midió periódicamente y se añadió a medida que se consumía procurando que nunca fuera inferior a 100 mg/L.

Los ensayos de Fenton se llevaron a cabo en el laboratorio, en recipientes de 3 L en continua agitación. Las condiciones iniciales fueron  $\text{pH} = 2.8$ , 20 mg/L de hierro disuelto y 300 mg/L de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se probaron dos valores de COD inicial con ambas especies de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ): 50 y 100 mg/L (10 y 20 mg/L proveniente de cada plaguicida respectivamente).

Los principales parámetros utilizados para evaluar la degradación y mineralización de la mezcla de plaguicidas fueron el COD, la concentración de los plaguicidas, el consumo de peróxido de hidrógeno y la concentración de hierro disuelto, todos ellos con respecto al tiempo de iluminación.

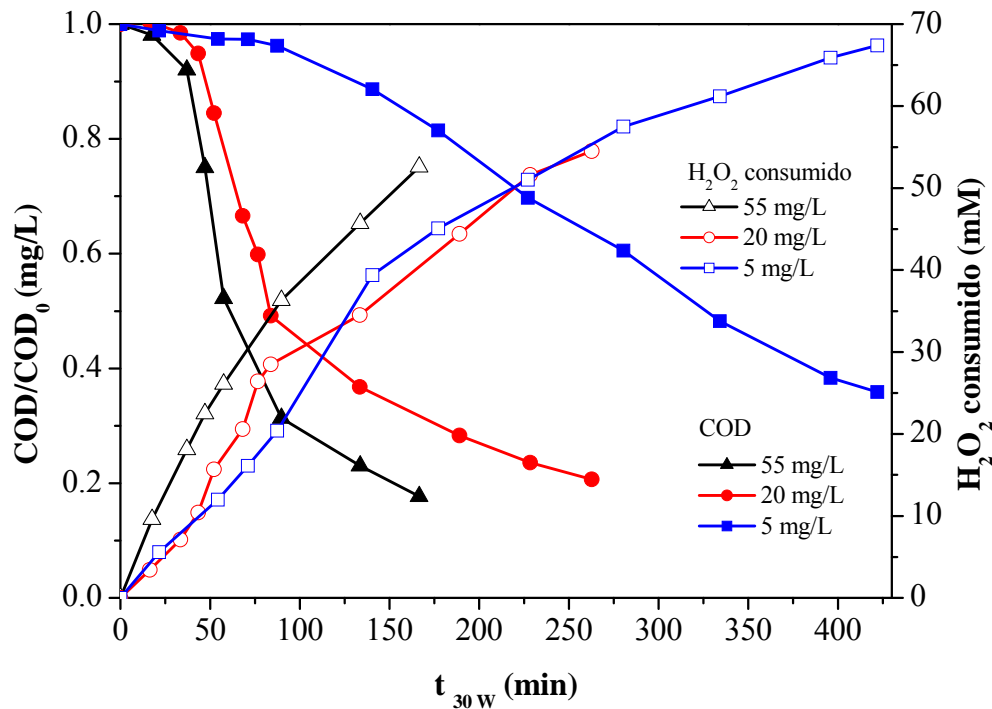
### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. Ensayos de foto-Fenton**

Como se ha mencionado en la introducción, el hierro es el catalizador en la reacción de foto-Fenton y por tanto un parámetro muy relevante a tener en cuenta. En este estudio se plantea la evaluación de la influencia de la especie y concentración de hierro en la eficiencia del proceso de degradación de la mezcla de los cinco plaguicidas comerciales seleccionados. Para ello, se llevaron a cabo diferentes ensayos empleando dos especies de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ) a tres concentraciones (5, 20 y 55 mg/L). Estas concentraciones se escogieron considerando un estudio previo realizado en la PSA que determinaba 0.2 – 0.5 mM de Fe como rango óptimo para los CPCs utilizados [Blanco-Gálvez y col., 2007].

En todos los casos el COD inicial fue de 200 mg/L (40 mg/L proveniente de cada plaguicida comercial) y la temperatura se fijó en 35 ° C. Las cantidades de materias activas contenidas en la mezcla fueron las siguientes: 84 mg/L de oxamilo, 22 mg/L de metomilo, 20 mg/L de imidacloprid, 32 mg/l de dimetoato y 54 mg/L de pirimetanil. La figura 7 muestra la mineralización de la mezcla de plaguicidas a las tres concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  (5, 20 y 55 mg/L) y los correspondientes consumos de peróxido de hidrógeno asociados para cada experimento.





**Figura 7.** Mineralización de la mezcla de plaguicidas y peróxido de hidrógeno consumido en los ensayos de foto-Fenton realizados a 200 mg/L de COD inicial a 5, 20 y 55 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$ .

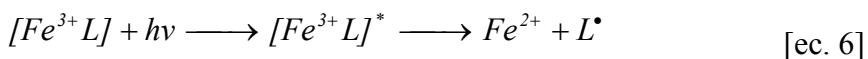
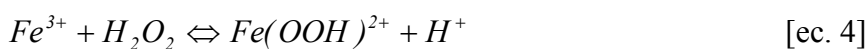
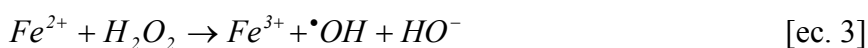
En la tabla 1 se comparan los consumos de peróxido de hidrógeno y los tiempos de iluminación requeridos para las dos especies de hierro a las tres concentraciones ensayadas.

Concentration	Degradación de las materias activas		75 % mineralización	
	$t_{30w}$ (min)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (mM)	$t_{30w}$ (min)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (mM)
<b><math>\text{Fe}^{2+}</math></b>				
5 mg/L	175	38	460	75
20 mg/L	50	16	220	50
55 mg/L	35	17	125	48
<b><math>\text{Fe}^{3+}</math></b>				
5 mg/L	200	47	500	78
20 mg/L	55	17	220	54
55 mg/L	36	15	155	50

**Tabla 1.** Consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y tiempo de iluminación normalizado necesarios para la eliminación de las materias activas y para alcanzar el 75% de mineralización en el proceso de degradación de la mezcla de plaguicidas comerciales mediante foto-Fenton ( $\text{COD}_0 = 200 \text{ mg/L}$ ) a diferentes especies y concentraciones de hierro

Hay dos puntos a destacar en relación a los datos presentados. En primer lugar, los resultados obtenidos en los ensayos realizados con  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  fueron similares entre sí a las tres concentraciones. No se observó ninguna diferencia significativa entre las dos especies de hierro con respecto a la evolución del COD, aunque sí en la degradación de los plaguicidas individuales como se discutirá más adelante (ver tabla 2). Para justificar este hecho se describen a continuación algunas nociones básicas relacionadas con las reacciones que forman parte del mecanismo del proceso de foto-Fenton.

Los iones ferrosos se transforman rápidamente a férricos en presencia de un exceso de  $H_2O_2$  (en los primeros segundos de reacción tras la adición del  $H_2O_2$ ). Sin embargo, los radicales hidroxilo producidos por la reacción de Fenton (ecuación 3) no son suficientes para producir una oxidación significativa de la materia orgánica de manera. Cuando se parte de iones férricos, el  $Fe^{3+}$  se reduce a  $Fe^{2+}$ , debido a la presencia de  $H_2O_2$  (ecuaciones 4 y 5). La radiación por debajo de 580 nm es también responsable de la fotorreducción de iones férricos a ferrosos [Bauer y col., 1999]. La primera etapa es una reacción de transferencia de carga del ligando al metal, y a continuación, algunos de los complejos que se han formado se disocian como se muestra en la reacción 6 [Zepp y col., 1992]. El ligando puede ser cualquier base de Lewis capaz de formar un complejo con el ión férrico, como es el caso de  $OH^-$ ,  $H_2O$ ,  $HO_2^-$ ,  $Cl^-$ ,  $R-COO^-$ ,  $R-OH$ ,  $R-NH_2$ , etc. Dependiendo del ligando que reaccione, el producto puede ser o bien un radical hidroxilo como en las ecuaciones 7 y 8, o bien otro radical formado a partir del ligando.



La absorbancia de los complejos férricos depende del ligando que tengan asociado, por lo que la reacción 6 puede ocurrir a diferentes longitudes de onda y con

rendimientos cuánticos variables. El pH juega un papel fundamental en la eficiencia del proceso de foto-Fenton, porque tiene una fuerte influencia sobre la formación de los complejos. El valor de 2.8 se considera óptimo para el proceso de foto-Fenton, porque a este valor no se observa una precipitación significativa de hidróxidos de hierro y la especie de hierro predominante es  $[\text{Fe}(\text{OH})]^{2+}$ , complejo férrico descrito como el más foto-activo [Pignatello y col., 2006].

Considerando el mecanismo de la reacción, el comportamiento del sistema no debe depender sustancialmente del estado de oxidación inicial del hierro. Sin embargo, en la práctica podrían observarse algunas diferencias en las velocidades de degradación si se inicia con  $\text{Fe}^{2+}$  o con  $\text{Fe}^{3+}$ . La presencia de iones ferrosos provoca una rápida fase inicial de degradación [Gallard y col., 2000] basada en reacción 3. La relevancia de esta fase depende fundamentalmente del ratio molar entre el hierro y el contaminante, y por ello es más extensa cuanto mayor sea la concentración inicial de hierro. Por otra parte, cuando el hierro proviene de iones férricos, la velocidad de oxidación inicial es menor que la observada con  $\text{Fe}^{2+}$ , ya que el primer paso es la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (a partir de reacciones 4 y 5) y consecuentemente los radicales  $\bullet\text{OH}$  se generan a una menor velocidad [Segura y col., 2008].

En estos ensayos se hizo también un seguimiento de la concentración de los plaguicidas individuales mediante HPLC-UV. En todos los casos, la velocidad de degradación se ajustó a una cinética de orden cero, lo que supone que las velocidades de degradación de los plaguicidas no dependen de la concentración de compuesto, sino de la concentración de radicales hidroxilo. Debido a que todos los ensayos se realizaron en presencia de un exceso de peróxido de hidrógeno, el factor que limita la velocidad de generación de radicales hidroxilo es la concentración de hierro presente. Por eso, la velocidad de degradación debe aumentar cuanto mayor sea la concentración de hierro presente.

En la tabla 2 se muestran las constantes cinéticas de orden cero para los cinco plaguicidas individuales en los experimentos de degradación empleando las dos especies de hierro a las tres concentraciones descritas.

Compuesto	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)			Fe <sup>3+</sup> (mg/L)		
	5	20	55	5	20	55
Oxamilo	0.47 (0.99)	1.48 (0.99)	3.62 (0.9)	0.29 (0.91)	1.34 (0.98)	2.50 (0.96)
Metomilo	0.11 (0.98)	0.40 (0.97)	0.55 (0.93)	0.10 (0.91)	0.36 (0.99)	0.47 (0.97)
Imidacloprid	0.11 (0.99)	0.44 (0.99)	1.08 (0.9)	0.10 (0.91)	0.41 (0.99)	0.69 (0.99)
Pirimetamil	0.24 (0.99)	0.89 (0.96)	0.99 (0.9)	0.24 (0.92)	0.75 (0.98)	1.14 (0.99)
Dimetoato	0.32 (0.99)	0.99 (0.9)	1.69 (0.97)	0.39 (0.97)	1.16 (0.99)	1.56 (0.96)

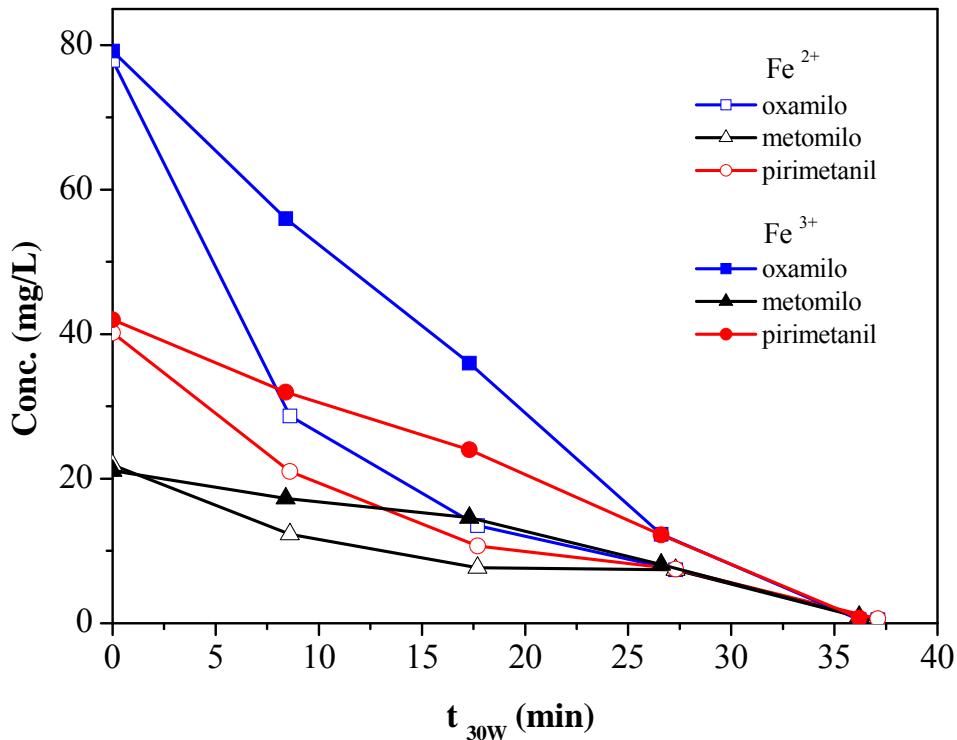
**Tabla 2.** Constantes cinéticas de orden cero (mg/L·min) y coeficientes de regresión lineal (R<sup>2</sup>) correspondientes a cada compuesto contenido en la mezcla de plaguicidas comerciales tratada con foto-Fenton

De acuerdo con lo esperado, el valor de las constantes cinéticas de todos los plaguicidas aumenta a medida que la concentración de hierro es mayor. Cabe destacar también que los valores de las constantes cinéticas al emplear Fe<sup>2+</sup> son ligeramente superiores que en el caso de Fe<sup>3+</sup>. Esto se debe a la fase de degradación inicial mencionada anteriormente (rápida oxidación de Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> con la consecuente generación de radicales •OH; efecto más notable en presencia de una mayor concentración de hierro y mayor relación molar Fe/contaminante).

No obstante, si el objetivo es la reducción del contenido orgánico presente en el agua, la elección de la especie inicial de hierro empleada es irrelevante, ya que sólo se observan diferencias significativas en la degradación de los plaguicidas individuales durante los primeros minutos de la reacción, pero no en el grado de mineralización, el tiempo de reacción o el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siempre y cuando se trabaje con concentraciones de hierro del orden de mM.

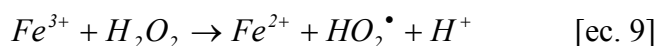
La figura 8 compara la degradación de tres de los cinco plaguicidas (oxamilo, metomilo y pirimetamil) a 55 mg/L de Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>. Los resultados obtenidos para los otros dos compuestos fueron similares. En las curvas de Fe<sup>2+</sup>, se observan dos regímenes cinéticos de degradación diferentes: una primera etapa de degradación

durante los primeros minutos de reacción (con una pendiente más acusada), seguida por una fase más lenta que se extiende hasta la oxidación completa de los plaguicidas individuales. Esto demuestra la generación de una mayor cantidad de radicales hidroxilo como consecuencia de la oxidación inicial de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (ecuación 3). Este efecto se observó en los ensayos a las tres concentraciones de hierro, siendo más pronunciado a mayor concentración de hierro (efecto más notable a 55 mg/L).



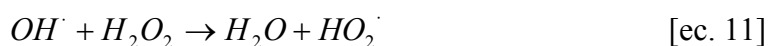
**Figura 8.** Evolución de la concentración de tres plaguicidas (oxamilo, metomilo, pirimetanil) a 55 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$  y 200 mg/L de COD inicial durante la degradación de la mezcla de cinco plaguicidas comerciales mediante foto-Fenton

Con respecto a las diferentes concentraciones de hierro, se observó que al trabajar con 5 mg/L el tratamiento fue notablemente más lento (ver tabla 1), ya que para alcanzar el 75 % de mineralización se requirió un mayor tiempo de tratamiento y un consumo de peróxido de hidrógeno superior para ambas especies de hierro. Esto se debe a que al disponer de concentraciones bajas de hierro todo el proceso se ve limitado ya que se dispone de una cantidad de catalizador insuficiente. Esto también provoca que parte del peróxido de hidrógeno se consuma en reacciones no deseadas en las que se generan radicales menos reactivos que el  $\bullet\text{OH}$ , como es el caso de la reacción 9.



Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con las otras dos concentraciones de hierro (20 y 55 mg/L), aunque como era esperable, la eficiencia fue ligeramente superior en el caso de 55 mg/L de hierro, ya que se dispone de mayor cantidad de catalizador. Considerando el diseño del foto-reactor, la concentración de hierro en ambos casos se considera suficiente para absorber toda la radiación solar, aumentando así las velocidades de las reacciones 7 y 8, y produciendo una rápida regeneración de los iones ferrosos. Se ha demostrado que en estas condiciones la cantidad de fotones absorbida es similar tanto a 20 como a 55 mg/L de hierro en un foto-reactor solar de 5 cm de diámetro (paso de luz) [Oller y col., 2007].

Por otro lado, la cantidad de peróxido de hidrógeno requerida para alcanzar un mismo grado de mineralización es menor a medida que aumenta la concentración de hierro presente (ver tabla 1). Esto se debe a que en presencia de concentraciones de hierro elevadas, el proceso se ve acelerado por dos efectos añadidos. En primer lugar, la regeneración fotocatalítica de los iones ferrosos es más rápida, y por tanto hay más  $Fe^{2+}$  disponible para reaccionar con  $H_2O_2$  y producir radicales hidroxilo. Por tanto, el consumo de  $H_2O_2$  se realiza de manera más eficiente. Cuando el proceso es más lento (menor concentración de hierro) parte del  $H_2O_2$  presente se pierde en reacciones no deseables, como es el caso de la descomposición en agua y oxígeno. Las ecuaciones 10 – 12 muestran algunos ejemplos de reacciones que tienen lugar cuando la concentración de  $H_2O_2$  es demasiado elevada [Gerjnak y col., 2006; Walling y col., 1975]. Obviamente, estas reacciones reducen la eficiencia global del proceso de degradación mediante foto-Fenton.

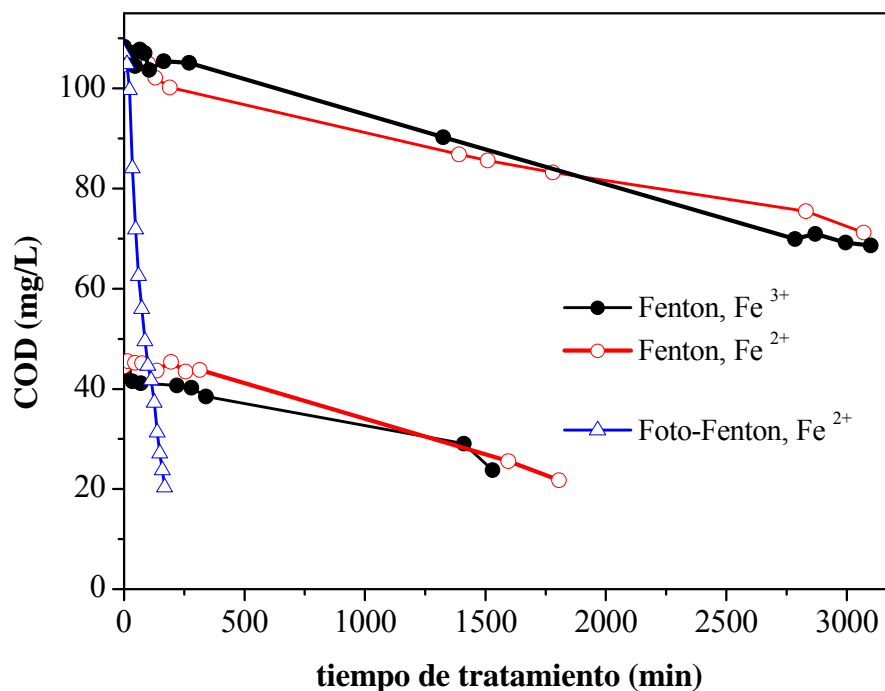


Tras el análisis de los resultados obtenidos puede concluirse que la eficiencia del proceso de degradación de la mezcla de plaguicidas mediante foto-Fenton es ligeramente superior cuando se parte de  $Fe^{2+}$ , aunque las diferencias encontradas no son significativas, siendo posible el uso indistinto de  $Fe^{2+}$  o  $Fe^{3+}$ .

En cuanto a la concentración de hierro, a pesar de obtener una eficiencia mayor cuando se trabaja a 55 mg/L, la mejora con respecto a 20 mg/L no es crítica. Aunque es evidente que un aumento de la concentración de catalizador conduce a un aumento de la velocidad de degradación, se ha comprobado que operando a 20 mg/L el proceso de foto-Fenton es efectivo. Otro punto a considerar es que el objetivo último del estudio es la evaluación de la biocompatibilidad de la mezcla tras un pretratamiento con foto-Fenton, y para esto concentraciones muy altas de hierro no son deseables. Por todo ello, los estudios posteriores se realizaron empleando 20 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$ .

### 3.2. Ensayos de Fenton

Para completar el estudio de la degradación de la mezcla de plaguicidas también se realizaron estudios de Fenton, empleando las dos especies de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ), esta vez sólo a 20 mg/L. Los experimentos se llevaron a cabo a dos valores iniciales de COD (50 y 100 mg/L; una quinta parte proveniente de cada plaguicida comercial). En este caso no se empleó el valor de 200 mg/L debido a que las reacciones de Fenton son mucho más lentas que las de foto-Fenton. No obstante, con el fin de comparar la eficiencia de ambos procesos se realizó un ensayo de foto-Fenton empleando 20 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$  a 100 mg/L de COD inicial. En la figura 9 se muestra la evolución de la mineralización de la mezcla de plaguicidas tanto en el proceso de Fenton (a los dos valores de COD para las dos especies de hierro) como en el ensayo de foto-Fenton. Para facilitar la comparación, en este caso el tiempo en el proceso de foto-Fenton se expresa como tiempo de reacción y no como tiempo de iluminación normalizado ( $t_{30W}$ ). En este ensayo, la radiación media recibida fue de 38 W/m<sup>2</sup>.



**Figura 9.** Comparación de la degradación de la mezcla de los cinco plaguicidas comerciales mediante Fenton (empleando 20 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ), y diferentes COD iniciales, 50 y 100 mg/L) y Foto-Fenton a 100 mg/L de COD inicial y 20 mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ . La variable independiente se expresa en ambos casos como tiempo absoluto de tratamiento.

Al igual que en los experimentos de foto-Fenton, no se observó ninguna diferencia significativa en la mineralización de la mezcla mediante Fenton empleando  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ . El  $\text{Fe}^{2+}$  se convierte en  $\text{Fe}^{3+}$  en la fase inicial del proceso de Fenton según la reacción 3. Puesto que la concentración inicial de hierro no es muy elevada, la cantidad inicial de radicales  $\cdot\text{OH}$  generados cuando se parte de  $\text{Fe}^{2+}$  no es muy alta. Debido a que la generación de radicales  $\cdot\text{OH}$  en la etapa inicial no es muy relevante, la mineralización de la mezcla es similar partiendo de ambas especies de hierro en el proceso de Fenton.

Por otro lado, el proceso de foto-Fenton resultó ser mucho más efectivo (mayor mineralización, menor tiempo de tratamiento) que el de Fenton. En la tabla 3 se muestra una comparación de ambos procesos en las mismas condiciones iniciales de operación (COD: 100 mg/L; 20 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $T^a$ : 35 ° C). Después de 3000 minutos de reacción, en el proceso de Fenton sólo se consiguió un 35 % de mineralización, mientras que en el proceso de foto-Fenton se observó un 80 % de reducción del DOC en 240 minutos de



reacción ( $t_{30W}$ : 168 minutos). Sin embargo, cabe destacar que el consumo de  $H_2O_2$  requerido para la degradación de las materias activas fue del mismo orden en ambos casos (6 mM aproximadamente).

	Fenton	foto-Fenton
Tiempo de reacción requerido para la eliminación de las materias activas (min)	820	45
$H_2O_2$ consumido para la eliminación de las materias activas (mM)	5.5	6
$H_2O_2$ consumido para conseguir el 20 % de mineralización	6.7	10
$H_2O_2$ consumido para conseguir el 35 % de mineralización	10	15

**Tabla 3.** Comparación de los procesos de Fenton y foto-Fenton en la degradación de la mezcla de los cinco plaguicidas comerciales a 20 mg/L de  $Fe^{2+}$  y 100 mg/L de COD inicial

Teniendo en cuenta estos resultados, se concluye que el proceso de Fenton como único tratamiento no es una opción viable para la degradación de la mezcla de plaguicidas seleccionada en combinación con un tratamiento biológico, ya que requiere tiempos de tratamiento muy elevados para conseguir la eliminación de las materias activas o un grado de mineralización significativo. Es evidente que si se emplearan concentraciones de hierro más altas, se obtendrían mejores resultados. Sin embargo y debido a que el objetivo último del estudio es determinar la biocompatibilidad de la mezcla tras la aplicación de un PAO, la concentración de hierro en el efluente debe minimizarse.

No obstante, la combinación de los procesos de Fenton / foto-Fenton se presenta como una opción atractiva para mejorar la eficiencia global del proceso. Según la tabla 3, el consumo de  $H_2O_2$  requerido para alcanzar cierto grado de mineralización es ligeramente menor en el proceso de Fenton. Considerando el modo de operación en una planta solar, el tratamiento podría mejorarse intercalando la reacción de Fenton en períodos de oscuridad o ausencia de radiación. De esta manera, la degradación de los contaminantes, aunque lenta, seguiría llevándose a cabo con un consumo eficiente del

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo se debe comprobar que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente no sea excesivamente alta para evitar reacciones paralelas en las que el reactivo se consuma de manera ineficiente (reacciones 10-12).

### 3.1. Análisis de toxicidad y biodegradabilidad

Estos ensayos se realizaron con el objetivo de conocer la influencia del proceso de foto-Fenton en la evolución de la toxicidad y biodegradabilidad de la mezcla inicial. La idea es conocer si mediante foto-Fenton se puede aumentar la biodegradabilidad y reducir la toxicidad, siendo adecuado como pre-tratamiento de aguas industriales que contienen compuestos tóxicos y no biodegradables.

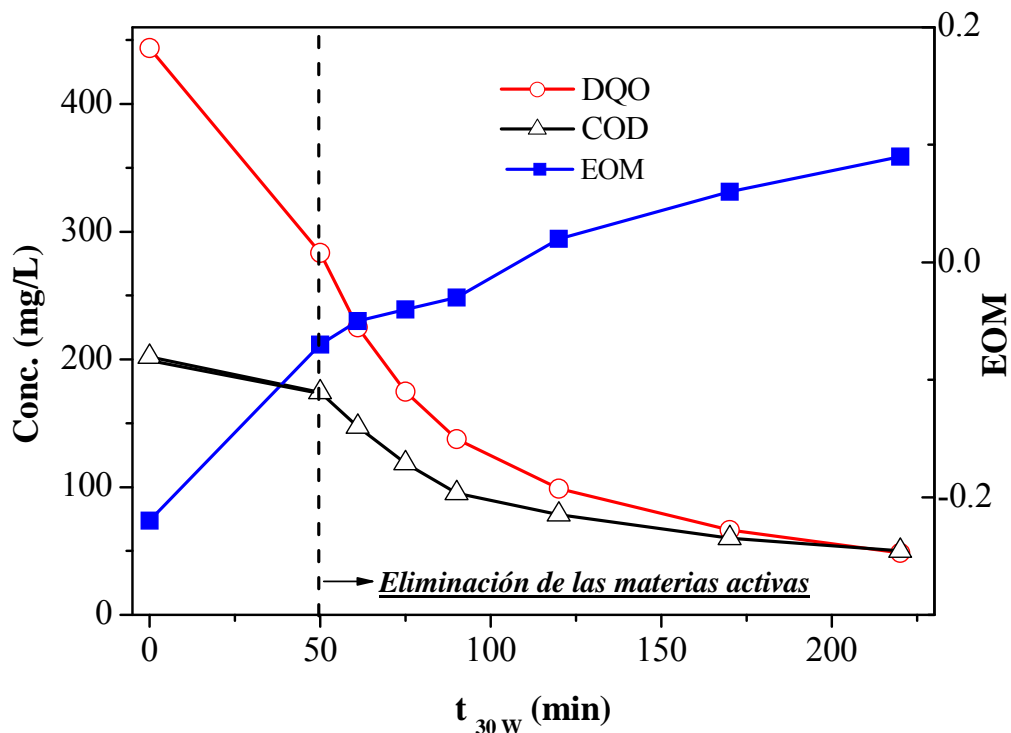
Para ello se realizó un ensayo de foto-Fenton con 200 mg/L de COD inicial, 20 mg/L de Fe<sup>2+</sup> y a 35 ° C, y se tomaron varias muestras para el análisis de la toxicidad y biodegradabilidad. Durante este experimento se realizó el seguimiento no sólo del COD, sino también de la DQO. Con estos dos parámetros se evaluó también el Estado de Oxidación Medio (EOM) de la disolución. El EOM permite conocer la evolución del grado de oxidación de la mezcla y por tanto proporciona una idea de en qué etapas del tratamiento de fotocatalisis es más conveniente realizar bioensayos. Variaciones sustanciales del EOM suelen ir aparejados con diferencias importantes en biodegradabilidad y toxicidad. El EOM es una relación entre la DQO y el COD, y se obtiene de acuerdo a la ecuación 13 [Matzavinos y col., 2004; Scott y col., 1995].

$$EOM = \frac{4(COD - DQO)}{COD} \quad [\text{ec. 13}]$$

En esta ecuación el COD está expresado en moles de C/L y la DQO en moles de O<sub>2</sub>/L. El valor del EOM varía entre +4 correspondiente al estado más oxidado del carbono (cuando todo el C está en forma de CO<sub>2</sub>), y -4 que corresponde al estado más reducido del carbono (cuando se encuentra en forma de CH<sub>4</sub>). Normalmente el EOM aumenta con el tiempo de tratamiento fotocatalítico hasta alcanzar un máximo a partir del cual permanece aproximadamente constante. A partir de ese momento, el EOM de los intermedios generados no cambia sustancialmente, incluso aunque continúe el tratamiento. La formación de intermedios (orgánicos) de reacción cada vez más oxidados demuestra indirectamente que el tratamiento es capaz de seguir mejorando la biodegradabilidad del agua, ya que los compuestos más oxidados suelen ser,

generalmente, más biodegradables que los menos oxidados. Pero el momento en el que el EOM se estabiliza indica una oxidación muy avanzada de la mezcla de forma que si continúa el PAO conducirá únicamente a la mineralización total de la misma. Además, es necesario destacar que en el período en el que el EOM permanece constante, las velocidades de degradación de la DQO y del COD suelen ser muy parecidas.

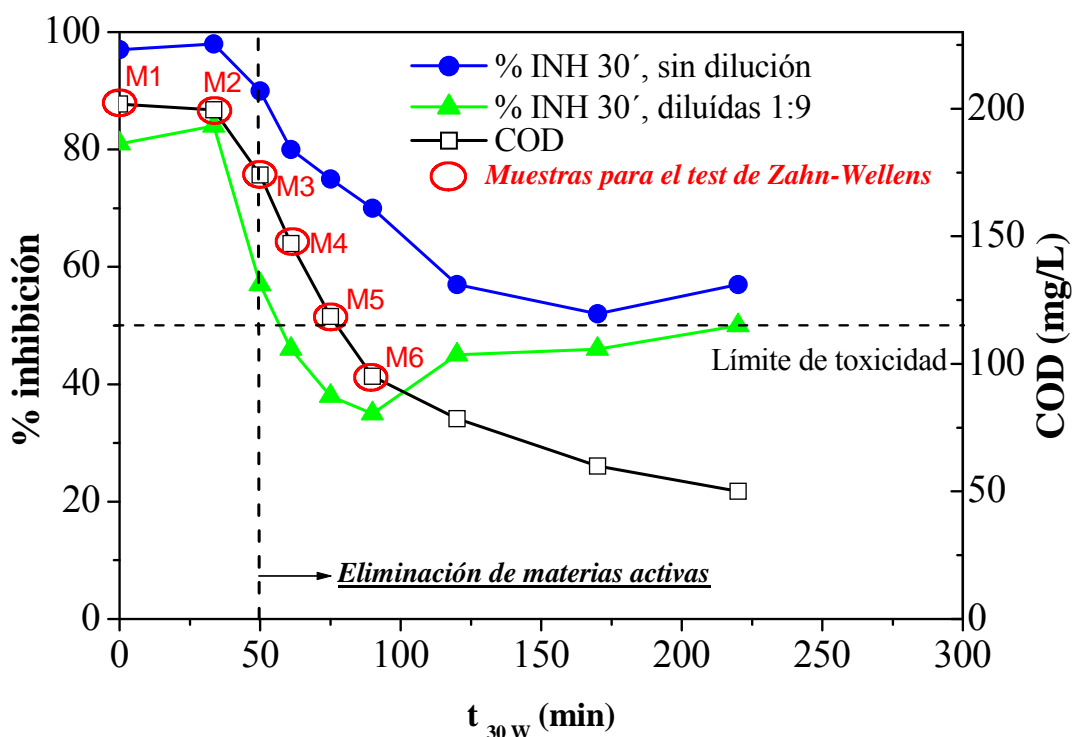
En la figura 10 se representa la evolución del COD, la DQO y el EOM durante el proceso de degradación de foto-Fenton de la mezcla de plaguicidas. Puede observarse que el EOM aumenta de manera gradual a medida que avanza el tratamiento, lo que significa que durante el proceso de foto-Fenton se generan intermedios cada vez más oxidados, provocando un cambio en la naturaleza química de la mezcla. Como se ha mencionado anteriormente, esto puede ser un indicativo de que el tratamiento fotocatalítico es capaz de mejorar la biodegradabilidad de la mezcla inicial. También se aprecia que a tiempos de tratamiento altos, el EOM se va estabilizando.



**Figura 10.** Evolución del COD, la DQO y el EOM durante la degradación de la mezcla de los plaguicidas comerciales mediante foto-Fenton a 200 mg/L de COD inicial y 20 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$

Para corroborar estos resultados, se realizaron estudios de toxicidad y biodegradabilidad. En la figura 11 se muestran los resultados de la evolución de la

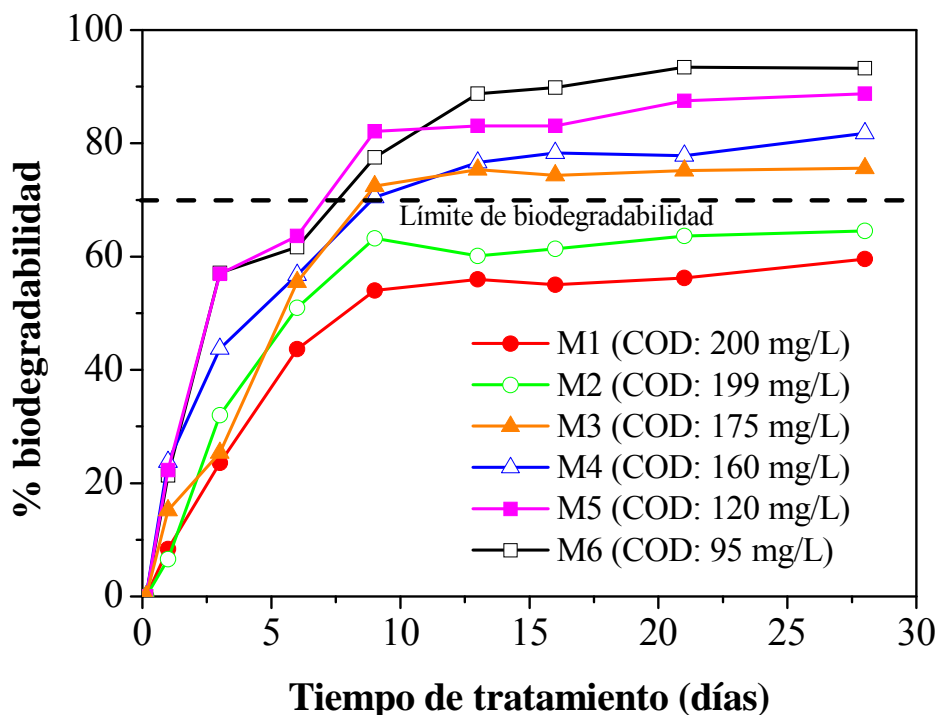
toxicidad durante el tratamiento de foto-Fenton expresada en porcentaje de inhibición de la bacteria *Vibrio Fischeri* tras 30 minutos de exposición a las muestras. Estos análisis se realizaron tanto en las muestras sin diluir como diluidas 10 veces para poder observar la tendencia en caso de que las muestras originales presentaran una toxicidad muy elevada. Sin embargo, en ambos casos se obtuvieron resultados similares. En las muestras diluidas, el porcentaje de inhibición se redujo desde el 80 % de la muestra inicial hasta un 50 % tras el tratamiento de foto-Fenton (75 % de mineralización). Cabe destacar que se observaron algunos puntos intermedios en los que se registró una toxicidad más baja, y que la bajada más pronunciada se produjo en las muestras inmediatamente posteriores a la degradación total de las materias activas ( $t_{30W} = 50$  minutos, 175 mg/L de COD). La subida final en los valores de toxicidad puede atribuirse a la formación de intermedios finales de degradación, antes los que la bacteria *Vibrio Fischeri* muestra una mayor sensibilidad.



**Figura 11.** Porcentaje de inhibición de la bacteria *Vibrio Fischeri* tras 30 minutos de exposición de muestras parcialmente tratadas por foto-Fenton ( $COD_0$ : 200 mg/L; 20 mg/L  $Fe^{2+}$ )

Debido a que los resultados muestran cambios continuos (también EOM indicaba que se estaban produciendo variaciones sustanciales de la composición durante el tratamiento) en los porcentajes de inhibición durante el tratamiento, para extraer

conclusiones fiables es necesario complementar estos estudios con análisis de biodegradabilidad. En este caso se escogió el test de Zahn-Wellens para la evaluación de la biodegradabilidad. Se seleccionaron seis muestras representativas de la evolución del fototratamiento (marcadas en la figura 11). La muestra 1 (M1) es la mezcla original de los plaguicidas sin tratar. La 2 (inicio del proceso) aún contiene concentraciones considerables de materias activas y en la 3 sólo se detectaron trazas de los cinco plaguicidas. El resto de las muestras se tomaron tras la completa degradación de los mismos. La evolución de la concentración de los cinco plaguicidas en las muestras 1 y 2 también se evaluó durante los 28 días del tratamiento. Las concentraciones de metomilo, imidacloprid y dimetoato permanecieron constantes durante todo el ensayo pero se observó una disminución gradual en las concentraciones de oxamilo y pirimetanil. La desaparición del oxamilo puede justificarse porque a pH neutro este compuesto se hidroliza dando lugar a un producto de hidrólisis estable,  $C_5H_{10}N_2O_2S$  [Harvey y col., 1978], compuesto que después de generarse se mantuvo en la disolución durante el tratamiento, indicando que tampoco es biodegradable. La reducción en la concentración del pirimetanil se atribuyó a adsorción en la biomasa. Una vez finalizado el test, las muestras 1 y 2 se mezclaron con cierta cantidad de acetonitrilo (1:1) para favorecer la desorción de los posibles compuestos adsorbidos en el fango activado. El análisis mediante HPLC-UV mostró una cantidad de pirimetanil adsorbido concordante con el que había inicialmente en el agua. Puede concluirse por tanto, que estos cinco plaguicidas son no biodegradables. En la figura 12 se muestra el resultado del test de Zahn-Wellens, expresado en porcentaje de biodegradabilidad de cada muestra en función del tiempo de tratamiento. Las muestras 1 y 2 resultaron ser no biodegradables, alcanzándose sólo un 50 y un 60 % de biodegradabilidad tras los 28 días; mientras que el resto de las muestras (COD < 175 mg/L; sin plaguicidas) alcanzaron el 70 % de biodegradabilidad en nueve días o menos. Cabe destacar que el resultado de la muestra 2 no es concluyente respecto a la biodegradabilidad (60%), ya que habitualmente el método de Z-W es más restrictivo que lo que ocurriría en un bioreactor a escala industrial. Parece que la biomasa es capaz de degradar una parte importante del COD de M2. No obstante, y debido a que los cinco plaguicidas son no biodegradables, la biomasa no sería capaz de eliminarlos, y el tratamiento global resultaría ineficiente ya que habría plaguicidas en el efluente del bioreactor. Por ello, la opción adecuada es aplicar el tratamiento biológico solo después de que se hayan eliminado los plaguicidas en el proceso de foto-Fenton.



**Figura 12.** Test de biodegradabilidad de Zahn-Wellens (Z-W) de las muestras parcialmente tratadas con foto-Fenton (marcadas en la Figura 12)

El aumento de biodegradabilidad que se observa a medida que el tratamiento de foto-Fenton avanza está en consonancia con la evolución del EOM mencionada anteriormente y con la caída de la toxicidad.

Teniendo en cuenta estos estudios se demuestra que un tratamiento integrado que combine foto-Fenton y tratamiento biológico es una opción efectiva para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con una mezcla de plaguicidas comerciales. Con el fin de optimizar el sistema combinado, la etapa de foto-Fenton debe reducirse al mínimo posible, para eliminar una gran parte de la materia orgánica en el tratamiento biológico, mucho más económico y respetuoso con el medio ambiente [Muñoz y col., 2007].

Según los resultados obtenidos en el estudio de diferentes especies y concentraciones de hierro, el peróxido de hidrógeno requerido para lograr la eliminación de los cinco plaguicidas originales (15 – 17 mM) es mucho menor que para alcanzar el 75 % de la mineralización (50 mM) para 20 y 55 mg/L con ambas especies de hierro (ver tabla 1). Sin embargo, los tiempos de iluminación necesarios son ligeramente inferiores en el caso de 55 mg/L de hierro, debido a la mayor cantidad de catalizador

presente. No obstante, como el objetivo es combinar el proceso de foto-Fenton con un tratamiento biológico no es conveniente trabajar con concentraciones de hierro muy elevadas, ya que puede ser perjudicial para la biomasa. Considerando además que el parámetro de optimización más relevante en un proceso de foto-Fenton es el  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido, se escoge 20 mg/L como la concentración de hierro más adecuada para el diseño de un sistema acoplado de depuración de aguas contaminadas con plaguicidas.

## **CONCLUSIONES**

Se ha demostrado que el proceso de foto-Fenton puede emplearse como pretratamiento capaz de aumentar la biodegradabilidad de un agua contaminada con una mezcla de cinco plaguicidas comerciales. Las principales conclusiones del estudio se resumen a continuación:

1) El hecho de que el catalizador original provenga de sal ferrosa o férrica no es una decisión crítica en el diseño del proceso. Los resultados de degradación obtenidos en ambos casos fueron similares en términos de mineralización y consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . No obstante, los iones ferrosos son ligeramente más activos en la fase inicial, debido a la rápida generación de radicales activos en el ciclo redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ .

2) 20 mg/L se considera la concentración más adecuada para llevar a cabo el proceso de foto-Fenton en fotoreactores tubulares con diámetro de tubo del orden de varios centímetros.

2) El proceso de foto-Fenton es mucho más efectivo que el de Fenton para la degradación de la mezcla de plaguicidas seleccionada. En las mismas condiciones de operación, la reacción de Fenton es 40 veces más lenta para conseguir la eliminación de las materias activas.

3) Según los análisis de toxicidad y biodegradabilidad, el planteamiento óptimo para el tratamiento de las aguas tratadas sería la aplicación de un proceso de foto-Fenton hasta conseguir la completa degradación de las materias activas, seguido de un biotratamiento.

**REFERENCIAS**

- Augugliaro V., Litter M., Palmisano L., Soria J. (2007) The combination of heterogeneous photocatalysis with chemical and physical operations: A tool for improving the photo process performance. *J. Photochem. Photobio. C: Photochem. Reviews*, 7, 123-144.
- Ballesteros Martín, M.M., Sánchez Pérez, J.A., Acién Fernández, F.G., Casas López, J.L., García-Ripoll, A.M., Arques, A., Oller, I., Malato Rodríguez, S. (2008) Combined photo-Fenton and biological oxidation for pesticide degradation: Effect of photo-treated intermediates on biodegradation kinetics, *Chemosphere* 70 (8), pp. 1476-1483.
- Bauer R., Waldner G., Fallmann H., Hager S., Klare M., Krutzler T., Malato S. and Maletzky P. (1999) The photo-Fenton reaction and the TiO<sub>2</sub>/UV process for wastewater treatment – novel developments. *Catal. Today*. 53, 131-144.
- Blanco-Galvez J. Fernández-Ibáñez P. and Malato-Rodríguez S. (2007) Solar Photocatalytic Detoxification and Disinfection of Water: Recent overview. *J. Solar Energy Eng.* 129, 4-15.
- Bressan M., Liberatorre L., D'Alessandro N., Tonucci L., Belli C., Ranalli G. (2004) Improved combined chemical and biological treatments of olive oil mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1228-1233.
- Comninellis, A. Kapalka, S. Malato, S.A. Parsons, I. Polios, D. Mantzavinos. (2008) Advanced oxidation processes for water treatment: Advances and trends for R&D. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 83, 769-776.
- Dalzell D., Alte S., Asichueta E., De la Sota A., Etxebarria J., Gutierrez M., Hoffmann C.C, Sales D., Obst U., Chistofi N. (2002). A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere* 47 (5), 535-545
- Directiva 1996/61/EC del Parlamento europeo del 24 de Septiembre del 1996.
- Directiva 2000/60/EC del Parlamento europeo del 23 de Octubre del 2000.
- Directiva 2008/105/EC del Parlamento europeo del 16 de Diciembre del 2008.



- EPA, United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101). Fates, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3200 Zahn-Wellens/EMPA Test. EPA 712-C-96-084 (April 1996).
- Farias, J., Albizzati, E.D., Alfano, O.M. (2009); Kinetic study of the photo-Fenton degradation of formic acid. Combined effects of temperature and iron concentration, *Catalysis Today* 144 (1-2), pp. 117-123
- Gallard, H., and De Laat, J. (2000) Kinetic modelling of Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation reactions in dilute aqueous solution using atrazine as a model organic compound, *Water Res.* 34, 3107–3116.
- Gernjak, W., Fuerhacker, M., Fernández-Ibañez, P., Blanco, J., Malato, S. (2006) Solar photo-Fenton treatment - Process parameters and process control, *Applied Catalysis B: Environmental* 64 (1-2), 121-130.
- Gernjak W., Krutzler T., Malato S., Bauer R. (2007) Photo-Fenton Treatment of Olive Mill Wastewater Applying a Combined Fenton/Flocculation Pretreatment. *J. Solar Energy Eng.* 129, 53-59.
- Gogate P.R., Pandit A.B. (2004) A review of imperative technologies for wastewater treatment I: Oxidation technologies at ambient conditions. *Adv. Environ. Res.* 8, 501-551.
- González, O., Esplugas, M., Sans, C., Esplugas, S (2008) Combination of photo-Fenton and biological SBBR processes for sulfamethoxazole remediation. *Water Science and Technology* 58 (9), pp. 1707-1713.
- Harvey J., Han J.C, (1978) Decomposition of oxamyl in soil and water, *J. Agric. Food. Chem.*, Vol. 26, 536-541.
- Herrmann J.M. (2005) Heterogeneous photocatalysis: state of the art and present applications. *Topics in Catalysis*, 14(1-4), 48-65.
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., Kassinos, D. (2009) Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes; *Environment International* 35 (2), pp. 402-417.
- Lee C., Yoon J. (2004) Temperature dependence of hydroxyl radical formation in the hv/Fe<sup>3+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fe<sup>3+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems, *Chemosphere* 56, 923–934.

- Lapertot M., Pulgarín C., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M.I., Pérez-Estrada L., Oller I., Gernjak W., Malato S. (2006) Enhancing biodegradability of priority substances (pesticides) by solar photo-Fenton, *Water Res.* 40, 1086-1094.
- Malato S., Blanco J., Vidal A., Alarcón D., Maldonado M.I., Cáceres J. and Gernjak W. (2003) Applied studies in solar photocatalytic detoxification: An overview. *Sol. Energy* 75, 329-336.
- Malato S., Blanco J., Vidal A., Richter C., (2002) Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: An overview. *Applied Catalysis B: Environmental* 37 (1), 1-15.
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M.I., Blanco, J., Gernjak, W. (2009) Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends, *Catalysis Today* 147 (1), pp. 1-59
- Moraes J. E. F., Quina, F. H., Nascimento, C. A. O., Silva, D. N., Chiavone-Filho O. (2004) Treatment of saline wastewater contaminated with hydrocarbons by the photo-Fenton process. *Environmental Science and Technology* 38, 1183-1187
- Mosteo, R., Gumy, D., Pulgarin, C. (2008), Coupled photo-Fenton-biological system: Effect of the Fenton parameters such as residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup> and pH on the efficiency of biological process, *Water Science and Technology* 58 (8), pp. 1679-1685.
- Muñoz I, Peral J., Ayllón J. A., Malato S., Martín M. J., Perrot J. Y., Vincent M., Domènech X. (2007) Life cycle assessment of a coupled advanced oxidation-biological process for wastewater treatment. Comparison with granular activated carbon adsorption. *Environ. Engineering Sci.*, 24(5), 638-651.
- Nogueira R.F.P., Mirela C.O., Paterlini W.C. (2005) Simple and fast spectrophotometric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in photo-Fenton reactions using metavanadate. *Talanta*, 66, 86-91.
- Oller I., Malato S., Sánchez-Pérez J.A., Maldonado M.I., Gassó R. and Blanco J. (2007) Detoxification of wastewater containing five common pesticides by Solar AOPs-Biological coupled system, *Cat. Today, Catalysis Today* 129, pp. 69-78.

- Parra S., Sarria V., Malato S., Péringer P., Pulgarín C. (2000) Photochemical versus coupled photochemical-biological flow system for the treatment of two biorecalcitrant herbicides: metobromuron and isoproturon. *Applied Catalysis B: Environmental* 27, 153-168.
- Pignatello J J., Oliveros E. and MacKay A. (2006) Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.*, 36, 1-84.
- Ricco G., Tomei M.C., Ramadori R., Laera G. (2004). Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: Comparison between respirometry and Microtox®. *Water Res.* 38 (8), 2103-2110.
- Sagawe G., Lehnard A., Lübber M., Bahnemann D. (2001) The insulated solar Fenton hybrid process: Fundamental investigations. *Helv. Chem. Acta*, 84, 3742-3758.
- Sarria V., Parra S., Alder N., Péringer P., Benítez N., Pulgarín C. (2002) Recent development in the coupling of photoassisted and aerobic biological processes for the treatment of biorecalcitrant compounds. *Catal. Today* 76, 301-315.
- Sarria, V.; Deront, M.; Péringer, P.; Pulgarín, C. (2003) Degradation of a biorecalcitrant dye precursor present in industrial wastewaters by a new integrated iron(III) photoassisted-biological treatment. *Appl. Catal., B*, 40 (3), 231.
- Scott J.P., Ollis D.F. (1997) Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment II: recent illustrations and experiences. *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2(3). 374-381.
- Segura, C., Zaror, C., Mansilla, H. D., and Mondaca, M. A. (2008) Imidacloprid oxidation by photo-Fenton reaction, *J. Hazard. Mat.* 150, 679-686.
- Suárez S., Carballa M., Omil F., Lema J.M. (2008) How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters?, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 125-138.
- Walling C. (1975) Fenton's Reagent Revisited, *Accounts of Chemical Research* 8 (4), pp. 125-131.

- Zaror C., Segura C., Mansilla H., Mondaca M.A., González P. (2008) Effect of temperature on Imidacloprid oxidation by homogeneous photo-Fenton processes. *Water Science and Technology*, 58, 259-264.
- Zepp R.G., Faust B.C. and Hoigné J. (1992). Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron (II) with hydrogen peroxide: The photo-Fenton reaction. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 313-319.

## **ANEJO I: Artículo de investigación**

*Solar photo-Fenton treatment of pesticides in water:  
Effect of iron concentration on degradation and  
assessment of ecotoxicity and biodegradability.*

A. Zapata, T. Velegraki, J.A. Sánchez-Pérez, D. Mantzavinos, M.I. Maldonado, S. Malato. Applied Catalysis B: Environmental, 88 (2009) 448–454.