

DIPLOMA DE ESTUDIOS
AVANZADOS

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
QUÍMICA**
Universidad de Almería

**PROGRAMA DE DOCTORADO: “*INGENIERÍA DE
BIOPROCESOS: FÁRMACOS, MEDIOAMBIENTE Y
ALIMENTACIÓN*”**

Profesor Responsable:

Jose Antonio Sánchez Pérez

Alumna:

Isabel Oller Alberola

MEMORIA RESUMEN DEL PERÍODO

DOCENTE

**PROGRAMA DE DOCTORADO: “INGENIERÍA DE
BIOPROCESOS: FÁRMACOS, MEDIOAMBIENTE Y
ALIMENTACIÓN”**



Departamento: Ingeniería Química.

Curso: 2003 – 2004.

Profesor Responsable: Jose Antonio Sánchez Pérez.

Alumna: Isabel Oller Alberola. Becaria FPI del Ministerio de Educación y Ciencia (ref: BES-2004-3767). Beca asociada al proyecto nacional con ref: PPQ 2003-07596-C03-01.

ÍNDICE: PERÍODO DOCENTE

Procesos de Oxidación Avanzada: Aplicaciones Medioambientales	3
Cinética del Crecimiento de Microorganismos	6
Diseño y Análisis de Biorreactores	10
Evaluación Económica de Bioprocesos	13
Metodología y Técnicas del Trabajo de Investigación científico	17
Genética Aplicada a la Biotecnología	20
Lípidos Estructurados	24

PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA: APLICACIONES
MEDIOAMBIENTALES

Programa: Ingeniería de Bioprocesos: Fármacos, Medioambiente y Alimentación

Profesores: Sixto Malato Rodríguez.

Duración: 30 horas

Evaluación:

La evaluación llevó a cabo teniendo en cuenta tanto la asistencia a clase, como la realización de un estudio bibliográfico sobre un plaguicida de uso común en la agricultura intensiva de la provincia de Almería.

Guión de contenidos:

1. Introducción.
2. Oxidación Avanzada.
 - a. Fundamentos.
 - b. Procesos.
 - c. Parámetros principales.
3. Tecnología.
 - a. Reactores con lámparas.
 - b. Reactores solares.
4. Aplicaciones.
 - a. Tratamiento de aguas.
 - b. Tratamiento de gases.
5. Posibles líneas de Evolución.
 - a. Colectores solares.
 - b. Catalizadores.
 - c. Aplicación de metodologías analíticas avanzadas y biotoxicidad.
 - d. Combinación con otras tecnologías de depuración de aguas.

Resumen:

El curso comenzó con una breve introducción a la problemática ambiental que supone el creciente uso en los últimos años de compuestos químicos resistentes en grado variable, tóxicos o no biodegradables (plaguicidas, aguas de la industria de celulosa y textil, etc.), y que no pueden ser procesados eficientemente por plantas convencionales de tratamiento biológico (por adsorción con carbón activado, etc.). En este contexto la legislación europea es cada vez más restrictiva con el objetivo de conseguir una completa reutilización de las aguas contaminadas (Integrated Pollution Prevention and Control Directive IPPC Directive, 96/61/EC) y la reducción de emisiones de sustancias consideradas como prioritarias para la unión europea (Water Framework Directive 2000/60/EC).

Con este propósito se está recurriendo en los países industrializados al uso de las llamadas Tecnologías o Procesos Avanzados de Oxidación (TOAs, POAs) que pueden aplicarse a la detoxificación de aquellas aguas contaminadas en pequeña o mediana escala. Se basan en procesos fisicoquímicos que involucran la generación y uso de especies transitorias de gran poder oxidante, principalmente el radical $\bullet\text{OH}$. Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida luz solar) o por otras formas de energía, y tiene una alta efectividad para la oxidación completa a CO_2 de la materia orgánica. Entre todos los POAs existentes, aquellos que pueden llevarse a cabo usando la energía procedente de la radiación solar han adquirido un especial interés en los últimos años: foto-Fenton y fotocatalisis heterogénea con UV/TiO_2 . En cuanto a los parámetros principales analizados en estos procesos se encuentran: la fotólisis-adsorción-termólisis, balance de materia, concentración de O_2 disuelto, concentración de TiO_2 en suspensión, la concentración inicial de contaminante, la intensidad de radiación, el flujo fotónico y el tipo de reactor.

A continuación se describieron las dos tecnologías empleadas en el desarrollo de los Procesos de Oxidación Avanzada para la detoxificación de aguas contaminadas: se trata de los reactores con lámparas y reactores solares.

- En los reactores con lámparas se emplean lámparas como fuente de luz, las más usadas son de mercurio de xenón y los llamados simuladores solares. Proporcionan luz en un rango de longitudes de onda por debajo de los

400nm. Las intensidades empleadas van de los 2 a los 135 mWcm⁻² y las potencias de unas pocas decenas a cientos de vatios.

- En los reactores solares, los primeros sistemas estaban basados en colectores cilindro parabólicos (CCPs), tienen mecanismos de seguimiento solar en uno o dos ejes y se basan en una parábola que refleja y concentra la luz solar, pueden usar sólo radiación solar directa. Tiene un alto coste, son complejos y tienen altas necesidades de mantenimiento. Más adelante se diseñaron los sistemas solares estáticos y sin concentración, colectores parabólicos compuestos (CPCs), están constituidos por una superficie reflectante que sigue una forma involuta alrededor de un reactor cilíndrico y pueden alcanzar un factor de concentración de hasta 10 soles gracias a la forma geométrica de su superficie reflectiva (aprovecha la radiación directa y difusa).

Con respecto a las aplicaciones prácticas de estos Procesos de Oxidación Avanzada, se distinguen las siguientes:

- El tratamiento de aguas contaminadas con nitrofenoles, halofenoles, metales pesados, cianuros. Desinfección de agua, degradación de disolventes, colorantes, tratamiento de residuos de la industria textil, tratamiento de alpechín y más recientemente, el tratamiento de plaguicidas.
- Tratamiento de gases. Tratamiento de compuestos típicos contaminantes del aire interior. Alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos y olefinas.

Por último y para finalizar el curso se analizaron las posibles líneas de evolución futura de la tecnología solar para el tratamiento de compuestos no biodegradables: El diseño de nuevos colectores solares, mejora en la aplicación de los catalizadores buscando una reducción de la concentración de catalizador aumentando el diámetro del fotoreactor, aplicación de metodologías analíticas avanzadas (establecimiento de rutas de degradación) y biotoxicidad (determinar la toxicidad del vertido final), y combinación con otras tecnologías de depuración de aguas

CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

Programa: Ingeniería de Bioprocesos: Fármacos, Medioambiente y Alimentación

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 del curso se estudió un modelo mecanístico desarrollado para la fotosíntesis en microalgas. Inicialmente se realizó una introducción del tema cuya idea general descansaba sobre la afirmación de que las algas son las responsables de aproximadamente el 50% del carbón fotosintético fijado cada año. Las algas se han adaptado al ambiente acuático desarrollando un mecanismo de concentración de CO₂ que aumenta su fijación y fotosíntesis. Dentro de éstas, el fitoplancton marino (microalgas), es uno de los principales “sumideros” de CO₂. El problema es que los niveles de CO₂ atmosférico han aumentado de 260 a 360 ppm durante el último siglo. Esto se puede hacer frente con nuevos biorreactores que pueden doblar la razón media de producción de algas proporcionando una competitiva ventaja. Por lo tanto, la biotecnología de microalgas podría ser una herramienta de interés para contribuir a la

reducción de la contaminación por CO₂ y sus efectos en el cambio climático (Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería).

A continuación se explicaron unas nociones sobre el proceso de fotosíntesis, el mecanismo y 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).

Volviendo al modelo mecanístico que ocupa esta primera parte del curso, se requiere un modelo cinético del proceso de fotosíntesis para poder diseñar adecuadamente los fotobiorreactores que nos permitan el máximo aprovechamiento de este fenómeno. La realización de diferentes ensayos concluyeron 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.

Este modelo se encuentra perfectamente descrito en una publicación titulada “A Mechanistic Model of Photosynthesis in Microalgae” (Fernando Camacho Rubio y cols., 2003) y que leímos y analizamos en las últimas clases. En esta cinética simplificada, se 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. Pero también es necesario considerar la fotoinhibición como un proceso que engloba el daño por irradiancias elevadas en el fotosistema II del PSU, los mecanismos de reparación (por parte de las células cuando baja el nivel de irradiancia), y los procesos fotoprotectivos. Por último se consideraron algunos casos específicos que interpreta este modelo.

En la segunda parte del curso se comenzó definiendo 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 empleados en el estudio del proceso de crecimiento de los 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.

En cuanto al tipo de reactores que se estudiaron fueron reactores en modo continuo y en modo discontinuo. Aplicando ecuaciones cinéticas se encontraron las expresiones que definen la concentración de biomasa, sustrato y producto generado por las células en función del tiempo para estas dos clases de reactores. También se realizó una comparación entre estos dos reactores en función de la producción de biomasa.

A continuación se analizaron dos modificaciones a escala industrial del reactor en continuo:

- *Reactores en serie*: El análisis de este sistema permitió determinar las condiciones de la corriente de salida conociendo las condiciones a la entrada. Para ello se aplicaron las ecuaciones obtenidas anteriormente para los balances de materia correspondientes a la biomasa, el sustrato y el producto, a un reactor “n” de la serie.
- *Reactores con recirculación*:

Se analizaron los sistemas con recirculación interna:

- Spin-filter interno, consiste en un filtro acoplado al agitador del que sale una corriente que abandona el reactor.
- Reactor en columna, son reactores con más altura que diámetro y divididos por una malla en una zona de crecimiento y otra de sedimentación.

Y los sistemas con recirculación externa, en los que se incluyeron también aquellos en los que aparece una nueva operación que es la separación de la recirculación y purga.

Por último se abordó el estudio de los reactores con más de un microorganismo, teniendo en cuenta las interacciones entre diferentes especies. Estas interacciones pueden ser indirectas, entre las que se distinguen la competición (ambas poblaciones de microorganismos se perjudican entre sí) y el comensalismo (cada uno de los microorganismos requiere de otro para que sintetice el nutriente que necesita para generar un metabolito). O interacciones directas, prelación o parasitismo, se produce entre microorganismos de diferentes tamaños, si se beneficia el mayor se trata de prelación, y si se beneficia el menor se denomina parasitismo.

DISEÑO Y ANÁLISIS DE BIORREACTORES

Programa: Ingeniería de Bioprocesos: Fármacos, Medioambiente y Alimentación

Profesores: Jose 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. Simulación de procesos biológicos para aplicaciones industriales mediante el software Super-Pro Designer.
2. Introducción al software de simulador Aspen Plus.
3. Ejemplos prácticos propuestos por el profesor.
4. Simulación de un ejemplo práctico mediante Super-Pro Designer: Tratamiento biológico de un plaguicida: Isoproturon.

Resumen:

El curso comenzó con una introducción teórica al software de simulación Super-Pro Designer, que facilita el modelado, la evaluación y la optimización de procesos integrados para una amplia selección de empresas: farmacéuticas, biotecnológicas, especialistas en productos químicos y alimentarios, microelectrónicas, de purificación de aguas, de tratamiento de aguas residuales, etc. La combinación de los modelos de fabricación y medioambiente en el mismo paquete permite, actualmente al usuario, diseñar y evaluar los procesos de fabricación y minimización de residuos con objeto de prevenir y controlar la posible contaminación ambiental.

Super-Pro Designer se considera como una valiosa herramienta para ingenieros y científicos, enfocada al desarrollo de procesos, ingeniería de procesos, y fabricación propiamente dicha. También resulta una herramienta útil para profesionales relacionados con temas medioambientales (tratamiento de aguas residuales, control de la contaminación aérea, minimización de los residuos, prevención de la contaminación).

Por último Super-Pro Designer permite también la realización de evaluaciones económicas de proyectos así como valoraciones de impacto ambiental.

Para el desarrollo de este software es necesario tener en cuenta una serie de etapas iniciales que se han de cumplir para la correcta consecución de la simulación (“Simulation Basis Manager”):

- Definición de los componentes que intervienen.
- Suministro de ecuaciones para el cálculo necesario para el diseño. Decidir el paquete termodinámico.
- Definir los elementos (Topología). Realizar un diagrama de flujo especificando el número de bloques y la conexión entre ellos.

A continuación se realizó una pequeña introducción del software de simulación Aspen Plus, llevando a cabo un ejemplo práctico. Este software es otro simulador utilizado como herramienta para el diseño y optimización en estado estacionario de procesos químicos, petroquímicos y de industria metalúrgica. La capacidad de simulación de Aspen Plus permite a los ingenieros predecir el comportamiento de un proceso usando relaciones de ingeniería básica como balances de materia y energía, equilibrio químico, y cinética de las reacciones. Con datos termodinámicos fiables, condiciones de operación reales y los rigurosos modelos para equipos de Aspen Plus, se puede simular el comportamiento real de una planta.

Para finalizar el curso y como parte de la evaluación del mismo, cada alumno escogió un proceso con etapa biológica para realizar la simulación del mismo mediante el Super-Pro Designer. En mi caso presenté la simulación de un tratamiento biológico de un plaguicida ampliamente usado en la agricultura de invernadero, el isoproturon. El objetivo del proceso era el tratamiento biológico de un efluente procedente de una planta de oxidación fotocatalítica:

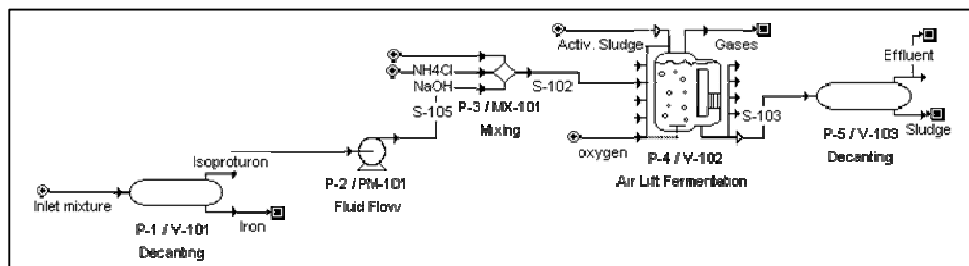


Diagrama de flujo de la planta de tratamiento biológico de Isoproturon.

En primer lugar el isoproturon era degradado parcialmente por un método fotocatalítico (foto-Fenton), en una planta formada por tres filas de colectores cilindro parabólicos (con aprovechamiento de luz solar). En cuanto a los parámetros del sistema, la corriente de entrada sólo contenía un 50% de plaguicida sin degradar, siendo el resto agua y un residuo del 10% de hierro catalizador del proceso de fotocátalisis y que será separado por decantación (con la consiguiente limpieza del equipo con agua). A la salida del decantador la corriente es bombeada (75% eficiencia) a un mezclador, en la que se introducen dos corrientes adicionales, una de cloruro amónico (contenido de nitrógeno necesario en el biorreactor), y otra de hidróxido sódico (necesaria para ajustar pH entre 6.5-7.5). Esta corriente mezcla pasa entonces al biorreactor aeróbico, en el que el oxígeno se introduce burbujeando por la base de la columna en contracorriente con el flujo. El biorreactor se inocula con fangos activados procedentes de una estación depuradora de aguas residuales, el objetivo es que los fangos oxiden de forma biológica a la corriente de entrada generando más biomasa. Por último la corriente de salida del biorreactor pasa a un decantador en el que se separa la biomasa arrastrada y se recupera un efluente en óptimas condiciones para su vertido al medio ambiente.

EVALUACIÓN ECONÓMICA DE BIOPROCESOS

Programa: Ingeniería de Bioprocesos: Fármacos, Medioambiente y Alimentación

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: Inversión, Costos de producción, costos de inmovilizado y Rentabilidad.
2. Estimación de los costos de producción: costos directos de operación, costos fijos y costos adicionales (previsiones, contingencias).
3. Estimación de los costos de inmovilizado: Elementos del capital inmovilizado, técnicas de estimación y coste específico de equipos.
4. Ejemplo: Estimación económica de un proceso real de producción. Diseño del proceso y 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:

En primer lugar se definieron una serie de conceptos generales cuyo conocimiento era necesario para el posterior desarrollo del curso. Se definieron *inversión* y *capital* desde tres puntos de vista: económico, financiero y jurídico. En el sentido económico el capital es el conjunto de bienes producidos que sirven para producir más bienes y que se compone de *capital inmovilizado* y *capital circulante*. Correspondiendo la inversión a un incremento neto de capital.

Los costes son originados por el ciclo de producción y se dividen en *costes de fabricación* (mano de obra, servicios generales...), y *costes de administración y ventas* (gastos comerciales, gerencia...).

Las *ventas* se definen como los ingresos anuales obtenidos por las ventas realizadas y cobradas, y el mercado es el ámbito en el que coinciden los que quieren comprar y vender.

Otras variables de interés son:

- La *amortización* o depreciación que se define como el coste equivalente a la pérdida de valor que experimenta el inmovilizado debido al uso, al envejecimiento, etc.
- Los *impuestos sobre beneficios* que se aplican del 36-40% de los netos, obtenidos al restar a los beneficios brutos los impuestos estatales.
- La *vida útil* del proceso, es la previsión del tiempo durante el cual el proceso puede operar sin realizar grandes inversiones en el mismo (en la industria este valor oscila entre 10 y 20 años).
- El *valor residual*, es el ingreso que se producirá al vender el inmovilizado al finalizar la vida útil.

A continuación se abordó el tema de análisis de inversiones así como los métodos de valoración y selección de las mismas.

- *Rentabilidad neta porcentual*: Se selecciona el proyecto con mayor beneficio neto porcentual (Bnp), el cual depende del procedimiento con que se evalúa la depreciación. Este método no considera la influencia del tiempo en el valor del dinero. La influencia del tiempo se cuantifica mediante un factor de actualización o de descuento (Ft).
- *Método del Plazo de Recuperación o Pay-Back*: Se denomina así al tiempo que tarda en recuperarse el capital invertido. Las inversiones preferentes son aquellas cuyo plazo de recuperación sea más corto. Este método tampoco tiene en cuenta el valor del dinero en el tiempo y no considera las cuasi rentas generadas después del plazo de recuperación.
- *Criterio del Valor Capital (VC) o Valor Actualizado Neto (VAN)*: El Valor Capital de una inversión es el valor actual de todos los rendimientos

esperados; es decir, la diferencia entre el valor actualizado de los cobros y los pagos previstos. El VAN proporciona una medida de la rentabilidad esperada de una inversión, en valor absoluto y actual. De este modo cuando el $VAN > 0$ la inversión será aceptada puesto que aumentará la riqueza de la empresa.

- *Criterio de la Tasa de Retorno o Tipo de Rendimiento Interno (TIR):* Se define como aquel valor de la tasa de actualización k que iguala el valor actualizado de los cobros con el valor actualizado de los pagos ($VAN = 0$). La TIR proporciona una medida de la rentabilidad relativa de una inversión.

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.

En cuanto a la estimación de los costos de producción, se diferenció 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:* Consiste en estimar el capital de una instalación nueva a partir del costo de una previa. Generalmente no es muy exacta. Esta estimación se aplicó a varios ejemplos.
- *Estimaciones preliminares:* Se trata de un método de estimación de factores, cuya metodología consiste en crear una lista del equipo requerido para el proceso industrial, determinar el precio de los equipos en fábrica y estimar el capital fijo multiplicando por un factor función de los materiales utilizados en la planta.

- *Estimación de diseño final:* Parte de un presupuesto preliminar realizado, comenzando contactos para adquisición de equipos y permitiendo el desarrollo de una disposición detallada de la planta. Esta estimación se lleva a cabo a partir de una ubicación concreta de la planta, una disposición detallada de la misma, y diagramas completos de tuberías e instrumentación. Materiales, mano de obra asociada a la instalación y costes indirectos, serán completamente detallados.
- *Nuevos métodos:* Continuamente nuevas técnicas de estimación son planteadas y refinadas: programas de ordenador para unificar las etapas del diseño; software de simulación de procesos en conjunción con software detallado de evaluación económica. Sólo unas pocas firmas poseen y comercializan software adecuado para el diseño de procesos biotecnológicos, conectando información de diseño y estimación de costos (BioPro designer, Process evaluator, Aspen Plus, Rapad Access Cost Estimating Spread sheet System).

Todas estas técnicas de estimación dependen de la información respecto al costo de los equipos. Las fuentes de información son: gráficos, publicaciones anuales, compras previas de equipos, vendedores de equipos...

Como conclusión se aplicó todo lo estudiado a 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 ejercicio práctico.

METODOLOGÍA Y TÉCNICAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICO

Programa: Ingeniería de Bioprocesos: Fármacos, Medioambiente y Alimentación

Profesores: Jose 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:

Puesto que el curso trata de la metodología y técnicas empleadas en un trabajo de investigación científica, éste se inició definiendo ciencia como el conjunto sistemático de conocimientos sobre la realidad observable, obtenidos mediante el método de investigación científico. Los objetivos fundamentales de la ciencia son analizar, explicar, prever o predecir y actuar. De aquí se deriva que el conocimiento científico debe de ser exacto, elaborado y cualificado.

En cuanto a los rasgos que caracterizan al método de investigación científica se distinguen: el contenido o método propiamente dicho y su base racional. El método científico debe ser siempre teórico tanto en su origen como en su fin, debe basarse en la duda científica y ser empírico, es inductivo y deductivo, crítico, analítico-sintético y finalmente, debe de ser selectivo y preciso. A partir de aquí, se enumeraron también las operaciones necesarias para una apropiada consecución del método científico: enunciar preguntas bien formuladas, contestar esas preguntas con conjeturas fundadas, derivar consecuencias lógicas de las conjeturas, someter las conjeturas a contraste, etc.

En la parte del curso denominada teleología del doctorado, se enunciaron los tres fines, compatibles entre sí, de que consta el doctorado. Ordenados de mayor a menor importancia son los siguientes:

1. Alcanzar el máximo grado académico que puede conferir la Universidad.
2. Realización de un trabajo de investigación original que aporte algo nuevo a la ciencia.
3. Formación de un investigador que culmina con la defensa de la tesis doctoral.

En cuanto a las aptitudes y valores de la investigación científica, se recaló el hecho de que el investigador tiene, incoadas en su ser, una serie de aptitudes o capacidades que, una vez desarrolladas, se manifiestan como actitudes ante la ciencia. Estas aptitudes son fomentables, ejercitables, desarrollables y consolidables. El investigador ha de 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.* En esta fase se lleva a cabo la búsqueda de fuentes de información sobre conocimientos precedentes acerca del tema investigado.

- *Investigación empírica.* Esta fase se conoce como investigación primaria, y consiste en la observación directa de la realidad estudiada y en la obtención de los datos pertinentes.
- *Exposición.* Esta fase consiste en la elaboración de los materiales recogidos en la investigación y la exposición de sus resultados.

Una vez analizadas las fases del proceso de investigación se abordaron los dos aspectos desde los que se puede enfocar dicho proceso:

1. Aspecto metodológico: enfoca la investigación desde el punto de vista de los pasos a seguir en la búsqueda de la solución o respuesta al problema. Las etapas de este proceso son: el problema es un interrogante sobre la realidad, en su inicio será abstracto, información teórica y empírica sobre la realidad, formular hipótesis y verificarlas, contraste de las hipótesis, probar hipótesis usando consecuencias empíricas, probar hipótesis con hechos mediante un diseño de la investigación, extensión de las conclusiones.
1. 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 a la idea expuesta del proceso de investigación y de sus fases, se llega a considerar la investigación científica como una actividad multitécnica, con las siguientes propiedades:

1. El carácter intelectual de la investigación científica.
 - i. El carácter empírico de la investigación científica, el empleo de técnicas específicas de investigación y observación: técnicas de investigación física, de investigación química, de investigación biológica y de investigación social.

Para finalizar el curso se dieron algunas nociones sobre las técnicas generales y específicas empleadas en la investigación científica. Al lado de éstas, existen también técnicas de empleo general que constituyen la metodología general del trabajo (de la investigación científica, del ejercicio de la inteligencia y sus operaciones, etc).

GENÉTICA APLICADA A LA BIOTECNOLOGÍA

Programa: Ingeniería de Bioprocesos: Fármacos, Medioambiente y Alimentación

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. Principios de genética.
2. Biología molecular.
 - a. Ácidos nucleicos.
 - b. Replicación.
 - c. Transcripción.
 - d. Traducción.
 - e. Niveles de control de la expresión de los genes.
3. Mutaciones.
 - a. Tipos de mutaciones.
 - b. Mutagénesis inducida.
 - c. Random screening.
4. Sistemas genéticos en microorganismos industriales.
5. Hibridación.
6. Ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante.
7. Aplicaciones de la ingeniería genética.

Resumen:

Como inicio del curso se definieron, en primer lugar, una serie de conceptos básicos necesarios para profundizar en las aplicaciones de la genética a la biotecnología:

- *Genes*: son los responsables físicos de la herencia (capacidad de un organismo para transmitir sus caracteres a su progenie).
- *Cromosomas*: donde se ubican los genes.
- *Organismos eucariotas*: son organismos superiores que tienen una dotación diploide (dos cromosomas de cada tipo).
- *Organismos procariotas*: organismos inferiores (bacterias, virus, etc), que tienen una dotación haploide (un cromosoma de cada tipo).
- *Ácidos nucleicos*: formados por nucleótidos (monosacárido + ácido fosfórico + una base orgánica nitrogenada).
- *Bases orgánicas nitrogenadas*: pueden ser grandes (purina) dentro de las que se encuentra la adenina (A) y la guanina (G). O pueden ser pequeñas (pirimidina), entre las que se pueden distinguir, la citosina (C), el uracilo (U) y la timina (T).

Se define una unión de nucleótidos como un enlace fosfodiéster entre una pentosa y el fosfato del otro nucleótido. Existen dos tipos de ácidos nucleicos, el ADN (no tiene uracilo) que son dos cadenas complementarias unidas entre sí por puentes de hidrógeno entre las bases orgánicas nitrogenadas (uniones AT y GC), y el ARN que es una cadena polinucleotídica simple (no tiene timina). Dentro del ARN se distinguen los siguientes tipos: ARN ribosómico (ARNr, síntesis de proteínas), ARN transferente o de transferencia (ARNt, transporte y transferencia de aminoácidos para la síntesis de las proteínas), y por último, el ARN mensajero (ARNm, codifica para proteínas).

Esta introducción a la genética finalizó con el estudio de las formas de procesamiento de la información almacenada en el genoma hasta las proteínas:

- *Replicación* del ADN: se lleva a cabo por enzimas.
- *Transcripción* del ADN: En este proceso la información contenida en el ADN pasa al ARN. La transcripción se lleva a cabo mediante la ARN polimerasa (I, II o III).
- *Traducción* del ARN: es el proceso por el que se sintetizan las proteínas a partir de la información genética contenida en el ARNm. En la traducción se

distinguen tres etapas: la Elongación, la Terminación y la Maduración del ARN.

En cuanto al control de la expresión génica necesario para la diferenciación y especificación de las células, se lleva a cabo en diferentes niveles: el control de la transcripción, el control del procesamiento del ARN, el control del transporte del ARNm, el control de la traducción y el control de la degradación del ARNm. El control de la expresión génica en procariotas 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 uno a uno (cada gen dispone de un promotor).

Otro concepto que adquiere una gran importancia para la aplicación de la genética a la biotecnología, es la mutación, que se define como cualquier cambio hereditario que se produce en la secuencia de pares de bases del ADN. Las mutaciones se pueden clasificar en:

- Mutaciones en las que se producen sustituciones de bases. Dentro de éstas se distingue entre las transiciones y las transversiones.
- Mutaciones que se clasifican desde el punto de vista de la estructura: las inversiones, transposiciones, traslocaciones, inserciones y deleciones.
- Mutaciones cromosómicas numéricas: que alteran el número de cromosomas.
- Pseudomutaciones: en las que aparecen nuevos fenotipos en líneas de la progenie de una célula.

Existe también un tipo de mutación enfocada principalmente a conseguir efectos beneficiosos, se trata de la mutagénesis inducida que puede llevarse a cabo de diferentes formas: mutagénesis química, mutagénesis física (choque térmico o radiaciones). Una vez inducida la mutación, es necesario realizar una fijación de la misma dejando, al menos un ciclo de división celular para que aparezcan moléculas de ADN con dos cadenas nucleotídicas alteradas.

A continuación se explicaron los procedimientos utilizados en el intercambio de la información genética en microorganismos industriales. Para el caso de los organismos procariotas no se produce fusión nuclear sino un intercambio parcial de material genético, y los procedimientos empleados son la transformación, la

transducción, la conjugación y el uso de los transposomas (también utilizado en organismos eucariotas). En este contexto se definió el concepto de la hibridación como cualquier cruce entre individuos genéticamente diferentes, y se estudiaron los dos tipos de hibridación, la sexual y la parasexual.

La parte teórica de la asignatura finalizó con la definición de la ingeniería genética como la tecnología mediante la que se introducen genes de un organismo en otro diferente, la explicación de las diferentes técnicas de manipulación genética: las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción (cortan en sitios específicos del ADN), y el uso de vectores como instrumentos de la transferencia de los genes. Y por último se estudiaron las diferentes etapas que dan lugar a la clonación.

En cuanto a la parte más práctica del curso, cada alumno presentó en clase un estudio realizado sobre alguna de las aplicaciones concretas de la ingeniería genética (investigación básica, medicina, zootécnicas, agrícolas, industriales). En mi caso yo expuse un estudio acerca de las “Plantas Transgénicas” y más exactamente sobre la producción de proteínas recombinantes en plantas, con fines terapéuticos.

LÍPIDOS ESTRUCTURADOS

Programa: Ingeniería de Bioprocesos: Fármacos, Medioambiente y Alimentación

Profesores: Alfonso Robles Medina.

Duración: 30 horas

Evaluación:

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

Guión de contenidos:

1. Funciones de los lípidos.
2. Digestión de los lípidos: papel de las lipasas.
3. La leche humana y su particular composición en lípidos.
4. El desarrollo de los lípidos estructurados y sus perspectivas nutricionales.
5. Ácidos grasos poliinsaturados y ácidos grasos de cadena media
 - 5.1. Ácidos grasos poliinsaturados
 - 5.2. Ácidos grasos de cadena media
6. Lipasas
 - 6.1. Aplicaciones
 - 6.2. Especificidades
7. Reacciones para la síntesis de lípidos estructurados catalizadas por lipasas.
8. Lipasas que catalizan la síntesis de lípidos estructurados.
9. Variables más importantes en la síntesis de lípidos estructurados.
 - 9.1. Disolvente
 - 9.2. Agua
 - 9.3. Adsorbentes
 - 9.4. Otras variables
10. Acil-migración.
11. Síntesis de lípidos estructurados por acidólisis.

12. Síntesis de lípidos estructurados por alcoholisis y esterificación.
13. Otros métodos de síntesis de LE.
14. Cinética y mecanismo de las reacciones catalizadas por lipasas.
15. Influencia de los procesos de transferencia de materia en las reacciones catalizadas por lipasas.
16. Acidólisis de trioleína y ácido caprílico.
17. Acidólisis de aceite de hígado de bacalao y ácido caprílico.
18. Acidólisis de EPAX45210 y ácido caprílico
 - 18.1. Reactor de lecho fijo con recirculación.
 - 18.2. Reactor de lecho fijo en continuo.
19. Obtención de LE mediante el proceso de tres etapas
 - 19.1. Alcoholisis de trioleína y etanol.
 - 19.2. Purificación de los 2-monoglicéridos.
 - 19.3. Esterificación de los 2-monoglicéridos con ácido caprílico.

Resumen:

El curso comenzó dando una introducción y unas nociones generales acerca de las funciones de los lípidos, el papel de las lipasas, la particular composición en lípidos de la leche humana y las perspectivas nutricionales. La importancia de los lípidos radica en que, junto a los carbohidratos y las proteínas, constituyen los principales componentes de la nutrición humana. Los lípidos son insolubles en agua y están formados por triglicéridos (93-95%), fosfolípidos y esteroides. Los más recientes esfuerzos tecnológicos están focalizados en la elaboración de nuevos triglicéridos, modificando su composición y estructura. Las lipasas son enzimas relativamente específicas en su actividad catalítica y algunas altamente estereoespecíficas (lingual-gástrica, pancreática y láctea).

En cuanto a la composición en ácidos grasos de la leche humana es relativamente variable. Comparada con la leche de vaca, la leche humana presenta una mayor proporción de ácido linoleico (18:2n6) y contiene ácido docosahexaenoico (DHA, ácido graso poliinsaturado muy importante para el desarrollo del sistema nervioso). Por lo

tanto, la leche de vaca no reemplaza nutricionalmente a la leche humana. Las fórmulas que se han desarrollado para reemplazar a la leche materna contienen lípidos de origen vegetal o animal que no simulan exactamente la estereoquímica de la leche materna, facilitándose la formación de jabones de calcio insolubles, lo que es causa común de estreñimiento y pérdida de calcio en lactantes.

Un lípido estructurado es una molécula “hecha a medida”, formulada para una función nutricional o tecnológica específica, de este modo se puede decidir el tipo de ácidos grasos y la posición de éstos en los triglicéridos que se deseen estructurar. Las lipasas permiten bajo ciertas condiciones la reversibilidad de las reacciones que catalizan, pudiendo hidrolizar un triglicérido en un medio acuoso y unir un ácido graso al glicerol en un medio virtualmente anhidro (“sintetasa”). Actualmente, los lípidos estructurados de más interés son los triglicéridos que contienen ácidos grasos de cadena corta o media o ambos y ácidos grasos de cadena larga en la misma molécula de glicerina.

A continuación se procedió al estudio de los ácidos grasos poliinsaturados y de cadena media, así como de las lipasas. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son compuestos orgánicos de cadena larga (18 o más carbonos), cuyas funciones en el organismo son las de reserva energética celular, como componentes de las membranas celulares y como precursores de biomoléculas esenciales. Las fuentes más usuales para la obtención de los PUFAs de mayor interés son: aceites de semillas como algodón y girasol, coles, espinacas, aceites de semillas (linaza, soja), lacha, arenque, hígado de bacalao, salmón, algas marinas...

Es importante considerar las ventajas potenciales de la utilización de las microalgas marinas como fuente alternativa de PUFAs, con respecto a los aceites de pescado. Estas ventajas son: buen sabor, biomasa libre de partículas y metales pesados, presentan una producción estable durante todo el año, ausencia de colesterol y tienen una composición de ácidos grasos más sencilla. Con fines médicos y dietéticos los PUFAs pueden suministrarse como ácidos grasos libres, como ésteres etílicos y como triglicéridos. En este sentido el grupo de investigación de Biotecnología de Microalgas Marinas de la Universidad de Almería ha puesto a punto un proceso para la extracción, concentración y purificación de PUFAs a partir de microalgas marinas y de aceites de pescado. En cuanto a los ácidos grasos de cadena media (de 8, 10 y 12 átomos de carbono), se encuentran en aceites vegetales como el de coco y el de semilla de palma o

animales como la grasa de la leche. Los triglicéridos con ácidos grasos de cadena media se utilizan como aporte calórico en pacientes con insuficiencia pancreática y otros problemas de absorción de lípidos.

Las lipasas son acilglicerol acilhidrolasas y su función primordial es la hidrólisis de acilglicéridos. Se utilizan en el tratamiento y modificación de grasas y aceites, en la obtención de productos farmacéuticos, cosméticos, etc., y en la producción enzimática de monoglicéridos (como emulsificadores para panadería, margarina, etc.). Las lipasas muestran grados variables de especificidad: especificidad por el sustrato, regioespecificidad, especificidad por el ácido carboxílico y estereoespecificidad.

Continuando con el tema de síntesis de lípidos estructurados (LE), se describieron la catálisis química y la enzimática como procesos usados para su obtención, así como los tipos de reacciones reversibles catalizadas por lipasas que afectan al enlace éster de grasas y aceites (hidrólisis, esterificación, acidólisis, interesterificación y alcoholisis). Para sintetizar LE las especificidades más interesantes son la posicional y la acilespecificidad. Considerando la economía del proceso, lo más importante es inmovilizar las lipasas para utilizarlas repetidas veces. En cuanto a las variables que afectan a la síntesis de LE se encuentran las siguientes: la naturaleza del disolvente orgánico, el contenido óptimo en agua en la mezcla de reacción, adsorbentes en el medio de reacción y otras variables como la concentración de sustratos, la relación molar entre ambos, etc.

Para finalizar la parte teórica del curso se estudiaron diferentes métodos para la síntesis de lípidos estructurados y la cinética de los mismos. La reacción más utilizada es la acidólisis entre triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga y ácidos grasos de cadena media, catalizada mediante lipasas 1,3 específicas. Las principales dificultades para obtener altos rendimientos es encontrar lipasas 1,3 específicas con actividad alta, evitar las migraciones de grupos acilo y encontrar triglicéridos de cadena larga con suficiente cantidad de ácidos grasos de cadena larga de interés en la posición 2. El método alternativo para obtener lípidos estructurados con la estructura deseada MLM, consiste en dos etapas, una de alcoholisis entre un triglicérido con un ácidos grasos de cadena larga y un alcohol catalizada por lipasa 1,3 específica para obtener 2-monoglicéridos y los ésteres correspondientes, y la segunda etapa es la esterificación con la misma lipasa entre el 2-monoglicérido y el ácido graso que se desea en las posiciones 1,3. Otros métodos empleados en la síntesis son los siguientes:

1. Interesterificación entre los triglicéridos de cadena larga y ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media y entre triglicéridos de cadena larga y de ácidos grasos de cadena media.
2. Por hidrólisis y esterificación. Llevando a cabo de forma independiente ambas reacciones para optimizar las condiciones de cada una también de forma independiente. El principal inconveniente de los procesos de dos etapas (hidrólisis + acidólisis o esterificación), es el alto contenido en diglicéridos que acompañan a los triglicéridos finales.

La cinética de las reacciones catalizadas por lipasas es bastante compleja, dado el gran número de ácidos grasos y de especies moleculares que pueden intervenir, así como la compleja especificidad de las lipasas. Los modelos más frecuentes son los modelos simplificados que no diferencian entre los distintos tipos de ácidos grasos. En medios hidrófobos los mecanismos más aceptados son los modelos de dos etapas basados en la formación de complejos enzima-sustrato multimoleculares .

Por último se abordaron dos ejemplos prácticos en el curso, la acidólisis de la trioleína y ácido caprílico y la acidólisis de aceite de hígado de bacalao y ácido caprílico.

MEMORIA DEL PERÍODO DE **INVESTIGACIÓN TUTELADA**

**Degradación y detoxificación mediante fotocátalisis
solar de sustancias consideradas Contaminantes
Prioritarios por la Unión Europea**

**PROGRAMA DE DOCTORADO: “INGENIERÍA DE
BIOPROCESOS: FÁRMACOS, MEDIOAMBIENTE Y
ALIMENTACIÓN”**



Departamento: Ingeniería Química.

Curso: 2004 – 2005.

Profesor Responsable: Jose Antonio Sánchez Pérez.

Alumna: Isabel Oller Alberola. Becaria FPI del Ministerio de Educación y
Ciencia (ref: BES-2004-3767). Beca asociada al proyecto nacional
con ref: PPQ 2003-07596-C03-01.

ÍNDICE: PERÍODO INVESTIGACIÓN TUTELADA

Introducción	31
Materiales y Métodos	36
Resultados y Discusión	49
Conclusiones	57
Referencias	58

INTRODUCCIÓN

El trabajo de investigación que se presenta a continuación ha sido desarrollado íntegramente en la Plataforma Solar de Almería (PSA) enmarcado dentro del ámbito de dos proyectos, uno nacional: “Aumento de la biodegradabilidad y eliminación de contaminantes persistentes en efluentes acuosos mediante métodos de Oxidación Avanzada” (PPQ 2003-07596-C03-01) y otro europeo: “A Coupled Advanced Oxidation-Biological Process for recycling of industrial wastewater containing persistent organic contaminants” (Contract n°: EVK1-CT-2002-00122).

En los últimos años la capacidad auto-depuradora del medio ambiente ha dejado de ser suficiente y los residuos han sobrepasado con creces los niveles permitidos, provocando la contaminación del medio ambiente. El principal problema lo constituyen los vertidos procedentes de la industria y la agricultura: plaguicidas, fertilizantes, detergentes, fenoles y otros productos químicos que son arrojados sin tratamiento directamente a la naturaleza, a través de vertederos, controlados o incontrolados y situados sin una estrategia de tratamiento.

La política de la Unión Europea referente a la protección del medio ambiente ha ganado importancia de forma continua desde los años 80 motivada por la presión social y el compromiso de los centros de investigación. En este contexto, la Comisión Europea ha adoptado una propuesta para una nueva y ambiciosa estrategia medioambiental que señala las prioridades de acción para el medio ambiente durante los próximos cinco a diez años: “**Environment 2010: Our Future, Our Choice**”. Esta propuesta se centra en cuatro áreas de acción principales: cambio climático, salud y medio ambiente, naturaleza y bio-diversidad y gestión de los recursos naturales.

La política del agua comunitaria está basada en los objetivos de una serie de Directivas principales contenidas en el Marco de Directivas del Agua, entre las que se encuentran las que normalizan el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales: la Directiva de Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas 91/271/EEC controlando la polución, en particular eutrofización de aguas superficiales con nutrientes (particularmente nitrógeno y fósforo), procedente de aguas residuales urbanas; la Directiva de Nitratos 91/676/EEC controlando la contaminación procedente de la agricultura y ganadería, complementando la Directiva de Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas; la Directiva de Sustancias Peligrosas 76/464/EEC y sus Directivas

Filiales, controlando la contaminación de aguas superficiales con sustancias peligrosas procedentes de la industria; la Directiva Control y Prevención Integrada de la Contaminación 96/61/EEC controlando la contaminación con sustancias peligrosas procedentes de grandes industrias y obligando a la reutilización de esas aguas. Y recientemente la Directiva Marco del Agua (WFD) 2000/60/EC que pone de acuerdo a todos los países miembros en una solución a medio plazo para todos los problemas relacionados con la contaminación de aguas.

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: la directiva WFD (Water Framework Directive, 2000/60/EC) adoptada en Octubre del año 2000, en su Artículo 16, contiene el marco legal y las bases metodológicas para la priorización de sustancias contaminantes. En ella se incluye una lista de 33 “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, que contienen PS a baja-media concentración (<500 mg/L). En este contexto, la Directiva IPPC (Integrated Prevention Pollution Control, 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.

Entre estas sustancias prioritarias se encuentran varios plaguicidas solubles en agua que han sido estudiados en este trabajo: alaclor, atrazina, clorofenvinfos, diuron, isoproturon y pentaclorofenol. Estos plaguicidas son de especial interés debido a que se propagan con extrema facilidad por el medio ambiente, gracias a su elevada solubilidad en agua, y a que constituyen una amenaza seria tanto para las aguas superficiales como para las subterráneas. Debido a sus características químicas los plaguicidas son en la mayoría de los casos contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su vida media en el ambiente puede ser elevada. El uso indiscriminado que en el pasado se ha dado a estos compuestos, ha provocado que en la actualidad se detecten residuos de éstos en el ambiente y se asocien con riesgos potenciales a la salud pública. Los principales factores que influyen en el comportamiento medioambiental de los plaguicidas son las propiedades físico-químicas de dichos compuestos (coeficiente de adsorción, solubilidad en agua, coeficiente de reparto en octanol-agua, constante de ionización,

estabilidad, volatilidad), el tipo de aplicación (formulación, método de aplicación, dosis, frecuencia), las características del suelo (textura, composición química, propiedades físico-químicas, actividad biológica, orografía), las prácticas culturales y las condiciones medioambientales (laboreo, riego, drenaje, cubierta vegetal, lluvia, temperatura y viento). Además de por su aplicación en cultivos, los plaguicidas pueden llegar al agua procedentes de otras prácticas: aguas de desecho de industrias agroalimentarias, aguas de desecho de plantas productoras de plaguicidas, aguas de lavado procedentes de contenedores y equipos de pulverización.

En la actualidad existen una gran variedad de procesos y tecnologías disponibles para el tratamiento de aguas contaminadas [Henze y col. 2000, Wilderer y col. 2002]. Los procesos y tecnologías de que se dispone en la actualidad para el tratamiento de contaminantes en agua son muy diversos y se pueden dividir en físicos, biológicos y químicos. Las aguas residuales urbanas suelen ser tratadas con técnicas físicas (decantación, homogeneización, cribado o filtrado, coagulación – floculación, precipitación y neutralización) y biológicas (procesos aerobios y anaerobios), las cuales reducen de forma significativa la contaminación, pero no lo suficiente como para cumplir los criterios cada vez más estrictos impuestos por las normativas legales. Sin embargo, la tendencia predominante en los últimos años es al uso de los procesos de tratamiento químico (intercambio iónico, ultrafiltración, procesos con membranas, electrodiálisis, “air stripping”, desinfección, procesos de oxidación convencionales y **Procesos de Oxidación Avanzada (POAs)**), para lograr una mayor y mejor depuración de las aguas, así como un adecuado uso y reciclaje de las mismas. Por otro lado, las aguas residuales que contienen plaguicidas a menudo no pueden ser tratadas mediante procesos biológicos, debido a su naturaleza tóxica para los microorganismos o no biodegradable.

Este trabajo está enfocado en el estudio de una tecnología diseñada para ayudar a solucionar el problema del tratamiento de estos compuestos no biodegradables y tóxicos. En un futuro próximo, los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) posiblemente se conviertan en uno de los recursos tecnológicos más utilizados en el tratamiento de aguas contaminadas con productos orgánicos, que no son tratables mediante técnicas convencionales debido a su elevada estabilidad química y/o baja biodegradabilidad [Gogate y Pandit 2004, Konstantinou y Albanis 2003, Pera-Titus y col. 2004].

Los POAs son aquellos procesos de tratamiento terciario que están basados en la generación de especies fuertemente oxidantes [Andreozzi y col. 1999]. Entre estos procesos, aquellos que producen radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) son los que tienen más éxito, ya que es la especie más fuertemente oxidante después del fluoruro (Potencial de Oxidación de 2.8 V). Estos radicales al ser agentes oxidantes muy enérgicos, son capaces de oxidar compuestos orgánicos y convertirlos en inorgánicos e inoocuos. En definitiva, las características más positivas de los POAs pueden resumirse en las siguientes:

- Capacidad para llevar a cabo una profunda mineralización de los contaminantes orgánicos y oxidación de compuestos inorgánicos hasta dióxido de carbono e iones como cloruros, nitratos, etc.
- Reactividad no selectiva con una inmensa mayoría de compuestos orgánicos. Hecho especialmente interesante si se quiere evitar la presencia de subproductos potencialmente tóxicos procedentes de los contaminantes originales, que sí pueden originarse mediante otros métodos que no consiguen la oxidación hasta sus últimas consecuencias.

El principal inconveniente de los POAs es su elevado coste por el uso de reactivos caros (p.e. agua oxigenada) y/o el elevado consumo energético (lámparas para generar radiación UV) y es obvio que nunca deben utilizarse como alternativa a tratamientos más económicos, como la biodegradación. En la **figura 1** se muestran los POAs más habituales.

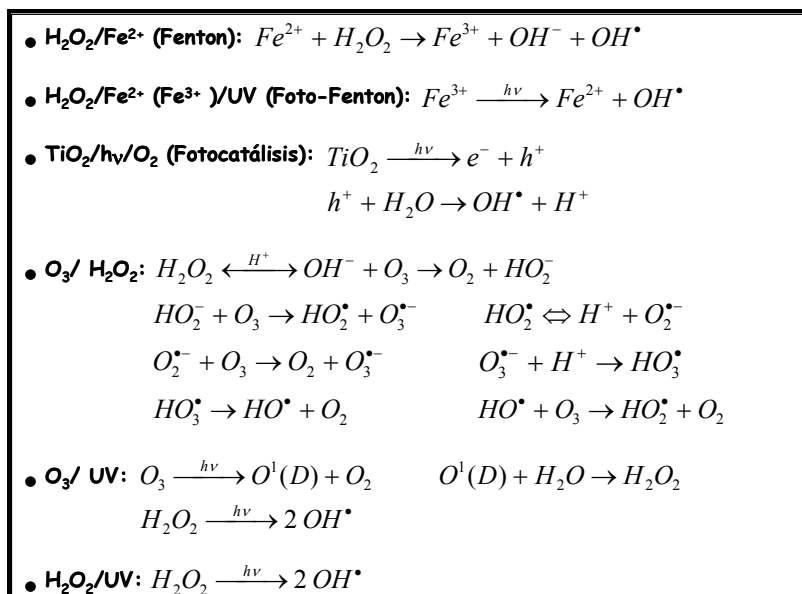


Figura 1. Procesos de Oxidación Avanzada más habituales.

De entre todos los POAs, aquellos que son capaces de aprovechar la radiación solar son de especial interés, ya que se elimina la desventaja del consumo de energía correspondiente a la generación de radiación UV mediante lámparas o a la producción de ozono. Por lo tanto, la investigación se centra cada vez más en los POAs que aprovechan la radiación solar a longitudes de onda mayores de 300 nm como son la fotocatalisis homogénea con el proceso foto-Fenton y la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 [Bockelmann y col. 2004, Malato y col. 2002]. Los procesos de fotocatalisis heterogénea emplean semiconductores sólidos (en suspensión acuosa o gaseosa) para la catálisis, que son estables bajo irradiación y que estimulan una reacción en la interfase sólido/líquido. El sólido puede ser reutilizado después de actuar en el sistema redox. En cuanto al proceso foto-Fenton, consiste en el empleo del reactivo Fenton complementado con radiación UV/visible, para aumentar las velocidades de degradación de compuestos orgánicos. El reactivo Fenton consiste en una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno e iones ferrosos que proporciona una fuente de radicales hidroxilo importante. La principal ventaja del proceso foto-Fenton con respecto al TiO_2 es su mayor espectro de sensibilidad a la luz, de hasta una longitud de onda de 580 nm, lo que podría suponer un mayor aprovechamiento de la energía solar, mientras que la actividad del TiO_2 se da a longitudes de onda inferiores a 400 nm.

En este trabajo se evalúan estos dos Procesos de Oxidación Avanzada aplicados a la degradación de los seis plaguicidas especificados anteriormente, que son considerados como PS por la directiva europea WFD. Los ensayos se han llevado a cabo en planta piloto solar, y la eficiencia de ambos tratamientos ha sido analizada no sólo en función de la degradación y mineralización del plaguicida correspondiente, sino también teniendo en cuenta la toxicidad del agua en diferentes etapas del tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los plaguicidas estudiados se utilizaron tal y como se recibieron sin ningún tratamiento adicional, y se obtuvieron con los siguientes porcentajes de pureza: alaclor ($C_{14}H_{20}ClNO_2$) como producto técnico con un 95% de pureza procedente de Aragonesas Agro S.A., atrazina ($C_8H_{14}ClN_5$) como producto técnico con un 95% de pureza procedente de Ciba-Geigy, clorofenvinfos ($C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$) como producto técnico con un 93.2% de pureza procedente de Aragonesas Agro S.A., diuron ($C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$) como producto técnico con un 98.5% de pureza procedente de Aragonesas Agro S.A., isoproturon ($C_{12}H_{18}N_2O$) como producto técnico con un 98% de pureza procedente de Aragonesas Agro S.A., y pentaclorofenol (C_6HCl_5O) como producto analítico con un 98% de pureza procedente de Sigma-Aldrich. Los patrones analíticos de los plaguicidas para análisis cromatográficos, se adquirieron en Sigma-Aldrich. En cuanto al agua usada en la planta piloto procede de la planta de destilación localizada en la Plataforma Solar de Almería (PSA), que presenta una conductividad inferior a $10 \mu S/cm$, una concentración de cloruros entre 0.7 y 0.8 mg/L y un contenido en carbono orgánico total inferior a 0.5 mg/L. Por último los reactivos necesarios para llevar a cabo los procesos fotocatalíticos son: el sulfato de hierro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), el peróxido de hidrógeno (30 % p/v) y el ácido sulfúrico (2N) empleado para el ajuste de pH (alrededor de 2.7-2.8), que se obtuvieron de Panreac S.A, y por otro lado, el TiO_2 utilizado fue Degussa P-25 (Frankfurt, Alemania), con un área superficial de entre $51-55 m^2/g$.

Determinaciones Analíticas

La evaluación del grado de mineralización del contaminante a lo largo de los dos procesos fotocatalíticos aplicados, se sigue mediante la determinación del Carbono Orgánico Total (COT). Para ello las muestras filtradas son inyectadas directamente en un Analizador Shimadzu modelo TOC-5050A (**figura 2**), 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 $680^\circ C$), que contiene un catalizador de platino inmovilizado sobre esferas de alúmina, y el posterior análisis del gas resultante (CO_2), 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 CO₂ a partir de los carbonatos y bicarbonatos de la muestra, el cual es arrastrado por el aire directamente al detector de IR. Este equipo está diseñado para almacenar y realizar calibraciones (con biftalato de potasio p.a. de Merck), cálculos estadísticos y de errores. 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 2. Fotografía del Analizador de Carbono Orgánico Total Shimadzu 5050A instalado en el laboratorio de la PSA.

Para evaluar la degradación del contaminante orgánico estudiado se ha utilizado Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa con Detector Ultravioleta (HPLC-UV, Agilent Technologies, series 1100 (**figura 3**), con una columna C-18 (LUNA 5µm, 3mm x 150mm de Phenomenex) y un caudal de 0.5 mL/min. La preparación de la muestra suele restringirse a la dilución de ésta (normalmente 1:1, con el disolvente que forma parte de la fase móvil) y a la filtración de la misma a través de filtros de 0.22 µm de tamaño de poro. Mediante este procedimiento se consiguen dos ventajas íntimamente relacionadas con los tratamientos fotocatalíticos:

- Al diluir con un disolvente orgánico las muestras procedentes de un experimento con TiO₂, se facilita la desorción del compuesto a analizar de la superficie del catalizador y la cuantificación completa del contaminante (adsorbido y no absorbido).

- El efecto “quenching”, que se refiere a la paralización de una reacción por desnaturalización del medio de reacción (esto es especialmente importante en experimentos con foto-Fenton, en los que puede ocurrir efectos relevantes en la oscuridad después de tomar la muestra del reactor).

Para la preparación de todas las disoluciones se utilizaron agua ultra pura destilada y desionizada mediante un sistema de generación de agua Milli-Q (Millipore Co.) y disolventes orgánicos con calidad HPLC.

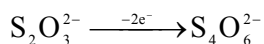
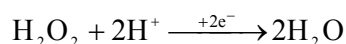
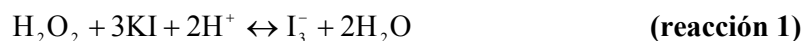


Figura 3. Fotografía del HPLC (Agilent Technologies serie 1100) y los cromatógrafos iónicos (DX120 Y DX600) en el laboratorio de la PSA.

El grado de mineralización de los contaminantes tratados durante los procesos fotocatalíticos también se determinó mediante el análisis de los iones inorgánicos. Al mineralizar los compuestos orgánicos éstos se transforman en CO_2 , H_2O y los ácidos (o sales minerales) correspondientes, que provienen de los heteroátomos contenidos en las moléculas orgánicas. Mediante la monitorización de estas especies iónicas se puede evaluar el grado de mineralización de los compuestos originales. La cromatografía iónica es un método eficaz de separación y determinación de iones, que se basa en el uso de columnas cromatográficas que contienen resinas de intercambio iónico y la cuantificación conductimétrica de los iones eluidos. Los más habituales en POAs son: Cl^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} y NH_4^+ . Estos procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una disolución y los iones del mismo signo de la fase estacionaria. Las concentraciones de los cationes se midieron con un cromatógrafo iónico Dionex modelo DX120 equipado con una columna Dionex Ionpac CS12A de 4mm x 250mm. Se aplicó un método isocrático utilizando H_2SO_4 10mM a un caudal de 1.2 mL/min. En cuanto a las concentraciones de aniones, se utilizó un

cromatógrafo iónico Dionex modelo DX600 equipado con una columna Dionex Ionpac AS11-HC de 4mm x 250mm. Los análisis se llevaron a cabo con un método de gradiente consistente en 5 min con NaOH 20 mM seguido de la inyección de la muestra filtrada, 8 min con NaOH 20 mM y 7 min con NaOH 35mM, a un caudal de 1.5mL/min (**figura 3**).

El método analítico empleado para la determinación de agua oxigenada (peróxido de hidrógeno, H₂O₂) durante los experimentos de foto-Fenton, se denomina yodometría. El control del consumo de H₂O₂ durante el proceso fotocatalítico es esencial, puesto que se trata del único reactivo que se consume y que cierra el ciclo catalítico. En la yodometría un exceso de KI es añadido a la muestra en medio ácido, se adiciona almidón usado como indicador y se valora con una disolución de tiosulfato potásico patrón. Las reacciones y semi-reacciones que tienen lugar son las siguientes [Marín Galvín, 1999]:



Evaluación de la toxicidad

Los bioensayos son experimentos en los que los efectos tóxicos originados por determinados contaminantes son medidos bajo condiciones controladas [Paustenbach 2000]. Existe una amplia variedad de bioensayos que se pueden clasificar dependiendo de los organismos utilizados (con especies individuales, con múltiples especies o con sistemas basados en infra-organismos), el tiempo de exposición (toxicidad aguda, toxicidad crónica, toxicidad subaguda y multigeneracionales), y la concentración del agente tóxico (sistemas estáticos, semi-estáticos y de flujo constante) [Connell 1997].

En la actualidad, tanto el desarrollo como las aplicaciones de la toxicidad biológica están evolucionando rápidamente. Hoy en día, existen numerosos tipos de

bioensayos disponibles en el mercado. En cualquier caso, muchos de los estudios más recientes están enfocados al uso de bacterias luminiscentes para la evaluación de la toxicidad [Dewhurst y col., 2002, Parkinson y col., 2001, Tixier y col., 2000]. En este trabajo se ha utilizado un bioensayo conocido comercialmente como Microtox®, basado en la actividad luminiscente de la bacteria *Vibrio fischeri* (**figura 4**). 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, y esta energía en forma de luz visible es generada como consecuencia de una reacción de oxidoreducción, catalizada por una enzima oxidoreductasa, conocida como luciferasa. La actividad bioluminiscente de *Vibrio fischeri* puede ser mermada debido a la acción bloqueante o inhibidora de intermediarios tóxicos generados durante los procesos de degradación (POAs), que pueden estar presentes en los efluentes, y que constituyen un serio problema para el medio ambiente [Muneer y col. 1999].

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 y/o para predecir la biodegradabilidad de las mismas.

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 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 5 y 15 minutos. En cuanto al peróxido de hidrógeno presente en las muestras que procedían de experimentos de photo-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.

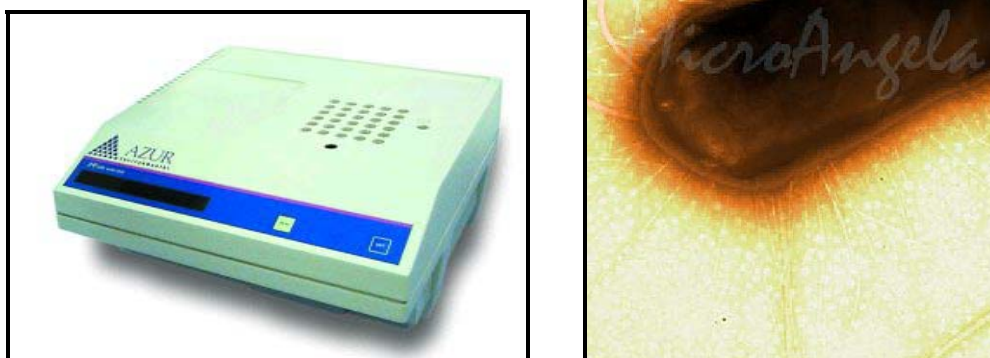


Figura 4. Fotografía del analizador SDI Microtox® Modelo 500 e imagen al microscopio de la bacteria *Vibrio fischeri*.

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. Estudios realizados en este sentido, han demostrado que se produce una variación de un 10% en la intensidad de luz emitida, por cada °C de variación en la temperatura de incubación [Ribo y col. 1990]. El equipo empleado para la medición de la producción de luz por parte de la bacteria fue el analizador SDI Microtox® Modelo 500 (**figura 4**). Se trata de un fotómetro de laboratorio que dispone de auto-calibración y de control de temperatura a 15°C (óptima para el bioensayo). El efecto inhibitorio de las muestras se comparó en todo momento con un control o blanco no tóxico, consistente en una disolución salina de cloruro sódico preparada al 2% en agua destilada. El porcentaje de inhibición correspondiente a cada muestra (INH %), se obtuvo a partir de la **ecuación 1**:

$$\text{INH \%} = \left(\frac{\Gamma}{1 + \Gamma} \right) \times 100 \quad (\text{ec. 1})$$

En esta ecuación la función gamma expresa la relación entre la pérdida de luz y la luz que continúan emitiendo aquellas bacterias cuya actividad bioluminiscente no ha sido mermada. Se calcula como se indica en la **ecuación 2**:

$$\Gamma = \left(\frac{R \times I_0}{I_t} \right) - 1 \quad (\text{ec. 2})$$

Donde I_0 e I_t corresponden a las intensidades luminiscentes de cada muestra al inicio y después del tiempo de contacto establecido, respectivamente, y R es el factor de corrección para el control que se calcula según la **ecuación 3**:

$$R = \frac{I_{C_t}}{I_{C_0}} \quad (\text{ec. 3})$$

Donde I_{C_0} e I_{C_t} corresponden a las intensidades luminiscentes del control al inicio y tiempo de contacto establecido, respectivamente.

Procedimiento experimental

Todos los experimentos que se presentan en este trabajo han sido desarrollados íntegramente en la Plataforma Solar de Almería (PSA, latitud 37° norte y longitud 2.4° oeste), en planta piloto y con aprovechamiento de radiación solar. Para llevar a cabo cualquier proceso fotocatalítico es necesario la existencia de una fuente de radiación ultravioleta, en nuestro caso se ha empleado la componente UV de la radiación solar. En la **figura 5** se muestra el espectro estándar de la radiación solar directa sobre la superficie terrestre (a nivel del mar y en un día claro), conjuntamente con el espectro de la radiación solar existente fuera de la atmósfera terrestre.

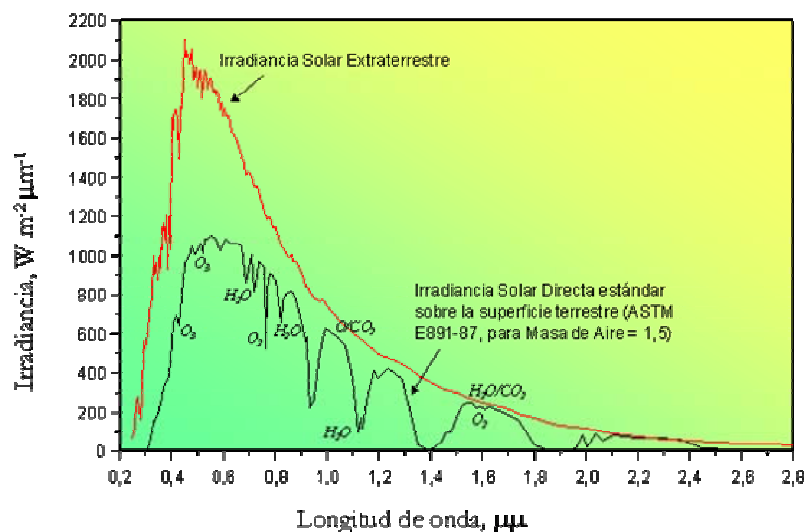


Figura 5. Espectros terrestre [ASTM, 1987a y 1987b] y extraterrestre [Thekaekara, 1973] de la irradiación solar directa. La absorción de la radiación

por parte de diversas sustancias de la atmósfera reduce la radiación sobre la superficie terrestre en determinadas longitudes de onda.

En este sentido el aprovechamiento de radiación solar llevado a cabo en la planta piloto de la PSA se basa en un sistema de colectores solares. Tradicionalmente los colectores se clasifican en función del grado de concentración alcanzado con ellos. La *relación de concentración* (RC) puede ser definida como la relación entre el área de superficie de captación de radiación (o área de apertura) y el área del reactor (área del componente que recibe la radiación solar concentrada, esté completamente iluminada o no). Esta RC influye directamente en la temperatura de trabajo del sistema y, de acuerdo con este criterio, los colectores se clasifican en tres tipos: sin concentración o baja temperatura (hasta 150° C), de concentración media o media temperatura (de 150° C a 400° C) y de alta concentración o alta temperatura (por encima de 400° C).

Los primeros reactores fotocatalíticos se diseñaron al final de la década de los 80 (laboratorios nacionales Sandia en EEUU), modificando los Colectores Cilindro-Parabólicos (CCPs) para aplicaciones térmicas, mediante el reemplazo del tubo receptor por un tubo Pyrex por el que fluía el agua contaminada. El CCP consiste en una estructura que soporta una superficie altamente reflectante y concentradora de la luz UV con forma de parábola. Dispone de uno o dos motores controlados por un sistema de seguimiento solar en uno o dos ejes respectivamente (**figura 6**). Las desventajas de este tipo de colectores es que no pueden concentrar la radiación solar difusa, son complejos, costosos y requieren unas necesidades de mantenimiento altas.

Más tarde se diseñaron los Colectores Cilindro-Parabólicos Compuestos (CPCs), que son una mezcla entre los CCPs y los sistemas sin concentración. Los CPCs suponen una de las mejores opciones para las aplicaciones fotocatalíticas solares y forman parte de la planta piloto utilizada en los experimentos de este trabajo de investigación. Son colectores estáticos con una superficie reflectante enfocada hacia un fotorreactor cilíndrico (**figura 7**), pueden ser diseñados con un factor de concentración 1 y, además, pueden capturar tanto la radiación UV directa como la difusa. Estos sistemas solares disponen de una simplicidad intrínseca, de una buena relación coste-efectividad, son fáciles de manejar y requieren un bajo capital de inversión [Malato y col., 2002b].



Figura 6. Colector Cilindro-Parabólico con seguimiento en dos ejes instalado en la PSA.

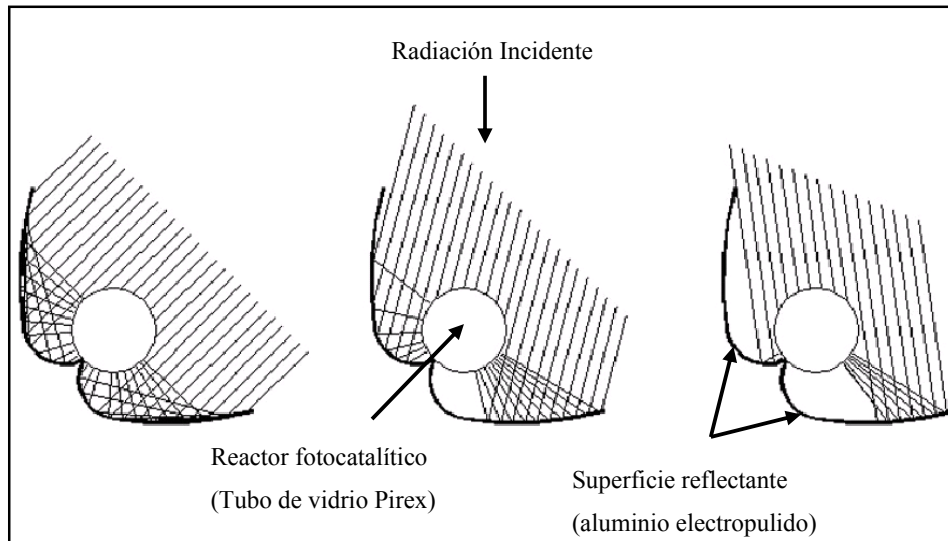


Figura 7. Radiación solar reflejada en un Colector Cilindro-Parabólico Compuesto (factor de concentración 1).

Esta reciente tecnología solar se aplica en la planta piloto en la que se han llevado a cabo los procesos fotocatalíticos objeto de este trabajo. La planta opera en modo discontinuo y consta, a su vez, de dos foto-reactores solares piloto gemelos, lo que permite llevar a cabo dos experimentos al mismo tiempo. Cada uno está formado por tres colectores tipo CPCs, un tanque y una bomba de recirculación. Cada colector solar está montado sobre una plataforma fija inclinada 37° (latitud local) sobre la superficie, y con un área de 1.03 m^2 . El agua fluye a un caudal de 20 L/min

directamente de un módulo a otro para llegar finalmente al tanque, desde el cual la bomba recircula el fluido de vuelta a los CPCs. En la **figura 8** se muestra el diagrama de flujo de los dos reactores así como una fotografía de los mismos. El volumen total de cada reactor es 35 L, que se encuentran divididos en dos partes: 22 L de tubos Pyrex que conforman el volumen total irradiado, y el volumen muerto del reactor (tanque + tubos de polietileno de alta densidad), que no se encuentra iluminado. Puesto que el sistema se encuentra en el exterior y, además, no existe ningún control térmico, la temperatura alcanzada en el interior de los reactores fue medida de forma continua mediante dos sensores PT-100 [Kositzi y col., 2004].

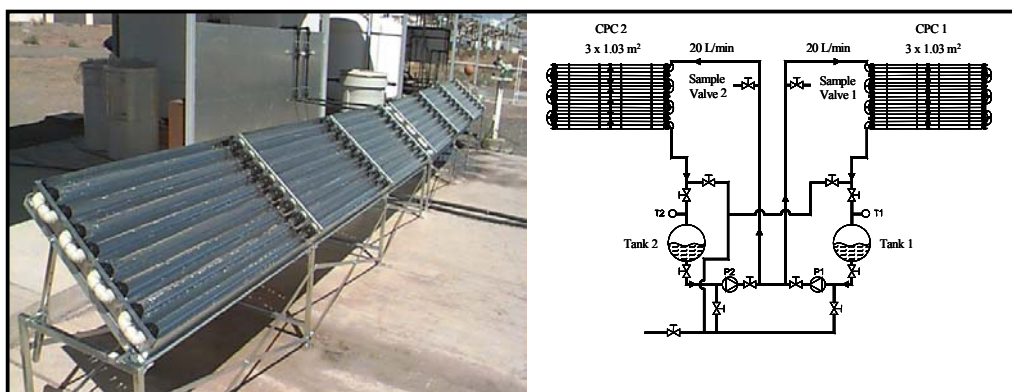


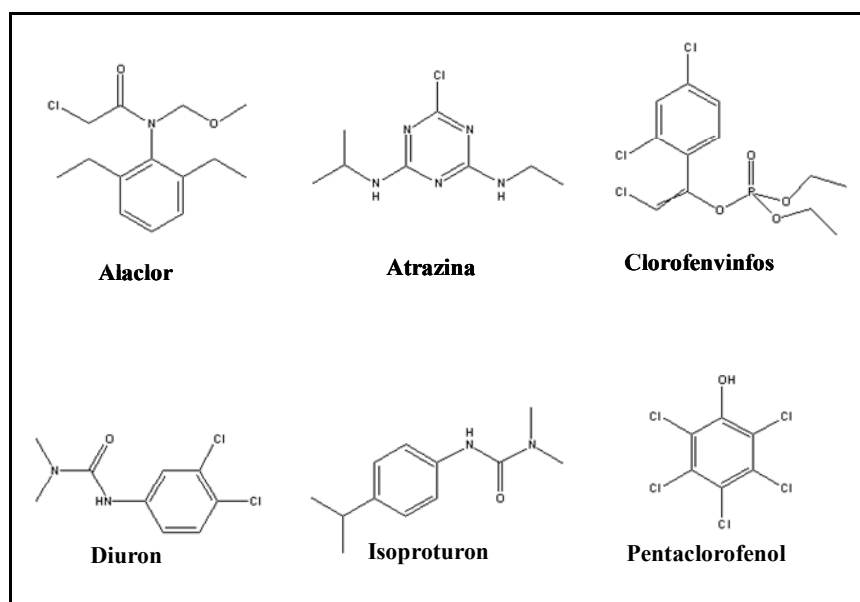
Figura 8. Fotografía y diagrama de flujo de las dos plantas piloto solares emplazadas en la PSA.

En cuanto a 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 del tiempo de iluminación en lugar de frente a la energía radiante acumulada, de esta manera es posible comparar datos de experimentos de diferentes días sin que influya la variación de radiación UV que se produce. Para ello, se asume 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 4**, es posible combinar los datos de experimentos realizados en distintos días, y además, compararlos con otros experimentos fotocatalíticos.

$$t_{30W,n} = t_{30W,n-1} + \Delta t_n \frac{UV}{30} \frac{V_i}{V_T}; \quad \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad (\text{ec. 4})$$

Donde t_n es el tiempo experimental correspondiente a cada muestra, UV es la radiación ultravioleta solar media medida durante el incremento de tiempo Δt_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} .

La baja solubilidad de los seis plaguicidas estudiados (**Esquema 1**), hizo necesaria la preparación previa de “aguas residuales simuladas”.

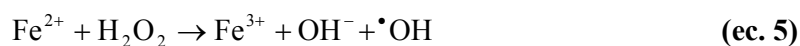


Esquema 1. Estructura química de los plaguicidas estudiados.

Las soluciones de alaclor, clorofenvinfos e isoproturon se prepararon mediante agitación durante varias horas para lograr una concentración de 50 mg/L en la planta piloto. En cuanto a la atrazina, diuron y pentaclorofenol su solubilidad en agua es menor de 50 mg/L a temperatura ambiente, por lo que con objeto de estudiarlos a la máxima concentración inicial permitida, se prepararon soluciones saturadas en un tanque auxiliar de 100 L y se mezclaron durante más de 24 horas. A continuación se llenó completamente la planta piloto con el agua procedente del tanque auxiliar, evitando que se produjera la transferencia de los sólidos no disueltos.

La manera de proceder en todos los experimentos fotocatalíticos ha sido idéntica para cada uno de los plaguicidas. Una vez que el plaguicida se encontraba completamente disuelto en agua era añadido directamente a la planta piloto, y se dejaba en recirculación durante 15 minutos para conseguir una completa homogenización del sistema. Los colectores permanecieron tapados durante ese tiempo para evitar la iluminación de los mismos. Después de esos 15 minutos y en ambos procesos fotocatalíticos, se tomó muestra para conocer la concentración inicial exacta del plaguicida en el reactor (**Punto 1** de las gráficas de resultados experimentales). Las siguientes etapas del proceso son diferentes según se lleve a cabo un tratamiento fotocatalítico homogéneo o heterogéneo. En los experimentos de foto-Fenton es necesario ajustar el pH entre 2.7 y 2.8 añadiendo H₂SO₄ 2N justo después de tomar la muestra inicial. Pasados otros 15 minutos que garanticen una correcta homogenización del sistema, se toma una segunda muestra para comprobar que el valor de pH alcanzado se encuentra dentro de los límites deseados (**Punto 2** de las gráficas de resultados experimentales). A continuación se añade la cantidad de sal de hierro (FeSO₄·7H₂O) que sea necesaria en función de la concentración de Fe²⁺ que se requiere para la experimentación (2mg/L o 55mg/L), y se homogeniza durante otros 15 minutos tomando una tercera muestra (**Punto 3** de las gráficas de resultados experimentales).

Finalmente se añade la cantidad inicial necesaria de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y después de 15 minutos se toma otra muestra con la que se evalúa la reacción de Fenton en la oscuridad. Es en este momento cuando se destapan los colectores ($t_{30w} = 0$) y el proceso de foto-Fenton comienza. La concentración inicial de peróxido de hidrógeno que se adiciona corresponde siempre al 200% de la demanda química de oxígeno calculada para alcanzar la completa mineralización del carbono orgánico a CO₂. La concentración de H₂O₂ en el reactor es controlada mediante frecuentes análisis para evitar su completa desaparición, por consiguiente, se van adicionando pequeñas cantidades de peróxido conforme se va consumiendo. Este proceso se convierte pues en catalítico cuando el Fe²⁺ se oxida a Fe³⁺ (**reacción 5**), que se reduce de nuevo a Fe²⁺ por acción de la radiación (**reacción 6**).



El hecho de que esta reacción genere radicales hidroxilo ha sido probado químicamente, así como se ha observado que el ión férrico acelera la fotodescomposición del peróxido de hidrógeno ya que la fotólisis directa de soluciones ácidas de H_2O_2 da radicales $\cdot OH$ como fotoproducto primario.

En cuanto al procedimiento seguido en los experimentos de fotocatalisis heterogénea con TiO_2 , una vez tomada la muestra correspondiente a la concentración inicial del plaguicida, se añade la cantidad necesaria de catalizador para alcanzar una concentración de 200 mg/L de TiO_2 en el reactor. Finalmente, y transcurridos los 15 minutos que garantizan una correcta homogenización del sistema, se toma una segunda muestra y se destapan los colectores, comenzando en ese momento el proceso fotocatalítico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los principales parámetros utilizados para evaluar la degradación y mineralización de cada plaguicida estudiado en este trabajo de investigación, fueron el Carbono Orgánico Total (COT), la concentración del compuesto original y la toxicidad (medida en porcentaje de inhibición). En algunos casos, la aparición de especies inorgánicas (principalmente cloruro, nitrato y amonio), procedentes de la estructura química del plaguicida se usaron como indicadores de la mineralización, es decir, de la desaparición del COT.

Algunos resultados extraídos de los ensayos realizados, son comunes a todos los plaguicidas y pueden ser discutidos conjuntamente. Por ejemplo, en todos los experimentos de foto-Fenton que se realizaron a una concentración de hierro de 2 mg/L la mineralización del plaguicida correspondiente sólo se consiguió después de destapar los colectores y gracias a la radiación solar. Sin embargo, en los experimentos con 55 mg/L de hierro se alcanzó ya una mineralización significativa sólo durante el proceso Fenton en oscuridad, sin radiación solar. En cuanto a los experimentos con TiO₂, nunca se detectó ningún tipo de degradación en la oscuridad.

El principal objetivo de la primera serie de experimentos era determinar la concentración óptima de hierro en los procesos de foto-Fenton para compararla directamente con el comportamiento de la fotocatalisis con TiO₂ (además de evaluar la toxicidad durante ambos foto-tratamientos). Para ello se seleccionaron dos concentraciones diferentes de Fe²⁺: 2 y 55 mg/L. De acuerdo con los resultados obtenidos previamente en el estudio de otros compuestos [Agüera y col., 2004, Fernández-Alba y col., 2002], pequeñas cantidades de hierro pueden ser suficientes para encontrar velocidades de reacción satisfactorias. Además, 1mM de hierro (lo que corresponde a 55 mg/L), ha sido utilizado frecuentemente como concentración máxima de hierro en otras investigaciones [Pera-Titus y col., 2004, Gogate y Pandit, 2004, Sagawe y col., 2001], debido a que por encima de ese valor los fotones son absorbidos sólo en la parte exterior de los fotorreactores.

En la **figura 9** se muestran los resultados de degradación y mineralización obtenidos mediante foto-Fenton, comparando entre sí las dos concentraciones de catalizador empleadas. Todos estos experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología explicada en el apartado de “procedimiento experimental”, únicamente en

el caso del pentaclorofenol el ácido sulfúrico no fue añadido para evitar la precipitación del plaguicida, sin embargo, el pH evolucionó rápidamente hacia valores ácidos (gracias a la liberación de iones cloruro del compuesto), y el foto-Fenton pudo llevarse a cabo de forma efectiva, sin detectar precipitación de hierro.

Tal y como se muestra en la **figura 9**, la velocidad de mineralización en los experimentos con 2 mg/L de hierro fue en la mayoría de los casos menor que con 55 mg/L. Sin embargo, todos los compuestos originales se degradaron por completo de forma muy rápida, y con una velocidad de degradación similar para ambas concentraciones de hierro. La principal diferencia se encontró durante la reacción de Fenton en la oscuridad, en la que en todos los casos se produjo una importante desaparición del plaguicida, pero sin embargo, para el caso de 2 mg/L de Fe^{2+} , se obtuvo una escasa mineralización (disminución del COT) antes de la iluminación. Por otro lado, la velocidad de mineralización después de la iluminación fue bastante parecida en todos los casos. Teniendo en cuenta estos resultados, se concluye que el proceso de foto-Fenton a baja concentración de hierro puede ser considerado como un tratamiento apropiado por las siguientes razones:

1. Porque usar sólo 2 mg/L de hierro como catalizador es suficiente para mineralizar a los plaguicidas.
2. Porque la mineralización de estos compuestos no tuvo lugar hasta que el proceso transcurrió bajo iluminación.
3. Y por último, porque una vez iluminado el sistema, la velocidad de mineralización fue muy similar para ambas concentraciones de hierro.

En cuanto a los compuestos clorados, el análisis de los cloruros en disolución liberados durante el proceso fotocatalítico, muestra una degradación y decloración muy rápida en comparación con la desaparición del COT. De esto se deduce, que el COT residual presente en el agua al finalizar algunos experimentos, no corresponde a ningún intermedio de degradación clorado. Generalmente, esta decloración también provoca una disminución de la toxicidad.

En muchos de los casos resultó difícil alcanzar una mineralización total, lo que se traduce en que los intermedios formados al final del proceso son más resistentes, y por tanto, continuar con el tratamiento podría resultar poco rentable desde el punto de vista económico (debido al elevado consumo de peróxido de hidrógeno que sería

necesario en esas condiciones). En este contexto, la evaluación de la toxicidad del agua antes de llegar a la mineralización total está más que justificada para detener el proceso fotocatalítico siempre y cuando se hayan alcanzado las necesidades de detoxificación requeridas.

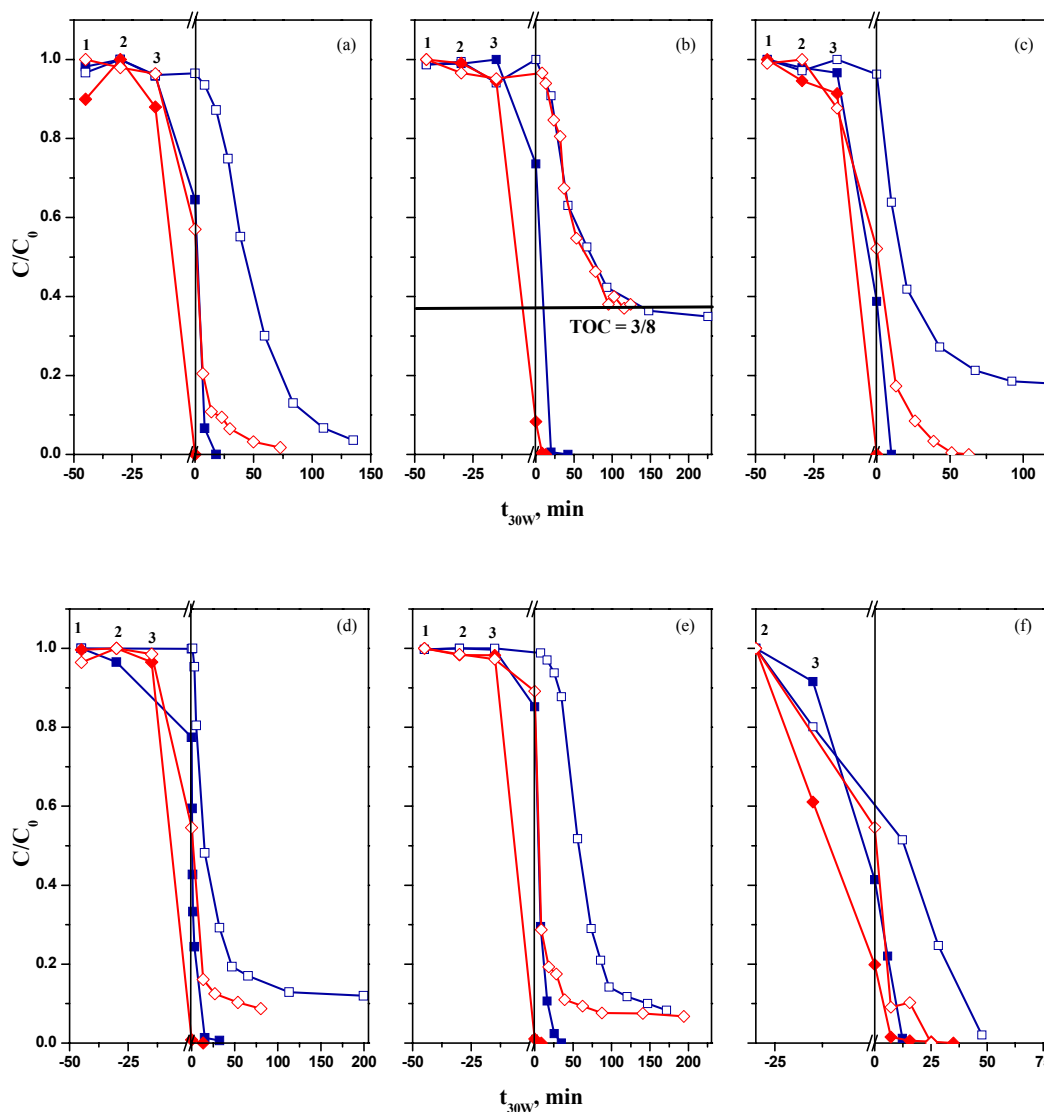


Figura 9. Degradación de todos los plaguicidas estudiados mediante foto-Fenton a dos concentraciones de hierro diferentes: (a) alaclor, (b) atrazina, (c) clorofenvinfos, (d) diuron, (e) isoptroturon y (f) pentaclorofenol. La línea correspondiente al 3/8 del TOC que aparece en el gráfico de atrazina representa el anillo de triazina no biodegradable. Los puntos 1, 2 y 3 corresponden a las diferentes etapas del proceso fotocatalítico previas a la iluminación del sistema (ver “procedimiento experimental”). (■)

plaguicida, Fe 2 mg/L; (◆) plaguicida, Fe 55 mg/L; (□) TOC, Fe 2 mg/L; (◇) TOC, Fe 55 mg/L.

En la **figura 10** se muestra la comparación directa entre los procesos de foto-Fenton con 2 mg/L de Fe^{2+} y el catalizado por TiO_2 . Se observa cómo en todos los casos el tratamiento fotocatalítico mediante foto-Fenton resulta ser más rápido y efectivo que con TiO_2 (esto será discutido con detalle más adelante). El pentaclorofenol se mineraliza más rápidamente que el resto de compuestos por foto-Fenton, lo cual no es extraño puesto que en general, los clorofenoles se degradan muy fácilmente por este POA. Es importante destacar también, que la reacción de Fenton en la oscuridad para este plaguicida resultó ser muy eficiente usando sólo una concentración de hierro de 2 mg/L.

Por otro lado, se puede observar cómo la atrazina no se llegó a mineralizar completamente como consecuencia de la formación de triazinas que, como es sabido, no pueden ser mineralizadas hasta el final de la fotocatalisis o del foto-Fenton debido a la alta estabilidad del anillo de triazina. Con respecto a las especies inorgánicas que aparecen en disolución, merece la pena mencionar que el cloro orgánico fue recuperado completamente como ión cloruro en todos los casos.

En cuanto al amonio y al nitrato, han sido detectados en diferentes concentraciones a lo largo de los procesos fotocatalíticos, y el balance total de nitrógeno se cerró sólo en el caso del alaclor, en el que todo el nitrógeno apareció principalmente en forma de ión amonio. En el caso del balance de nitrógeno en la atrazina, se consideró que dos de los átomos de nitrógeno podían ser mineralizados, mientras que los otros tres continuaban formando parte del anillo. Tal y como se ha descrito en investigaciones anteriores [Low y col., 1991], la atrazina genera iones nitrato y amonio durante la fotocatalisis con TiO_2 , en una relación de concentraciones de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^- = 0.69$, donde los iones amonio aparecen como los precursores del nitrato. En los experimentos realizados en este trabajo se ha encontrado una relación de concentraciones parecida.

El comportamiento del diuron y el isotroturon fue similar, aproximadamente el 10% del COT inicial resultó muy difícil de degradar en ambos casos. Este efecto se observó indistintamente para el TiO_2 y para el foto-Fenton, y exclusivamente en relación a la velocidad de mineralización. Ese COT debe de corresponder únicamente a

compuestos alifáticos, puesto que el detector de diodo array del HPLC no muestra ninguna señal por debajo de 210nm.

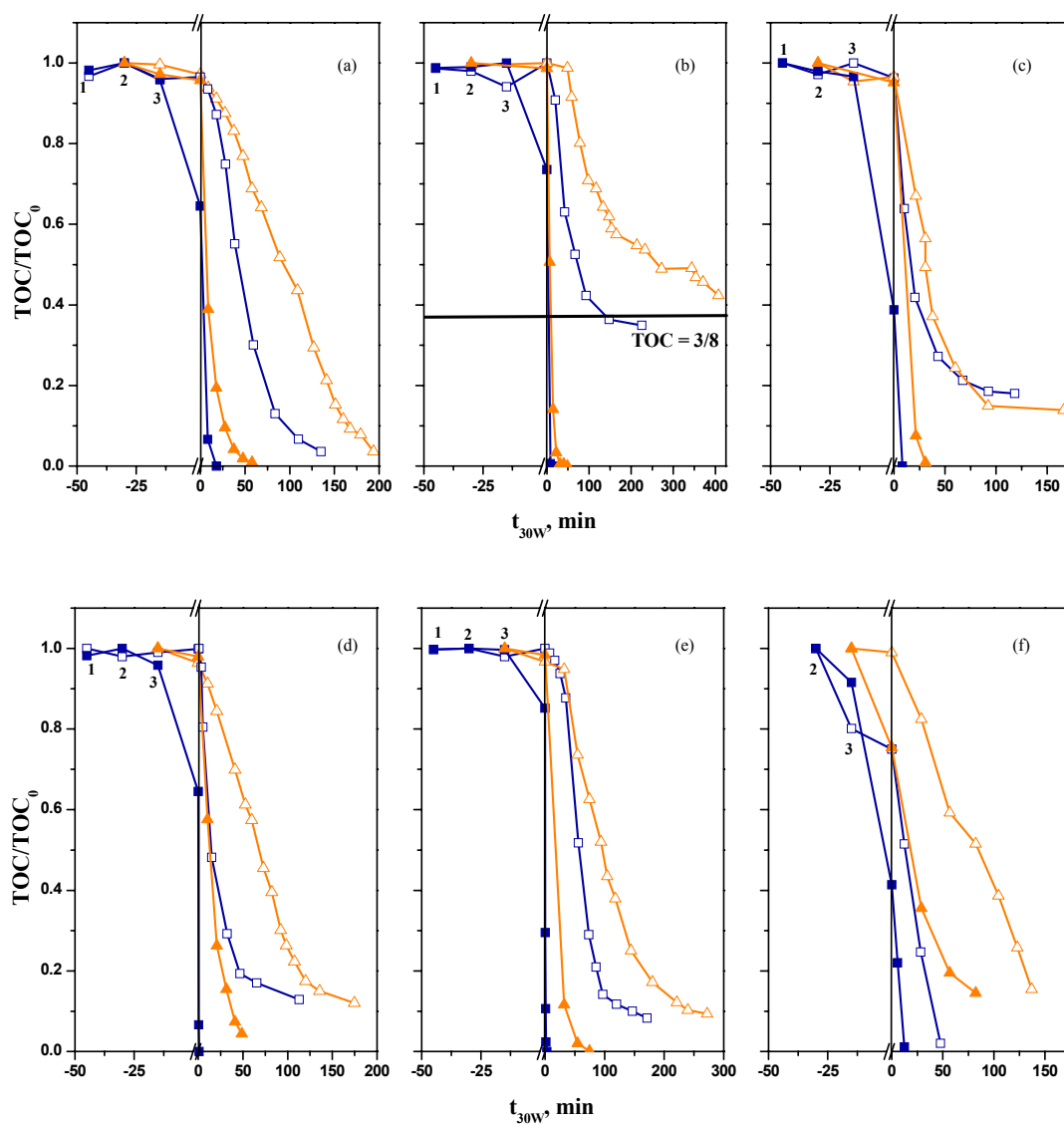


Figura 10. Degradación y mineralización de todos los plaguicidas mediante foto-Fenton (Fe 2 mg/L) y TiO₂: (a) alaclor, (b) atrazina, (c) clorofenvinfos, (d) diuron, (e) isotroturon y (f) pentaclorofenol. La línea correspondiente al 3/8 del TOC que aparece en el gráfico de atrazina representa el anillo de triazina no biodegradable. Los puntos 1, 2 y 3 corresponden a las diferentes etapas del proceso fotocatalítico previas a la iluminación del sistema (ver “procedimiento experimental”). (■) plaguicida, Fe 2 mg/L; (▲) plaguicida, TiO₂ 200 mg/L; (□) TOC, Fe 2 mg/L; (△) TOC, TiO₂ 200 mg/L.

La lenta degradación del COT procedente de plaguicidas de fenilurea después del 80-90% de mineralización [Maurino y col., 1999, Muneer y col., 1999, Parra y col., 2002], así como la lenta mineralización de la urea [Maletzky y Bauer, 1998] que puede ser considerada como un intermedio de la degradación del diuron y el isoproturon, han sido previamente estudiados. La urea contiene sólo un átomo de carbono y dos de nitrógeno, lo que puede justificar no sólo la cantidad residual de COT correspondiente al 10% del inicial, sino también la liberación incompleta de todo el nitrógeno de la molécula en forma de NH_4^+ o NO_3^- . Para ambos tratamientos fotocatalíticos y en el caso del diuron y el isoproturon, cuando el COT es el 10% del inicial, los dos átomos de nitrógeno aún no se han mineralizado. Esto también se observa en los resultados de toxicidad mostrados a continuación, en los que la toxicidad prácticamente no cambia cuando el COT es el 10% del inicial, lo que significa que una vez alcanzado ese punto del proceso, el agua tratada aún contiene el mismo tipo de compuestos.

La determinación de la toxicidad del agua, en distintas fases del tratamiento de POAs con bioensayos de toxicidad aguda, utilizando diferentes microorganismos [Fernández-Alba y col. 2002 a y 2002b] es otra forma de reducir los costes de operación de los POAs.

Realizar una correcta evaluación toxicológica de las reacciones complejas que se dan entre las mezclas de compuestos originadas en diferentes etapas de los procesos de degradación fotocatalítica, no es una tarea fácil. La toxicidad de estas mezclas es muy difícil de predecir, puesto que la identidad e incluso la concentración de cada uno de los compuestos presentes en las muestras suelen ser desconocidas. Lo que es más, el mecanismo de actuación tanto de los compuestos originales como de sus productos de degradación debe ser conocido, lo cual es prácticamente imposible en la mayoría de los casos. En este trabajo se ha estudiado la evolución de la toxicidad a partir de la bacteria *Vibrio fischeri* cuya sensibilidad ha sido previamente evaluada para varios plaguicidas [Ruiz y col., 1997].

La **figura 11** muestra las curvas de toxicidad, medida en porcentajes de inhibición (**ec. 1**), correspondientes a los bioensayos realizados durante la aplicación de ambos procesos fotocatalíticos a los seis plaguicidas. Antes de llevar a cabo estos bioensayos, fue necesario eliminar los productos químicos que se habían añadido al agua durante la fotocatalisis, el TiO_2 se eliminó por filtración, el H_2O_2 por adición de la

enzima catalasa y el hierro mediante la coagulación y filtración del precipitado una vez neutralizadas las muestras.

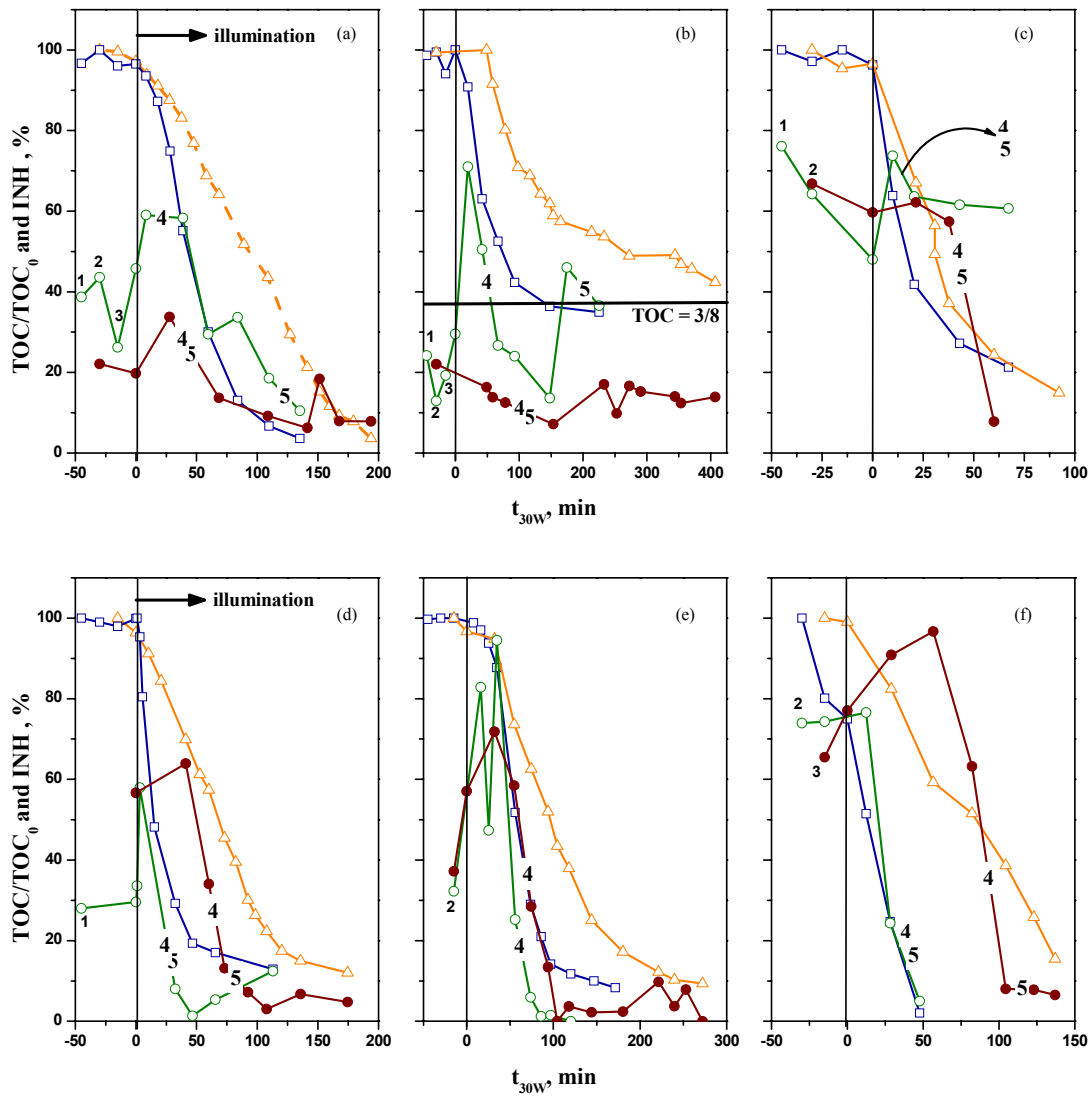


Figura 11. Evolución de la mineralización y la toxicidad de los plaguicidas tratados mediante foto-Fenton (Fe 2 mg/L) y TiO₂: (a) alaclor, (b) atrazina, (c) clorofenvinfos, (d) diuron, (e) isoproturon y (f) pentaclorofenol. La línea correspondiente al 3/8 del TOC que aparece en el gráfico de atrazina representa el anillo de triazina no biodegradable. Los puntos 1, 2 y 3 corresponden a las diferentes etapas del proceso fotocatalítico previas a la iluminación del sistema (ver “procedimiento experimental”). (4) señala la desaparición completa del plaguicida, y (5) señala la recuperación del cloro

orgánico en forma de cloruro en disolución. (□)TOC, Fe 2 mg/L; (△) TOC, TiO₂ 200 mg/L; (○) % inhibición, Fe 2 mg/L; (●)% inhibición, TiO₂ 200 mg/L.

La **figura 11** muestra también la evolución de la toxicidad en función del tiempo de iluminación durante los experimentos con TiO₂ y con foto-Fenton. En este caso los experimentos fotocatalíticos se mantuvieron hasta que los ensayos de toxicidad mostraron un porcentaje de inhibición inferior al 50%, o hasta que la mineralización del COT fue significativa (superior al 90%). En cuanto a la toxicidad del alaclor se observa que tuvo un comportamiento muy parecido en ambos tratamientos, la toxicidad aumentó al inicio de los procesos fotocatalíticos pero disminuyó de forma acusada una vez alcanzada la completa desaparición del alaclor, y principalmente cuando todo el cloro de la molécula se recuperó en forma de ión cloruro. Estos resultados refuerzan la hipótesis de la formación de intermedios clorados más tóxicos que el compuesto original. Según esto, considerar la total degradación del alaclor como “parámetro de control” para el vertido de las aguas contaminadas con este plaguicida, podría resultar arriesgado. En la mayoría de los otros casos se ha detectado un comportamiento similar, se formaron compuestos más tóxicos que el plaguicida original en las primeras etapas del tratamiento fotocatalítico, mientras que en las siguientes etapas se consiguió llegar a la degradación total del contaminante de partida.

Cabe destacar también, que en todos los casos la toxicidad fue menor cuando se alcanzó la total decloración del plaguicida (porcentaje de inhibición inferior al 20%), excepto en el caso del clorofenvinfos en el que al final del tratamiento con foto-Fenton parecen quedar compuestos clorados sin degradar que provocan una toxicidad aún elevada. En cuanto a la liberación del resto de iones inorgánicos (amonio, nitrato, etc), no se ha observado ninguna relación con la evolución de la toxicidad. Incluso parece que para valores iguales de COT alcanzados en las primeras etapas del tratamiento, los intermedios formados con foto-Fenton no son exactamente iguales a los formados durante la fotocátalisis con TiO₂. Esto significa que el uso del COT como único parámetro que determine la eficacia de los diferentes métodos fotoquímicos, resulta inadecuado puesto que para valores iguales de COT, la toxicidad puede ser muy diferente. Sin embargo también se ha observado en este trabajo, que valores de COT lo suficientemente bajos, daban lugar a toxicidades prácticamente iguales.

CONCLUSIONES

Uno de los principales objetivos de este trabajo de investigación consiste en demostrar que la detoxificación de agua contaminada con plaguicidas (alaclor, atrazina, clorofenvinfos, diuron, isoproturon y pentaclorofenol) es posible en un tiempo razonable y sin llegar a alcanzar una completa mineralización. Esto se ha conseguido demostrar para los seis plaguicidas estudiados y mediante la aplicación de los dos procesos fotocatalíticos con aprovechamiento de radiación solar.

Este trabajo demuestra que el uso de hierro a muy bajas concentraciones (2 mg/L), es suficiente para tratar aguas residuales contaminadas con plaguicidas, lo cual puede resultar muy útil puesto que, en este caso, la recogida del hierro después del tratamiento fotocatalítico, y su posterior vertido no serían necesarios.

Por otro lado, también se ha demostrado que la fotocatalisis mediante foto-Fenton es más efectiva que con TiO_2 , no sólo en términos de degradación del plaguicida sino también en cuanto a la mineralización del COT.

Por último, se puede concluir a partir de los análisis efectuados en este trabajo, que los metabolitos de los plaguicidas son más tóxicos que los propios plaguicidas originales. Esto significa que la concentración inicial del compuesto original y/o el COT correspondiente, no se pueden relacionar de forma simple con la toxicidad. Se ha comprobado que la toxicidad disminuye siempre al final del tratamiento fotocatalítico, pero además, justo después de que todo el cloro procedente de la molécula del plaguicida se libera en forma de cloruros, la toxicidad presenta ya valores bastante bajos.

REFERENCIAS

- A. Agüera, M. Mezcuá, D. Hernando, S. Malato, J. Cáceres, A. Fernández-Alba (2004). *Application of GC-MS and GC-AED to the evaluation of by-products formed by solar photo-Fenton degradation of methyl tert-butyl ether in water*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 84, 149.
- J.V. Andreozzi, V. Caprio, A. Insola, R. Marotta (1999). *Advanced Oxidation Processes (AOP) for Water Purification and Recovery*. Catalysis Today, 53, 51-59.
- ASTM: American Society for Testing and Materials (1987a). *Standard Tables for Terrestrial Direct Normal Solar Spectral Irradiance for Air Mass 1.5*. Designation: E891-87.
- ASTM: American Society for Testing and Materials (1987b). *Standard Tables for Terrestrial Direct Normal Solar Spectral Irradiance for Air Mass 1.5 for 37° Tilted Surface*. Designation: E892-87.
- Bockelmann D, Dillert R, Dzengeľ J, Goslich R, Grob E, Hgendorff M, Hufschmidt D, Memming R, Sagawe G, Schober M, Schuhmacher H-W, Selzer V, Siemon U, Vollmer S, Theurich J, Bahnemann D (2004). *Photocatalysis*. Solar Energy, 77: 445.
- W. Connell (1997). *Basic Concepts of Environmental Chemistry*, Lewis Publishers.
- D.J.B. Dalzell, S. Alte, E. Asichueta, A. De la Sota, J. Etxebarria, M. Gutierrez, C.C. Hoffmann, D. Sales, U. Obst, N. Chistofi (2002). *A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge*. Chemosphere 47 (5), 535-545.
- R.E. Dewhurst, J.R. Wheeler, K.S. Chummun, J.D. Mather, A. Callaghan, M. Crane (2002). *The comparison of rapid bioassays for the assessment of urban groundwater quality*. Chemosphere 47 (5), 547-554.
- A.R. Fernández-Alba, M.D. Hernando, G. Díaz-López, Y. Christi (2002a) *Comparative Evaluation of the Effects of Pesticide in Acute Toxicity Luminescence Bioassays*. Analytical Chemical Acta. 451, 195-202.
- A.R. Fernández-Alba, M.D. Hernando, G. Díaz-López, Y. Christi (2002b). *Toxicity of Pesticides in Wastewater: a Comparative Assessment of Rapid Bioassays*. Analytica Chemical Acta, 426, 289-301.
- A.R. Fernández-Alba, D. Hernando, A. Agüera, J. Cáceres, S. Malato (2002). *Toxicity assays: A way for evaluation AOPs efficiency Water*. Res. 36, 4255-4262.

- Gogate P.R, Pandit A.B (2004). *A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidations technologies at ambient conditions*. Adv. Environ. Res. 8: 501-551.
- M. Henze, P. Harremoës, J. La Cour Jansen, E. Arvin (2000). *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*, 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Konstantinou I.K, Albanis T.A (2003). *Photocatalytic transformation of pesticides in aqueous titanium dioxide suspensions using artificial and solar light: intermediates and degradation pathways*. Appl. Catal. B: Environ. 42: 319-335.
- M. Kositzki, I. Poullos, S. Malato, J. Cáceres, A. Campos (2004). *Solar photocatalytic treatment of synthetic municipal wastewater*. Water Res. 38 1147.
- G.K.-C. Low, S.R. McEvoy, R.W. Matthews (1991). *Formation of nitrate and ammonium ions in titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of organic compounds containing nitrogen atoms*. Environ. Sci. Technol. 25 (3), 460-467
- S. Malato, J. Blanco, A. Vidal, C. Richter (2002). *Photocatalysis with solar energy at pilot-plant scale: An overview*. Appl. Catal. B: Environ. 37 (1), 1-15.
- P. Maletzky, R. Bauer (1998). *The photo-Fenton method –Degradation of nitrogen containing organic compounds*. Chemosphere 37 (5), 899-909.
- V. Maurino, C. Minero, E. Pelizzetti, M. Vicente, (1999). *Photocatalytic transformation of sulfonylurea herbicides over irradiated titanium dioxide particles*. Colloid Surf. A: Phys. Eng. Asp. 151 (1-2), 329-338.
- M. Muneer, J. Theurich, D. Bahnemann (1999). *Formation of toxic intermediates upon the photocatalytic degradation of the pesticide Diuron*. Res. Chem. Intermed., 25 (7) 667-683.
- A. Parkinson, M.J. Barry, F. A. Roddick, M.D. Hobday (2001). *Preliminary toxicity assessment of water after treatment with UV-irradiation and UVC/H₂O₂*. Water Res. 35 (15), 3656-3664.
- S. Parra, J. Olivero, C. Pulgarín (2002). *Relationships between physicochemical properties and photoreactivity of four biorecalcitrant phenylurea herbicides in aqueous TiO₂ suspension*. Appl. Catal. B: Environ. 36 (1), 75-85.
- D.J. Paustenbach (2000). *The practice of exposure assessment: A state-of-art review*. J. Toxicol. Environ. Health B 3 (3), 179-291.

- M. Pera-Titus, V. García-Molina, M.A. Baños, J. Giménez, S. Espulgas (2004). *Degradation of Chlorophenols by means of advanced oxidation processes: A general review*. Appl. Catal. B: Environ. 47, 219.
- J.M. Ribo, F. Rogers (1990). *Toxicity of Mixtures of Aquatic Contaminants using the Luminiscence Bacteria Bioassay*. Toxicity Assessment: An Internation. Journal, 5, 135-152.
- G. Ricco, M.C. Tomei, R. Ramadori, G. Laera (2004). *Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: Comparison between respirometry and Microtox®*. Water Res. 38 (8), 2103-2110.
- M.J. Ruiz, L. López-Jaramillo, M.J. Redondo, G. Font (1997). *Toxicity assessment of pesticides using the Microtox test: Application to environmental simples*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 59 (4),619-625.
- G. Sagawe, A. Lehnard, M. Lübber, D. Bahnemann (2001). *The insulated solar Fenton hybrid process: Fundamental investigations*. Helv. Chem. Acta 84 (12), 3742-3759.
- M.P. Thekaekara (1973). *Solar energy outside the earth's atmosphere*. Solar Energy, 14, 109-127.
- C. Tixier, P. Bogaerts, M. Sancelme, F. Bonnemoy, L. Twagilimana, A. Cuer, J. Bohatier, H. Veschambre (2000). *Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: Structure and toxicity of metabolites*. Pest. Manage. Sci. 56(5), 455-462.
- P. Wilderer, S. Wuertz (2002). *Modern Scientific Tools in Bioprocessing*, Elsevier, Amsterdam.