



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

Empleo de la reacción Fenton heterogénea para el tratamiento de aguas que contienen colorantes y microorganismos indicadores de contaminación fecal

María Paula Castellanos Romero
Ángela Viviana Uscátegui Montaña

Director:
Carlos Enrique Daza
Químico, Ph.D.
Profesor Departamento de Química

Bogotá, Junio de 2012



Empleo de la reacción Fenton heterogénea para el tratamiento de aguas que contienen colorantes y microorganismos indicadores de contaminación fecal

María Paula Castellanos Romero
Ángela Viviana Uscátegui Montaña

Ingrid Shuller
Decana Académica

Janneth Arías
Directora del programa de
Microbiología industrial

Bogotá, Junio de 2012



Empleo de la reacción Fenton heterogénea para el tratamiento de aguas que contienen colorantes y microorganismos indicadores de contaminación fecal

María Paula Castellanos Romero
Ángela Viviana Uscátegui Montaña

Carlos Enrique Daza
Director trabajo de grado

León Darío Pérez Pérez
Jurado

Bogotá, Junio de 2012

Nota de advertencia

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se duplique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.

Resumen:

La reacción Fenton es un proceso de oxidación avanzada en el que se usa el H_2O_2 y el ion Fe^{2+} , con el fin de lograr una degradación acelerada de contaminantes orgánicos presentes en aguas residuales. **Objetivo:** Realizar el tratamiento de aguas que contienen colorantes (Negro Reactivo 5 y cristal violeta) y microorganismos indicadores de contaminación fecal (*E.coli*) mediante el sistema Fenton heterogéneo empleando catalizadores de Fe soportados sobre carbón activado obtenido a partir de biomasa vegetal. **Materiales y Métodos:** El carbón activado fue obtenido a partir de biomasa residual de rosas colombianas por medio de pirólisis a alta temperatura, seguida de activación química con NaOH. Los catalizadores fueron sintetizados por la técnica de impregnación húmeda incipiente a partir de los nitratos de Fe^{3+} en proporciones de 1, 3, 5 y 10 % m/m del metal. Se realizó caracterización del carbón activado por la técnica de infrarrojo y titulaciones Boehm (ácido-base). Para la reacción Fenton se realizaron experimentos en un reactor tipo Batch, empleando agua que contenía colorantes (Negro Reactivo 5 y cristal violeta) en una concentración de 10 ppm, se emplearon 50 mg de catalizador Fe/carbón activado. Las reacciones de remoción se llevaron a cabo durante 3 h y las de inactivación bacteriana durante 1 h con muestreos seleccionados. El seguimiento del proceso Fenton para la degradación de los colorantes se monitoreó por colorimetría a 590 nm y la inactivación de *E.coli* por la técnica de conteo por microgota en agar Trypticase de soja. Por último, se realizaron ensayos de toxicidad aguda empleando *Hydra attenuata*. **Resultados:** La caracterización química del carbón activado evidencia un carácter predominantemente básico con grupos funcionales $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $\text{C}-\text{C}$ y $\text{C}=\text{C}$ en su superficie. El mayor porcentaje de remoción para el Negro Reactivo 5 se obtuvo con el catalizador de 3% Fe (98,33 %) en un tiempo de 180 min. Para el caso del cristal violeta se obtuvo que la mayor remoción del colorante se logra a una concentración del 1% Fe (63,95 %) durante 180 min. Los catalizadores obtenidos alcanzan niveles de remoción realmente altos en comparación con catalizadores reportados. En cuanto a las curvas de inactivación de *E.coli*, se encontró que para los diferentes tratamientos las unidades log UFC/mL bajaron en promedio entre 1 y 2 respecto a la concentración inicial, sin embargo, el proceso no llega a inactivar por completo a la bacteria. **Conclusión:** Se puede determinar que el proceso Fenton heterogéneo con Fe soportado en carbón activado es eficiente para la remoción de colorantes altamente refractarios como el Negro Reactivo 5 y el cristal violeta con concentraciones entre 1 y 3% de Fe. La inactivación de *E.coli*, mediante el proceso planteado en el presente trabajo, no es alta ya que no se logra una disminución significativa de la población inicial de la bacteria.

1. Introducción

La contaminación del agua es uno de los grandes problemas ambientales actuales relacionado directamente con importantes implicaciones a nivel social y económico así como de salud pública. Son diversos los tipos y grados de contaminación presentes en distintos tipos de efluentes acuosos. A baja escala, se puede mencionar entre muchos otros casos, que los residuales provenientes de laboratorios de investigación, docencia y ensayos de prueba contienen residuos químicos en los cuales están presentes compuestos orgánicos en distintas concentraciones y combinaciones las cuales los convierten en tóxicos y peligrosos tanto para su descarga al medio ambiente como para su almacenamiento. Así mismo, estos residuales contienen una alta carga microbiana que en la mayoría de los casos supera a las estipuladas por las legislaciones vigentes (1). En muchos casos, los compuestos químicos presentes en los efluentes son refractarios al tratamiento biológico, por lo que la biodegradación directa del residual no constituye una verdadera solución. Por esta razón, se buscan nuevas alternativas de degradación que sean económicas y efectivas disminuyendo la carga orgánica y su toxicidad y buscando garantizar una descarga segura del efluente (2). Uno de los métodos más promisorios es el proceso de oxidación avanzada conocido como proceso Fenton, en el que se utilizan como reactivos peróxido de hidrógeno y Fe^{2+} haciendo uso de un reactor simple. La descomposición del peróxido en presencia de Fe^{2+} genera especies reactivas de oxígeno (radicales hidroxilo) que degradan la materia orgánica por lo que mejoran la calidad del agua tratada (3).

El uso de la reacción Fenton heterogénea, utilizando carbón activado como soporte catalítico mejora el proceso; debido a la mayor área superficial y porosidad del material en comparación con otros tipos de sólidos, lo que facilita la interacción del peróxido de hidrógeno y Fe^{2+} , dando así como resultado un mayor porcentaje de remoción del contaminante orgánico (4-5). Así mismo, el uso de carbones activados genera una disminución en el costo de operación del tratamiento, debido a que se facilita la separación del catalizador al finalizar la reacción y adicionalmente, al bajo valor agregado de este material (6).

En el presente trabajo, se estudiará la eficiencia en la degradación y disminución de la toxicidad de aguas que contienen colorantes (Negro Reactivo 5 y cristal violeta) y microorganismos indicadores de contaminación fecal (*E. coli*) aplicando el proceso Fenton heterogéneo (3). Para este propósito se evaluará la efectividad de catalizadores de Fe/carbón activado obtenido a partir de biomasa vegetal proveniente de cultivos de rosas.

2. Justificación:

En la actualidad, se generan residuos provenientes de más de 10.000 diferentes colorantes sintéticos en todo el mundo por año, estos son utilizados ampliamente en las industrias de impresión, en alimentos y textiles, además de tener aplicación en las identificaciones histológicas y microbiológicas. Estos colorantes, en su mayoría son considerados tóxicos y perjudiciales para el ambiente ya que generan cambios en las características físicas y químicas de los ecosistemas, además, son perjudiciales para la salud, debido a que son considerados carcinogénicos (7).

Por otro lado, se sabe de la existencia de agentes microbianos patógenos en aguas residuales causantes de una gran cantidad de enfermedades en especial en comunidades vulnerables. Estos microorganismos pueden ser eliminados por diversos tratamientos, aunque en muchos otros casos son descargados directamente en el efluente y entran a las aguas receptoras (8).

Para la degradación de estos compuestos coloreados y microorganismos se deben tener alternativas económicas que posibiliten la degradación efectiva de la carga sin producir efectos colaterales. A su vez, el método seleccionado debe contribuir a la economía del proceso facilitando su operación en ambientes industriales sin comprometer la efectividad del tratamiento y así garantizar una descarga segura del efluente (7).

El tratamiento de compuestos orgánicos y agentes patógenos en solución acuosa, se puede realizar con procesos de oxidación avanzada, los cuales se basan en la generación de especies reactivas como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) que oxida una amplia gama de contaminantes orgánicos de forma rápida y no selectiva. Entre los potenciales procesos de oxidación se encuentra la reacción Fenton, la cual tiene una gran pertinencia debido a la economía en su implementación y su efectivo potencial de aplicación (1). La reacción Fenton, presenta numerosas ventajas como su alta eficiencia, simplicidad y limpieza ya que los residuos generados son inocuos y estables, lo que garantiza una disposición adecuada de residuos acuosos (1). Adicionalmente, debido a que en este proceso se pueden usar catalizadores sólidos (reacción heterogénea) hay una ventaja en el momento de la separación del mismo del medio acuoso tratado, disminuyendo costos en la implementación. Un ejemplo de lo anterior son los soportes provenientes de materia orgánica como el carbón activado, que le dan una gran ventaja a este método ya que presenta una amplia disponibilidad y un bajo costo al

provenir de desechos biológicos, además de unas características físico-químicas como porosidad, amplia área superficial y propiedades químicas variables (9).

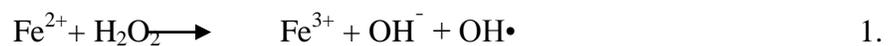
Con base en lo antes mencionado, en el presente trabajo se estudiará la eficiencia del proceso Fenton heterogéneo usando catalizadores de Fe soportados sobre carbones activados en la degradación y disminución de la toxicidad de efluentes acuosos simulados que contienen colorantes como el Negro Reactivo 5 y el cristal violeta, además de agentes microbianos indicadores de contaminación fecal como *E.coli*.

3. Referentes conceptual: Marco Teórico.

3.1.Reacción Fenton:

El proceso Fenton es un proceso de oxidación avanzada (POA) en el que se utilizan como reactivos peróxido de hidrógeno y sales de hierro (10). La reacción se inicia con la descomposición catalítica del H_2O_2 en medio ácido seguido por la transferencia de un electrón, dando lugar a Fe^{3+} y un radical $OH\bullet$ de alta reactividad y baja selectividad (11).

Las ecuaciones generales (1-3) que representan el proceso se presentan a continuación:



La reacción Fenton puede ser de dos tipos: homogénea o también llamada reacción Fenton convencional y heterogénea. En la reacción convencional, el peróxido de hidrógeno diluido reacciona con Fe^{2+} en solución, produciendo el radical hidroxilo $OH\bullet$ y el ion férrico a valores de pH cercanos a 3 (11-12). Por otro lado, la reacción heterogénea se presenta como una alternativa ante el alto costo del proceso convencional (12). En esta reacción no se utiliza Fe^{2+} disuelto como catalizador homogéneo, sino el Fe^{+3} heterogéneo másico o soportado, adicionalmente algunas veces puede ser mediado por fotocatalisis (11,13).

3.2. Catalizadores para la reacción Fenton heterogénea

Para la reacción Fenton es de gran importancia la selección del catalizador ya que este debe permitir una alta actividad catalítica con una baja concentración de hierro lixiviado (14). Entre las características que se deben tener en cuenta en el momento de escoger un catalizador son la resistencia química, la actividad catalítica, el pH de trabajo y, en especial, la ausencia de lixiviación del Fe (15). La reacción puede realizarse con catalizadores que incluyen óxidos de Fe^{3+} inmovilizados en una larga variedad de soportes sólidos (16). Entre estos se encuentran, las películas de Nafion, las resinas basadas en Fe^{2+} y Fe^{3+} , el hierro inmovilizado en aluminatos, arcillas u óxidos de minerales (16-17). Así mismo, se reporta el uso de diferentes catalizadores, soportados en carbón activado logrando una alta eficiencia en los procesos de degradación de pesticidas altamente refractarios a través de la reacción Fenton (18). De la misma manera, también se ha reportado el uso de óxidos de hierro presentes en la matriz del suelo tales como la goethita ($\alpha\text{-FeOOH}$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), magnetita (Fe_3O_4) y/o ferrihidrita ($\alpha\text{-Fe}_{10}\text{O}_{15}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (11-18).

El estudio de Ramírez J et. al. (19) emplea dos tipos de carbón activado: uno preparado a partir de subproductos agroindustriales y el otro un aerogel de carbono. Los autores señalan que la selección del catalizador debe estar basada en características del catalizador tales como el tamaño de grano y de partícula de Fe, la distribución del Fe en la superficie, el área superficial y el volumen del poro del soporte.

3.3. Tratamiento de aguas residuales con la reacción Fenton

Para el tratamiento de aguas residuales, generalmente se utilizan métodos tradicionales entre los que se encuentra la floculación o la coagulación, la separación por membrana y la adsorción por carbón activado, los cuales no generan una solución completa al problema; debido a que en estos se pueden producir productos como los lodos, provocando así que la contaminación se transfiera de un lado a otro (20).

Como ya se mencionó, dentro de las técnicas más promisorias y más ampliamente utilizadas se encuentra el sistema Fenton, debido a que genera una completa degradación de las moléculas orgánicas contaminantes ya que las desmineraliza, disminuyendo su toxicidad y dando como resultado la conservación de los efluentes acuáticos (20-21). Con base en esto, la oxidación catalítica de compuestos orgánicos biorecalcitrantes, es una técnica viable empleada para la descontaminación de aguas residuales a baja escala. Uno de los muchos ejemplos reportados en la literatura es el de Benatti C et. al. (22), quienes trataron aguas residuales de laboratorios de docencia mediante la reacción Fenton con catalizadores de Fe^{2+} obteniendo excelentes resultados para la degradación de compuestos polifenólicos.

En el presente trabajo se propone el uso de la reacción Fenton heterogénea en el tratamiento de dos colorantes (Negro Reactivo 5 y cristal violeta) y de microorganismos indicadores de contaminación fecal (*E. coli*). A continuación se dan detalles de los sistemas de estudio.

3.4. Colorantes: Negro Reactivo 5 y cristal violeta

Los colorantes son sustancias orgánicas cromofóricas de color intenso que por lo general imparten un color a una sustancia incolora, o a un sustrato por medio de una absorción selectiva de luz (23-24). En su estructura, los colorantes presentan por lo general anillos aromáticos los cuales presentan uniones a grupos de tipo mono o di- azos altamente reactivos en los medios acuosos. Adicionalmente, estos compuestos pueden presentar combinaciones con grupos reactivos de tipo tricloropirimidinas, vinil-sulfones, difluorocloropirimidina y clorotrazinas (20-24).

Un ejemplo de colorante di-azo es el Negro Reactivo 5 (Tetrasodio-4-amino-5-hidroxi-3,6 (Bis (4-2- (sulfatnatooxi) (Etilsulfonil) Fenil) Azo)- Naftaleno-2,7-Disulfonato), el cual es un di-azo sulfónico compuesto por un complejo auxocromo-cromoforo, constituido por el grupo azo (dos átomos de nitrógeno unidos por un triple enlace) y anillos aromáticos unidos a este (Figura 1, izquierda). El colorante presenta en su estructura un grupo sulfato ($-NaSO_3$), el cual determina la solubilidad del compuesto; Se ha demostrado que la LD_{50} es cercana a 14000 mg/kg y que es irritante al contacto con la piel (26). Este colorante es de gran importancia ya que es utilizado comúnmente en la industria textil y presenta un nivel de contaminación ambiental alto debido a que más del 15 % de su contenido va directo a aguas residuales y causa un alto impacto en el ambiente (26).

Por otra parte, el Cristal Violeta, un trifenil metano compuesto de violeta básica, cloruro de hexametilpararosanilina y violeta de metilo (Figura 1, derecha); se utiliza ampliamente en la industria textil, además de ser un agente de tinción bacteriológico e histopatológico (27), es considerado un veneno mutagénico y mitótico, por lo que es de gran preocupación a nivel de salud pública y ambiental (28).

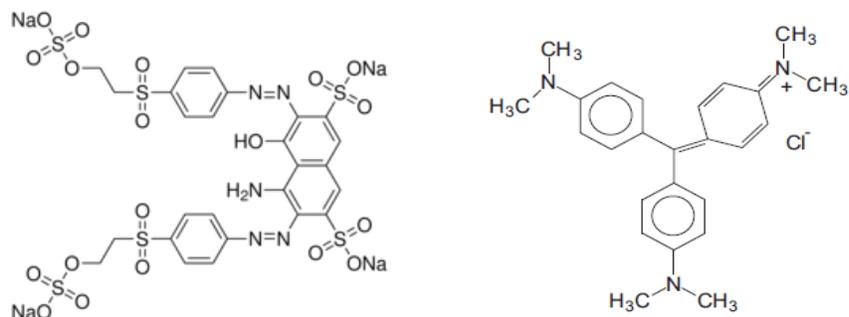


Figura 1. Formula estructural del Negro Reactivo 5 (izquierda) y cristal violeta (derecha).

3.5. Tratamiento de los colorantes con la reacción Fenton

Es muy poco lo que se encuentra en la literatura sobre la degradación de estos dos tipos de colorantes empleando la reacción Fenton. En nuestra revisión solamente encontramos que Chen C et. al (29) realizaron el tratamiento de un agua residual contaminada con cristal violeta proveniente de una industria textil, para este propósito manejaron diferentes tratamientos en los que se combinaba el pH, la concentración de H₂O₂ y el catalizador dando como resultados que la mayor eficiencia en la remoción se lograba a bajos pH cuando empleaban concentraciones altas de Fe (>1.3 g/L). Así mismo, demostraron que la degradación de este colorante llevaba a la formación de compuestos intermediarios que generan diferentes rutas de degradación.

A partir de la búsqueda bibliográfica que se realizó se concluye que el tratamiento de este tipo de contaminantes es novedoso y altamente pertinente dada la elevada toxicidad de estos dos compuestos mencionada anteriormente.

3.6. Microorganismos en aguas residuales

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias representan un gran riesgo y son la principal causa de muerte en niños y adultos jóvenes. Según información de la Organización Mundial de la Salud, considerando únicamente las enfermedades diarreicas frecuentemente asociadas al consumo de agua o alimentos contaminados, aproximadamente 2 millones de personas mueren cada año siendo mayoritariamente niños menores de 5 años (30).

Uno de los mayores problemas con las aguas residuales o negras, es que estas son usadas generalmente para riego agrícola o de consumo humano para aquellas personas o poblaciones que viven cercanas a sus vertederos. Esto genera que en la mayoría de casos se presenten cuadros clínicos como infecciones en la piel o problemas gastrointestinales de tipo diarreico, este último generado por la presencia de microorganismos de tipo parasitario como *Giardia sp* y *Entamoeba histolytica* y de tipo bacteriano por coliformes fecales como *E.coli* (31).

3.7. Tratamiento de microorganismos con la reacción Fenton

La reacción Fenton al ser un proceso degradador y de disminución de la toxicidad de materia orgánica puede ser utilizado para una gran variedad de aplicaciones entre las cuales se puede incluir la inactivación de *E.coli* en aguas de ríos y pre-potables (10). Desde este punto de vista, el proceso Fenton es particularmente atractivo ya que es capaz de degradar completamente y convertir en productos inocuos y/o biodegradables a un amplio espectro de microorganismos (32-33).

Para el caso de las bacterias, como *E.coli* los radicales $\text{OH}\cdot$ producidos en la reacción Fenton pueden generar un daño celular conocido como peroxidación lipídica, en el cual se da la interacción del $\text{OH}\cdot$ con los ácidos grasos poli-insaturados que componen los fosfolípidos de las membranas dando como resultado un daño oxidativo celular (34).

En la Pontificia Universidad Javeriana, el grupo de Microbiología Ambiental ha realizado importantes esfuerzos en el tratamiento de microorganismos patógenos, incluyendo *E.coli*, mediante métodos avanzados de oxidación logrando resultados muy prometedores (35). No obstante, el esfuerzo debe continuar y los sistemas deben estudiarse a fondo dado que la literatura reportada sobre el tema es escasa.

3.8.Pruebas de ecotoxicidad.

Son una herramienta alternativa para la evaluación de la toxicidad de las aguas y la Biodegradabilidad, después de los tratamientos tanto biológicos como físico-químicos, como lo afirma Oller I et. al. (33); estos pueden generar sustancias intermediarias, las cuales pueden llegar a ser tóxicas en el momento de su descarga al medio ambiente.

En este tipo de pruebas toxicológicas es recomendado utilizar organismos representativos de la cadena trófica y del ambiente en el que se esté estudiando, por ejemplo *Lactuca sativa* como indicador vegetal, *Hydra attenuata*, *Daphnia magna* como indicador animal (36) y como indicadores bacterianos se encuentra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona fluorescens*, *Pseudomona putida* y *Vibrio fischeri*.

La especie *H. attenuata* es empleada como organismo de prueba por la facilidad de su cultivo en laboratorio, su rápida reproducción, su estructura primaria (ectodermo, mesodermo y endodermo), que favorece el intercambio intra e intercelular y su potencial para la detección de compuesto tóxicos, así como por presentar cambios morfológicos fácilmente reconocibles bajo condiciones progresivas de intoxicación. Los ensayos de toxicidad con *H. attenuata* permiten determinar subletalidad y letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros (37).

En este trabajo, se emplearon algunos de estos organismos para evaluar la toxicidad de posibles productos generados durante los tratamientos Fenton a los sistemas de estudio.

4. Objetivos:

4.1.Objetivo general:

Realizar el tratamiento de aguas que contienen colorantes (Negro Reactivo 5 y cristal violeta) y microorganismos indicadores de contaminación fecal (*E.coli*) mediante el sistema Fenton heterogéneo empleando catalizadores de Fe soportados sobre carbón activado obtenido a partir de biomasa vegetal.

4.2.Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la concentración de Fe (%m/m) de los catalizadores soportados sobre carbón activado empleados en el tratamiento de aguas mediante el proceso Fenton, para la degradación de los colorantes Negro Reactivo 5 y cristal violeta.
- Determinar el efecto de la concentración de Fe (%m/m) de los catalizadores soportados sobre carbón activado empleados en el tratamiento de aguas mediante el proceso Fenton, para la inactivación de *E.coli*.
- Evaluar la posible toxicidad generada por el sistema Fenton empleando catalizadores Fe/carbón activado por medio de bioensayos con *Hydra attenuata*.

5. Metodología

5.1.Síntesis de los carbones activados

Los carbones activados fueron obtenidos a partir de la biomasa residual de rosas colombianas por medio de pirolisis a alta temperatura (400°C/1h), seguida de activación química con NaOH en relación 1:1 en peso. Se hizo uso del equipo de pirolisis construido en el Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana (ver anexo 1).

5.2.Síntesis de los catalizadores de Fe

Los catalizadores se sintetizaron por la técnica de impregnación húmeda incipiente a partir de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en proporciones de 1, 3, 5 y 10 % m/m del metal. La calcinación se llevó a cabo en atmosfera de N_2 a 400 °C por 2 h.

5.3.Caracterización de los catalizadores

La caracterización de los catalizadores se realizó por Infrarrojo con el fin de determinar los principales grupos funcionales presentes en la superficie y por medio de titulaciones volumétricas con NaOH y HCl (titulaciones Boehm) para determinar las características ácido-básicas del carbón activado.

5.4.Preparación del banco de trabajo de E.coli

Para la realización de las curvas de inactivación de *E.coli* se realizó un banco de trabajo que consta de 100 viales con un volumen de 1000 µl cada uno, el contenido corresponde a una suspensión de *E.coli* ATCC con una concentración de 27×10^{14} UFC/ml en caldo BHI, con glicerol al 25%. El almacenamiento se llevó a cabo en nevera a una temperatura de 2 °C.

5.5.Reacción Fenton

Los experimentos en el proceso Fenton se realizaron en un reactor tipo Batch de vidrio (ver anexo 2) empleando colorantes (Negro Reactivo 5 y cristal violeta) disueltos en agua destilada con una concentración de 10 ppm.

Se realizaron experimentos preliminares con diferentes cantidades de catalizador Fe /carbón activado (0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml) para determinar la concentración adecuada de trabajo. Luego se realizaron los tratamientos con la concentración determinada de catalizador Fe/carbón activado, pH=3,7, temperatura igual a 20 ± 2 °C y presión atmosférica. El alimento del reactor fue de 2 L/h de aire y 0,1 mL/h de H₂O₂ 0,1 M. Posteriormente, se realizaron las curvas de remoción durante 3 h e inactivación durante 1 h con muestreos seleccionados en función del tiempo. Los controles utilizados fueron: carbón activado sin Fe, el uso de H₂O₂ y un tratamiento Fenton homogéneo con FeSO₄ (10ppm). El seguimiento del proceso Fenton para la degradación de los colorantes se monitoreó por colorimetría a una longitud de onda de 590 nm.

Para las pruebas de inactivación de *E. coli* se realizaron dos curvas preliminares por una hora con el carbón activado sin Fe³⁺ y una con H₂O₂ solamente. Posteriormente a estas curvas se realizaron tratamientos con 50 mg de catalizador Fe /carbón activado, pH: 3,7, temperatura igual a 25 °C y presión atmosférica. El seguimiento del proceso Fenton de inactivación fue

llevado a cabo por la técnica de conteo por microgota en agar Tripticasa de soja. Adicionalmente se realizó un control con tratamiento Fenton homogéneo con FeSO_4 .

Con el propósito de estimar la eficiencia de los mejores catalizadores soportados sobre carbón activado obtenidos en este presente trabajo frente a un catalizador ya reportado y cuya actividad y selectividad ha sido comprobada, se empleó una arcilla pilarizada con Fe (10%)-Ce (1%) sintetizada mediante el método utilizado por Carriazo J et. al. (38).

5.6. Ensayos de toxicidad de los colorantes Negro Reactivo 5, cristal violeta y *E.coli*

A partir de los resultados obtenidos en las curvas de degradación e inactivación se realizaron montajes para tratar nuevamente el agua hasta obtener la inactivación y remoción previamente definidas por las curvas, luego se retiró el agua tratada para realizar ensayos de toxicidad aguda empleando *Hydra attenuata* (39).

5.7. Muestreo durante la reacción Fenton

El tipo de muestreo que se llevó a cabo es de tipo no probabilístico por conveniencia; esto debido a que se buscó tomar las muestras en unos intervalos de tiempos regulares, escogidos considerando como tiempo cero el comienzo de la adición de H_2O_2 . El número de tratamientos a realizarse incluyó tres controles y cinco concentraciones diferentes de Fe^{3+} en el catalizador. En la tabla 1 se presentan los detalles de los muestreos que se realizaron:

Tabla 1. Detalle del número de muestras a realizarse por cada procedimiento.

Población	Muestra	Número de tratamientos	Veces a realizar la prueba	Total de muestras por prueba
Colorante Negro Reactivo 5	7 muestreos en tratamientos de 3 h	9	2	126
Colorante cristal violeta	7 muestreos en tratamientos de 3 h	9	2	126
Suspensión	9 muestreos en	6	2	108

bacteriana de <i>E.coli</i>	tratamientos de 1 h			
Prueba de toxicidad	Después de 4 h para colorantes y después de 1 h para <i>E.coli</i>	6	1	6
Total de muestras				366

6. Resultados y discusión

6.1.Efecto de la cantidad de carbón activado en la remoción de los colorantes

Como parte de la metodología propuesta, se determinó el efecto de la cantidad de carbón activado en la remoción de los colorantes. Lo anterior con el fin de estimar la proporción carbón activado/muestra más pertinente para realizar las curvas de eliminación puesto que un exceso de carbón activado puede causar que la remoción sea total y exclusivamente por adsorción impidiendo establecer valores de conversión comparables cuando se realiza el proceso Fenton, en tal sentido, se prefieren cantidades que generen porcentajes de remoción bajos.

En el caso del Cristal violeta se probaron cantidades desde 0,05 mg/mL hasta 5 mg/mL. En la Figura 1 es posible observar que por encima de 0,5 mg/mL la adsorción del colorante es total con tiempos inferiores a 100 min. indicando la fuerte afinidad del carbón activado con el cristal violeta a pH=3,7. Lo anterior es coherente con lo expuesto por Senthilkumaar S et. al. (40), quienes afirman que un incremento en la concentración de carbón activado aumenta la remoción del cristal violeta debido a una mayor área expuesta para la adsorción y a la afinidad de la superficie por el colorante dada su estructura molecular .

Por otra parte, con concentraciones menores a 0,25 mg/mL se encontraron porcentajes de eliminación menores al 20%. Estos valores de remoción son, de acuerdo con nuestro criterio, adecuados para realizar la reacción Fenton dado que con porcentajes de remoción bajos será posible ver el efecto que tenga el proceso minimizando la eliminación causada por la adsorción. Con base en esto, se seleccionó la concentración de 0,25 mg/mL (50mg de carbón activado).

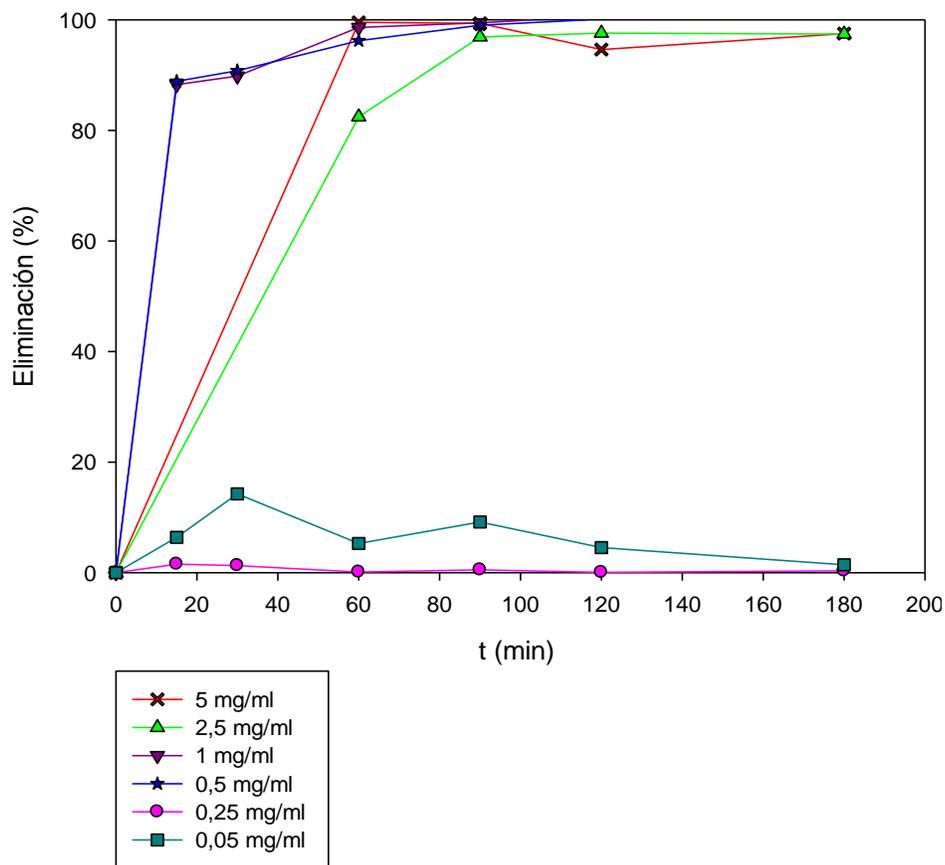


Figura 2. Porcentaje de eliminación de las diferentes cantidades de carbón activado para el colorante cristal violeta.

Para el caso del Negro Reactivo 5 las cantidades de carbón activado probadas fueron de 0,05 mg/mL y 0,25 mg/mL, las cuales fueron seleccionadas con base en los resultados discutidos anteriormente para el cristal violeta. En estos experimentos (ver figura 3), se pudo determinar que para estas concentraciones los porcentajes de remoción por adsorción son inferiores al 20% presentando menores errores en la determinación cuantitativa cuando se usa 0,25 mg/mL. Con el propósito de unificar condiciones de análisis para los dos colorantes, para el Negro Reactivo 5 también se seleccionó 0,25 mg/mL.

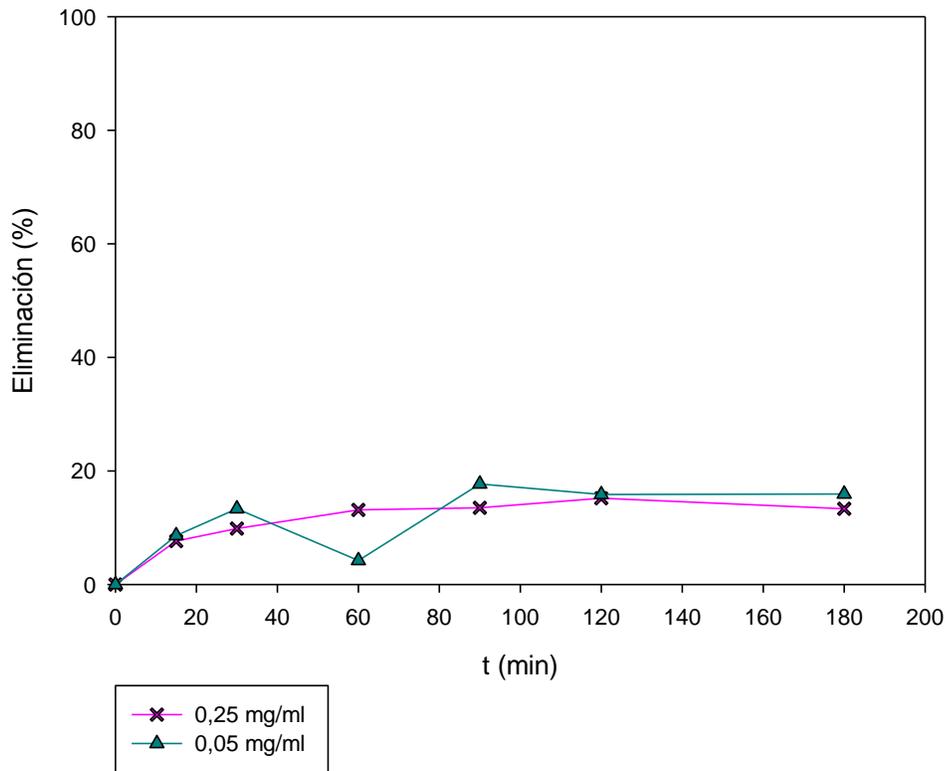


Figura 3. Porcentaje de eliminación de las diferentes cantidades de carbón activado 0% para el colorante Negro Reactivo 5.

No obstante, pese a que la concentración adecuada de carbón activado fue la misma para ambos, es posible apreciar que la capacidad de adsorción por parte del carbón activado es diferente para cada colorante observándose que para el Negro Reactivo 5 se origina un mayor porcentaje de eliminación en un menor tiempo (ver figuras 2 y 3). Este resultado se puede explicar con base en el tamaño de la molécula del colorante; ya que como lo menciona Wang S et al. (41), la capacidad de adsorción y el tiempo necesarios para llevar a cabo este proceso está determinada por el tamaño de la molécula de los colorantes, esto debido a que entre mayor sea el tamaño menor capacidad de penetrar los poros del carbón activado lo que limita su adsorción en la superficie, mientras que las moléculas pequeñas pueden ingresar por los poros del carbón activado fácilmente incrementando la eliminación.

Tan I et al. (42) afirman que en las primeras horas de adsorción las moléculas del colorante se enfrentan a un efecto de capa limitante que luego será superado para poderse difundir por la parte interna porosa del carbón activado. Lo anterior lleva a deducir el posible mecanismo

llevado a cabo durante los procesos de adsorción de los dos colorantes, demostrando además con base en los resultados obtenidos que para el Negro Reactivo 5 este proceso se lleva con mayor facilidad que para el cristal violeta.

6.2. Caracterización del carbón activado

La caracterización del carbón activado se llevó a cabo mediante la determinación de acidez y de basicidad por el método de Boehm (43), el cual permitió determinar que el carbón activado utilizado en este estudio es principalmente de carácter básico como lo muestra la tabla 2. El carácter básico del carbón activado es evidente cuando se le pone en contacto con agua ya que en el momento de su adición los valores de pH se aumentan drásticamente hasta 8.5 y 9.0. Esta característica dificulta el ajuste del pH al inicio del proceso Fenton pero puede favorecer rutas de oxidación que involucren la presencia de sitios básicos en la superficie del material. El carácter básico del carbón activado puede deberse al proceso de activación con NaOH que posiblemente genera gran cantidad de grupos hidroxilados terminales de carácter básico de Lewis.

Tabla 2. Resultados de la determinación del carácter ácido-básico del carbón activado por el método Boehm.

Grupos ácidos (meqg ⁻¹)	Grupos básicos meqg ⁻¹
0,07246 ± 0,00100	0,1408 ± 0,0008

Bastidas M et. al. (44) reportan que para carbones activados obtenidos a partir de precursores carbonosos se obtienen valores para los grupos básicos entre 0,041 y 0,206 meqg⁻¹. Adicionalmente, Pirajan J et al (45), en su estudio de adsorción de Fenol y 3-Clorofenol sobre carbones activados mediante calorimetría de inmersión, demuestran que por medio de pirolisis para la obtención de carbones activados, estos adquieren un carácter básico con valores entre 0.53 y 0.79 meqg⁻¹. Los valores obtenidos en este trabajo indican que el carbón activado presenta un carácter básico moderado dentro los valores reportados para materiales similares.

La caracterización del carbón activado se hizo mediante la técnica de infrarrojo con el objetivo de determinar los principales grupos funcionales presentes en su superficie. El espectro (ver Figura 3) permite establecer que en su mayoría se encuentran grupos -OH (3600 cm^{-1} y 1400 cm^{-1}) posiblemente de compuestos fenólicos, -COOH (3000 cm^{-1}), -C-H (1400 cm^{-1}) y enlaces C=C aromáticos (1600 cm^{-1}) (ver Figura 4).

Los grupos funcionales encontrados para el carbón activado empleado en el presente trabajo son coherentes con los encontrados en estudios reportados en la literatura. En efecto, los estudios de Pedrozo O et. al. (46) y Xiao H et. al. (47) muestran que los principales grupos encontrados en los carbones activados obtenidos de bagazo de caña son C=O para éteres a 1200 cm^{-1} , alcoholes a $1049\text{-}1276\text{ cm}^{-1}$, -OH fenólicos en 1100 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} , C=C aromático $1585\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, C-H alifático a 2900 cm^{-1} , ácidos carboxílicos 1150 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} (42).

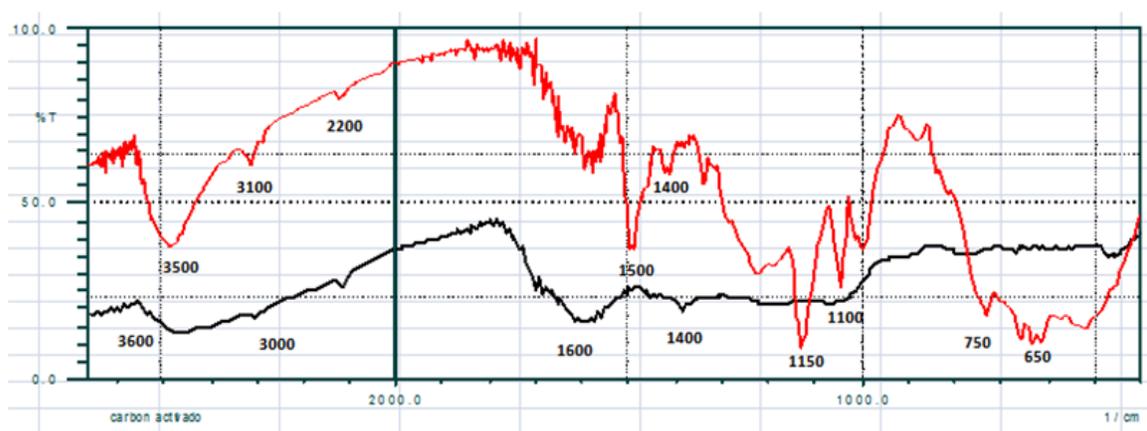


Figura 4. Infrarrojo del de carbón activado (negro) y del carbón activado luego de la adsorción de Negro Reactivo 5 (rojo)

Por otro lado, en la figura 4 se puede ver el espectro infrarrojo del carbón activado luego de la adsorción del Negro Reactivo 5. El espectro presenta señales correspondientes a los principales grupos funcionales del colorante que son: anillos aromáticos (1600 cm^{-1}), C=C aromático (1500 cm^{-1}), grupos sulfónicos (1150 cm^{-1}), grupo azo (2200 cm^{-1}), aminas primaria (3500 cm^{-1}) y C-H de anillo aromático (3100 cm^{-1}). Comparando el espectro presentados en la Figura 4 con el del colorante, se puede ver que el pico de los grupos azo es de menor intensidad cuando está adsorbido, esto nos lleva a proponer que durante la adsorción del

colorante, el grupo azo tiene gran trascendencia en la interacción de la molécula con la superficie del carbón activado.

Para corroborar los datos anteriores en el estudio de Ip A et. al. (48) muestra que en los procesos adsorptivos del colorante Negro Reactivo 5, se da un efecto dissociativo de la molécula, que conlleva a la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos carboxílico y fenólico presentes en la superficie del carbón activado y los grupos NH_2 , S, -OH presentes en la molécula del colorante.

En el caso del carbón activado luego de la adsorción del cristal violeta (ver Figura 5), el espectro infrarrojo muestra señales correspondientes a aromáticos ($3100\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$), C=C, anillos aromáticos (1600 cm^{-1}), grupos $-\text{CH}_3$ (1300 cm^{-1}), aminas aromáticas ($1170\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$), grupo CH_2 (700 cm^{-1}) y C-H alcanos (300 cm^{-1}). Se puede ver que existe una relación significativa entre los grupos funcionales encontrados en el infrarrojo y los presentes en la estructura molecular del colorante. No obstante, estos espectros no son contundentes en proporcionar información acerca del tipo de interacción que ocurre entre el cristal violeta y el carbón activado por lo que se cree que es de tipo física a través de interacciones electrostáticas en el interior de los poros del material (40).

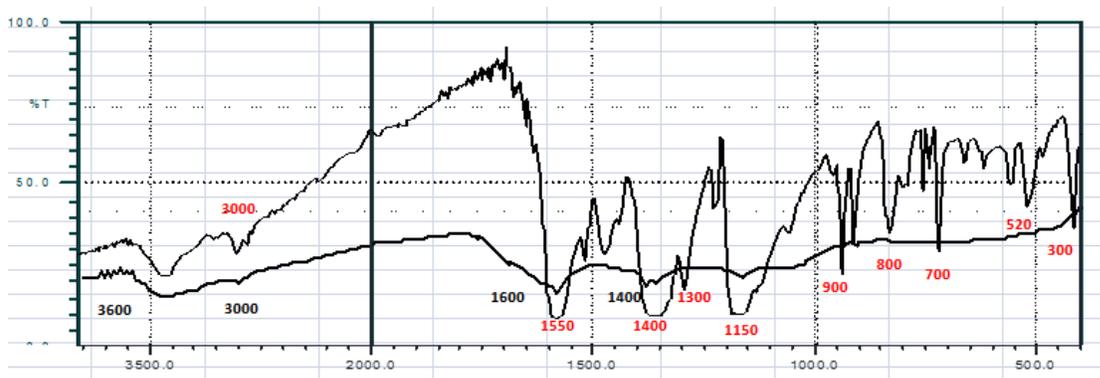


Figura 5. Infrarrojo del de carbón activado y del carbón activado luego de la adsorción de cristal violeta.

6.3. Reacción Fenton para la eliminación del Negro Reactivo 5

En la figura 6 se presentan los resultados del proceso Fenton para el Negro Reactivo 5 empleando los catalizadores de Fe con diferentes cantidades nominales. En posible observar

que para todos los catalizadores existe un mayor porcentaje de eliminación en un menor tiempo en comparación con el proceso de adsorción discutido anteriormente y con el uso de peróxido de hidrógeno sin catalizador. Los resultados permitieron comprobar que la combinación de H_2O_2 más Fe soportado en el carbón activado da como resultado el incremento en el porcentaje de eliminación.

Nuestro estudio nos indicó además, que existe una fuerte influencia de la velocidad de adición y de la cantidad agregada de H_2O_2 sobre los porcentajes de remoción alcanzados. En efecto, la literatura reafirma estos resultados dado que Lucas M et. al. (49) evaluaron diferentes concentraciones de peróxido y determinaron que la adición de H_2O_2 entre $0,5 \times 10^{-3}$ y 2×10^{-3} mol/L incrementaban la decoloración hasta un porcentaje de 86% a 96% respectivamente en 20 min., sin embargo, un incremento de la dosis de H_2O_2 por encima de estos valores causó una disminución de la degradación del colorante.

Por otro lado, cuando la concentración de Fe aumenta se registra un incremento en el porcentaje de eliminación dentro del rango de 0 a 3% de Fe observándose que el mayor porcentaje de eliminación (85 %) se dió con el catalizador de 3% de Fe alcanzándose en un tiempo de 20 min (ver figura 6).

No obstante, con los mayores porcentajes de Fe (5 y 10 %) se observan bajos porcentajes de eliminación. Es probable que el exceso en la concentración de Fe pueda generar un efecto inhibitor en la formación de radicales $\text{OH}\cdot$ ya que da lugar a la disminución de la eficiencia del proceso debido a la activación de reacciones secundarias no deseadas (50-51).

Hui-Sun J et. al. (51), afirman que el uso de altas concentraciones de hierro puede conducir a la retención de radicales hidroxilo por el Fe y afectar la tasa de disminución de degradación del contaminante. Lo anterior podría sugerir que el comportamiento observado en el tratamiento con altas concentraciones de Fe presenta una cinética más lenta para que se alcance el máximo porcentaje de eliminación lo cual es coherente con nuestros resultados.

Por otra parte, las grandes concentraciones de Fe pueden favorecer la formación de agregados de partículas del metal activo de mayor tamaño los cuales pueden bloquear la porosidad del carbón activado y consecuentemente deterioran el área superficial del material disminuyendo la actividad del catalizador en el proceso Fenton (39).

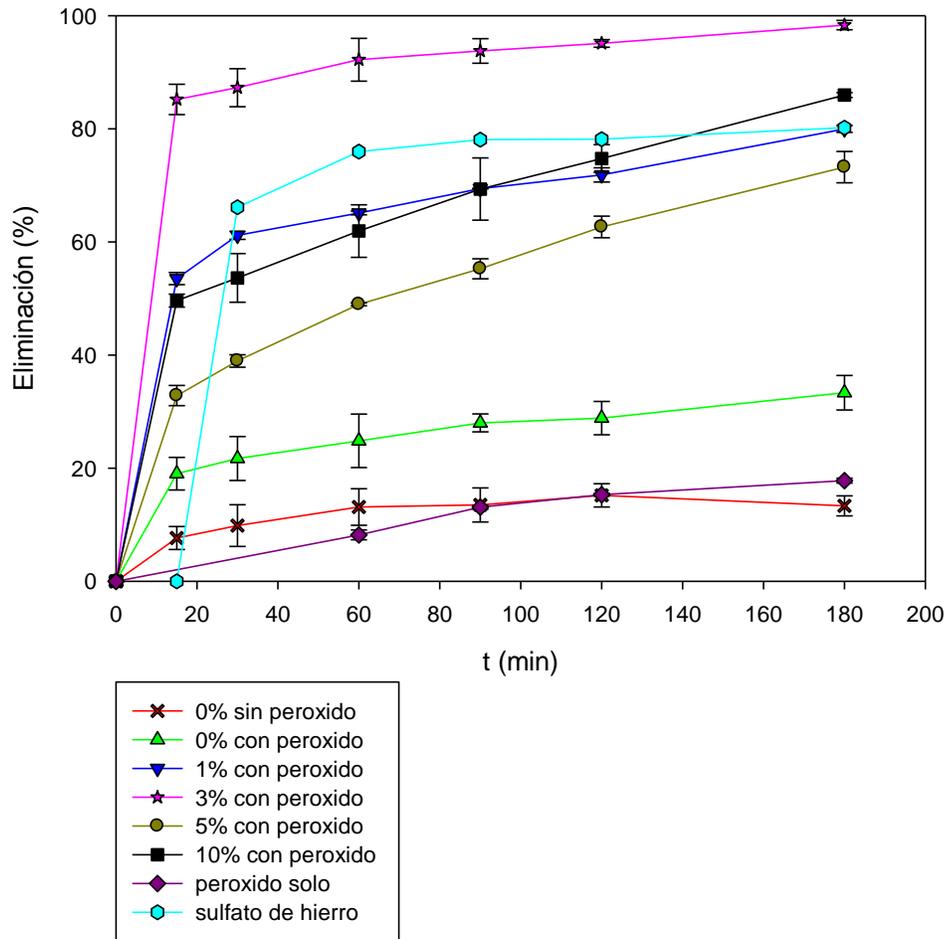


Figura 6. Porcentaje de eliminación de los diferentes tratamientos para el Negro Reactivo 5 Vs tiempo de reacción en minutos

En nuestro trabajo, se evaluó el porcentaje de eliminación del Negro Reactivo 5 empleando una arcilla pilarizada con Fe-Ce la cual ha sido reportada como un catalizador muy activo y selectivo en procesos Fenton (38). Kim S et. al. (52) demostraron que el tratamiento Fenton del Negro Reactivo 5 con una arcilla pilarizada puede llegar a remover el colorante de manera significativa en los primeros 20 minutos.

Los resultados se compararon con el catalizador que contiene 3% de Fe soportado sobre carbón activado que fue el que presentó mayor actividad de la serie que se obtuvo en el presente trabajo. Bajo las condiciones empleadas en esta investigación y empleando una concentración de 0,25 mg/mL para ambos catalizadores, claramente se observa que el

catalizador soportado sobre carbón activado presenta un porcentaje de eliminación considerablemente más alto que la arcilla pilarizada lo cual hace evidente que el tratamiento desarrollado en nuestro trabajo presenta una alta efectividad para la remoción de Negro Reactivo 5 (ver figura 7).

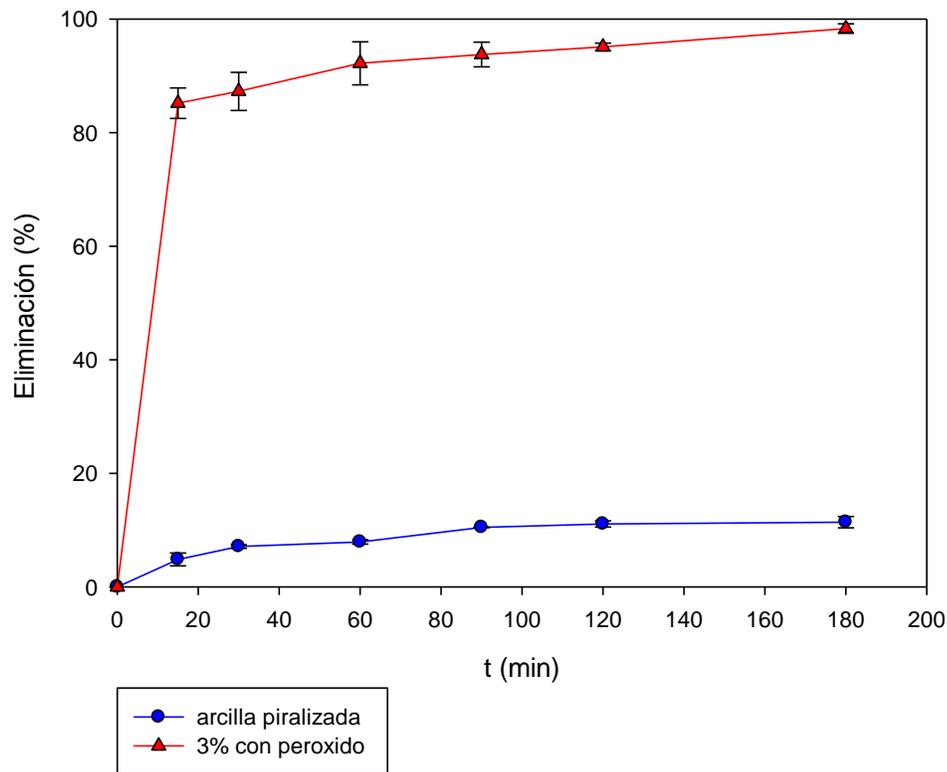


Figura 7. Porcentaje de eliminación de los tratamientos con arcilla pilarizada y 3% de Fe para el Negro Reactivo 5 Vs tiempo de reacción en minutos.

6.4.Reacción Fenton para la eliminación del cristal violeta

Los resultados para la remoción del cristal violeta indicaron que la mayor degradación se alcanza con el tratamiento que utiliza al catalizador con 1% de Fe (ver Figura 8) demostrando además que para este colorante y con esa concentración de Fe, se necesitan más de tres horas de tratamiento para que se llegue a dar una remoción comparable con la obtenida para el Negro Reactivo 5.

En este caso, se observó que un incremento en el porcentaje de Fe no necesariamente significó un aumento en los porcentajes de remoción de hecho se observa una disminución en función del contenido de Fe por encima del 1%. Estos resultados indican la fuerte influencia en el tamaño de agregado del sitio activo en la degradación de esta molécula.

Por otro lado, observando la figura 8 se pudo determinar que este colorante logra su mayor porcentaje de remoción con el carbón activado indicando que el proceso que se está llevando a cabo es preferencialmente por un mecanismo de adsorción caso contrario con lo sucedido con el Negro Reactivo 5 esto es debido a que la estructura molecular del cristal violeta es de menor tamaño lo que facilita su ingreso y adsorción en el carbón activado (41-42). Eso es un claro indicio de que el cristal violeta es una molécula de difícil degradación química.

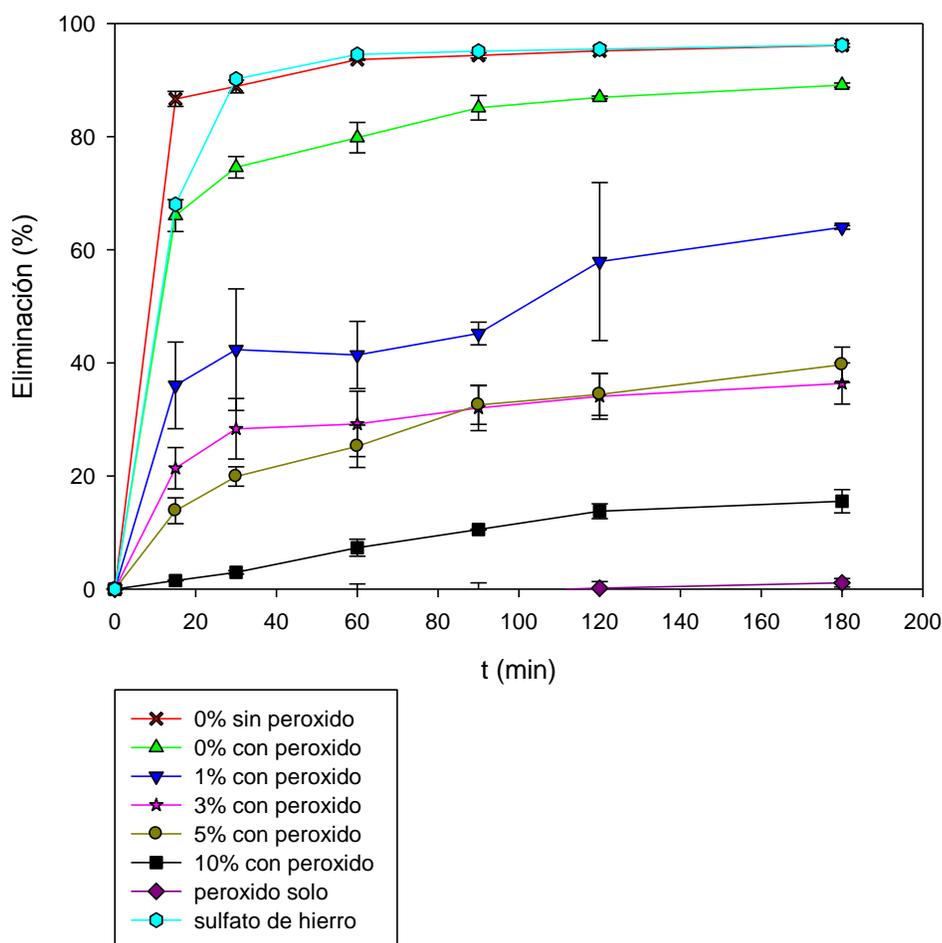


Figura 8. Porcentaje de eliminación de los diferentes tratamientos para el cristal violeta Vs tiempo de reacción en minutos

Con base en lo anterior y teniendo en cuenta el estudio de Ramirez J et. al. (19) en el cual se afirma que la distribución del hierro sobre el carbón activado puede llegar a no ser homogénea por los diferentes tamaños de poro del carbón activado y los altos contenidos de Fe, consideramos que para el caso del cristal violeta al ser la adsorción el mecanismo preferente de remoción, el Fe presente en el soporte pudo llegar a bloquear los sitios activos de adsorción del carbón lo que se tradujo en una disminución de la eliminación alcanzada. Al respecto se afirma que la actividad catalítica de este tipo de materiales depende del tamaño de partícula, alta área superficial y volumen de poro específico. Adicionalmente, es posible que el área de contacto del Fe especialmente a altas concentraciones no era la adecuada desfavoreciendo la reacción con H_2O_2 (19).

En contra posición a los resultados obtenidos, se encuentra el estudio de Chen C et. al. (29), quienes al someter al cristal violeta a un tratamiento Fenton heterogéneo con carbón activado granular, obtuvieron que la mayor remoción del colorante se da por la combinación de carbón activado, Fe y H_2O_2 y una menor remoción cuando se usa el carbón activado solo. Este estudio lleva a suponer que el cristal violeta puede ser removido por el método Fenton siempre y cuando el carbón no favorezca la adsorción del colorante y el Fe sea distribuido de una forma uniforme sobre la superficie del soporte.

Los resultados del proceso Fenton con la arcilla pilarizada comparada con el proceso empleando el catalizador del 1% de Fe (ver Figura 9) indican que existe una diferencia significativa entre los dos métodos, demostrando así que aunque la degradación por parte del carbón activado y Fe no es superior al 60%, la arcilla pilarizada no alcanza a tener un porcentaje de remoción mayor del 20%. Esto es un indicio muy contundente que el método empleado en el presente trabajo alcanza niveles de eficiencia bastante altos.

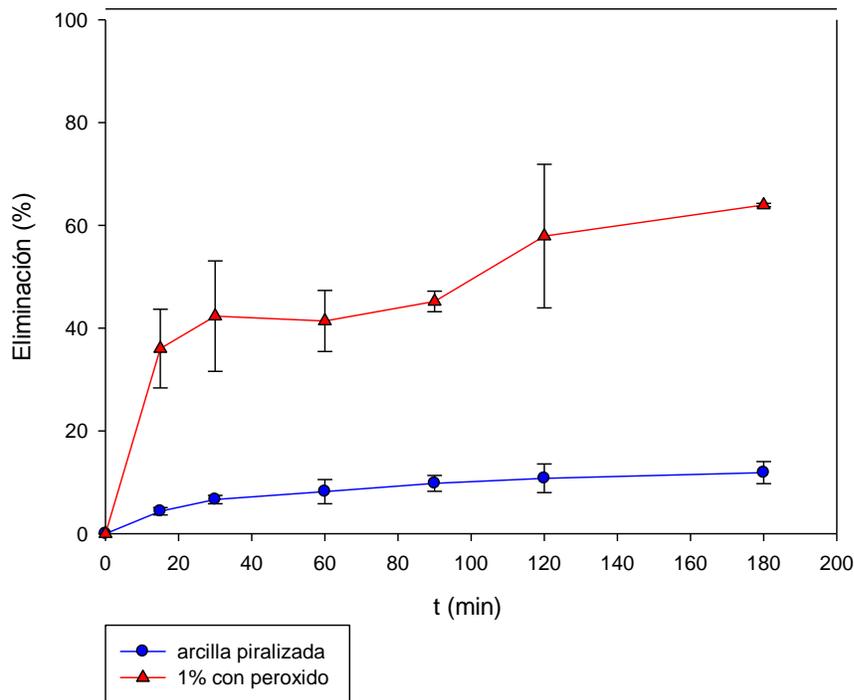


Figura 9. Porcentaje de eliminación de los tratamientos con arcilla pilarizada y 1% de Fe^{3+} para el cristal violeta Vs tiempo de reacción en minutos

6.5.Reacción Fenton para la inactivación para *E.coli*

Para el tratamiento Fenton de *E. coli* se realizaron curvas de inactivación preliminares por una hora con el carbón activado sin Fe y carbón activado sin Fe con peróxido. Los resultados obtenidos indicaron que no hubo una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (ver figura 10).

Estos resultados comparados con los reportados por Mazille F et. al. (53) en donde evaluaron Fe soportado en botellas PET en presencia de H_2O_2 +luz como sistema heterogéneo y $Fe^{+3}+H_2O_2$ +luz como sistema homogéneo, indican que no se alcanzó inactivación mediante el método planteado. En efecto, los investigadores citados observaron una gran inactivación bacteriana especialmente en el sistema homogéneo en donde las especies de hierro disueltas llegan a ser absorbidas en la superficie de la bacteria e incluso entrar en el medio intracelular causando su muerte.

En nuestro caso para ninguno de los tratamientos realizados en este trabajo (tanto homogéneo como heterogéneo) se presentó una disminución de la concentración bacteriana manteniéndose

constante en el rango de 10 unidades Log UFC/ml a 8 unidades Log UFC/ml. Adicionalmente, para los tratamientos con el carbón activado solo, se observa que tampoco hubo eliminación de *E.coli*, lo que sugiere que el proceso de adsorción no se lleva a cabo, posiblemente porque el tamaño del poro del carbón activado es menor que el de *E.coli*.

Spuhler D et, al. (54), afirman que la mayor inactivación celular se logra por una reacción Foto-Fenton en presencia de H_2O_2 . Además, afirman que en ausencia de luz no se observa un efecto bactericida, por lo que el peróxido más la luz UV tiene un efecto sinérgico donde participa la enzima catalasa, que es importante para la defensa celular contra el estrés oxidativo.

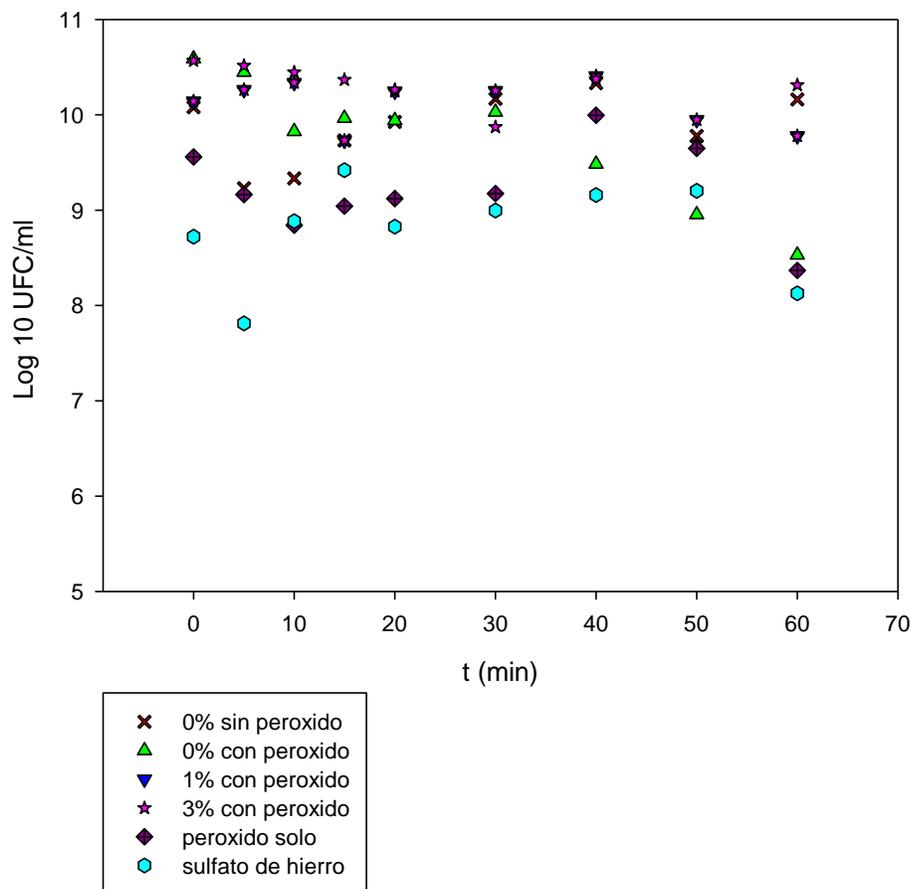


Figura 10. Curva de inactivación de *E.coli* en log UFC/ml VS tiempo en minutos

Moncayo A et. al. (55) afirman que la baja disminución bacteriana obtenida en su trabajo se debe al conjunto de proteínas que conforman la membrana celular de *E. coli*, las cuales le confieren una resistencia marcada a condiciones de estrés, como la hiperosmolaridad, la acidez y la escases de nutrientes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el tiempo de tratamiento también es un factor que influye en el proceso de inactivación bacteriana; ya que tomando como referencia el mismo estudio nombrado anteriormente se presenta una mayor inactivación con 3 h de tratamiento. El proceso llevado a cabo en el presente estudio, se realizo por 1 h, lo que no permitiría que se generara el ataque oxidativo por parte de las especies reactivas de (OH•) sobre la membrana celular de *E.coli* (peroxidación lipídica) y por consiguiente no se produce la muerte celular (34-35).

6.6.Pruebas de ecotoxicidad con *Hydra attenuata*.

Las pruebas de toxicidad nos permitieron determinar que para las muestras con el colorante negro reactivo 5 sin tratamiento Fenton se obtuvo una mayor toxicidad comparada con la del cristal violeta (ver tabla 3). Los resultados muestran que para el primer colorante se presenta un % de subletalidad de 22,2% al 50% (dilución), mientras que para el segundo se presentó un % subletalidad del 22,2% al 100% (dilución); esto significa que para el negro reactivo 5, aun diluyendo la muestra a la mitad, se genera un cambio morfológico al 22,2 % de la población de *Hydra attenuata*, mientras que para el cristal violeta sin hacer la dilución se alcanza el mismo porcentaje de subletalidad.

Este fenómeno se puede explicar con base en las estructuras moleculares y los grupos funcionales presentes en cada unos de los colorantes; ya que como se sabe el negro reactivo 5 cuenta con grupos Azo (N=N) los cuales según lo reportado por la literatura son altamente tóxicos y carcinogénicos (56).

Por otro lado, Meric, S et. al. (57) reportan que el negro reactivo 5 logra ejercer un efecto negativo (inmovilización del 25%) sobre *Daphnia magna* después de una concentración de 75 ppm. Lo anterior sumado con los resultados obtenidos en el presente estudio, nos lleva a deducir que el colorante es realmente toxico; ya que a partir de concentraciones de 10 ppm (utilizadas en esta investigación), se generan efectos perjudiciales sobre los organismos utilizados para este tipo de pruebas los cuales sirven de modelos de representación de los ecosistemas (ver tabla 3)

En el caso del colorante cristal violeta se evidencia que aunque no se muestra una toxicidad tan elevada como para el negro reactivo 5 se logra ejercer un efecto negativo sobre *Hydra attenuata*. Comparado los resultados anteriores con lo obtenido por Lee H et. al (58); en donde la mayor toxicidad se encontró para el cristal violeta comparado con otros 16 colorantes azo en los que se encontraba a el negro reactivo 5, se deba principalmente a la concentración del colorante; ya que en el estudio se muestra que en concentraciones por debajo de 0,1 mg/ml se logra la mayor toxicidad (EC₂₀) por parte del cristal violeta, mientras que a un concentración de 10 mg/L (usada en el presente estudio), los efectos negativos sobre el microorganismos de estudio (*E.coli* GC2) no son tan altos. Por el contrario para el negro reactivo 5 las concentraciones de EC₂₀ son de 300- 450 mg/ml.

Con base en lo anterior, cabe resaltar que aunque los organismos de estudio son diferentes en los dos estudios, se obtienen datos interesantes sobre las concentraciones a las que se puede considerar tóxico el colorante. Adicionalmente, se muestra que no se necesitan de concentraciones altas del compuesto para lograr un efecto toxico sobre los organismos modelos de estudio para este tipo de pruebas.

Tabla 3. Resultados de las pruebas de toxicidad con *Hydra attenuata* para los sistemas estudiados (en el anexo 7 se pueden observar los reportes correspondientes a estos datos).

Muestra	Unidades	Resultado
Agua residual artificial- colorante cristal violeta 10 ppm	% de subletalidad	22,2% al 100%
Agua residual artificial- colorante negro reactivo 5 10 ppm	% de subletalidad	22,2 % al 50%
Agua peptonada con suspensión de <i>E.coli</i> a una concentración de 10 ⁷ UFC/ml	% de letalidad	77,8% al 6,25%
Agua residual artificial- colorante cristal violeta después de tratamiento con Fenton- carbon 1% Fe	% de letalidad	66,7% al 25%
Agua residual artificial- colorante negro reactivo 5 después de tratamiento con Fenton- carbon 3% Fe	% de subletalidad	11,1% al 12,5%
Agua residual artificial-suspensión de <i>E.coli</i> después de tratamiento con Fenton –carbón 1% de Fe	% de letalidad	22,2% al 6,25%

En cuanto a los resultados del colorante cristal violeta, después del tratamiento Fenton al 1%, se evidenció un % de letalidad del 66,7 % al 25%. Lo anterior indica que en este caso el 66,7 % de la población de *Hydra attenuata* a dilución del 25% no presenta cambios morfológicos sino que se genera la muerte. Caso contrario al colorante negro reactivo después del tratamiento Fenton al 3%, en el cual se evidenció un porcentaje de subletalidad del 11,1% al 12,5%, lo que indica que en este caso el 11,1% de la población de *Hydra attenuata* presentó cambios morfológicos pero no la muerte (ver tabla 3).

Esto nos permite afirmar que el efecto observado puede estar relacionado como los productos intermediarios producidos durante la degradación de los colorantes. En el caso del cristal violeta se forman compuestos principalmente dados por la N-demetilación del colorante, como las aminas aromáticas secundarias y N-de-alkilados primarios, los cuales presentan estructuras similares a las aminas aromáticas de alto poder cancerígeno (7). Por otro lado, los intermediarios de la oxidación del colorante negro reactivo 5 son el ácido oxálico y el ácido fórmico los cuales presentan menor toxicidad para los organismos (59)

Así mismo, cabe resaltar que para las muestras de los colorantes después del tratamiento Fenton la toxicidad aumenta, llevando a deducir que los productos intermediarios de la reacción de oxidación de los colorantes son más tóxicos que el mismo colorante en sí.

Par los ensayos de toxicidad de *E.coli* se presenta que la suspensión bacteriana sin tratamiento Fenton tuvo un % de letalidad de 77,8% al 6,5% y con el tratamiento Fenton presentó una letalidad del 22,2% al 6,5%. Lo anterior lleva a deducir que antes de la reacción, la suspensión bacteriana con una concentración de 10^7 UFC/ml es perjudicial para *Hydra attenuata*, mientras que después de la reacción aunque la concentración de microorganismos no se disminuye más de 2 unidades log UFC/ ml se observa que el efecto no es tan alto como con la suspensión sin tratamiento.

7. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de grado se concluye:

1. Existe influencia de la cantidad de carbón activado respecto al residual estableciéndose que por encima de 0,25 mg/mL se logra una adsorción completa del colorante a pH=3,7.
2. En las pruebas de remoción del colorante Negro Reactivo 5 se determinó que la concentración de mayor actividad para el Fe soportado en carbon activado es del 3 %, en la cual se observó un porcentaje de eliminación del 98% en un tiempo de 20 minutos.
3. En las pruebas de remoción del colorante cristal violeta se determinó que la concentración de mayor actividad para el Fe soportado en carbon activado es del 1% en la cual se observó un porcentaje de eliminación del 63 % en un tiempo de 180 minutos. Esto permite establecer que se requiere mayor tiempo de tratamiento para lograr una mayor degradación del colorante.
4. Bajo las condiciones empleadas en este trabajo, los catalizadores de Fe soportados en carbón activado presentan alta actividad frente a la remoción de Reactivo 5 y cristal violeta mediante el método Fenton en comparación con otro tipo de catalizadores como las arcillas pilarizadas con Fe.
5. El proceso Fenton con catalizadores de Fe soportados en carbones activados empleado en el presente trabajo presenta bajo niveles de inactivación de *E.coli*.
6. En cuanto a los ensayos de toxicidad realizados con *Hydra attenuata*, se determinó que después de los tratamientos Fenton la toxicidad aumenta posiblemente a factores como los productos intermedarios resultado de la reacción y la no separación del Fe/carbón activado de las muestras.

8. Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de grado se recomienda:

- La caracterización de las propiedades texturales del carbón activado obtenido (área superficial, volumen de poro, etc).
- La caracterización química del carbón activado para definir aspectos superficiales que pueden relacionarse con la actividad catalítica.

- Estudiar métodos de deposición del Fe sobre la superficie del carbón activado que puedan mejorar la distribución y homogeneidad de las especies activas.
- Determinar el tamaño de partícula del Fe (en función del contenido nominal) por medio de difracción de rayos X o microscopía electrónica de transmisión.
- Realizar la determinación de Carbono Orgánico Total y Demanda Química de oxígeno para las pruebas de degradación de los colorantes.
- Realizar pruebas de inactivación de *E.coli* durante tiempos más prolongados de reacción.
- Realizar un estudio detallado de los intermediarios generados durante la degradación química empleando técnicas avanzadas de análisis.

10. Agradecimientos

Al proyecto “*Aprovechamiento de la biomasa residual de la rosa colombiana para la obtención de carbón activado y su potencial uso en la eliminación de níquel en medio acuoso diluido*” código 12010U00401200, auspiciado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana.

A las profesoras Aura Marina Pedroza y Ana Karina Carrascal, al Microbiólogo Industrial Jorge Fernández del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Claudia Campos del Laboratorio de Indicadores de Microorganismos en aguas y lodos, por su apoyo en la realización de las pruebas de inactivación y ecotoxicidad.

11. Bibliografía:

- (1) Telles, C, Granhen, C, Aparecida, T. Optimization of Fenton's oxidation of Chemical laboratory wastewaters using the response surface methodology. *Journal of Environmental Management* 2006; **80**, 66-74.
- (2) Martínez, E, Lopez, G. Tratamiento químico de contaminantes orgánicos- El proceso Fenton. Instituto de desarrollo y diseño. Universidad Tecnológica Nacional de Santa fe, Argentina. 2001; 1-7.
- (3) Valero P. Determinación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en procesos Fenton y Foto-Fenton. **Tesis de pregrado**. Departamento de ingeniería química y tecnología del medio ambiente. Universidad de Zaragoza, España, 2011, 49 p.
- (4) Valdes H, Zaror C. Influencia de la composición química superficial del carbón activado en la adsorción de benzotiazoles. *Ingeniare. Rev. chil. Ing* 2010; **18**, 38-43.
- (5) Estupiñán H; Vasquez C, Pulido J. Obtención de un material carbonáceo activado de antracita para posibles aplicaciones en hidrometalurgia. *Rev. fac. ing. univ. Antioquia* 2006; **37**, 31-40.
- (6) Wang A, Qu J, Ru J, Liu H, Ge J. Mineralization of an azo dye Acid Red 14 by electro-Fenton's reagent using an activated carbon fiber cathode. *Dyes and Pigments* 2005; **65**, 227-233.
- (7) Fan H, Huang S, Chung W, Janb J, Linc W, Chena C. Degradation pathways of crystal violet by Fenton and Fenton-like systems: Condition optimization and intermediate separation and identification. *Journal of Hazardous Materials* 2009; **171**, 1032-1044.
- (8) Girones R, Ferru's M, Alonso J, -Manzano J, Calgua B, Correa A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S. Molecular detection of pathogens in water e The pros and cons of molecular techniques. *Water research* 2010; **44**, 4325 - 4339.
- (9) Nguyena T, Hoa Phanb N, Doa M, Tham Ngoa K. Magnetic Fe₂MO₄ (M:Fe, Mn) activated carbons: Fabrication, characterization and heterogeneous Fenton oxidation of methyl orange. *Journal of Hazardous Materials* 2011; **185**, 653-661.

- (10). Valero P. Determinación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en procesos Fenton y Foto-Fenton. **Tesis de pregrado**. Departamento de ingeniería química y tecnología del medio ambiente. Universidad de Zaragoza, España, 2011, 49 p.
- (11) Lin Yap C, Gan S, Kiat Ng H. Fenton based remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils. Review. *Chemosphere* 2011; **83**, 1414–1430.
- (12) Giraldi T, Arruda C, da Costa G, Longo E, Ribeiro C. Heterogeneous Fenton reactants: a study of the behavior of iron oxide nanoparticles obtained by the polymeric precursor method. *J Sol-Gel Sci Technol* 2009; **52**, 299 - 303.
- (13) Arslan, I. Balciog A. Degradation of commercial reactive dyestus by heterogeneous and homogenous advanced oxidation processes: a comparative study. *Dyes and Pigments* 1999; **43**, 95 – 108.
- (14) Liao Q, Sun J, Gao L. Degradation of phenol by heterogeneous Fenton reaction using multi-walled carbon nanotube supported Fe_2O_3 catalysts. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2009; **345**, 95–100.
- (15) Ortiz, G. Descontaminación de aguas por medio de la reacción fenton heterogénea. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Del Litoral. Facultad de Ingeniería Química. 2009; 189 p.
- (16) Daud N, Hameed B. Acid Red 1 dye decolorization by heterogeneous Fenton-like reaction using Fe/kaolin catalyst. *Desalination* 2011; **269**, 291–293.
- (17) Garrido E, Theng B, Mora M. Clays and oxide minerals as catalysts and nanocatalysts in Fenton-like reactions - A review. *Applied Clay Science* 2010; **47**, 182-192.
- (18) Fontecha MA, Alvarez MA, Carrasco M, Lopez MV, Moreno C. Heterogeneous and homogeneous Fenton processes using activated carbon for the herbicide amitrol from wáter. *Applied catalysis b: environmental* 2011; **101**, 425-430.
- (19) Ramirez J, Hódar F, Pérez A, Moreno C, Costa C, Madeira L. Azo dye Orange II degradati6n by heterogeneous Fenton-like reaction using carbon-Fe catalysts. *Applied catalysis b: environmental* 2007; **75**, 312-323.
- (20) Papi'c S, Vujevi'c D, Koprivanac N, ˇSinko D. Decolourization and mineralization of commercial reactive dyes by using homogeneous and heterogeneous Fenton and UV/Fenton processes. *Journal of Hazardous Materials* 2009; **164**, 1137-1145.

- (21) Moreno, J, Sarria, V, Polo, A, Girarlo, L. Evaluacion del Peroxido de Hidrogeno en la Oxidacion de Fenol con Hierro Soportado Sobre Tela de Carbon Activado. Departamento de Química. Universidad Nacional de Bogotá, Colombia.2007; 18, 67-72.
- (22) Benatti C, Tavares C, Guedes T. Optimization of Fenton's oxidation of chemical laboratory wastewaters using the response surface methodology. *Journal of Environmental Management* 2006; **80**, 66- 74.
- (23) Moeller G, Garzón M. Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo. *Anuario Imta* 2003; **23**, 123-129.
- (24) Greluk M, Hubicki Z. Kinetics, isotherm and thermodynamic studies of Reactive Black 5 removal by acid acrylic resins. *Chemical Engineering Journal* 2010; **162**, 919–926.
- (25) Moreno, N; Ospina, X. Evaluacion de Inductores Metalicos y Co- Sustratos para la Remocion de Negro Reactivo 5 empleando Pleurotus ostreatus inmovilizado en fique. **Tesis de Grado**. Facultad de ciencias. Universidad Javeriana, Colombia, 2008, 18p.
- (26) Marco S. Lucas, José A. Peres. Degradation of Reactive Black 5 by Fenton/UV-C and ferrioxalate/H₂O₂/solar light processes. *Dyes and Pigments* 2007; **74**, 622-629.
- (27) Huan F, Shiuh- H, Wen C, JengJ, Wan L, Chiing C. Degradation pathways of crystal violet by Fenton and Fenton-like systems: Condition optimization and intermediate separation and Identification. *Journal of Hazardous Materials* 2009; **171**, 1032-1044.
- (28) Sahoo C, Grupta A.K., Anjali Pal. Photocatalytic degradation of Crystal Violet (C.I. Basic Violet 3) on silver ion doped TiO₂. *Dyes and Pigments* 2005; **66**, 189-196.
- (29) Chen C, Chenb W, Chioub M, Chenb S, Chenb Y, Fanb H. Degradation of crystal violet by an FeGAC/H₂O₂ process. *Journal of Hazardous Materials* 2011;**196**, 420-425.
- (30) Bofill S, Clemente P, Albiñana N, Maluquer C, Hundesa A, Girones R. Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Revista española de Salud pública* 2005; **79**, 253-269.
- (31) Cifuentes E, Blumenthal U, Ruiz G, Bennett S, Quigley M, Peasey A, Alvarez U. Problemas de salud asociados al riego agrícola con agua residual en México. *Salud pública de México* 1993; **35** (6): 1-9.

- (32) Ortiz G. Descontaminación de aguas por medio de la reacción de foto-Fenton Heterogénea. **Tesis de grado**. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral, Argentina, 2009, 174 p.
- (33) Oller I, Malato S, Sánchez J.A. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination- A review. *Science of the total environmental* 2011; **409**, 4141-4166.
- (34) Gonzales J, Araujo A, Avila H. Regulación de lesiones oxidativas en bacterias. *UCV – Scientia* 2009; **1**, 96-101.
- (35) Villanueva C. Fotocatálisis con TiO₂ /ultravioleta y TiO₂ CuSO₄ visible como sistemas de desinfección para inactivar E. coli proveniente de agua residual doméstica. **Tesis de maestría**. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Colombia, 2011.
- (36) Berto J, Rochenbach G, Barreiros M, Correa A, Silva S, Radetski C. Physico.chemical, microbiological and ecotoxicological evaluation of a septic tank/Fenton reaction combination for treatment of hospital wastewaters. *Ecotoxicology and enviromental safety* 2009; **72**, 1076-1081.
- (37) Ramírez, P; Mendoza, A. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales. Instituto Nacional de Ecología. 2008, 7, 428 p.
- (38) Carriazo J, Guélou E, Barrault J, Tatibouët J, Molina R, Moreno S. Catalytic wet peroxide oxidation of phenol by pillared clays containing Al–Ce–Fe. *Water Research* 2005; **39**, 3891–3899.
- (39) Castillo G. *Ensayos toxicologicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, Estandarización, Intrecalibración, resultados y aplicaciones*. Primera edición. Centro internacional de investigación para el desarrollo. Canadá. 2004, 188 p.
- (40) Senthilkumaar S, Kalaamani P, Subburaam C. Liquid phase adsorption of Crystal violet onto activated carbons derived from male flowers of coconut tree. *Journal of Hazardous Materials* 2006; **136**, 800–808.
- (41) Wang S, Zhu Z. Effects of acidic treatment of activated carbons on dye adsorption. *Dyes and Pigment* 2007; **75**, 306-314.

- (42) Tan I, Ahmad A, Hammed B. Adsorption of basic dye on high-surface-area activated carbon prepared from coconut husk: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Hazardous Materials* 2008; **154**, 337–346.
- (43) Yu G, Lu S, Chen H, Zhu Z. Diesel fuel desulfurization with hydrogen peroxide promoted by formic acid and catalyzed by activated carbon. *Carbon* 2005; **43**, 2285–2294.
- (44) Bastidas M, Buelvas L, Márquez M, Rodríguez K. Producción de Carbón Activado a partir de Precursores Carbonosos del Departamento del Cesar, Colombia. *Información Tecnológica* 2010; **21**, 87-96.
- (45) Piraján J, Navarrete L, Giraldo L, García V. Adsorción de Fenol y 3-Cloro Fenol sobre Carbones Activados mediante Calorimetría de Inmersión. *Información Tecnológica* 2007; **18**, 71-80.
- (46) Pedrozo O, Castillo F, Fuentes E, Maestre R. Carbones activados a partir de bagazo de caña de azúcar y zuro de maíz para la adsorción de cadmio y plomo. *Rev. Acad. Colomb. Cienc* 2011; **35**, 387-396.
- (47) Xiao H, Peng H, Deng S, Yang X, Zhang Y, Yuanwei Li Y. Preparation of activated carbon from edible fungi residue by microwave assisted K₂CO₃ activation—Application in reactive black 5 adsorption from aqueous solution. *Bioresource Technology* 2012; **111**, 127–133.
- (48) Ip A, Barford J, McKay G. A comparative study on the kinetics and mechanisms of removal of Reactive Black 5 by adsorption onto activated carbons and bone char. *Chemical Engineering Journal* 2010; **157**, 434–442.
- (49) Lucas, M; Peres,S. Degradation of Reactive Black 5 by Fenton/UV-C and Ferrioxalate/H₂O₂/solar light processes. *Dyes and Pigments* 2007;**74**, 622-629.
- (50) Blanco, J. Degradación de un efluente textil real mediante procesos Fenton y Foto-Fenton. **Tesis de maestría**. Ingeniería Ambiental. Universidad Politécnica de Cataluña, España, 2009.,P14.
- (51) Hui J, Peng S, Liang G, Ping Q. Degradation of azo dye Amido black 10B in aqueous solution by Fenton oxidation process. *Dyes and Pigments* 2007; **74**, 647-652.

- (52) Kim S, Lee D. Effects of Cu on the catalytic wet peroxide oxidation of reactive dye solutions with Al-Cu pillared clays. *Studies in Surface Science and Catalysis* 2004; **154**, 2958-2965.
- (53) Mazille F, Moncayo A, Spuhler D, Serra A, Peral J, Benitez L, Pulgarin C. Comparative evaluation of polymer surface functionalization techniques before iron oxide deposition. Activity of the iron oxide-coated polymer films in the photo-assisted degradation of organic pollutants and inactivation of bacteria. *Chemical Engineering Journal* 2010; **160**, 176–184.
- (54) Spuhler D, Rengifo J, Pulgarin C. The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing Escherichia coli K12. *Applied Catalysis B: Environmental* 2010; **96**, 126–141.
- (55) Moncayo A, Torres R, Kiwi J, Benitez N, Pulgarin C. Bacterial inactivation and organic oxidation via immobilized photo-Fenton reagent on structured silica surfaces. *Applied Catalysis B: Environmental* 2008; **84**, 577–583.
- (56) Chen B. Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by Pseudomonas luteola: toxicity and kinetics. *Process Biochemistry*, 2002; **38**, 437- 446.
- (57) Meric S, Kaptan D, Olmez T. Color and COD removal from wastewater containing Reactive Black 5 using Fenton's oxidation process. *Chemosphere*. 2004; **54**, 435–44.1
- (58) Lee H, Choi S, Gu M. response of bioluminescent bacteria to sixteen azo dyes. *Biotechnology and bioprocess engineer* 2003; **8**, 101-105.
- (59) Huang Y, Huang Y, Changa P, Chena C. Comparative study of oxidation of dye- Reactive Black B by different advanced oxidation processes: Fenton, electro-Fenton and photo-Fenton. *Journal of Hazardous Materials* 2008; **154**, 655–662.
- (60) Rizzo L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water research* 2011; **45**, 4311-4340.

ANEXOS

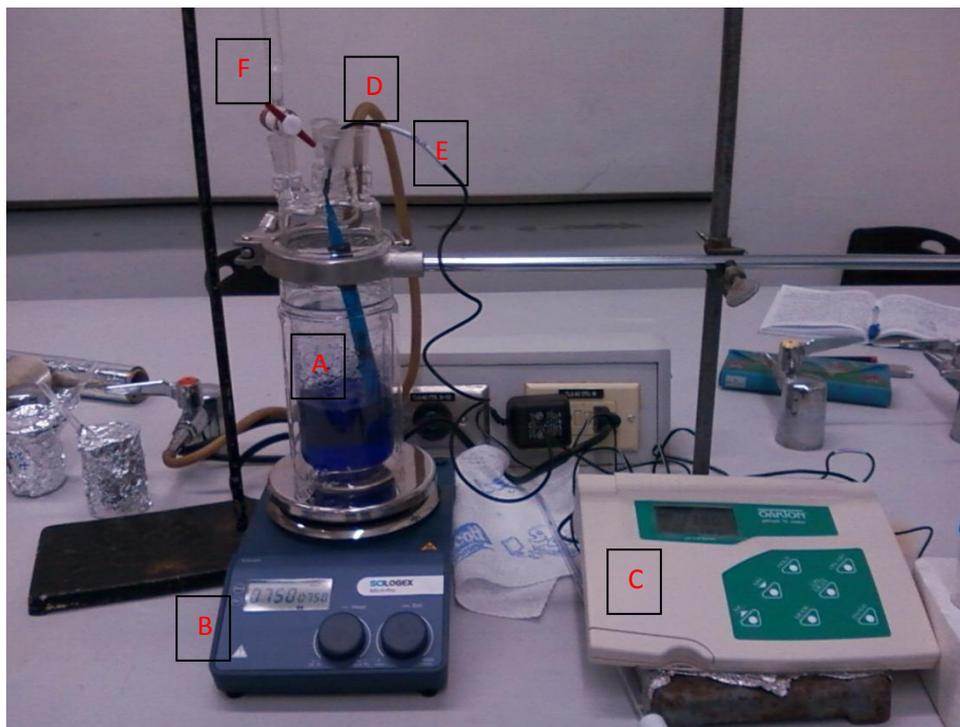
Anexo 1: Montaje para la obtención de los carbones activados



Descripción del montaje:

- A) Bala de gas de nitrógeno
- B) Regulador de flujo de gas
- C) Horno de alta temperatura
- D) Aceite, para el control del flujo de aire.
- E) Regulador de temperatura

Anexo 2: Montaje para la reacción Fenton



Descripción del montaje:

A) Biorreactor de 500 ml con VET (volumen efectivo de trabajo) 200 ml

B) Plancha de agitación magnética: Agitación 750 rpm

C) pH- metro: pH a 3,7

D) Aire: 2L/h

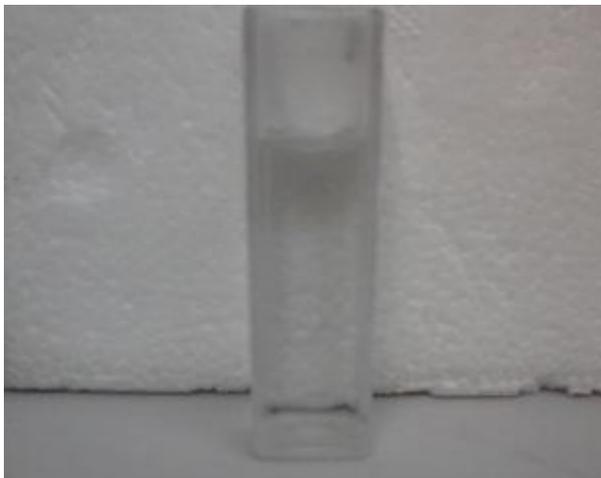
E) Termómetro: 25°C

F) Bureta: 10 ml de Peroxido 0,1 M

Anexo 3: Muestra de agua con colorante negro reactivo 5 antes del tratamiento Fenton con catalizador de 3% Fe^{3+} soportado en carbón activado.



Anexo 4: Muestra de agua con colorante negro reactivo 5 después de 3 horas del tratamiento Fenton con catalizador de 3 % Fe^{3+} soportado en carbón activado.



Anexo 5: Muestra de agua con cristal violeta antes (Izquierda) y después de 3 horas (derecha) del tratamiento Fenton con catalizador de 1% Fe^{3+} soportado en carbón activado.



Anexo 6: Recuento de *E.coli* por la técnica de microgota para la dilución 10^6 luego del tratamiento Fenton con el catalizador 1%Fe. Arriba izquierda: tiempo 0, arriba derecha: tiempo 20 minutos, abajo izquierda tiempo 50 minutos y abajo derecha: tiempo 60 minutos.

