



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA



EXCELENCIA
SEVERO
OCHOA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DESARROLLO DE NUEVOS MATERIALES CON PROPIEDADES BIOCIDAS Y NUEVOS CATALIZADORES PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN AGUA

Trabajo Final de Máster en Química Sostenible

Presentada por:

Adrián Pla Hernández

Dirigida por:

Prof. Antonio Eduardo Palomares Gimeno

Dr. José Luis Cerrillo Olmo

Valencia, septiembre 2019

Resumen

El presente trabajo final de máster trata dos temáticas diferentes. En primer lugar, se desarrollan nuevos materiales biocidas basados en aceites esenciales soportados sobre zeolitas comerciales, sobre arcillas y sobre zeolitas sintetizadas a partir de recursos renovables (paja de arroz) con la finalidad de producir nuevos materiales con propiedades antifúngicas. Los materiales se caracterizaron mediante diversas técnicas como DRX, adsorción, DR UV-vis, FTIR y TG. Los estudios fungicidas se han desarrollado en diferentes ámbitos, combatiendo algunos de los hongos fitopatógenos que actúan sobre las frutas de mayor producción y consumo en la Comunidad Valenciana, las naranjas. Esta parte de la investigación se ha llevado a cabo en colaboración con el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, concretamente con el Centro de Tecnología Postcosecha.

En segundo lugar, se ha llevado a cabo la síntesis y posterior caracterización de catalizadores, basados en metales nobles (Pd y Pt) soportados sobre γ -alúmina (comercial y preparada partir de bohemita). Además, se ha estudiado la aplicación de estos catalizadores en la eliminación de aniones inorgánicos en agua, en concreto cloritos (ClO_2^-) y cloratos (ClO_3^-). Los catalizadores fueron caracterizados por diversas técnicas como ICP, difracción de rayos X, quimisorción y análisis textural para poder detectar sus propiedades físico-químicas y estructurales. Las técnicas empleadas para la caracterización fueron ICP, difracción de rayos X, reducción a temperatura programada, quimisorción y análisis textural.

La reacción de estudio fue la reducción catalítica de cloratos, y mezcla de ClO_2^- y ClO_3^- , empleando hidrógeno como agente reductor y los catalizadores anteriormente citados. Se determinó la influencia de la composición del catalizador en su actividad y los resultados fueron comparados con las propiedades fisicoquímicas de los catalizadores empleados, buscando una relación entre ellos.

Palabras clave: Materiales biocidas, aceites esenciales, compuestos clorados, catálisis, contaminación de aguas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Materiales biocidas	9
1.1.1 Enfermedades en poscosecha	9
1.1.1.1 Podredumbre verde (<i>Penicillium digitatum</i>) y podredumbre azul (<i>Penicillium italicum</i>).....	10
1.1.1.2 Podredumbre amarga (<i>Geotrichum citro – aurantii</i>).....	11
1.1.2 Actuaciones alternativas en poscosecha	12
1.2 La contaminación del agua.....	13
1.2.1 Contaminación del agua por cloritos y cloratos	15
1.2.2 Técnicas de eliminación de cloritos y cloratos.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.1 Materiales	21
3.1.1 Sólidos	21
3.1.2 Líquidos.....	21
3.1.3 Gases.....	22
3.1.4 Material biológico	22
3.2 Preparación de los materiales	23
3.2.1 Zeolitas y óxidos.....	23
3.2.2 Arcillas	23
3.2.3 Tratamientos de funcionalización.....	23
3.2.3.1 Impregnación a volumen de poro	23
3.2.3.2 Impregnación húmeda	24
3.3 Técnicas de caracterización	25
3.3.1 Espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción	25
3.3.2 Difracción de Rayos X	26

3.3.3	Análisis textural.....	26
3.3.4	Quimisorción	27
3.3.5	Análisis termogravimétrico	27
3.3.6	Espectroscopía de reflectancia difusa ultravioleta – visible.....	27
3.3.7	Espectroscopía infrarroja.....	28
3.4	Estudios de actividad biocida	28
3.4.1	Efecto fungicida.....	28
3.4.1.1	Ensayos <i>in vitro</i>	28
3.4.1.2	Ensayos <i>in vivo</i>	29
3.4.2	Estadística.....	30
3.4.3	Ensayo de lixiviación	30
3.5	Estudios de reducción catalítica	31
3.5.1	Condiciones de reacción.....	31
3.5.2	Sistema de análisis.....	32
4.	MATERIALES BIOCIDAS	35
4.1	Caracterización de materiales.....	35
4.1.1	Zeolita FAU.....	35
4.1.2	Sílice y zeolita LTA.....	36
4.1.3	Zeolita MCM-22.....	37
4.1.4	Arcilla	39
4.1.5	Aceites esenciales	40
4.2	Estudios fungicidas.....	42
4.2.1	Estudio <i>in vitro</i>	42
4.2.2	Estudio <i>in vivo</i>	44
4.2.3	Estudio de lixiviación	48
5.	ELIMINACIÓN CATALÍTICA DE CLORITOS Y CLORATOS	51
5.1	Caracterización de catalizadores	51

5.2 Estudio de la actividad catalítica	54
5.2.1 Catalizadores con distinto contenido en paladio	56
5.2.2 Catalizadores con distinto contenido en platino	57
6. CONCLUSIONES.....	61
7. BIBLIOGRAFÍA.....	63

1. INTRODUCCIÓN

En este trabajo final de máster se han desarrollado dos temas diferentes relacionados con la Química Sostenible: el desarrollo de nuevos materiales con propiedades biocidas a partir de aceites esenciales y la preparación y uso de nuevos catalizadores basados en metales nobles para la eliminación de contaminantes inorgánicos del agua: cloritos y cloratos. En este apartado se presente la problemática asociada a ambos temas.

1.1 Materiales biocidas

Un material biocida es una sustancia que puede tener diferentes orígenes (sintético, natural o microorganismos) y posee como finalidad la eliminación de cualquier organismo con un efecto nocivo. La etimología de la palabra biocida proviene del griego *bios* y del latín *-cida*, refiriéndose a que mata organismos vivos.

En particular, este trabajo se centra en el desarrollo de materiales que eliminen o impidan el crecimiento de diferentes hongos perjudiciales para la naranja, los cuales suelen aparecer tras su recolección en la poscosecha. Esto permitiría mejorar su calidad, sería garantía de seguridad alimentaria e incrementaría la vida útil de estos productos agroalimentarios.

1.1.1 Enfermedades en poscosecha

La contaminación de un fruto se puede dar en precosecha, cosecha o poscosecha, por lo tanto, es de gran importancia el control de las condiciones del fruto a lo largo de todas las etapas. Sin embargo, en el caso de la naranja los principales problemas aparecen tras su cosecha, antes de su comercialización. Para minimizar estos problemas es necesario realizar un “Control Integrado, No Contaminante, de Enfermedades Poscosecha” (CINCEP)^[1] que debe abarcar el estudio

epidemiológico de los patógenos. En este control se deben tener en cuenta todos los factores que determinan la incidencia de la enfermedad. Esto se conoce como triángulo de enfermedad y los factores que la determinan son: las condiciones ambientales, los patógenos y el fruto huésped (figura 1). Los tres factores están íntimamente relacionados,

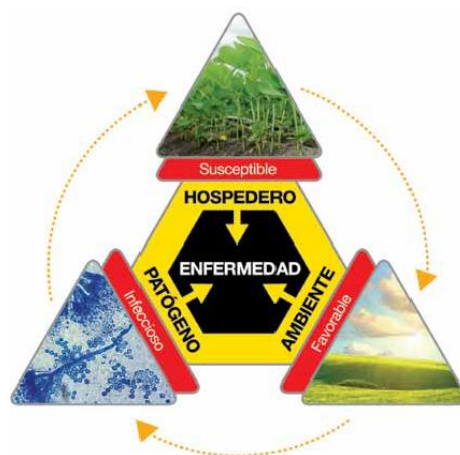


Figura 1. Triángulo de enfermedad (condiciones ambientales-patógeno-fruto huésped).

así las condiciones ambientales influyen en que el fruto huésped sea más o menos susceptible al ataque de un determinado patógeno.

En el caso de las naranjas y de un ataque patógeno producido por hongos, el problema se inicia con la producción y diseminación de inóculo (esporulación). Cuando las esporas llegan al fruto huésped que aún no está infectado, este se contamina, y luego se producirá la infección si el fruto tiene heridas y las condiciones ambientales son adecuadas. Posteriormente, se producirá un desarrollo y colonización de los tejidos del fruto hasta que aparecen los síntomas de podredumbre.

En función a esto, existen 2 clasificaciones de patógenos que causan podredumbre:

1. Patógenos de herida: son infecciones en cosecha/poscosecha que dependen de que el fruto posea una herida o no. Dentro de este tipo de patógenos encontramos la podredumbre verde y azul, causadas por *Penicillium digitatum* e *italicum*, la podredumbre amarga causada por *Geotrichum citri-aurantii* y la podredumbre *Rhizopus*.
2. Patógenos latentes o quiescentes: en este caso se ha producido una infección en el campo, pero esta se ha detenido. Sin embargo, una vez recolectada la fruta la infección latente reaparece causando podredumbres. Como patógenos latentes encontramos la podredumbre negra (*Alternaria* spp.), podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides*), podredumbre marrón (*Phytophthora citrophthora*) y podredumbres pedunculares (*Lasiodiplodia theobromae* o *diplodia natalensis*; *Phomopsis citri*).

En el presente trabajo nos centramos en enfermedades poscosecha causadas por patógenos de herida, en particular en los hongos causantes de la podredumbre verde, la podredumbre azul y la podredumbre amarga.

1.1.1.1 Podredumbre verde (*Penicillium digitatum*) y podredumbre azul (*Penicillium italicum*)

El moho verde y el moho azul (figura 2) son las fitopatologías más importantes en los frutos cítricos durante la postcosecha. Estos patógenos tienen un ciclo de enfermedad muy corto (3 a 5 días a 25°C) y en una sola fruta se pueden producir de 1 a 2 millones de conidias^[2,3] que se dispersan eficientemente a través de corrientes de aire^[4]. En el clima

mediterráneo, el hongo más importante es el *Penicillium digitatum*, el cual produce entre el 55% y el 80% de las enfermedades causadas por hongos. El *Penicillium italicum* es menos abundante aunque se calcula que produce entre el 2% y el 30% de las enfermedades^[5]. Para combatirlos, se utilizan fungicidas químicos como el imazalil, el tiabendazol o el o-fenilfenol de sodio^[6-9].

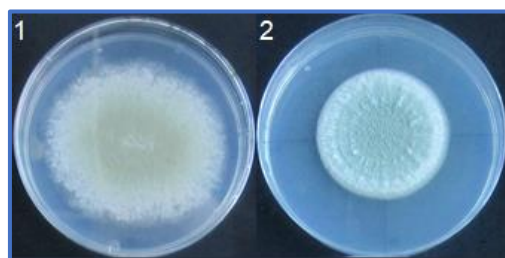


Figura 2. *Penicillium digitatum* (1) y *Penicillium italicum* (2) (in vitro).

1.1.1.2 Podredumbre amarga (*Geotrichum citri-aurantii*)

El hongo *Geotrichum citri-aurantii* (figura 3) es otra de las enfermedades comunes de los cítricos^[10,11] y, aunque se trata de una patología menos común que el moho azul y el moho verde^[5], la infección de los frutos cítricos con este hongo puede causar, en periodos de altas precipitaciones, pérdidas significativas. Al igual que las causadas por *P. digitatum* y *P. italicum*, sus infecciones se originan a través de heridas en la superficie de los frutos durante la recolección y el manejo posterior en postcosecha^[13,14].



Figura 3. *Geotrichum citri-aurantii* (in vitro).

La podredumbre agria no se puede controlar con imazalil y tiabendazol. Esta enfermedad se controla con o-fenilfenato de sodio. Sin embargo, el uso de o-fenilfenato de sodio se encuentra limitado debido al riesgo de fitotoxicidad^[15]. Otra forma de controlar su infección es la prevención mediante tratamientos de saneamiento y conservación a baja temperatura, no obstante, las lesiones por frío, las fluctuaciones térmicas durante el transporte y la comercialización siguen generando importantes problemas.

En la actualidad, el propiconazol es el único fungicida disponible contra la podredumbre amarga^[16], sin embargo, este fungicida solo estará activo hasta el 19 de marzo de 2020 debido a una revisión realizada por la EPSA en octubre de 2018 que canceló el uso de este fungicida para los países de la Unión Europea^[17]. Por lo tanto, se inicia un periodo en el que no existe ningún fungicida aceptado que sea eficaz contra el *Geotrichum citri-aurantii*.

1.1.2 Actuaciones alternativas en poscosecha

Las restricciones legales^[18] o comerciales, debido al empleo prolongado de fungicidas químicos para el control de los patógenos en los cítricos, han fomentado la búsqueda de métodos alternativos no contaminantes que no generen residuos nocivos ni contaminen el medioambiente. Esto es necesario pues se ha comprobado que hay un mayor nivel de resistencia de cepas *Penicillium* a los fungicidas de uso más frecuente en la poscosecha^[19], lo que obliga a usar una mayor dosis de fungicidas y aumenta la cantidad de tóxicos presentes en productos frescos.

El CINCEP sería una alternativa a estos métodos y se basa en una actuación empleando medios no contaminantes en busca de la reducción de pérdidas económicas producidas por enfermedades postcosecha. En primer lugar, propone realizar un manejo adecuado de los frutos, y una limpieza y desinfección de los mismos. Además, propone realizar tratamientos antifúngicos para una desinfección superficial en la que se pueden utilizar cloro y derivados [NaClO, ClO₂, Ca(ClO)₂], ozono, ácido peracético, peróxido de hidrógeno y mezclas^[20]. Sin embargo, se utilizan también tratamientos de control físicos alternativos a los fungicidas^[21] como son tratamientos con calor (agua caliente), el curado con aire caliente, irradiaciones con luz UV-C, tratamientos complementarios de conservación y tratamientos químicos de bajo riesgo, en los que se utilizan sustancias naturales o de síntesis con efectos residuales y toxicológicos muy bajos sobre personas, animales y el medio. Dentro de estos tratamientos químicos de bajo riesgo se incluye el uso de sustancias naturales como serían los aceites esenciales, aditivos alimentarios como el sorbato de potasio (para el control de *P. digitatum* y *G. citri – aurantii*^[22]), o el benzoato de sodio (sobre el *P. italicum*^[23]), sustancias GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro), sustancias inductoras de resistencia y recubrimientos comestibles antifúngicos^[24, 25].

Un método que ha ganado creciente aceptación e interés en los últimos años es la utilización de extractos naturales como agentes biocidas^[26-29] que podrían aplicarse a envases activos^[30-32]. Estos aceites esenciales se han utilizado tanto en pruebas *in vitro* como en *in vivo* obteniendo resultados positivos en la inhibición del crecimiento de los patógenos en la granada^[33], sin embargo, los tratamientos *in vivo* no mostraron unos resultados tan positivos en otras frutas, como la manzana^[34].

Este TFM se centra en el desarrollo de tratamientos químicos antifúngicos de bajo riesgo utilizando sustancias naturales, como son los aceites esenciales, para tratar enfermedades poscosecha causadas por patógenos de herida. En particular, se estudiará la actividad biocida frente a los hongos causantes de la podredumbre verde, la podredumbre azul y la podredumbre amarga. Para ello, se va a trabajar con aceites esenciales de tomillo y canela, desarrollando un material que permita la liberación controlada de los aceites esenciales^[35], de manera que se inhiba el crecimiento de los hongos *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Geotrichum citri-aurantii*^[36,37], incrementando así la vida útil y la calidad de los productos agroalimentarios.

1.2 La contaminación del agua

El agua es fundamental para la humanidad y para todos los ecosistemas de nuestro Planeta. La historia nos enseña como todas las civilizaciones han entendido su importancia para la supervivencia, permitiendo su evolución social, económica y cultural. Uno de los Siete Sabios Griegos, Tales de Mileto, ya afirmaba que el agua es el principio de todas las cosas, y desde la Antigüedad hasta nuestros días el agua es esencial para el desarrollo y supervivencia de la sociedad y los ecosistemas naturales.

Se calcula que en el Planeta hay 1386 millones de km³ de recursos hídricos, pero únicamente el 3% es agua dulce. De este porcentaje únicamente el 0.6% se encuentra fácilmente disponible, mientras que el resto se encuentra en fase sólida formando parte de los casquetes y glaciares polares^[38,39], como se refleja en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución del agua dulce ^[38].

Localización de agua dulce	Volumen (Km ³)
Glaciares y casquetes polares	24064000
Acuíferos subterráneos	10000000
Lagos naturales	91000
Depósitos artificiales/pantanos	5000
Ríos	2120

A pesar de la relativamente poca disponibilidad de agua dulce, su consumo ha aumentado alrededor de un 1% por año, desde los años ochenta^[40] hasta nuestros días. Esto se relaciona con el crecimiento de la población, el desarrollo social y económico de países en desarrollo y con patrones de consumo evolutivos^[41]. El sector que mayor cantidad de

agua consume, con aproximadamente un 69% de las extracciones anuales globales, es la agricultura, seguido del sector industrial con un 19% y por último, los hogares que representan un consumo de un 12%^[40]. Las previsiones para el año 2040 son que la demanda global continúe en crecimiento hasta llegar a un 20 –

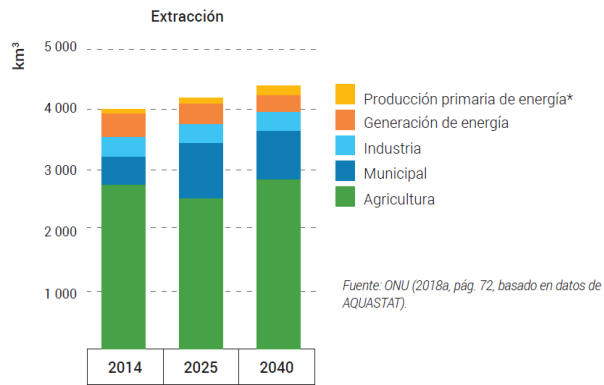


Figura 4. Demanda global de agua por sector para el 2040.

30%^[42] de consumo sobre el nivel de extracción actual, debido a aumentos en la demanda de los sectores industriales y domésticos^[42-44] (figura 4). Pero además, hay que tener en cuenta que los usos y el acceso al agua no son homogéneos en el Planeta, así se calcula que, en 2015, aproximadamente 2100 millones de personas no tenían acceso a servicio de agua potable y 4500 millones no tenían acceso a servicios de saneamiento^[45]. El incremento del consumo de agua producirá un impacto en la disponibilidad de aguas superficiales y subterráneas, aumentando el potencial de conflictos entre los usuarios, y aumentando las cifras de personas afectadas por el fenómeno de estrés hídrico. Además, un mayor uso del agua disminuye la calidad de la misma, lo que limita aún más su acceso y aumenta los riesgos sanitarios de la población que la consume^[46]. Estas limitaciones afectan tanto a países en desarrollo como a los países desarrollados, y producen la pérdida de acuíferos, el aumento de contaminantes emergentes y la propagación de especies invasoras^[47]. Un ejemplo de ello es que enfermedades como el cólera y la esquistosomiasis siguen siendo frecuentes en muchos países en desarrollo, donde únicamente se trata en depuradoras una fracción muy pequeña del total de aguas residuales, antes de su liberación al medio natural^[48]. Por ello, para mejorar la calidad y solucionar los problemas relacionados con el agua es indispensable el uso de técnicas de depuración que eliminen o reduzcan la concentración de contaminantes en el agua potable permitiendo un mejor aprovechamiento de esta^[49,50].

En el presente trabajo se estudia una posible solución a la contaminación de aguas producida por la presencia de cloritos y cloratos.

1.2.1 Contaminación del agua por cloritos y cloratos

El agua natural no es pura, está compuesta por iones, gases disueltos, sedimentos e incluso posee seres vivos. Su contaminación se produce cuando se altera su composición o estado, directa o indirectamente, debido a la actividad humana de forma que el agua queda con una calidad inferior que impide su uso^[51]. Los contaminantes hidrológicos son sustancias de naturalezas y fuentes diversas, sin embargo, principalmente podemos encontrar compuestos orgánicos biodegradables y no biodegradables (plásticos, pesticidas, etc.), metales iónicos (Hg^+ , Pb^{4+} , Cr^{6+} , etc.), sedimentos, elementos patógenos (virus, bacterias, ...), sales disueltas, nutrientes (nitratos y fosfatos) y contaminación térmica.

En la actualidad, los casos más habituales de contaminación están relacionados con: (1) el aumento de aguas residuales debido al desarrollo de núcleos poblacionales más grandes en una zona determinada, (2) la actividad del sector primario y (3) la generación de aguas contaminadas y no tratadas por parte del sector secundario^[52]. La contaminación de los recursos hídricos supone un riesgo para el medioambiente y su eliminación es un reto para la investigación y para la conservación de la calidad del agua^[47,53].

La contaminación del agua por cloritos (ClO_2^-) y cloratos (ClO_3^-) se produce principalmente debido al uso de dióxido de cloro (ClO_2) como desinfectante en las plantas potabilizadoras y depuradoras de agua, ya que este desinfectante puede generar como subproductos ambos oxoaniones^[55,56]. El ClO_2 se descompone rápidamente a clorito, iones clorato y cloruro en el agua tratada, siendo el clorito la especie predominante, esta reacción es favorecida en condiciones alcalinas^[57]. El clorato se forma por una reacción de desproporción del ClO_2 catalizada por luz ultravioleta^[58], dando lugar a una molécula de clorito y a una molécula de clorato. Por otro lado, también pueden aparecer dichos contaminantes en industrias como la de producción de dióxido de cloro para su uso como agente blanqueador, en textiles, en la fabricación de productos de paja, en la fabricación de tintes, cerillas, explosivos, herbicidas y defoliantes, etcétera^[59-62].

Debido a la gran cantidad de casos de intoxicación por clorato producidos por su empleo como herbicida^[59] se evaluaron los efectos de los cloratos en humanos durante 3 meses y se concluyó en que el consumo de medio litro de agua por día que contenía 5 ppm de clorato de sodio provocaba un cambio corpuscular de la hemoglobina y en el grupo de nitrógeno ureico en el torrente sanguíneo. También se evaluaron los efectos de los cloritos, realizando el tratamiento en las mismas condiciones, observándose nuevamente

un cambio corpuscular de la hemoglobina^[63]. A partir de estos estudios, la International Agency for Research on Cancer (IARC), concluyó en que los cloritos y los cloratos no se pueden clasificar como carcinógenos para humanos^[64]. Sin embargo, al comprobar que estos contaminantes provocan cambios en los glóbulos rojos por estrés oxidativo^[65-67], la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido una concentración límite provisional de $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para ambos contaminantes en agua potable^[67], siendo esta concentración un valor de referencia porque el uso de desinfectantes puede dar lugar a valores superiores. Esta organización ha recomendado también realizar estudios a largo plazo de la toxicidad de estos iones.

1.2.2 Técnicas de eliminación de cloritos y cloratos

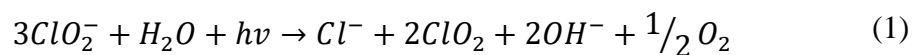
Como se ha comentado en el apartado anterior la contaminación de aguas por cloritos y cloratos es un problema para la sociedad. Y más aún, si se tiene en cuenta que los métodos de desinfección de aguas pueden provocar un incremento de la concentración de estos oxoaniones en el agua potable.

La manera más efectiva de reducir la formación del ion clorato es evitar valores de pH altos, tener bajas concentraciones iniciales de reactantes e intentar que esté presente el ácido hipocloroso libre. Para minimizar la cantidad de clorito formado tras la desinfección con ClO_2 , se aconseja el uso de hipoclorito sódico (NaClO) como pre-oxidante^[68,69] formándose entre un 40% y un 60% menos de compuestos oxoclorados en estas condiciones.

No obstante, debido a que estas condiciones preventivas no son suficientemente efectivas, se han desarrollado diversos tratamientos para la eliminación de los iones clorito y clorato en agua, entre los que se encuentran:

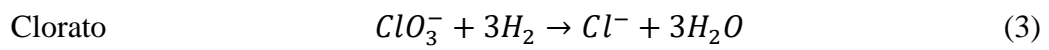
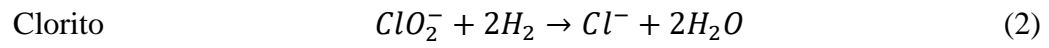
- Adsorción: se trata de una de las técnicas más comunes para la eliminación de contaminantes y se basa en un proceso por el cual los contaminantes disueltos son eliminados del agua mediante el contacto con una superficie sólida. Se han desarrollado tratamientos como el empleo de un aerogel adsorbente de celulosa modificado en su superficie mediante el polímero (N,N-dimetil aminoetil metacrilato)^[70]. También se puede utilizar el carbón activo, que es un material multifuncional debido a que produce no solo la adsorción de iones clorato, sino que también favorece la reducción de iones clorito a cloruro^[71].

- Intercambio iónico: esta técnica se realiza mediante materiales sintéticos formados por una matriz polimérica a la que se le unen radicales polares, ácidos o bases. Un ejemplo de este tratamiento sería la utilización de resinas de intercambio iónico magnético^[72], capaces de eliminar los iones clorito y clorato.
- Biorremediación: basado en la utilización de organismos vivos para la absorción, degradación o transformación de los contaminantes. Esta técnica se puede utilizar para el tratamiento de agua con bajos niveles de iones clorato, los cuales se reducen al actuar como aceptores de electrones para los microorganismos^[73]. Sin embargo, los procesos de tratamiento de aguas potables suelen ser diseñados mediante procesos físico-químicos, evitando el uso de biorreactores para la posible contaminación del agua tratada.
- Fotodescomposición por luz UV: se trata de la disociación de las moléculas por efecto de la luz. Así se ha descrito la fotólisis de cloritos por luz UV^[74] formando:



- Reducción química: se basa en la utilización de reactivos con poder reductor para la conversión de cloritos y cloratos a cloruros. Dentro de estos tratamientos podemos encontrar la reducción de cloritos y cloratos añadiendo hierro (II) para la formación de complejos polihidroxo férricos (utilizados como floculantes)^[75].
- Reducción catalítica^[76,77]: es una de las mejores opciones desde el punto de vista medioambiental, ya que está basada en la utilización de un catalizador para la reducción del contaminante con alta eficacia y selectividad. No serían necesarios equipos costosos y no se generarían subproductos que necesiten tratamientos posteriores, reduciendo así el tiempo de reacción y realizando un proceso sostenible.

En el presente trabajo de fin de máster se ha estudiado la reducción catalítica de iones clorito y clorato, empleando hidrógeno como agente reductor. Para llevar a cabo esta reacción es necesario el uso de un catalizador monometálico basado en paladio o platino soportado. Las reacciones generales que tienen lugar se representan en las ecuaciones 2 y 3:



Esta reacción empleó un reactivo inocuo, el H₂, transformando el contaminante en un ion que aparece de forma natural en las aguas, los cloruros.

2. OBJETIVOS

De acuerdo con la problemática planteada, los objetivos de este TFM se centran en dos temáticas diferentes: el uso de materiales biocidas para el control de la podredumbre en cítricos y el estudio de la eliminación catalítica de cloritos y cloratos en agua. En concreto se pretende:

1. Sintetizar y caracterizar materiales biocidas basados en SiO_2 , arcilla y zeolitas con aceites esenciales de canela y tomillo.
2. Estudiar la actividad inhibitoria de estos materiales contra los hongos fitopatógenos causantes de la podredumbre en cítricos, mediante ensayos *in vitro*.
3. Estudiar, *in vivo* con naranjas cosechadas, la actividad de estos materiales contra los hongos fitopatógeno que más problemas producen en la comercialización de cítricos.
4. Sintetizar y caracterizar catalizadores de paladio y platino soportados sobre alúmina, para su uso en la reducción catalítica de cloritos y cloratos.
5. Estudiar la actividad de estos catalizadores en aguas contaminadas con cloratos y cloritos, empleando hidrógeno como agente reductor.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiales

En el siguiente apartado se identifican y clasifican los diferentes reactivos empleados para la realización del trabajo experimental.

3.1.1 Sólidos

- Nitrato de paladio (II) dihidratado, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich[®].
- Tetramino dicloro platino (II) hidratado, $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$, pureza 98%, Sigma-Aldrich[®],
- Alúmina, $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, Sigma-Aldrich[®].
- Hidróxido de aluminio, grado reactivo, Sigma-Aldrich[®].
- Cloruro de sodio, NaCl, ACS reactivo $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich[®].
- Clorito de sodio, NaClO_2 , pureza 80%, Sigma-Aldrich[®].
- Clorato de sodio, NaClO_3 , ACS reactivo $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich[®].
- Bicarbonato de sodio, NaHCO_3 , ACS reactivo, $\geq 99.7\%$, Sigma-Aldrich[®].
- Carbonato de sodio, Na_2CO_3 , ACS reactivo, $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich[®].
- Naranjas, variedad Valencia Late.
- Zeolita Linde Type A (LTA) de relación Si/Al = 1; Sigma-Aldrich[®].
- Zeolita Faujasita (FAU) de relación Si/Al = 2.4, Zeolita Y (CBV100), Zeolyst[®].
- A Zeolite Rice Husk (zeolita A realizada con sílice de la cáscara de arroz), preparada en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
- Raw rice husk (solo sílice de cáscara de arroz), preparada en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
- CACMCM-22 (zeolita MCM-22 realizada con sílice de la cáscara de arroz), preparada en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
- CS16-21H-C (arcilla CSNa^+ hinchada con C_{16}TABr , secada a temperatura ambiente durante 21 horas, pilareada con TEOS y calcinada), preparada en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.1.2 Líquidos

- Agua destilada, H_2O .
- Agua ultra pura, H_2O Milli-Q.
- Agua para análisis, H_2O ACS, Panreac[®].

- Acetona, C₂H₆O, Scharlau[®].
- Ácido sulfúrico, H₂SO₄ ACS reactivo 95,0 – 98,0%, Sigma-Aldrich[®].
- Ácido fluorhídrico, HF solution 40% w/w, Scharlau[®].
- Ácido nítrico, HNO₃ 65%, Panreac[®].
- Ácido clorhídrico, HCl grado reactivo ≈ 37%.
- Etanol, C₂H₅OH pureza 96%, Scharlab S.L.
- Solución estándar aniónica multielemental para cromatografía iónica, certificada, Sigma-Aldrich[®].
- Isopropanol, C₃H₈O, Acros Organics[®].
- Acetato de etilo, C₄H₈O₂ ACS, Scharlab S.L.
- Aceite esencial de tomillo, PLANTIS.
- Aceite esencial de canela, Sigma-Aldrich[®].

3.1.3 Gases

Los gases utilizados fueron los siguientes:

- Hidrógeno 5.0 99,99%, Abelló Linde S.A.[®].
- Nitrógeno 5.0 99,99%, Abelló Linde S.A.[®].

3.1.4 Material biológico

El estudio de la capacidad biocida de nuevos materiales implica el uso de organismos biológicos (hongos) y medios de cultivo que fueron los siguientes:

- *Penicillium Digitatum* (PD)
- *Penicillium Italicum* (PI)
- *Geotichum Citri-aurantii* (GC)
- PDA o medio de cultivo gelificante, se compone de 0.4% de extracto de patata, 2% dextrosa y 1.5% agar en agua destilada.
- Agar nutritivo para placa Petri, compuesto por PDA y agua destilada en una concentración de 39 g/L.
- Formulación 10 (F10) como medio de cultivo in vivo. Preparada con: 2% polímero, 1% glicerol, 0,5% lípido, 0.25% GiraLec, 0.25% Moglicet, 1% fungicida y 95% de agua destilada, con un contenido sólido 5%.

3.2 Preparación de los materiales

Con el fin de llevar a cabo los objetivos propuestos en este trabajo se utilizaron diferentes materiales porosos y óxidos metálicos que fueron preparados y/o funcionalizados tal como se especifica a continuación.

3.2.1 Zeolitas y óxidos

En el presente trabajo se utilizó SiO_2 y diferentes estructuras zeolíticas, con distinta relación Si/Al, como soportes inorgánicos porosos para aceites esenciales. Algunas de ellas fueron sintetizadas en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), mientras que otras se utilizaron en su forma comercial. Las zeolitas sintetizadas en la UFRGS fueron una zeolita MCM-22 (CACMCM-22), una zeolita LTA (CACLTA) y un óxido de sílice (CAC) que fueron preparadas con sílice extraída de la cáscara de arroz. Las zeolitas comerciales fueron la LTA y la FAU suministradas por Sigma-Aldrich® y Zeolyst®, respectivamente.

Se utilizó también una alúmina comercial suministrada por Sigma-Aldrich® y un precursor de la misma (bohemita), suministrado por la misma compañía. Estos soportes fueron usados para preparar los catalizadores de Pd y Pt empleados en las reacciones de reducción de cloritos y cloratos.

3.2.2 Arcillas

Para la evaluación de la actividad biocida se utilizó además una arcilla modificada mediante un procedimiento de expansión con C_{16}TABr y posterior pilarización con TEOS. Esta arcilla se preparó en colaboración con la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.2.3 Tratamientos de funcionalización

Todos los materiales descritos fueron funcionalizados mediante diferentes métodos de impregnación.

3.2.3.1 Impregnación a volumen de poro

Esta técnica se empleó para la preparación de los materiales con propiedades biocidas. Se basa en añadir el aceite esencial directamente o disuelto con isopropanol sobre el sólido a impregnar, de forma que la totalidad de los poros del soporte se queden completamente ocupados, evitando un exceso de disolución. Las disoluciones empleadas contienen la cantidad necesaria del aceite esencial para conseguir que el material final posea el

porcentaje de aceite deseado. Una vez impregnado a volumen de poro, el material funcionalizado se dejó secar a temperatura ambiente durante un día.

El método de impregnación a volumen de poro fue utilizado para preparar diferentes materiales con distintos contenidos en peso de aceite esencial. Para el estudio *in vitro* se utilizó una zeolita comercial, la faujasita (FAU), con contenidos en aceite esencial de tomillo o canela de 40%, 20% y 2%. Para el estudio *in vivo* se prepararon también por este método materiales sintetizados a partir sílice extraída de la cáscara de arroz y la arcilla pilareada (CS16-21H-C) con un contenido en aceite esencial de tomillo del 20%.

3.2.3.2 Impregnación húmeda

El método de impregnación húmeda se utilizó para preparar los catalizadores que se usaban en la reducción de cloritos y cloratos en agua. Se prepararon catalizadores de paladio y platino soportados sobre alúmina y la bohemita. La sal precursora de paladio fue $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, mientras que como sal precursora de platino se utilizó $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Estas se disolvieron en agua Milli-Q con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Preparada la disolución del metal a impregnar, esta se vertió en un matraz de fondo redondo al que se añadió previamente la masa de soporte necesaria ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ o bohemita). Esta mezcla se colocó en un rotavapor que, con el apoyo de un baño termostático y un sistema de vacío acoplado, permite la eliminación del disolvente provocando la deposición del metal sobre el soporte catalítico. Posteriormente, se llevó a cabo la eliminación completa del disolvente en una estufa a 100°C durante aproximadamente 8 horas y se calcinó según el programa de calcinación de la figura 5.

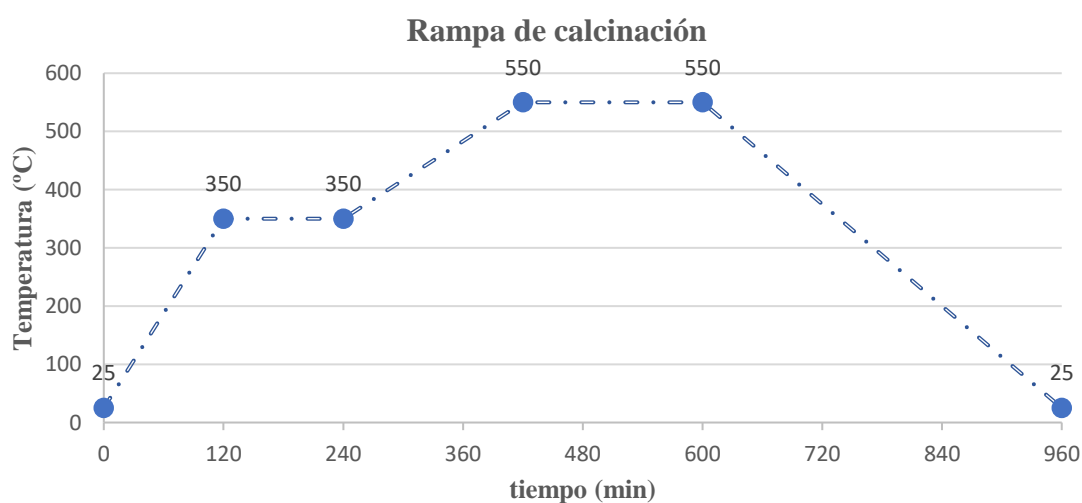


Figura 5. Esquema del programa de calcinación empleado.

Tras la calcinación, los catalizadores se sometieron a un proceso de reducción para su activación. Esta activación se consigue aumentando la temperatura hasta 200°C en atmósfera inerte (N₂), una vez alcanzada esta temperatura se mantuvo y se aplicó una atmósfera reductora (H₂) durante 4 horas y finalmente, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente en atmósfera inerte (N₂), empleando un flujo de gases en todas las etapas de 100 mL·min⁻¹ (figura 6).

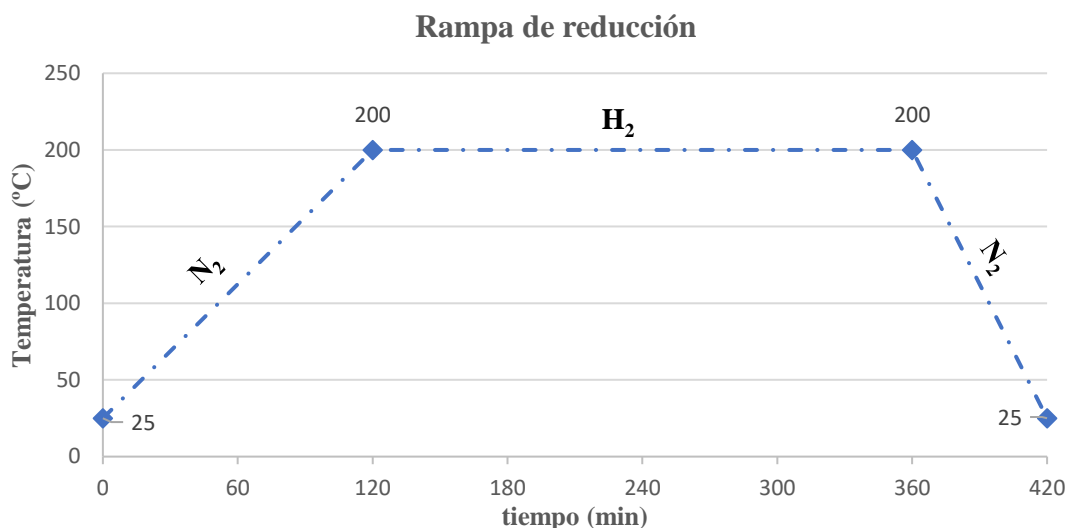


Figura 6. Esquema del programa de reducción empleado.

3.3 Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización empleadas fueron las siguientes:

3.3.1 Espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción

La técnica de espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES) estudia la emisión de radiación por átomos o iones libres en estado excitado. Se basa en el análisis de la radiación emitida por parte de los átomos presentes en un material que es sometido a una serie de procesos consecutivos de disolución, nebulización y ruptura de los enlaces para obtener átomos en estado fundamental que son excitados. Estos átomos, al relajarse, emiten una radiación característica^[78], lo que permite realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de estos elementos.

Para el análisis de los diferentes materiales sólidos, es necesario realizar un calibrado utilizando patrones certificados. Una vez hecho el calibrado se toman 30-50 mg de los diferentes materiales y se disgregan en una mezcla ácida de HF (40% v/v), HNO₃ (65%

v/v) y HCl (30% v/v) de proporciones volumétricas 1/1/3, para posteriormente diluirlos con agua. El equipo utilizado para la determinación de la composición metálica de los diferentes materiales fue un equipo Varian 715-ES.

3.3.2 Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica de caracterización basada en el análisis de radiación difractada por un sólido sobre el cual incide un haz monocromático de rayos X con un ángulo variable. La difracción se produce como consecuencia de las interferencias constructivas debidas a la periodicidad cristalina de la muestra. De acuerdo con la ecuación de Bragg^[79], el ángulo de incidencia de la radiación se relaciona con el espaciado interplanar para cada línea de difracción:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \text{sen } \theta \quad (4)$$

donde n es un número entero ($n=1, 2, 3, \dots$), d_{hkl} es el espaciado interplanar de los planos cristalinos con índices de Miller ($h k l$), λ es la longitud de onda y θ es el ángulo de incidencia del haz de rayos X.

Las medidas de muestras sólidas homogéneas se realizaron con un difractómetro CUBIX de PANalytical equipado con un detector PANalytical X'Celerator. Para la obtención de los difractogramas, se utilizó una radiación de rayos X de Cu K α ($\lambda_1 = 1.5406 \text{ \AA}$, $\lambda_2 = 1.5444 \text{ \AA}$, $I_2/I_1 = 0.5$), y un voltaje e intensidad de tubo de 45 kV y 40 mA, respectivamente.

3.3.3 Análisis textural

El análisis del área/microporo por adsorción-desorción de nitrógeno es una técnica de caracterización que permite conocer la superficie de área total y la superficie microporosa. Se basa en los fenómenos de adsorción y desorción gas-sólido, gracias a los cuales se obtiene información sobre las propiedades texturales del adsorbente, como la superficie específica, que suele estar relacionada con la actividad catalítica de los catalizadores preparados.

Los estudios de adsorción – desorción de N₂ se llevaron a cabo en un equipo Micromeritics ASAP 2040 a una temperatura de -196 °C, siendo necesarios 200 mg de la muestra con un tamaño entre 0.4 – 0.6 mm a los que se aplicó un pre-tratamiento a 200°C

y vacío. Para determinar la superficie específica se aplicó el modelo de isoterma BET (modelo explicado por Brunauer, Emmet y Teller) mediante la obtención del valor de la monocapa^[80]. Además, se determinó la superficie específica con los datos de presión y volumen de gas absorbido.

3.3.4 Quimisorción

La quimisorción de H₂ es una técnica de caracterización que permite cuantificar superficies metálicas reducidas en sólidos. Se basa en la capacidad que tienen las nanopartículas metálicas para quimisorber moléculas de H₂, junto con aproximaciones estequiométricas y geométricas^[81].

Esta técnica fue empleada para conocer el área superficial activa del metal en el catalizador, su dispersión sobre el soporte y el tamaño medio del cristal, suponiendo geometría esférica^[82]. Para ello, los experimentos de quimisorción se llevaron a cabo en un equipo Quantachrome Autosor – 1C. En estos experimentos, se cargaron aproximadamente 100 mg de catalizador en un tubo de cuarzo en forma de U. La muestra se secó en flujo de He a 120°C y se redujo durante 4 horas a 200°C, evacuándose a 1,3 Pa y enfriándose a vacío hasta 35°C tras el proceso de reducción. Por último, se introduce H₂ puro registrándose la primera isoterma de adsorción. Tras evacuar a vacío, se registra la segunda isoterma. La diferencia entre las dos isotermas permite calcular la quimisorción de H₂.

3.3.5 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TG) es una técnica que informa de los cambios másicos de una muestra durante su calentamiento a temperatura programada utilizando una atmósfera controlada^[83].

Los experimentos se realizaron con aproximadamente 10 mg de muestra y se llevaron a cabo en un equipo Mettler-Toledo TGA/SDTA 851. Para ello se cargó la muestra en un crisol de alúmina, acoplado a una balanza de precisión y un termopar tipo S (Rh-Pt), y se calentó desde 25°C hasta 800°C con una rampa de 10°C · min⁻¹ en flujo de aire sintético.

3.3.6 Espectroscopía de reflectancia difusa ultravioleta – visible

La espectroscopía de reflectancia difusa UV – visible (DR UV-vis) es una técnica de caracterización basada en la capacidad de absorción fotónica de los átomos y moléculas del material que produce una transición electrónica hacia un estado excitado de mayor

energía. Esta absorción energética se produce cuando la energía de los fotones coincide con la diferencia entre su estado fundamental y su estado excitado.

La medida de las muestras se realizó en un equipo de Varian UV – Vis Spectrophotometer Cary 50 equipado con un detector de reflectancia difusa Praying Mantis Harrick, empleando BaSO₄ como patrón.

3.3.7 Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja (FTIR) es una técnica de caracterización basada en el análisis de la absorción de radiación infrarroja por el material expuesto. La absorción de radiación infrarroja por la materia provoca alteraciones en los estados vibracionales y rotacionales de grupos funcionales presentes en las moléculas^[84,85], mostrándose en el espectro IR como bandas específicas asociadas a vibraciones propias de tensión o flexión que son diferentes para cada conjunto atómico y que se caracterizan por la intensidad y frecuencia a las que aparecen.

La medida de las muestras se realizó en un equipo Nicolet 710 FTIR, empleando el método de pastilla de KBr.

3.4 Estudios de actividad biocida

Uno de los objetivos de esta tesis es el desarrollo de nuevos materiales con actividad biocida frente a hongos como *Penicillium Digitatum* (PD), *Penicillium Italicum* (PI) y *Geotichum Citri-aurantii* (GC). En este apartado se describe el procedimiento experimental utilizado para evaluar el efecto fungicida de los materiales impregnados con aceites esenciales de tomillo o canela.

3.4.1 Efecto fungicida

La actividad fungicida se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición en el crecimiento fúngico de hongos fitopatógenos frecuentes en la naranja PD, PI y GC. Para el desarrollo de este estudio se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo*.

3.4.1.1 Ensayos *in vitro*

La evaluación de la actividad antifúngica de los materiales se realizó inicialmente en un estudio *in vitro*, preparando un total de 9 tratamientos antifúngicos, que se aplicaron en el medio de cultivo, y un control (sin incorporación de material biocida) para cada uno de los hongos del estudio. Por cada tratamiento y control se realizaron tres réplicas. Para el

crecimiento de los hongos es necesario un medio de cultivo que aporte los nutrientes necesarios, para ello se utilizó un caldo de cultivo compuesto por patata, dextrosa y agar (PDA). Este se disolvía en medio acuoso y fue calentado hasta ebullición e introducido en un autoclave durante 30 minutos a 120°C para su esterilización. Una vez esterilizado se finalizó su preparación incorporando un 1% en peso de zeolita funcionalizada con distinta cantidad de aceite esencial. Posteriormente, 20 mL de la mezcla PDA más la zeolita funcionalizada se depositaron en placas Petri de 9 mm cubriendo por completo la superficie de la placa, dejándolas enfriar hasta temperatura ambiente para su gelificación.

Una vez gelificado se procedió a la inoculación de los hongos estudiados. El hongo *Geotrichum citri-aurantii* (GC) fue inoculado empleando colonias en forma de discos de 5 mm de diámetro, por otro lado, el *Penicillium digitatum* (PD) y el *Penicillium italicum* (PI) fueron inoculados utilizando 4 µL de una suspensión 10⁵ esporas·mL⁻¹, que fue vertida sobre un agujero realizado previamente en el medio de PDA gelificado. Finalmente, se introdujeron en una cámara a 40-45°C para su crecimiento y se tomaron medidas a los 3, 5 y 7 días.

Los resultados del estudio se expresaron como el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico (ecuación 5), donde d_{mc} es la media de los diámetros de las colonias de hongos desarrollados en el medio de cultivo infectado, en las distintas réplicas del control, es decir, en el material al que no se ha añadido ningún tratamiento. Por otro lado, d_{mti} es la media de los diámetros de las colonias en las muestras a las que se añadió material biocida^[86, 87].

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{d_{mti} - d_{mc}}{d_{mc}} \cdot 100 \quad (5)$$

3.4.1.2 Ensayos *in vivo*

Una vez realizado el estudio *in vitro* se procedió al desarrollo de un estudio *in vivo* realizado en naranjas de la variedad Valencia, estudiando el efecto antifúngico de 6 tipos de materiales funcionalizados con aceites esenciales. La actividad antifúngica se evaluó frente a 3 tipos de hongos diferentes (PD, PI y GC). Cada ensayo se hacía con 40 naranjas y, además, se realizó un control sin incorporación de material biocida. La inoculación del



Figura 7. Herida en la zona ecuatorial de la naranja, inoculada (3 días).

hongo se realizó con un punzón de acero inoxidable, previamente mojado en una suspensión de 10^5 esporas·mL⁻¹ del hongo específico, realizando una herida de aproximadamente 2 mm de profundidad y 1 mm de anchura en el centro de la naranja (figura 7).

Pasado un día tras la inoculación del hongo, se realizó el recubrimiento de la fruta con una formulación (F10) basada en una mezcla de polímeros (2%), glicerol (1%), lípidos (0.5%), GiraLec (0.25%), Moglicet (0.25%), antifúngico (1%) y agua (95%) en peso. Este recubrimiento se impregnó mediante la inmersión de la naranja en la formulación producida.

Tras inocular y tratar las frutas, estas se dejaron durante 7 días en cámaras de incubación. Las naranjas infectadas con *Penicillium* se incubaron a 20°C y las infectadas por *Geotrichum* fueron incubadas a 28°C. En todos los casos se trabajó con una humedad relativa de 90%. Pasado este tiempo, la actividad biocida de los materiales desarrollados se evaluó analizando la:

- Incidencia: porcentaje de naranjas infectadas.
- Fitotoxicidad: referido a manchas o cambios de coloración.
- Esporulación: porcentaje de naranjas con esporas.
- Severidad: diámetro de crecimiento del hongo.

3.4.2 Estadística

La gran cantidad de datos con la que se trabaja obliga a realizar estudios estadísticos para su evaluación. Para la realización de estos se utilizó el software Statgraphics 5.1 (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA), aplicando análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95%.

3.4.3 Ensayo de lixiviación

Para evaluar capacidad de liberación de los aceites esenciales por cada uno de los materiales se realizaron diversos estudios con espectroscopía U.V. Para ello, se caracterizaron las bandas de absorción de los aceites esenciales que fueron a 275 nm para el aceite esencial de tomillo y a 279 nm para el aceite esencial de canela. Tras ello, se realizaron calibrados a distintas concentraciones empleando disoluciones de aceite esencial en acetato de etilo. La capacidad de liberación de los aceites esenciales se evaluó dispersando en acetato de etilo durante 48 horas los diferentes sólidos funcionalizados

con los aceites esenciales. Una vez pasado este tiempo, se filtró y se determinó la absorbancia UV del líquido en el que el aceite esencial había podido ser extraído, centrándose en las longitudes de onda correspondientes de cada aceite. La cantidad de aceite esencial extraído en 48 horas por el acetato de etilo se calculó como la cantidad de aceite esencial en la disolución dividido entre la cantidad de aceite esencial introducido en el material (ecuación 6). Este dato nos da una idea de la capacidad de liberación de los aceites esenciales en los diferentes materiales utilizados.

$$Eficacia\ de\ la\ lixiviación\ (\%) = \frac{mg\ AE\ en\ disolución}{mg\ AE\ introducido} \cdot 100 \quad (6)$$

3.5 Estudios de reducción catalítica

El segundo objetivo de esta investigación es el estudio de la eliminación de cloritos y cloratos en agua mediante la reacción de hidrogenación catalítica. El procedimiento experimental llevado a cabo se describe en este apartado.

3.5.1 Condiciones de reacción

El estudio de la actividad catalítica de los diferentes tipos de catalizadores empleados se realizó con un reactor discontinuo de tanque agitado (RDTA). Este consiste en un reactor de vidrio de 1 L equipado con una varilla agitadora de teflón, tal como se muestra en la figura 8. La agitación es necesaria debido a que la reacción de estudio se trata de una reacción multifásica y, por lo tanto, requiere la presencia, contacto e interacción de varias fases durante toda la reacción^[88]. El RDTA está equipado con un difusor de gases para la introducción del gas reductor.

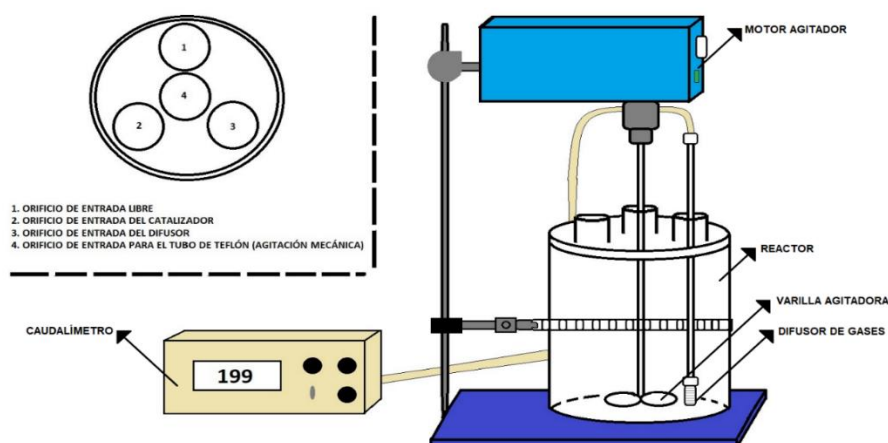


Figura 8. Esquema del sistema del reactor discontinuo de tanque agitado empleado (RDTA).

Los ensayos se realizaron utilizando 600 mL de una disolución de cloratos, o con una mezcla de cloritos y cloratos, con una concentración aproximada de 100 ppm por cada contaminante. Previamente a la reacción de reducción catalítica, la disolución fue hidrogenada durante 2 horas para saturarla de H₂ a flujo constante (normalmente 250 mL·min⁻¹). Tras esto se añadió 1 gramo de catalizador, manteniendo el flujo de agente reductor constante y una agitación de 900 rpm. Todos los ensayos se llevaron a cabo a presión atmosférica y temperatura ambiente.

Con la finalidad de cuantificar la actividad de los catalizadores preparados y poder seguir el avance de las reacciones, se tomaron alícuotas de las mezclas de reacción (aprox. 4mL) a distintos tiempos, mediante una jeringa equipada con un filtro, que posteriormente fueron analizadas. Una vez acabado el ensayo, se recuperó el catalizador mediante filtración a vacío y posterior secado a 100°C durante 12 horas.

3.5.2 Sistema de análisis

Se utilizaron dos sistemas de detección para el análisis de los reactivos y productos. Uno basado en el empleo de técnicas electroquímicas (electrodo selectivo de cloruros) y otro basado en técnicas cromatográficas (cromatografía iónica).

- *Electrodo selectivo de iones (ISE)*

Los electrodos selectivos de iones se basan en la potenciometría y permiten determinar la presencia de un ion determinado en una disolución de forma rápida, directa y no destructiva. En este trabajo se ha utilizado un electrodo combinado de cloruros, donde el electrodo indicador y el electrodo de referencia se combinan en un único sensor. La diferencia de potencial entre las interfases membrana – disolución del ISE es proporcional a la actividad de una determinada especie química, concretamente los cloruros. La concentración del ion a analizar se calcula utilizando la ecuación 7, donde E_{cel} corresponde a la diferencia de potencial entre electrodo de referencia y el electrodo indicador. El calibrado con una disolución patrón de Cl⁻ permite establecer el valor de K, z es la carga del ion, F es la constante de Faraday, R la constante de los gases ideales, T es la temperatura y [X⁻] la concentración de iones cloruro.

$$E_{cel} = K - \frac{RT}{zF} \log[X^-] \quad (7)$$

- *Cromatografía iónica*

La cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia o HPLC de intercambio iónico se conoce como cromatografía iónica. Se trata de un tipo de cromatografía líquida de alta eficacia en la que la retención del analito tiene lugar por atracción electrostática entre los iones de la disolución y la fase estacionaria. Al introducirse la muestra a través del inyector, esta avanza con la fase móvil a través de la columna de intercambio aniónico y cada anión, presente en la muestra, eluye con una velocidad diferente, dependiendo de la afinidad (carga y tamaño del ion) de cada soluto por cada una de las fases. Cada analito eluye del sistema con un tiempo de retención diferente, consiguiéndose así su separación analítica. Una característica que mejora la sensibilidad y el límite de detección de esta técnica es la utilización de un supresor iónico. Este supresor es un intercambiador catiónico intercalado entre la columna analítica y el detector conductimétrico el cual hace que todos los cationes sean intercambiados por protones, consiguiéndose así eliminar la conductividad del eluato al mismo tiempo que se exalta la conductividad debida a los aniones.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo iónico modelo 883 Basic IC Plus de la marca Metrohm, equipado con una columna Metrosp A Supp 5 – 150/4.0 (figura 9). Además, para la realización de los análisis se prepara como eluyente una disolución tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (3.2mM/1mM) y, como regenerante de la columna supresora, una disolución 200 mM de H_2SO_4 .



Figura 9. Cromatógrafo iónico.

Para los análisis, se introducen 2mL de una disolución de la muestra 1:1 con agua Milli-Q de los cuales 20 μL quedan en el loop para ser inyectados en el cromatógrafo. La muestra se inyecta con un flujo de eluyente de 0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y presiones entre 11 – 13 MPa, obteniendo cromatogramas de 17 minutos. Para determinar la concentración de los

analitos fue necesaria la dilución de las muestras debido a que el calibrado de los aniones había sido realizado en el rango de 0 – 50 ppm con patrones certificados.

Con esta técnica se puede determinar la actividad del catalizador y seguir el avance de la reacción. Para ello, se realizaron análisis de la disolución a distintos tiempos. Una vez recogidas las muestras, estas se filtraban para que estuviesen libres de partículas sólidas y se analizaban en el equipo de cromatografía iónica.

4. MATERIALES BIOCIDAS

El primero de los objetivos de este trabajo es el desarrollo de nuevos materiales con características biocidas. En este apartado, se estudia la acción biocida de aceites esenciales impregnados en diferentes materiales frente a los microorganismos causantes de las principales podredumbres en la piel de naranja. Se han preparado los siguientes materiales descritos en la tabla 2 (FAU para la faujasita, CAC para el óxido de silicio, CACLTA para la LTA, CACMCM-22 para la MCM-22, y CS16-21H-C para la arcilla), que se nombran con el siguiente código de caracterización: tipo de material, seguido de la cantidad de aceite esencial (% en peso) y del aceite esencial empleado tomillo (T) o canela (C).

Tabla 2. Origen y estudio en el que se aplican los diferentes materiales funcionalizados con aceites esenciales.

Materiales	Origen	Estudio
FAU	Comercial	<i>In vitro</i>
FAU-40%C		<i>In vitro</i>
FAU-20%C		<i>In vitro</i>
FAU-2%C		<i>In vitro</i>
FAU-40%T		<i>In vitro</i>
FAU-20%T		<i>In vitro/in vivo</i>
FAU-2%T		<i>In vitro</i>
CAC-20%T	UFRGS	<i>In vivo</i>
CACLTA-20%T		<i>In vivo</i>
CACMCM-22-20%T		<i>In vivo</i>
CS16-21H-C-20%T		<i>In vivo</i>

4.1 Caracterización de materiales

En el presente trabajo se ha estudiado el uso zeolitas comerciales, zeolitas sintetizadas a partir de sílice extraída de la cáscara de arroz, sílice de origen natural y arcillas pilareadas, como soportes de aceites esenciales para su aplicación como fungicida, los cuales se han caracterizado por distintas técnicas.

4.1.1 Zeolita FAU

Los primeros ensayos fungicidas se realizaron con un material zeolítico comercial de poro grande, en concreto con una faujasita (FAU). Dentro de este grupo zeolítico se encuentra la zeolita Y, un material microporoso con canales de poro grande que conducen a supercavidades en su interior. La zeolita empleada es de tipo sódico con una relación

Si/Al de 2.4. Para proporcionarle actividad biocida, se funcionalizó con distinta cantidad y tipos de aceites esenciales (2%, 20% y 40% en peso de aceite esencial de tomillo y canela), y se caracterizaron mediante distintas técnicas físico-químicas.

Inicialmente, se realizó un estudio de difracción de rayos X de la faujasita (figura 10), obteniéndose el difractograma característico de esta estructura con picos de difracción a $2\theta = 6.3^\circ$; 10.1° ; 11.8° ; 15.7° ; 20.4° ; 23.7° ; 27.0° y 31.4° [89,90].

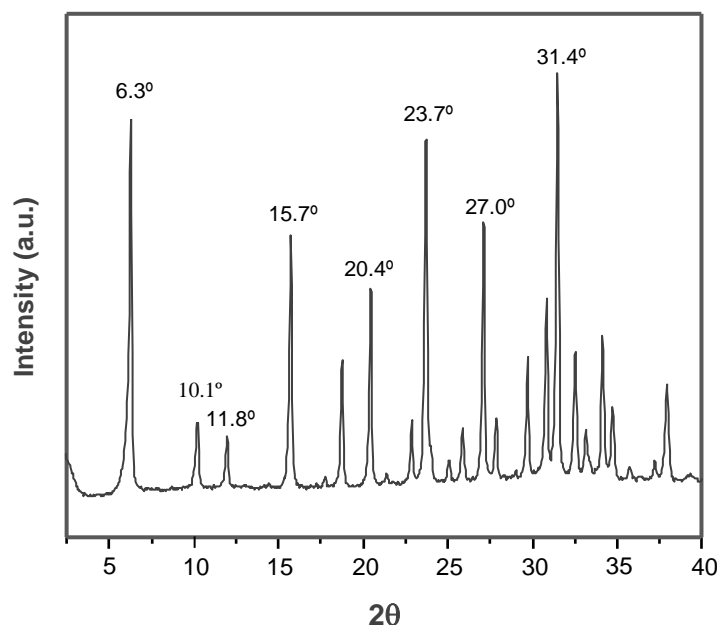


Figura 10. Difractograma de la faujasita (CBV100).

Se determinaron también sus propiedades texturales mediante el estudio de las isoterma de adsorción, obteniendo los valores presentados en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades texturales de la faujasita (CBV100).

Material	$S_{BET}(m^2g^{-1})$	$S_{EXT}(m^2g^{-1})$	$V_{MICRO}(cm^3g^{-1})$	$V_{TP}(cm^3g^{-1})$
FAU	668.9	11.23	0.324	0.381

4.1.2 Sílice y zeolita LTA

Se estudió también la función biocida de materiales basados en aceites esenciales soportados sobre sílice extraída de la cáscara de arroz y sobre zeolita LTA sintetizada a partir de esta sílice de origen natural. Esta zeolita posee una estructura de poros tridimensional con un diámetro de poro menor que el del grupo faujasita. Para dotarles de actividad biocida, se funcionalizaron los diferentes materiales con un 20% en peso de aceite esencial de tomillo, y se caracterizaron mediante distintas técnicas.

En primer lugar, se efectuó el estudio de difracción de rayos X de la zeolita LTA comercial (LTAcóm) y la zeolita LTA sintetizada en la UFRGS (CACLTA), comparándose con el difractograma de la zeolita LTA, extraído de la International Zeolite Association (LTA-IZA). Los resultados aparecen en la figura 11, donde se puede observar la similitud entre los difractogramas de la zeolita comercial y de la sintetizada con sílice extraído de la paja de arroz. Ambas muestran picos característicos a $2\theta = 7.2^\circ$; 10.3° ; 12.6° ; 21.8° ; 24.0° ; 27.2° ; 30.0° y 34.3° , confirmando que la sílice de origen natural podría usarse como fuente alternativa para la síntesis de la zeolitas LTA.

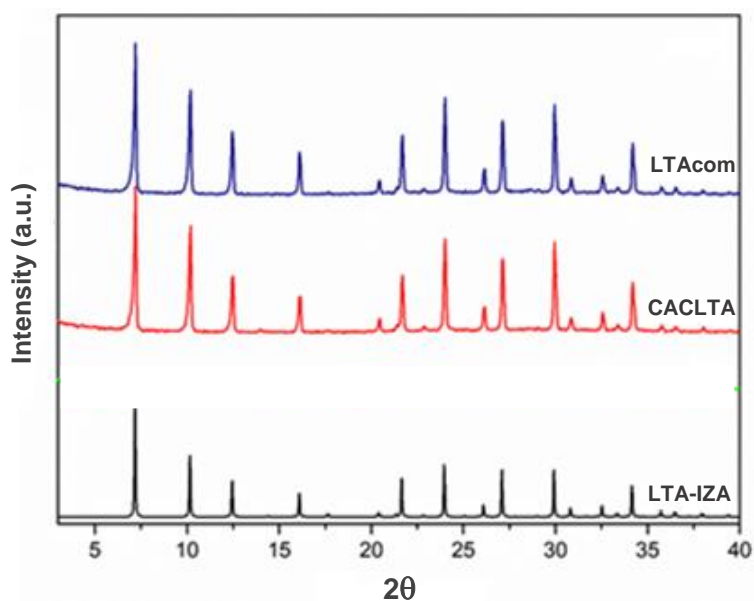


Figura 11. Difractograma de la zeolita LTA comercial (LTAcóm), de la sintetizada a partir de sílice extraída de cáscara de arroz (CACLTA) y difractograma de la LTA proporcionado por la IZA.

También, se caracterizaron las propiedades texturales de la zeolita CACLTA y del óxido de silicio mediante el estudio de las isothermas de adsorción obteniéndose los valores presentados en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades texturales de la zeolita LTA y del SiO₂ preparados en UFRGS.

Material	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	S _{EXT} (m ² g ⁻¹)	V _{MICRO} (cm ³ g ⁻¹)	V _{TP} (cm ³ g ⁻¹)
CAC	88	123	0.009	0.113
CACLTA	3.18	0.507	0.001	0.005

4.1.3 Zeolita MCM-22

Se empleó también la zeolita MCM-22 sintetizada a partir de sílice natural. Este tipo de estructura presenta cavidades de 12MR accesible por ventanas de 10 MR formadas en las

láminas condensadas. Para funcionalizar el material y proporcionarle actividad biocida, se impregnó con un 20% en peso de aceite esencial de tomillo, y se caracterizó mediante distintas técnicas.

En la figura 12 aparecen los difractogramas, antes y después de la calcinación, de la zeolita MCM-22 (CACMCM-22), sintetizada en la UFRGS. En la misma figura estos se comparan con los difractogramas obtenidos en una síntesis tradicional de MCM-22 (MCM-22-Trad).

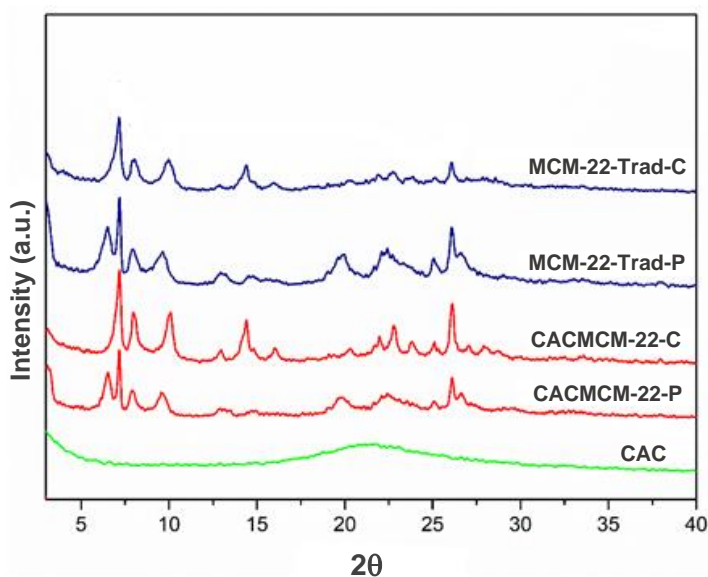


Figura 12. Difractograma de la zeolita MCM-22 sintetizada de forma tradicional (MCM-22-Trad), y sintetizada a partir de sílice extraída de cáscara de arroz (CACMCM-22), siendo P referente a la zeolita antes de calcinación y C referente a la zeolita una vez calcinada.

Los difractogramas antes de la calcinación (P) muestran que la síntesis de la zeolita MCM-

22 a partir del precursor zeolítico derivado de la sílice de cáscara de arroz conducía a la misma estructura que en la síntesis tradicional. Antes de ser calcinadas las muestras aparecen picos de difracción a $2\theta = 6.6^\circ$, correspondiente al plano (002), relativo al apilamiento laminar zeolítico de MWW. Estas láminas se encuentran conectadas por enlaces de hidrógeno entre los diferentes grupos silanol con la presencia de hexametilamina (HMI) interlaminar. También, se detectan picos de difracción intralaminares a $2\theta = 7.1^\circ$ correspondientes al plano (100) y las reflexiones a $2\theta = 25.1^\circ$; 26.2° referidas a los planos (220) y (310), respectivamente. Tras la calcinación (C) de las zeolitas los grupos silanol se condensan y se elimina el template orgánico, observándose la desaparición del pico a $2\theta = 6.6^\circ$, lo que indicaría que la estructura zeolítica está interconectada formando una estructura tridimensional^[91]. En este caso, de nuevo coinciden los DRX de la muestra preparada por el método tradicional y la preparada a partir de cáscara de arroz, lo que indica que el material se ha preparado correctamente.

Por otro lado, se caracterizaron las propiedades texturales de las zeolitas calcinadas mediante el estudio de las isothermas de adsorción y se obtuvieron los valores presentados

en la tabla 5, observando que el material sintetizado a partir de sílice de origen natural posee una mayor área superficial (BET).

Tabla 5. Propiedades texturales de la zeolita MCM-22 sintetizada con sílice de origen natural y con sílice comercial una vez calcinadas.

Material	$S_{BET}(m^2g^{-1})$	$S_{EXT}(m^2g^{-1})$	$V_{MICRO}(cm^3g^{-1})$	$V_{TP}(cm^3g^{-1})$
CACMCM-22	511.1	130	0.150	0.431
MCM-22-Trad	379.6	129.9	0.099	0.347

4.1.4 Arcilla

En este estudio se utilizó la arcilla CS16-21H-C, preparada a partir de la arcilla sódica $CSNa^+$ tras su expansión con $C_{16}TABr$ y posterior pilarización con TEOS. Para funcionalizar este material y proporcionarle actividad biocida, se impregnó con un 20% en peso de aceite esencial de tomillo, y se analizó mediante distintas técnicas de caracterización.

El estudio de caracterización por difracción de rayos X de la arcilla pilareada frente a la arcilla sódica, representado en la figura 13, muestra la desaparición del plano (001) asociado a la expansión, desapareciendo los fenómenos de delaminación y convirtiéndose en un material amorfo con la estructura más probable conocida como “casa de naipes”.

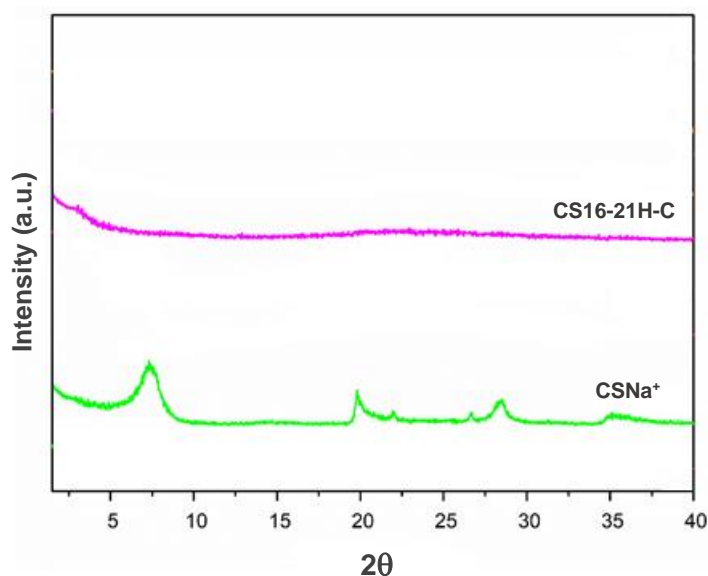


Figura 13. Difractograma de la arcilla modificada CS16-21H-C y la arcilla de partida $CSNa^+$.

Al realizar un análisis textural sobre estos materiales se observó un aumento sustancial en el área superficial (BET) al realizar la expansión y posterior pilarización de la arcilla sódica, incrementándose también la proporción de microporos y mesoporos.

Tabla 6. Propiedades texturales de la arcilla sintetizada (C16-21H-C) y la arcilla sódica precursora (CSNa⁺).

Material	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	S _{EXT} (m ² g ⁻¹)	V _{MICRO} (cm ³ g ⁻¹)	V _{TP} (cm ³ g ⁻¹)
CSNa ⁺	43.8	27.9	0.0	0.084
C16-21h-C	331.1	290.5	0.016	0.617

4.1.5 Aceites esenciales

Una vez analizada la estructura cristalina y las propiedades texturales de los distintos materiales, se realizó un estudio de espectroscopía infrarroja y un análisis termogravimétrico de las muestras impregnadas.

El análisis por espectroscopía infrarroja de las muestras impregnadas con aceites esenciales muestra las bandas asociadas a la zeolita junto a las bandas propias de los aceites esenciales. Así las bandas a 3400-3600 cm⁻¹ son propias de los grupos OH que proceden tanto de los grupos Si-OH de la zeolita como de los grupos R-OH presentes en el aceite esencial de canela. Las bandas en el rango de 980 a 1200 cm⁻¹, también coinciden con vibraciones estructurales de la zeolita por estiramientos asimétricos T-O-T (T = Si o Al) y las bandas en 800 cm⁻¹ equivalen a estiramientos simétricos. Las bandas características del aceite esencial de canela, que aumentan al aumentar el contenido en aceite esencial, son las que aparecen alrededor de 1500 cm⁻¹ características los enlaces C = C en anillos aromáticos, y las bandas a 1220-1260 cm⁻¹ propias de fenoles (Figura 14).

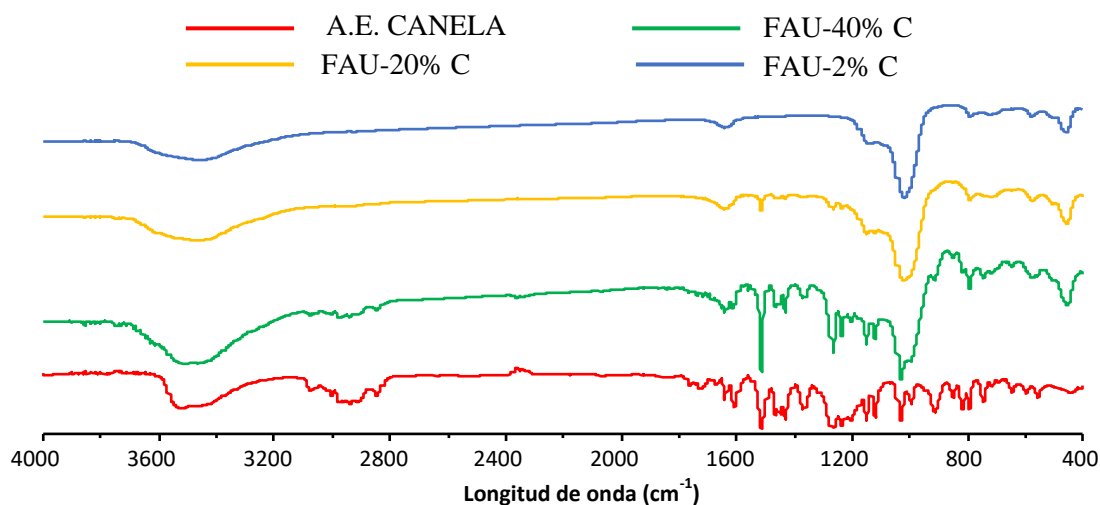


Figura 14. Espectros FTIR del aceite esencial de canela y la zeolita FAU funcionalizada con este aceite esencial.

Igualmente, se realizó el análisis por espectroscopía infrarroja del aceite esencial de tomillo y la zeolita FAU funcionalizada (figura 15). En este estudio, también se observaron las bandas propias de la zeolita junto con las bandas características aceite esencial de tomillo. Las bandas asociadas al aceite esencial de tomillo, que aumentan al aumentar el contenido en aceite esencial, aparecen en el rango de 2900-3000 cm^{-1} y están asociadas a la tensión del enlace C – H en alcanos y las de 1220-1260 cm^{-1} características de fenoles.

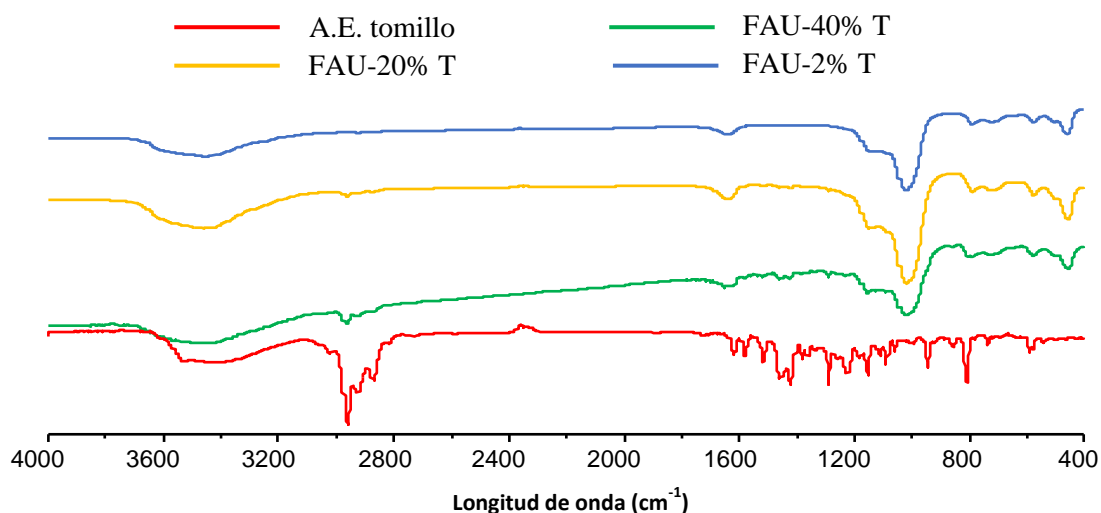


Figura 15. Espectros FTIR del aceite esencial de tomillo y la zeolita FAU funcionalizada con este aceite esencial.

Los análisis termogravimétricos de las faujasitas funcionalizadas con un 20% de aceite esencial de canela y de tomillo reflejaron unos perfiles termogravimétricos diferentes. Como se observó en la figura 16, el material funcionalizado con aceite esencial de canela presentó una pérdida másica de 16.8% entre 40 y 220°C, de 9% entre 220 y 420°C y de 4.2% entre 420 y 590°C, mientras que el material funcionalizado con aceite esencial de

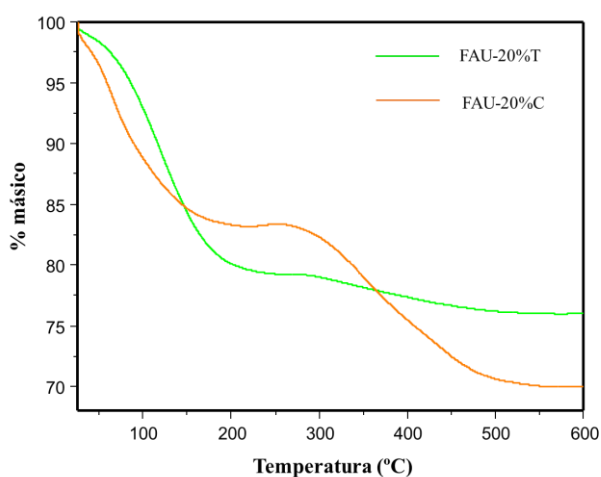


Figura 16. Análisis termogravimétrico de las zeolitas FAU funcionalizadas con un 20% de aceite esencial de tomillo y canela.

tomillo mostró una pérdida másica de 19.6% entre 40 y 270°C y de 3.20% entre 270 y 580°C. Estos resultados se relacionan con la distinta composición química de los aceites

esenciales de canela y tomillo^[92,93], lo que queda de manifiesto en el FTIR, puesto que el aceite esencial de canela está formado principalmente por cinamaldehído en un 72% y por eugenol en un 13%, y estos tienen unas temperaturas de ebullición de aproximadamente 250°C, superiores en más de 100°C a las temperaturas de ebullición de algunos de los compuestos principales del aceite esencial de tomillo que son: timol, p-cimeno, γ -terpineno y carvacrol.

4.2 Estudios fungicidas

Los hongos obtienen nutrientes para su supervivencia a partir de una digestión enzimática externa de compuestos sintetizados por otros organismos^[94]. Es por ello que son imprescindibles en algunos ciclos de descomposición de materia orgánica. Sin embargo, existen también hongos patógenos causantes de la disminución en la calidad y vida útil de productos agroalimentarios^[95-96], siendo necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos para la reducción de estas pérdidas^[97].

4.2.1 Estudio *in vitro*

La evaluación *in vitro* del efecto antifúngico de las muestras preparadas se realizó a partir de nueve tratamientos diferentes y un control, empleando PDA como medio de cultivo, dos aceites esenciales (tomillo y canela) y tres hongos: *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium italicum* (PI) y *Geotrichum citri-aurantii* (GC).

Los primeros estudios se realizaron con la zeolita faujasita comercial impregnada con diferentes aceites esenciales a distintas composiciones en peso. Los diferentes tratamientos aparecen descritos en la tabla 7.

Tabla 7. Diferentes tratamientos realizados *in vitro* para el estudio de la actividad antifúngica.

	Tratamiento	Dosis del material fungicida en el medio	Concentración de aceite esencial en el medio
C	Control	-	-
T1	FAU		-
T2	FAU-40%T		0.4%
T3	FAU-40%C		0.4%
T4	FAU-20%T	1%	0.2%
T5	FAU-20%C		0.2%
T6	FAU-2%T		0.02%
T7	FAU-2%C		0.02%
T8	A.E. TOMILLO	0.4%	0.4%
T9	A.E. CANELA	0.4%	0.4%

En primer lugar, se analizaron las propiedades fungicidas de las zeolitas funcionalizadas con aceite esencial de tomillo y canela, incorporando la misma cantidad de faujasita en el medio de cultivo (PDA). Sin embargo, al tener las zeolitas diferentes contenidos de aceite esencial, la concentración del aceite esencial en el PDA acabó siendo de 0.4%, 0.2% y 0.02%. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 17 y 18, donde se reflejan los porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico para cada hongo tras la adición de la misma concentración de zeolita, pero con diferente contenido de aceite esencial en el PDA.

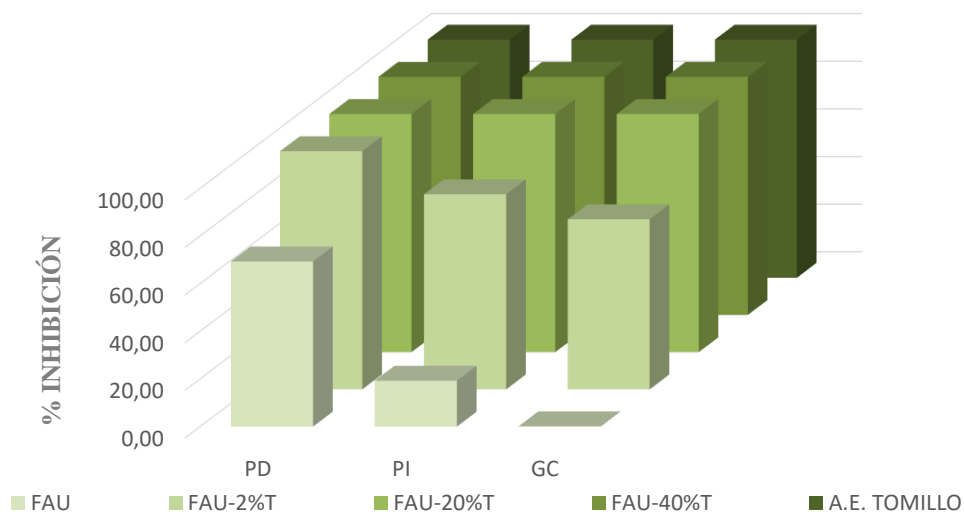


Figura 17. Porcentajes de inhibición del crecimiento de diferentes hongos tras la aplicación de diversos tratamientos con aceite esencial de tomillo (PD y PI 7 días y GC 8 días tras la aplicación del tratamiento).

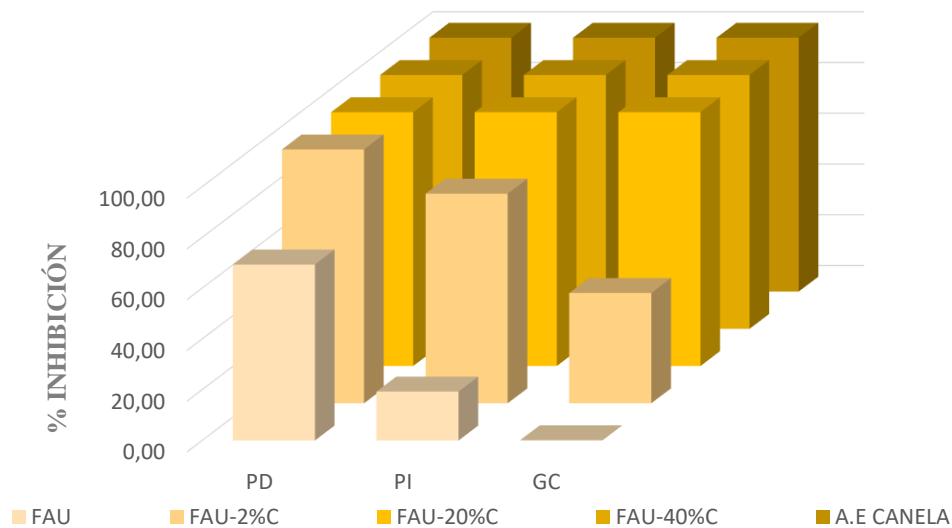


Figura 18. Porcentajes de inhibición del crecimiento de diferentes hongos tras la aplicación de diversos tratamientos con aceite esencial de canela (PD y PI 7 días y GC 8 días tras la aplicación del tratamiento).

Los resultados obtenidos indican que las zeolitas con un contenido en aceite esencial mayor o igual a 20% provocan una inhibición total del crecimiento fúngico, al igual que si se aplica el aceite puro, tanto al usar aceite esencial de tomillo como de canela. Sin embargo, se observa que la zeolita con un menor contenido (2% en peso) inhibe el crecimiento del *Penicillium digitatum*, pero no el del *Penicillium italicum* ni el del *Geotrichum citri-aurantii*. En este caso, se observa diferencia entre los aceites esenciales utilizados siendo la inhibición mayor cuando se utilizó el aceite esencial de tomillo. Cabe destacar que la zeolita FAU sin aceite esencial posee también una cierta actividad fungicida contra PD (70%), PI (20%), aunque no es activa frente a GC. Estos resultados permiten confirmar que la aplicación de aceites esenciales soportados sobre zeolitas es una manera adecuada de prevenir el crecimiento fúngico, con la ventaja de que la zeolita podría posibilitar una liberación controlada en el tiempo del fungicida, al igual que se ha descrito que ocurre cuando se usan zeolitas con cationes Ag^+ intercambiados para el control de hongos^[98]. También, cabe destacar que la incorporación de las zeolitas funcionalizadas en el medio de cultivo no modificó apenas el color ni la textura del medio con respecto al control, sin embargo, la adición directa de aceite esencial modificó las mismas (figura 19), lo que podría dificultar el uso directo de aceite esencial en aplicaciones comerciales en frutos.

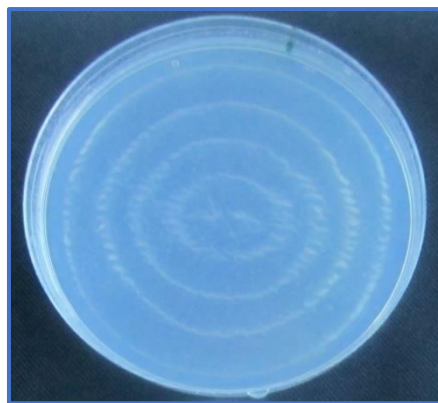


Figura 19. Imagen de la dispersión del aceite esencial de canela en el medio de cultivo.

El análisis de los resultados discutidos reflejaría que contenidos iguales o superiores a 0.2% de aceite esencial en el medio de cultivo son suficientes para el control del crecimiento de todos los hongos estudiados. Contenidos inferiores (0.02%) muestran una mayor eficacia por el hongo *P. digitatum*, disminuyendo esta al actuar frente al *P. italicum* y aún más al actuar frente a *G. citri-aurantii*. Comparando entre los distintos aceites parece que las zeolitas con aceite esencial de tomillo son más eficaces que las zeolitas con aceite esencial de canela.

4.2.2 Estudio *in vivo*

A la vista de los resultados obtenidos al usar las zeolitas funcionalizadas como agente fungicida en el estudio *in vitro*, y vista la mayor efectividad del aceite esencial de tomillo,

se efectuaron un conjunto de experimentos *in vivo* con frutas infectadas con los hongos PD, PI y GC a los que se aplicó una formulación conteniendo el material impregnado con aceite esencial y se analizó la evolución de la fruta tras este tratamiento. Se realizaron seis tratamientos y un control (tabla 8) empleando esta formulación, añadiendo la misma por inmersión del fruto. Como fruto se escogió el de mayor producción y consumo en España, la naranja.

Tabla 8. Diferentes tratamientos realizados *in vivo* para el estudio de la actividad antifúngica.

	Tratamiento	Dosis del material fungicida en la formulación	Concentración de aceite esencial en la formulación
C	Control	-	-
T1	FAU-20% T		0.2%
T2	CAC-20% T		0.2%
T3	CACLTA-20% T	1%	0.2%
T4	CACMCM-22-20% T		0.2%
T5	CS16-21H-H-20% T		0.2%
T6	A.E. TOMILLO	0.2%	0.2%

Se estudió la actividad biocida de la arcilla pilareada (CS16-21H-C), de la faujasita comercial (CBV100) y de diferentes materiales sintetizados a partir de sílice de la cáscara de arroz: sílice puro (CAC), zeolita LTA (CACLTA) y zeolita MWW (CACMCM-22). Estos materiales se funcionalizaron con un 20% en peso de aceite esencial de tomillo y se utilizaron para 5 tratamientos diferentes representando un 1% en peso de la formulación (F10), lo que supuso un 0.2% en peso de aceite esencial en la formulación.

En primer lugar, se analizó el posible efecto fitotóxico de los diferentes tratamientos en el hesperidio de la naranja, observando si la fruta presentaba manchas o cambios de coloración. Tras la aplicación de la formulación se comprobó que ninguno de los tratamientos produjo fitotoxicidad, concluyendo que un 0.2% de aceite esencial en la formulación no produce alteraciones en la piel de la naranja.

Tras esto, se estudió el resultado de la aplicación de estos tratamientos sobre los distintos hongos analizando la cantidad de naranjas infectadas (incidencia), el diámetro de crecimiento del hongo (severidad) y la cantidad de naranjas en las que el patógeno ha esporulado (esporulación). Estos resultados se pueden observar en las figuras 20, 21 y 23 donde aparecen los resultados obtenidos frente a los hongos PD, PI y GC, respectivamente.

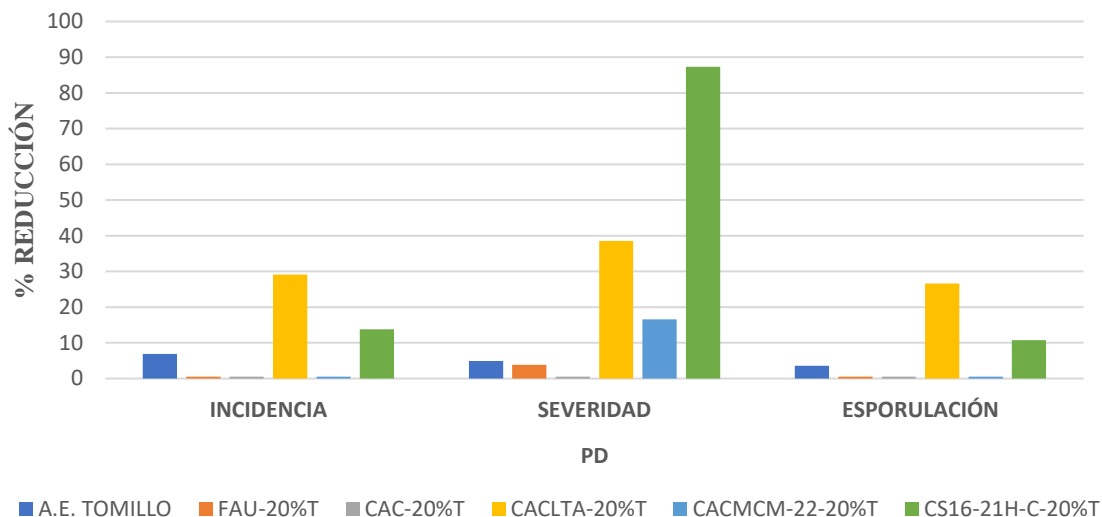


Figura 20. Porcentajes de reducción de la incidencia, severidad y esporulación al aplicar los tratamientos a naranjas infectadas con PD respecto del control.

Los resultados presentados en la figura 20, referente a la infección por *Penicillium digitatum*, muestran que los mejores resultados en cuanto a severidad se obtuvieron utilizando el tratamiento a partir de la arcilla CS16-21H-C, que mostró una inhibición en el crecimiento fúngico de aproximadamente un 90%. Este material también reduce la incidencia y la esporulación, pero con valores más bajos. El siguiente material más activo es la zeolita LTA con resultados positivos en la reducción de la incidencia, severidad y esporulación.

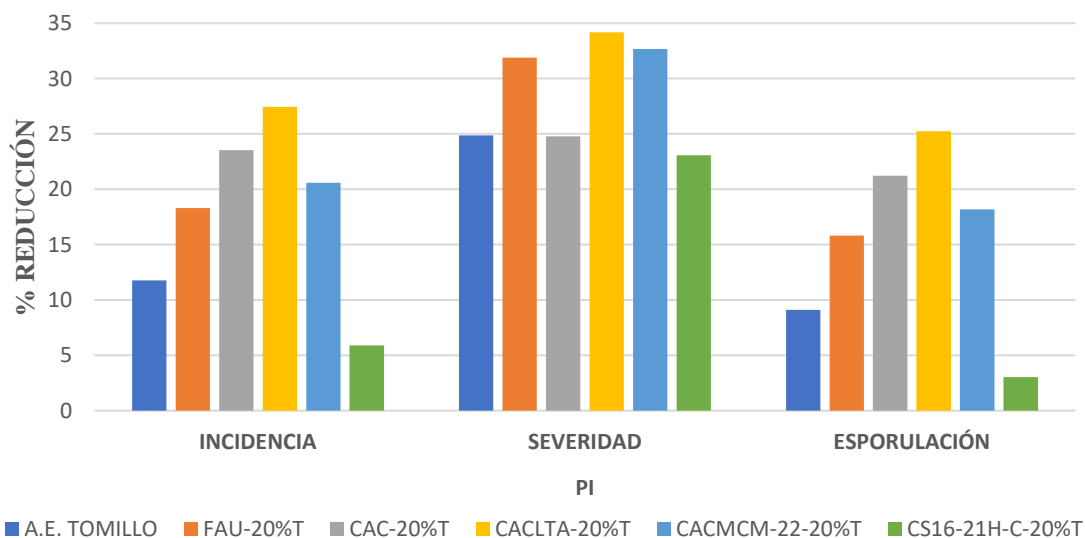


Figura 21. Porcentajes de reducción de la incidencia, severidad y esporulación al aplicar los tratamientos a naranjas infectadas con PI respecto del control.

Se obtuvieron resultados diferentes con el *Penicillium italicum* (figura 21). En este caso, el tratamiento con la zeolita LTA (CACLTA-20%T) es el que parece presentar mayores ventajas con respecto al control para todos los parámetros estudiados, presentando mejores resultados que los obtenidos con el material arcilloso funcionalizado. Las imágenes de las naranjas tratadas a partir de los materiales funcionalizados, con mayor efectividad antifúngica, frente en los hongos PD y PI se pueden observar en la figura 22.

Figura 22. Fotografías de las naranjas tratadas: (1) control (sin tratamiento); (2) tratadas con la arcilla modificada CS16-21H-C-20%T y (3) tratadas con la zeolita CACLTA-20%T.



Así pues, parece que los mejores resultados conjuntos frente a los hongos *Penicillium* en cuanto a incidencia, severidad y esporulación se obtienen con la zeolita CACLTA-20%T. Sin embargo, estos resultados son muy diferentes a los observados en la inhibición del crecimiento fúngico *in vitro* donde se produce una inhibición completa en el crecimiento del hongo, esto puede deberse al innumerable conjunto de variables que aparecen en los estudios *in vivo*, como pueden ser entre otras el estado de la fruta, el tiempo tras su cosecha, etc. Además, también hay que considerar que en este caso al añadir la formulación sobre la piel de la fruta, la cantidad de agente activo sobre la colonia de hongos es mucho menor que lo que puede haber en un estudio *in vitro*.

Por último, se estudió también la infección por *Geotrichum citri-aurantii* (figura 23). En este caso, una vez más la zeolita CACLTA consiguió los mejores resultados en la inhibición del crecimiento fúngico y la formación de esporas por parte del hongo, y aunque no se consiga reducir la incidencia, sí que se inhibe la expansión del *Geotrichum citri-aurantii* (severidad y esporulación).

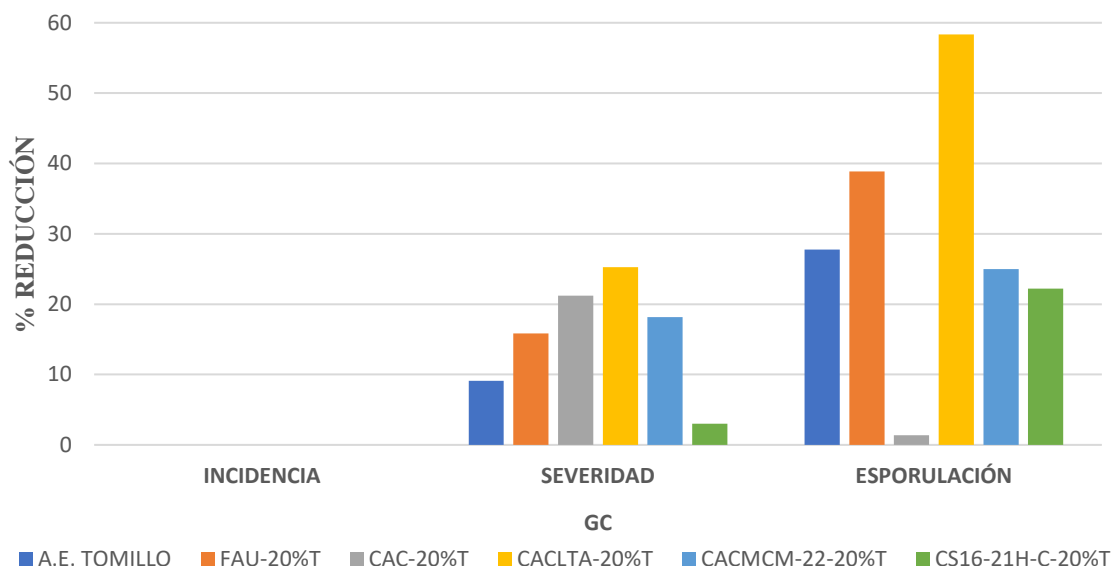


Figura 23. Porcentajes de reducción de la incidencia, severidad y esporulación al aplicar los tratamientos a naranjas infectadas con GC respecto del control.

Los resultados muestran que los tratamientos poscosecha realizados por inmersión en una suspensión acuosa que contiene los fungicidas estudiados son relativamente eficaces frente al control de la podredumbre causada por *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Geotrichum citri-aurantii*, pero sería necesario utilizar una mayor cantidad de material antifúngico para un control más efectivo. Además, se ha comprobado que la actividad biocida depende de la estructura utilizada como soporte.

4.2.3 Estudio de lixiviación

Se llevó a cabo un análisis de la capacidad de liberación de aceites esenciales por parte de los diferentes materiales, realizando ensayos de lixiviación y la técnica de caracterización DR UV-visible, reflejándose los resultados en la tabla 9. En estos, se observa que las zeolitas FAU, CACMCM-22 y CACLTA liberaban en 48 horas aproximadamente la totalidad del aceite esencial impregnado, mientras que en el mismo ensayo la arcilla (CS16-21H-C-20%T) retiene el 65% del aceite esencial de tomillo, lo que indicaría que este material tiene una mayor capacidad de liberación controlada. Así, si comparamos el porcentaje de inhibición del crecimiento a los 4 días y a los 7 días (figura 24) se observa que el aceite esencial puro ha perdido toda su actividad tras 1 semana, que la actividad de zeolita LTA ha disminuido en un 30% del cuarto al séptimo día, pero que la arcilla aumenta su actividad con el tiempo.

Tabla 9. Eficiencia de lixiviación de los diferentes materiales antifúngicos.

Material	Eficiencia de lixiviación (%)
FAU-2%C	100
FAU-20%C	78
FAU-40%C	81
FAU-2%T	100
FAU-20%T	99.5
FAU-40%T	100
CAC-20%T	73.5
CACLTA-20%T	99.2
CACMCM-22-20%T	95.3
CS16-21H-C-20%T	35.8

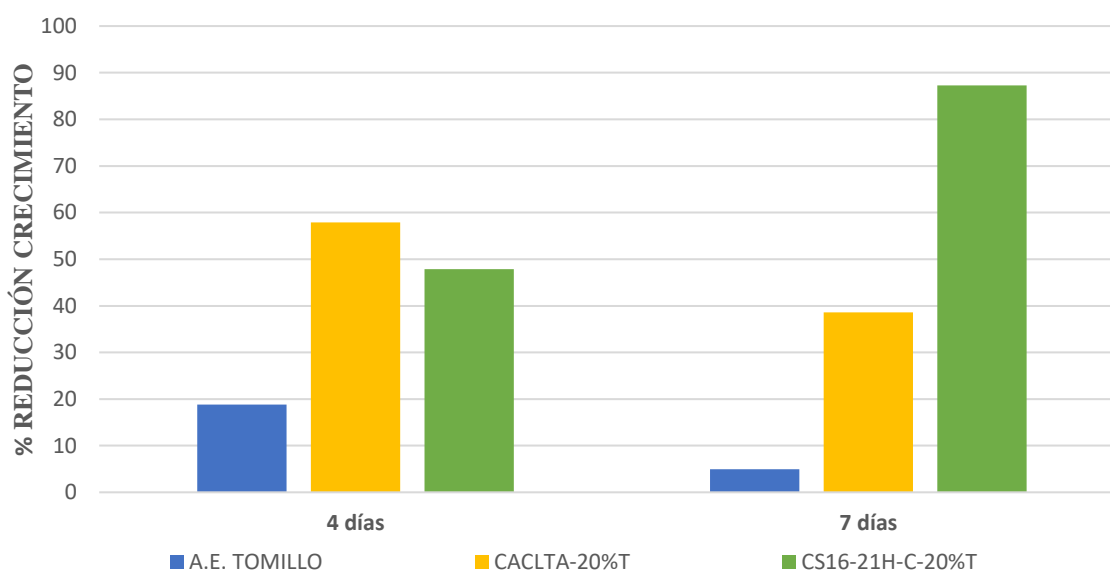


Figura 24. Porcentajes de inhibición del crecimiento al aplicar los tratamientos a naranjas infectadas con PD respecto del control.

Se puede concluir de este estudio que los diferentes materiales funcionalizados con aceites esenciales pueden ser empleados en tratamientos poscosecha, como biocidas aplicándose como recubrimiento sobre la superficie de las naranjas. Se observó que los mejores resultados se obtuvieron cuando los materiales funcionalizados contenían mayor cantidad aceite esencial, aunque otros parámetros, como las características físico-químicas y estructurales de los materiales, también podían afectar a la actividad fungicida y a su eficacia temporal, obteniéndose los resultados más interesantes con la arcilla y con la zeolita LTA funcionalizadas con aceite esencial de tomillo. Estos resultados abren la puerta a distintas investigaciones en las que se modifique la cantidad y el tipo de aceite esencial en los materiales incorporados a la formulación de recubrimiento para así

aumentar la eficiencia fungicida. Estos estudios deben ir en paralelo con los estudios de los recubrimientos aplicados a las frutas, pues en este TFM solo se ha trabajado, en colaboración con el IVIA, con una de las posibles formulaciones usadas para las naranjas.

5. ELIMINACIÓN CATALÍTICA DE CLORITOS Y CLORATOS

El segundo de los objetivos de este trabajo es el desarrollo de catalizadores basados en paladio y platino soportados sobre γ -alúmina para la eliminación de cloritos y cloratos en medio acuoso. En este apartado, se estudia la actividad catalítica de diferentes catalizadores soportados sobre alúmina impregnados con distintas cantidades de metal para la eliminación de cloratos y para la eliminación conjunta de cloritos y cloratos. Los soportes utilizados han sido γ -alúmina comercial o bohemia sobre la que se impregnaban los precursores de paladio y platino, calcinándose posteriormente la muestra.

Tabla 10. Catalizadores preparados y utilizados en la reacción de eliminación catalítica de cloritos y cloratos, para identificar los diferentes catalizadores se emplea inicialmente el porcentaje teórico del metal (M) añadido, y si el soporte ha sido sintetizado a partir de bohemia se añade (CAT) después de la alúmina.

Catalizadores	Reacción de reducción
2.5%Pd/Al ₂ O ₃	Cloratos
5%Pd/Al ₂ O ₃	Cloratos
2.5%Pd/Al ₂ O ₃ (CAT)	Cloritos + cloratos (conjunta)
5%Pd/Al ₂ O ₃ (CAT)	Cloritos + cloratos (conjunta)
2.5%Pt/Al ₂ O ₃	Cloratos
5%Pt/Al ₂ O ₃	Cloratos
2.5%Pt/Al ₂ O ₃ (CAT)	Cloritos + cloratos (conjunta)
5%Pt/Al ₂ O ₃ (CAT)	Cloritos + cloratos (conjunta)
5%Pt/Al ₂ O ₃	Cloritos + cloratos (conjunta)

5.1 Caracterización de catalizadores

La composición química de los catalizadores se determinó mediante ICP-AES. Los resultados aparecen en la figura 25, observando un contenido metálico similar al contenido teórico deseado, lo que indica que el procedimiento de preparación utilizado ha sido adecuado.

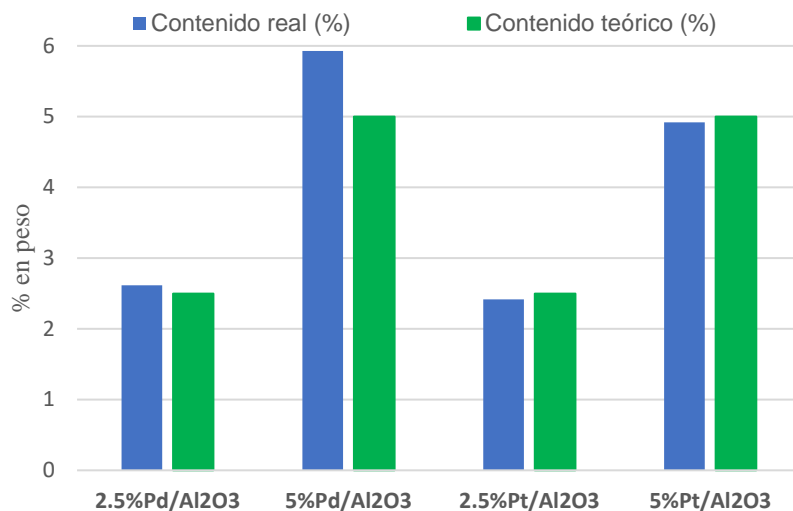


Figura 25. Porcentaje en peso de los catalizadores de Pd y Pt soportados sobre γ -alúmina.

Se llevó a cabo un estudio de difracción de rayos X de los diferentes catalizadores para conocer las fases que se encuentran presentes en el catalizador. En primer lugar, se analizaron los soportes utilizados, apareciendo los picos representativos de la bohemita a $2\theta = 14^\circ; 28.2^\circ; 38.4^\circ; 49.3^\circ; 55.2^\circ; 65^\circ; 67.1^\circ; 72^\circ$ y 86.6° , mientras que para la γ -Al₂O₃ a $2\theta = 37^\circ; 46^\circ, 62^\circ$ y 67° ^[99]. Se observa también que los picos más representativos de la bohemita desaparecen tras la calcinación, produciéndose un cambio de fase a γ -alúmina, tal como se puede observar en la figura 26.

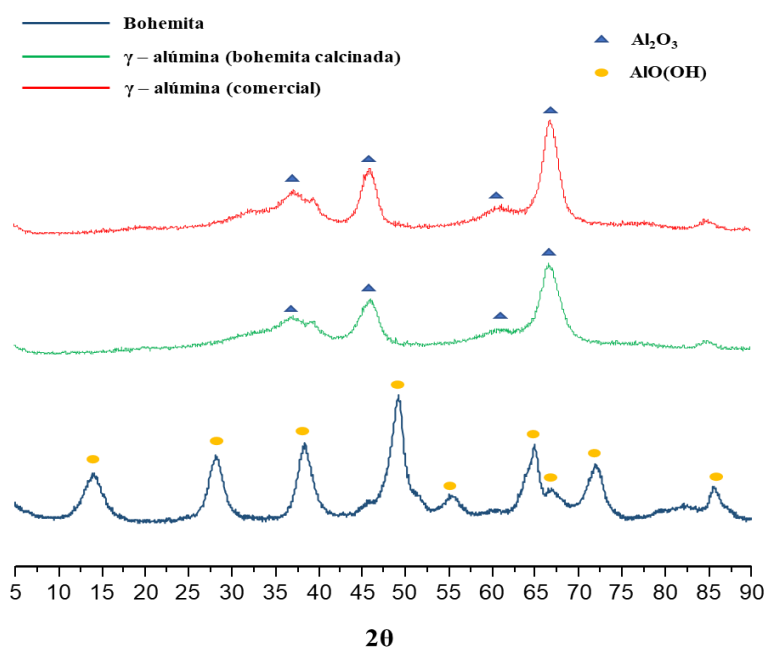


Figura 26. Difractogramas de rayos X de los soportes catalíticos: AlO(OH), γ -Al₂O₃ (comercial) y γ -Al₂O₃ (bohemita calcinada).

Los difractogramas de DRX de los catalizadores calcinados y reducidos con distinto contenido en paladio se muestran en la figura 27. Se observan los picos de la γ -alúmina a $2\theta = 37^\circ; 46^\circ, 62^\circ$ y 67° [99], y los de paladio metálico a $2\theta = 40^\circ; 47^\circ; 68^\circ$ y 82° [100], asociados con la estructura cristalográfica cúbica centrada en las caras (*fcc*) [101]. Los difractogramas de los catalizadores preparados a partir de los distintos soportes son iguales, indicando que tras la calcinación y reducción aparecen las mismas fases en todos ellos.

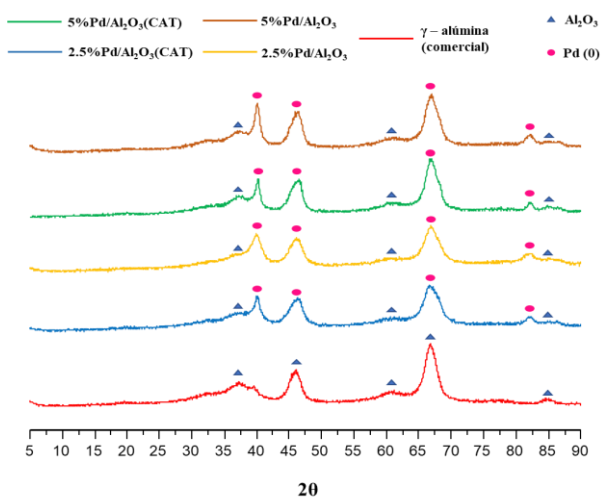


Figura 27. Difractogramas de rayos X de los catalizadores basados en Pd soportado sobre γ -alúmina.

Por otro lado, los difractogramas de los catalizadores de platino soportado sobre alúmina con distinto contenido en platino se muestra en la figura 28. Tal como se observa la fase predominante es la referida a la γ -alúmina, apareciendo además otra fase correspondiente a platino metálico con picos de difracción a $2\theta = 39.7^\circ; 46.2^\circ; 67.5^\circ$ y 81.3° [102]. Como en el caso anterior no hay diferencia entre los difractogramas de los catalizadores preparados a partir de alúmina y los preparados a partir de bohemita.

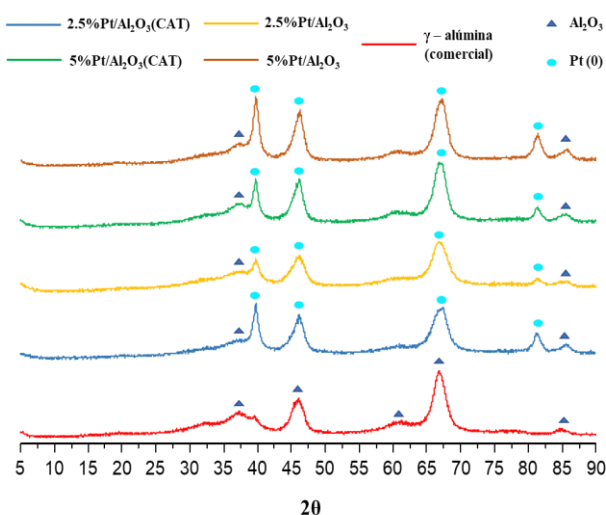


Figura 28. Difractogramas de rayos X de los catalizadores basados en Pt soportado sobre γ -alúmina.

Para el análisis de las propiedades texturales de los catalizadores se realizó un estudio de adsorción-desorción de N_2 . Los resultados se representan en la tabla 11, observándose que en la mayor parte de los casos al añadir el metal disminuye ligeramente el área superficial de los catalizadores. Comparando los distintos catalizadores se observa que los preparados a partir de bohemita (CAC) tienen un área superficial ligeramente mayor que los preparados a partir de γ -alúmina comercial.

Tabla 11. Área superficial (BET) y área externa (t-plot) de los soportes catalíticos utilizados y de los catalizadores de Pd y Pt soportado sobre γ -alúmina.

Muestra	Área de superficie BET (m ² /g)	Área de superficie externa t-plot (m ² /g)
γ -Al ₂ O ₃	213	323
2.5%Pd/Al ₂ O ₃	206	295
5%Pd/Al ₂ O ₃	202	282
2.5%Pt/Al ₂ O ₃	215	324
5%Pt/Al ₂ O ₃	196	294
γ -Al ₂ O ₃ (CAT)	255	360
2.5%Pd/Al ₂ O ₃ (CAT)	218	486
5%Pd/Al ₂ O ₃ (CAT)	219	383
2.5%Pt/Al ₂ O ₃ (CAT)	222	346
5%Pt/Al ₂ O ₃ (CAT)	243	356

Se estudió la dispersión y el tamaño de partícula de los catalizadores con un 5%Pt mediante quimisorción de H₂. Los resultados, aparecen reflejados en la tabla 12, observando que tanto el catalizador preparado con alúmina como el preparado con bohemita tienen una dispersión y un tamaño de partícula parecidos, sin diferencias significativas. En ambos casos la dispersión metálica es muy elevada, lo que se debe al aumento del porcentaje de platino en la muestra.

Tabla 12. Dispersión metálica y tamaño de partícula de los catalizadores 5%Pt/Al₂O₃.

Catalizador	Dispersión metálica (%)	Tamaño de partícula (nm)
5%Pt/Al ₂ O ₃	18	6.3
5%Pt/Al ₂ O ₃ (CAT)	19.2	5.9

5.2 Estudio de la actividad catalítica

Se evaluó la actividad catalítica de los cuatro catalizadores para la reacción de reducción de cloritos y cloratos en agua, empleando H₂ como agente reductor y trabajando a presión atmosférica y temperatura ambiente.

En primer lugar, se realizaron experimentos en blanco sin utilizar ningún catalizador, añadiendo únicamente H₂ como agente reductor en un reactor discontinuo de tanque agitado con 0.6 L de una disolución con 100 ppm de cloritos y 100 ppm de cloratos (figura 29). Este ensayo mostraba conversiones de cloritos próximas al 40% tras 6 horas de reacción, sin embargo, en estas condiciones no se produce la reducción de iones clorato.

Los cloritos que reaccionan son reducidos a cloruro, permitiendo afirmar que no se forman otras especies intermedias.

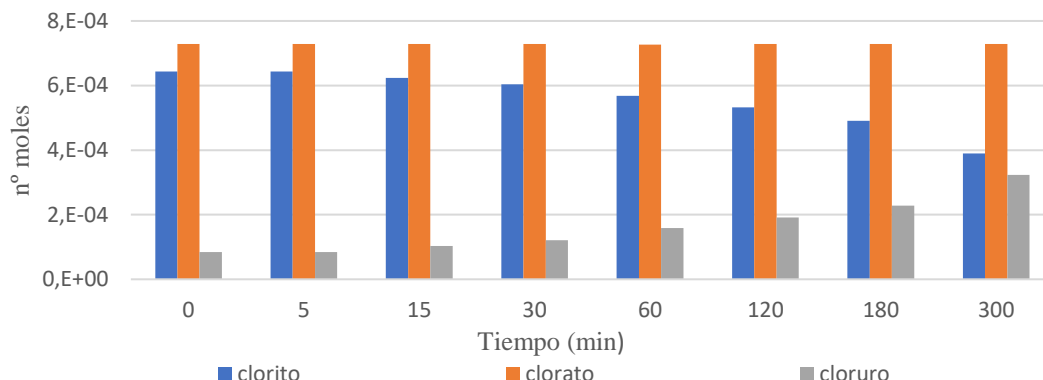


Figura 29. Estudio de la reacción química no catalítica de la reducción de cloritos y cloratos (100 ppm de cloritos + 100 ppm cloratos, 0.6 L, T_{amb} y P_{atm}).

Asimismo, se estudió la posible actividad catalítica del soporte en la reacción, añadiendo alúmina sin metal noble en el medio de reacción. Los resultados obtenidos aparecen representados en la figura 30 y permiten afirmar que la alúmina no es activa en la reacción pues se obtienen los mismos resultados que en la reacción no catalítica. Además, los resultados muestran que el soporte no adsorbe cloritos, cloratos ni cloruros. Por contra, cuando se utilizó el catalizador con paladio se observa una gran actividad para la reducción de cloritos, aunque esta no es significativa para la reducción de clorato. Este hecho permite concluir que las especies de Pd (0) presentes en el catalizador reducido son las especies catalíticamente activas para la reducción de cloritos en fase acuosa a presión y temperatura ambiente de cloritos.

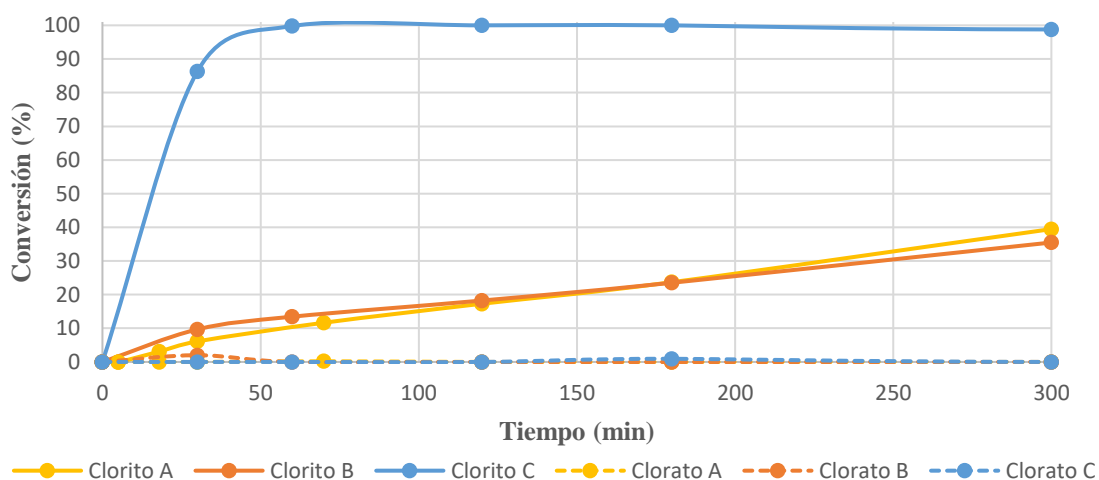


Figura 30. Reacción de reducción de cloritos y cloratos en agua empleando H_2 como agente reductor: (A) sin catalizador, (B) con 0,975g de alúmina y (C) con 1g 2.5%Pd/ Al_2O_3 (CAT) activado (100 ppm de cloritos + 100 ppm cloratos, 0.6 L, T_{amb} y P_{atm}).

5.2.1 Catalizadores con distinto contenido en paladio

La actividad de los catalizadores, con distinto contenido en Pd metálico, se evaluó por un lado en la reacción de reducción de cloratos y, por otro lado, en la reacción de reducción simultánea de cloritos y de cloratos. Los resultados se muestran en las figuras 31 y 32, respectivamente.

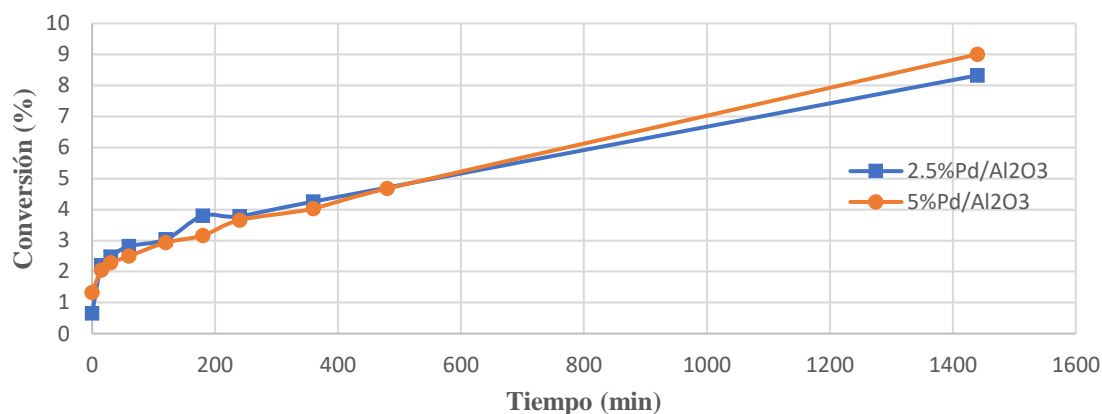


Figura 31. Influencia del contenido en Pd en la reacción de reducción catalizada de cloratos en agua empleando H₂ como agente reductor (1 g catalizador, 100 ppm cloratos, 0.6 L, T_{amb} y P_{atm}).

En primer lugar, se evaluó la actividad de los catalizadores de paladio para la reducción de cloratos cuando esta es la única especie en el medio de reacción. En la figura 31 se muestra como la actividad de los catalizadores con distinto contenido de paladio es muy baja independientemente del contenido de paladio, llegando a producirse únicamente una reducción del 9% tras 24 horas de reacción. Este estudio se realizó también para la reducción simultánea de cloritos y cloratos obteniéndose los resultados que aparecen en la figura 32.

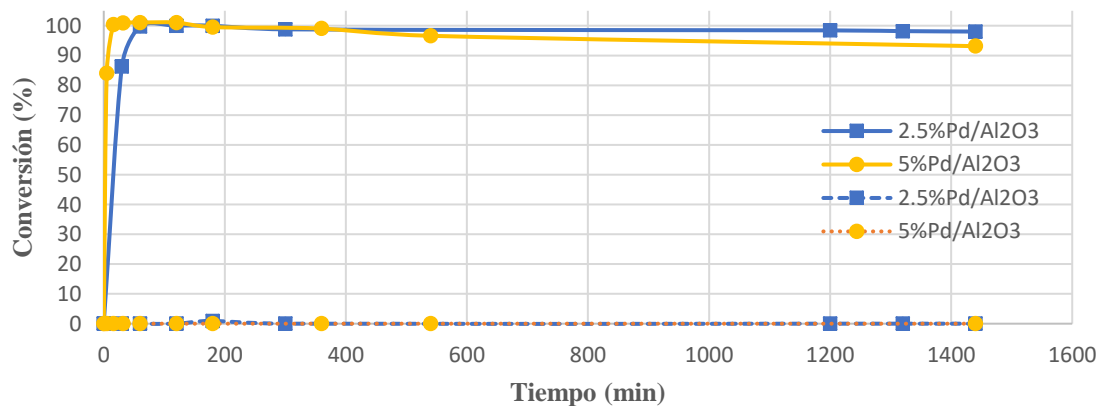


Figura 32. Influencia del contenido en Pd en la reacción de reducción simultánea de cloritos (línea continua) y cloratos (línea discontinua) en agua empleando H₂ como agente reductor (1 g catalizador, 100 ppm cloritos + 100 ppm cloratos, 0.6 L, T_{amb} y P_{atm}).

Los resultados, reflejados en la figura 32, muestran de nuevo una eliminación muy rápida de los iones clorito llegando a conversiones del 80% en menos de 30 minutos, siendo más rápida la reacción con el catalizador con un mayor contenido en paladio. Sin embargo, ninguno de los catalizadores es activo para la eliminación de cloratos, lo que contrasta con los resultados obtenidos en la reacción en la que solo había cloratos. Esto puede ser debido a que, al reducirse los cloritos, se forman especies cloruro (Cl^-) y quedan adsorbidas sobre el paladio del catalizador impidiendo la ya de por sí difícil reacción de reducción de los cloratos (figura 33).

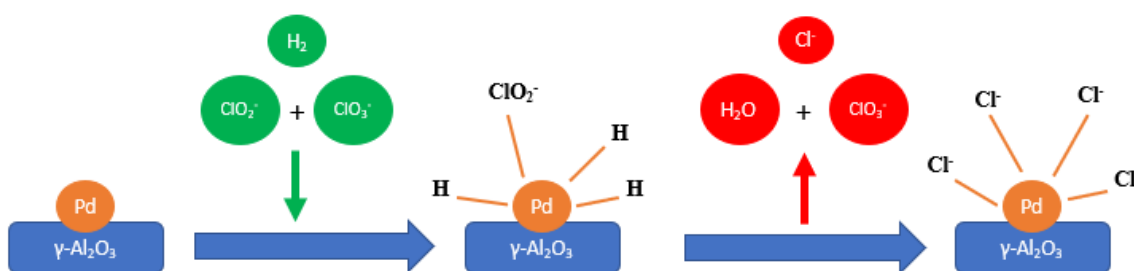


Figura 33. Posible mecanismo en la reducción catalizada de cloritos y cloratos sobre catalizadores de Pd.

5.2.2 Catalizadores con distinto contenido en platino

Una vez finalizado el estudio con los catalizadores basados en paladio se realizó un estudio sobre la actividad de los catalizadores preparados, con distinto contenido en platino. Este estudio se realizó de nuevo en la reacción de reducción de cloratos y en la reacción de reducción simultánea de cloritos y cloratos. Los resultados se muestran en las figuras 34 y 35, respectivamente.

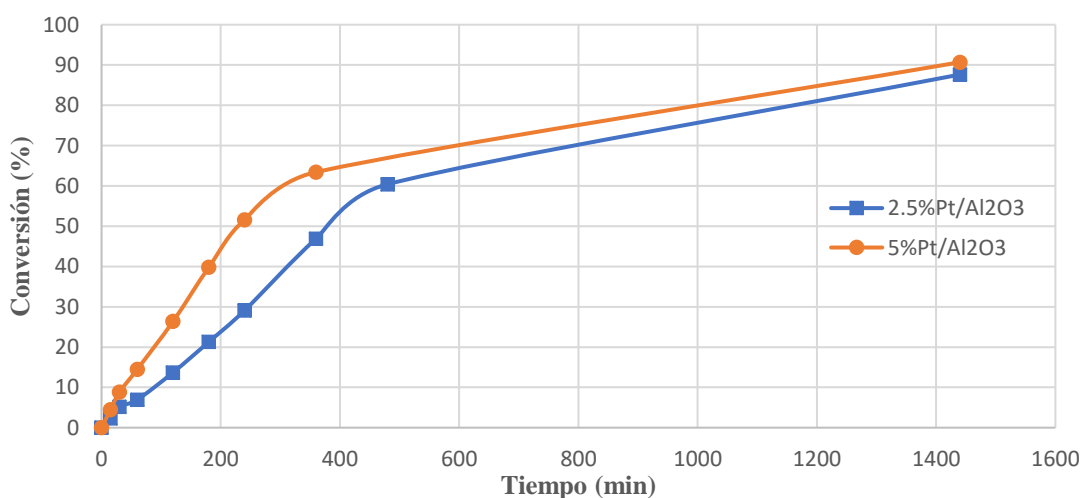


Figura 34. Influencia del contenido en Pt en la reacción de reducción catalítica de cloratos en agua empleando H_2 como agente reductor (1 g catalizador, 100 ppm cloratos, 0.6 L, T_{amb} y P_{atm}).

Inicialmente, se estudió la actividad catalítica de los diversos catalizadores preparados con diferente contenido de platino soportado sobre γ -alúmina comercial. En la figura 34 se observa como al aumentar el contenido en platino se produce un incremento de la velocidad de reacción, obteniendo una conversión del 50% a los 250 minutos para el catalizador con un 5% de platino, y a los 390 minutos para el catalizador con un 2.5% de Pt. No obstante, ambos catalizadores tras 24 horas de reacción consiguen un 90% de eliminación, obteniendo mejores resultados con los catalizadores de platino que con los de paladio. Se determinó en ambos casos la velocidad de la reacción normalizada al contenido de platino, es decir, el TOF (turno over frequency) de ambos catalizadores (ecuación 7).

$$TOF(\text{min}^{-1}) = \frac{\text{moles } ClO_3^- \text{ convertidos}}{\text{moles Pt} * t(\text{min})} \quad (7)$$

Los cálculos muestran que el TOF para ambos catalizadores es muy similar siendo $6,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ para el catalizador con un contenido de 2.5%Pt y $6,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ para el catalizador con un 5%Pt. Este resultado muestra que todos los centros activos del catalizador son equivalentes o igualmente accesibles.

Se evaluó también la actividad catalítica de catalizadores con distinto contenido en Pt en la reducción conjunta de cloritos y cloratos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 35, observándose de nuevo una eliminación muy rápida del ion clorito, llegando a conversiones superiores al 80% en menos de 15 minutos para ambos casos. Estos catalizadores también son activos para la eliminación de cloratos. En este caso, se observa que una vez reducida la totalidad de los cloritos comienzan a reducirse los cloratos, pero se observa claramente que esta reacción no empieza hasta que se han reducido la totalidad de los cloritos del medio. Cabe destacar que el catalizador con menor contenido en platino es menos activo que el catalizador con un contenido de un 5% de Pt, alcanzando una conversión del 43% en 24 horas.

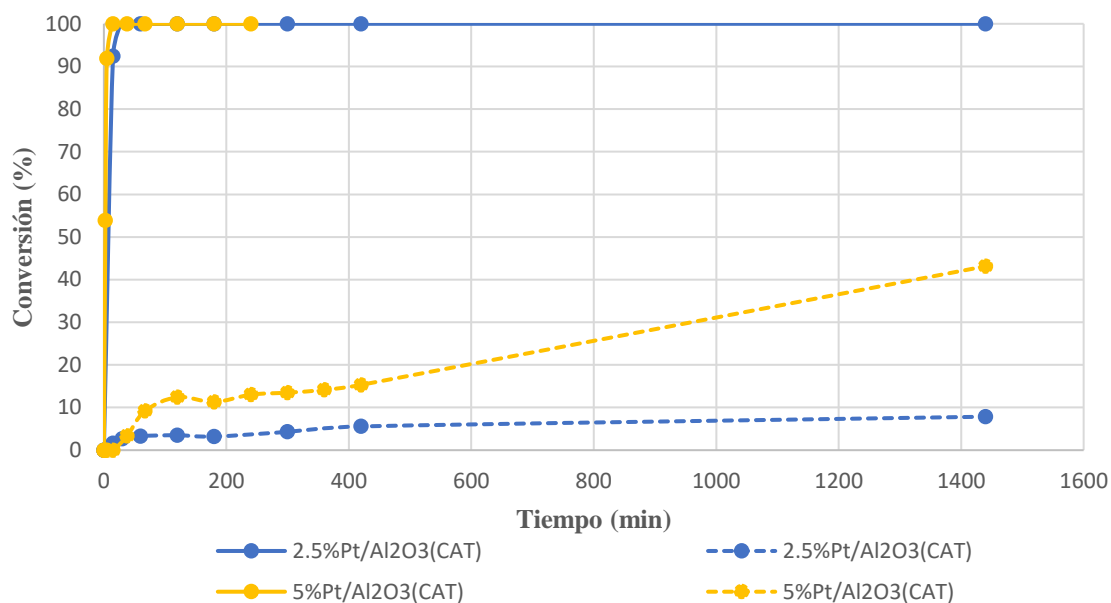


Figura 35. Influencia del contenido en Pt en la reacción de reducción simultánea de cloritos (línea continua) y cloratos (línea discontinua) en agua empleando H₂ como agente reductor (1 g catalizador, 100 ppm cloritos + 100 ppm cloratos, 0.6 L, T_{amb} y P_{atm}).

Comparando los resultados obtenidos, se observa claramente que se obtienen mejores resultados empleando catalizadores de platino metálico que de paladio en las reacciones de reducción de ClO₂⁻ y ClO₃⁻. Los resultados de la figura 35 también parecen mostrar que en presencia de cloritos la reacción de reducción de cloratos se ralentiza si se compara con la reacción en la que solo hay clorato (figura 34). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados de la figura 34 se obtuvieron empleando un catalizador soportado sobre γ -Al₂O₃ comercial, mientras que el otro estaba soportado sobre bohemia. Por ello, se evaluó la actividad del catalizador con un contenido de un 5% en platino soportado sobre γ -Al₂O₃ comercial. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 36, mostrándose de nuevo una eliminación muy rápida del ion clorito, con conversiones del 90% en menos de 15 minutos, pero se observa que empleando el catalizador de platino soportado sobre γ -Al₂O₃ comercial hay una mayor actividad en la eliminación de iones clorato en comparación con el catalizador de platino soportado sobre bohemia. En este caso, se obtiene una conversión para el ion clorato del 90% en 24 horas como ocurría en la reacción en la que solo había clorato. Sin embargo, en presencia de clorito la velocidad de reacción inicial es más baja, siendo necesarios 475 minutos para eliminar el 50% de los cloratos formados frente a los 250 minutos necesarios cuando no hay cloritos en el medio. Esto de nuevo indicaría que primero se reducen los cloritos y, tras ello, se inicia

la reacción de reducción de cloratos que es más lenta probablemente por la presencia de cloruros adsorbidos sobre los centros activos.

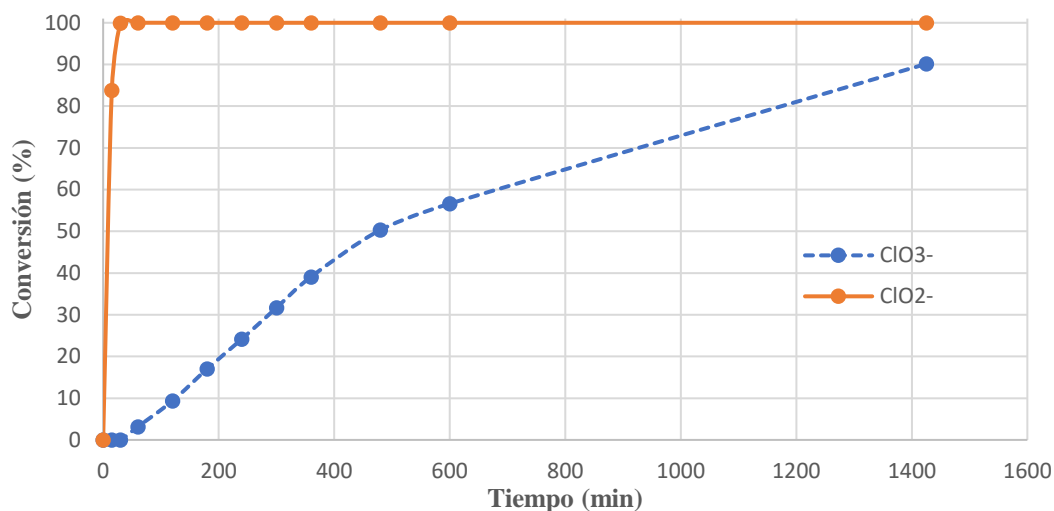


Figura 36. Influencia del soporte en la reacción de reducción simultánea de cloritos (línea continua) y cloratos (línea discontinua) en agua empleando H₂ como agente reductor (1 g catalizador, 100 ppm cloritos + 100 ppm cloratos, 0.6 L, T_{amb} y P_{atm}).

Así pues, se puede concluir que los catalizadores de Pt soportado sobre γ -Al₂O₃ comercial son los catalizadores más activos para la reacción de reducción de cloritos y cloratos, siendo más fácil reducirse la primera especie. Los resultados también indicarían que es el Pt (0), observado por difracción de rayos X, la especie activa en esta reacción. Sin embargo, esta especie aparece tanto en los catalizadores preparados a partir de γ -Al₂O₃ comercial como a partir de bohemita, no mostrando las técnicas de caracterización utilizadas diferencias significativas entre los catalizadores preparados a partir de estos dos soportes. No obstante, cabe esperar que al añadir el precursor metálico sobre la bohemita y calcinar, haya una mayor interacción entre las fases recién formadas, esto es la γ -Al₂O₃ y los óxidos metálicos, que persiste tras la reducción. Esta mayor interacción del metal noble con el soporte puede dificultar la interacción del centro activo con los reactivos, lo que resultaría en una menor actividad, especialmente frente a aquellas especies más difíciles de reducir como son los cloratos.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo final de máster permiten llegar a las siguientes conclusiones.

En relación con el desarrollo de nuevos materiales con propiedades biocidas, se puede concluir que es posible realizar estos materiales mediante la funcionalización de óxidos, de arcillas y de zeolitas con aceites esenciales de canela y tomillo, los cuales muestran una alta eficacia frente al control de los diferentes hongos en estudios *in vitro*. Los resultados en el estudio *in vivo* también muestran una actividad inhibitoria frente a los hongos causantes de las principales podredumbres de los cítricos. Los materiales desarrollados actúan como soportes del aceite esencial, permitiendo una liberación prolongada del aceite en el tiempo. Entre todos los materiales utilizados lo que mejores resultados han dado han sido la zeolita LTA y la arcilla preparada en la UFRGS, aunque sería necesario utilizar una mayor concentración de aceite fungicida que la utilizada en este trabajo, 0.2% en peso de la formulación. Esto se podría conseguir aumentando la cantidad de zeolita o arcilla incorporada o el porcentaje de aceite esencial soportado sobre la zeolita o arcilla.

El segundo de los objetivos es el desarrollo de catalizadores para la eliminación de cloritos y cloratos en agua mediante su reducción catalítica con H₂, pudiéndose concluir que los catalizadores de paladio soportados sobre γ -alúmina son activos en la eliminación de cloritos, pero no son activos para la eliminación de cloratos en aguas. Sin embargo, los catalizadores de platino poseen actividad tanto en la reducción de cloratos como en la reducción simultánea de cloritos y cloratos, siendo el catalizador con un contenido de un 5% de platino y soportado sobre γ -Al₂O₃ comercial el más activo en todos los casos. Se ha comprobado que en estos catalizadores la velocidad de reacción depende del contenido de platino, aumentando esta al incrementar el contenido metálico, y que el clorito se reduce más fácilmente que el clorato. Por otro lado, la caracterización de los catalizadores confirma que las especies activas en la reducción catalítica son el Pd(0) y el Pt(0), aunque el platino es siempre más activo que el paladio. Asimismo, se ha comprobado que la actividad del catalizador depende del soporte utilizado obteniéndose mejores resultados con el catalizador de platino soportado sobre γ -Al₂O₃ comercial.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Vall, L. P. (2011). Control integrado no contaminante de enfermedades de poscosecha (CINCEP): nuevo paradigma para el sector español de los cítricos. *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos*, (406), 173-183.
- [2] Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- [3] Brown, G. E. Citrus diseases-postharvest. *University of Florida: IFAS Indian River Research and Education Center*.
- [4] Holmes, G. J., & Eckert, J. W. (1995). Relative fitness of imazalil-resistant and-sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant disease*, 79(10), 1068-1073.
- [5] Tuset, J. J. (1987). *Podredumbres de los frutos cítricos* (No. SB608. C5 T87).
- [6] Boubaker, H., Saadi, B., Boudyach, E. H., & Benaoumar, A. A. (2009). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to imazalil and thiabendazole in Morocco. *Plant Pathology Journal*, 8(4), 152-158.
- [7] Smilanick, J. L., Michael, I. F., Mansour, M. F., Mackey, B. E., Margosan, D. A., Flores, D., & Weist, C. F. (1997). Improved control of green mold of citrus with imazalil in warm water compared with its use in wax. *Plant disease*, 81(11), 1299-1304.
- [8] Ayazpour, K., Rshanvar, M., & Zakerin, A. (2014, December). Control of *Penicillium* postharvest disease of Valencia sweet orange using rosemary extract and thiabendazol. In *III Asia Pacific Symposium on Postharvest Research, Education and Extension: APS2014 1213* (pp. 615-618).
- [9] Eckert, J. W., & Eaks, I. L. (1989). Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. *The citrus industry*, 5, 179-260.
- [10] Butler, E. E. (1965). Taxonomy, pathogenicity and physiological properties of the fungus causing sour rot of citrus. *Phytopathology*, 55, 1262-1268.
- [11] Hershenthorn, J., Dori, S., & Barash, I. (1992). Association of *Geotrichum citri-aurantii* with citrus groves in Israel. *Phytoparasitica*, 20(1), 31-36.

- [12] Suprapta, D. N., Arai, K., & Iwai, H. (1997). Effects of volatile compounds on arthrospore germination and mycelial growth of *Geotrichum candidum* citrus race. *Mycoscience*, 38(1), 31-35.
- [13] Mercier, J., & Smilanick, J. L. (2005). Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biological Control*, 32(3), 401-407.
- [14] Liu, F., Tu, K., Shao, X., Zhao, Y., Tu, S., Su, J., ... & Zou, X. (2010). Effect of hot air treatment in combination with *Pichia guilliermondii* on postharvest anthracnose rot of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 58(1), 65-71.
- [15] Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., ... & Shachnai, A. (1998). Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological control*, 12(2), 97-101.
- [16] McKay, A. H., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2012). Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. *Plant disease*, 96(2), 235-242.
- [17] EC (European Commission). (2019). EU Pesticides database: Propiconazole. European Commission: Health and Food Safety. Recuperado de <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1770>
- [18] Llorens, A., Lloret, E., Picouet, P. A., Trbojevich, R., & Fernandez, A. (2012). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 24(1), 19-29.
- [19] Vázquez, G. (2014). *Mejora de la eficacia de Penicillium oxalicum como agente de biocontrol en enfermedades de plantas hortícolas* (tesis doctoral). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.
- [20] Goodburn, C., & Wallace, C. A. (2013). The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: a review. *Food Control*, 32(2), 418-427.
- [21] Meireles, A., Giaouris, E., & Simoes, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*, 82, 71-85.

- [22] Lado, J., Luque, E., Blanco, O., & Pérez Faggiani, E. (2011). Evaluación de alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 55-63.
- [23] Stanojevic, D., Comic, L., Stefanovic, O., & Solujic-Sukdolak, S. (2009). Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15(4), 307-11.
- [24] Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., Del Rio, M. A., & Perez-Gago, M. B. (2008). Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hydroxypropyl methylcellulose– lipid edible composite films containing food additives with antifungal properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(23), 11270-11278.
- [25] Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., del Rio, M. A., & Pérez-Gago, M. B. (2011). Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(9), 872-900.
- [26] Singh, G., Singh, O. P., & Maurya, S. (2002). Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian Curcuma species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 45(1-2), 75-81.
- [27] Stupar, M., Grbić, M. L., Džamić, A., Unković, N., Ristić, M., Jelikić, A., & Vukojević, J. (2014). Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *South African Journal of Botany*, 93, 118-124.
- [28] Gomes, M. S., Cardoso, M. D. G., Soares, M. J., Batista, L. R., Machado, S. M., Andrade, M. A., ... & Rodrigues, L. (2014). Use of essential oils of the genus Citrus as biocidal agents. *American Journal of Plan Sciences*, 5, 299-305.
- [29] Avila-Sosa, R., Palou, E., Munguía, M. T. J., Nevárez-Moorillón, G. V., Cruz, A. R. N., & López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International journal of food microbiology*, 153(1-2), 66-72.

- [30] Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(3), 185-193.
- [31] Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of food science*, 68(2), 408-420.
- [32] Vermeiren, L., Devlieghere, F., de Kruijf, N., & Debevere, J. (2000). Development in the active packaging of foods. *Journal of Food Technology in Africa*, 5(1), 6-13.
- [33] Munhuweyi, K., Caleb, O. J., Lennox, C. L., van Reenen, A. J., & Opara, U. L. (2017). In vitro and in vivo antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. *Postharvest biology and technology*, 129, 9-22.
- [34] Daniel, C. K., Lennox, C. L., & Vries, F. A. (2015). In vivo application of garlic extracts in combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. *Postharvest biology and technology*, 99, 88-92.
- [35] Kaya, D. A., Vuluga, Z., Nicolae, C. A., Radovici, C., & Albua, M. G. (2013). Proprietatile a doi zeoliti naturali modificati cu ulei essential de oregano/The properties of two natural zeolites modified with oregano essential oil. *Revista Romana de Materiale*, 43(1), 48.
- [36] Plaza, P., Torres, R., Usall, J., Lamarca, N., & Vinas, I. (2004). Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79(6), 935-940.
- [37] Regnier, T., Combrinck, S., Veldman, W., & Du Plooy, W. (2014). Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citri-aurantii* and other postharvest pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products*, 61, 151-159.
- [38] Cerrillo, J. L. (2019). *Desarrollo de nuevos materiales basados en metales nobles y seminobles para catálisis medioambiental y aplicaciones biocidas* (tesis doctoral). Instituto de Tecnología Química, Valencia, España

- [39] Ordoñez, J. (2011). *Cartilla técnica: Ciclo hidrológico. Contribuyendo al desarrollo de una cultura del agua y la gestión integral de recurso hídrico*. Lima, Perú: Foro Peruano para el Agua.
- [40] FAO (2016). AQUASTAT: Recursos hídricos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado de http://www.fao.org/nr/water/aquastat/water_res/indexesp.stm
- [41] United Nations World Water Assessment Programme Secretariat (WWAP). (2016). Water and jobs.
- [42] Wada, Y., Flörke, M., Hanasaki, N., Eisner, S., Fischer, G., Tramberend, S., ... & Burek, P. (2016). Modeling global water use for the 21st century: the Water Futures and Solutions (WFaS) initiative and its approaches. *Geoscientific Model Development*, 9, 175–222.
- [43] Marchal, V., Dellink, R., Van Vuuren, D., Clapp, C., Chateau, J., Magné, B., & Van Vliet, J. (2011). OECD environmental outlook to 2050. *Organization for Economic Co-operation and Development*, 8, 397-413.
- [44] IEA. (2016). World energy statistics 2016. *International Energy Agency*, Paris, France.
- [45] OMS/UNICEF. (2017). *Progresos en materia de agua potable, saneamiento e higiene: informe de actualización de 2017 y línea de base de los ODS*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [46] WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de la UNESCO). (2019). *Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos 2019: No dejar a nadie atrás*. París, UNESCO.
- [47] WWAP (Programa Mundial de las Naciones Unidas de Evaluación de los Recursos Hídricos)/ONU-Agua. (2018). *Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2018: Soluciones basadas en la naturaleza para la gestión del agua*. París, UNESCO.

- [48] WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). (2017). *The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource*. Paris, UNESCO
- [49] Desarrollo, F. E. Y. (2003). *El agua, un recurso limitado. Sequía, desertificación y otros problemas*. Madrid, Biblioteca Nueva.
- [50] Franks, F. (2007). *Water: a matrix of life*. Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry.
- [51] de Europa, C. (1968). *Carta europea del agua. Comité Nacional Español para "La Carta Europea del Agua", Dirección General de Obras Hidráulicas del Ministerio de Obras Públicas, Ministerio de Información y Turismo*.
- [52] Gallardo, A. (2008). *Máster en Medio Ambiente y Empresa. Módulo 6: Agua, depuración*; Universidad Jaime I: Castellón
- [53] Mendoza, J., Montañés, M., & Palomares, A. (2000). *Ciencia y tecnología del medio ambiente*. España: Universidad Politécnica de Valencia.
- [54] Zandaryaa, S. (2015). *Iniciativa Internacional Sobre la Calidad del Agua*. Francia, París: Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO)
- [55] Couri, D., Abdel-Rahman, M. S., & Bull, R. J. (1982). Toxicological effects of chlorine dioxide, chlorite and chlorate. *Environmental Health Perspectives*, 46, 13-17.
- [56] Amy, G., Bull, R., Craun, G. F., Pegram, R. A., Siddiqui, M., & World Health Organization. (2000). *Environmental Health Criteria 216: Disinfectants and disinfectant by-products*. Ginebra, Suiza.
- [57] Gordon, G., Kieffer, R. G., & Rosenblatt, D. H. (1972). The chemistry of chlorine dioxide. *Progress in inorganic chemistry*, 15, 201-286.
- [58] Stevens, A. A. (1982). Reaction products of chlorine dioxide. *Environmental Health Perspectives*, 46, 101-110.
- [59] NAS (1987). *Drinking water and health*. Vol. 7. Washington, DC, National Academy of Sciences, National Academy Press.

- [60] Vanwijk, D. J., & Hutchinson, T. H. (1995). The ecotoxicity of chlorate to aquatic organisms: a critical review. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 32(3), 244-253.
- [61] Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., & Heckelman, P. E. (1989). *The merck index* (Vol. 11, pp. 2330-2331). Rahway, NJ: Merck.
- [62] Meister, R. T., Zilenziger, G. T., Sine, A. W., Smith, C., Miller, G. B., & WJ Schwaller, G. F. (1989). *Farm chemicals handbook 1989* (No. C015. 003). Meister Publishing Co.
- [63] Lubbers, J. R., Chauhan, S., & Bianchine, J. R. (1981). Controlled clinical evaluations of chlorine dioxide, chlorite and chlorate in man. *Fundamental and applied Toxicology*, 1(4), 334-338.
- [64] IARC. (1991). Chlorinated drinking-water; chlorination by-products; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds. *International Agency of Research on Cancer (IARC): Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 52.
- [65] Heffernan, W. P., Guion, C., & Bull, R. J. (1979). Oxidative damage to the erythrocyte induced by sodium chlorite, in vivo. *Journal of environmental pathology and toxicology*, 2(6), 1487-1499.
- [66] Harrington, R. M., Romano, R. R., Gates, D., & Ridgway, P. (1995). Subchronic toxicity of sodium chlorite in the rat. *Journal of the American College of Toxicology*, 14(1), 21-33.
- [67] WHO. (2017). *Guidelines for drinking-water quality: 4th edition incorporating the 1st addendum*. Ginebra, Suiza: World Health Organization.
- [68] Gordon, G., Sloopmaekers, B., Tachiyashiki, S., & Wood III, D. W. (1990). Minimizing chlorite ion and chlorate ion in water treated with chlorine dioxide. *Journal-American Water Works Association*, 82(4), 160-165.
- [69] Sorlini, S., Biasibetti, M., Gialdini, F. & Collivignarelli, M. C. (2015). How can drinking water treatments influence chlorine dioxide consumption and by-product formation in final disinfection? *Water Supply*, 16(2), 333-346.

- [70] Yang, G., Zhang, Y., Liu, Y., Pei, R., Lv, Y., & Liu, M. (2019). Reductive Cellulose Aerogel as an Efficient Adsorbent for ClO₃-in Drinking Water. *BioResources*, 14(2), 3668-3687.
- [71] Gonce, N., & Voudrias, E. A. (1994). Removal of chlorite and chlorate ions from water using granular activated carbon. *Water research*, 28(5), 1059-1069.
- [72] Ding, L., Zhu, Y., Jin, X., Ma, J., Zhang, X., & van der Hoek, J. P. (2017). Removal of chlorite from aqueous solution by MIEX resin. *Desalination and Water Treatment*, 77, 264-273.
- [73] Logan, B. E. (1998). A review of chlorate-and perchlorate-respiring microorganisms. *Bioremediation Journal*, 2(2), 69-79.
- [74] Cosson, H., & Ernst, W. R. (1994). Photodecomposition of chlorine dioxide and sodium chlorite in aqueous solution by irradiation with ultraviolet light. *Industrial & engineering chemistry research*, 33(6), 1468-1475.
- [75] Narkis, N., & Katz-Stoller, A. (2002) Back to pre-desinfection of highly polluted waters. *Water Supply*, 2(3), 219-226.
- [76] Westerhoff, P. (2003). Reduction of nitrate, bromate, and chlorate by zero valent iron (Fe⁰). *Journal of Environmental Engineering*, 129(1), 10-16.
- [77] Cao, J., Elliott, D., & Zhang, W. X. (2005). Perchlorate reduction by nanoscale iron particles. *Journal of Nanoparticle Research*, 7(4-5), 499-506.
- [78] Saberi, A. (2012). Faraldos, M., & Goberna, C. (Eds.). (2011). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- [79] Lifshin, E. (1999). *X-ray Characterization of Materials* (Vol. 38). E. Lifshin (Ed.). New York: Wiley.
- [80] Brunauer, S., Emmett, P. H., & Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American chemical society*, 60(2), 309-319.
- [81] Anderson, J. R., & Pratt, K. C. (1985). *Introduction to characterization and testing of catalysts*. Sydney, Australia: Academic Press.
- [82] Anderson, J. R. (1975). *Structure of metallic catalysts*. New York: Academic Press.

- [83] Faraldos, M., & Goberna, C. (2011). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. Madrid, España: Editorial CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).
- [84] Burriel, F., Lucena, F., Arribas, S., Hernández, J. (1985). *Química analítica cualitativa*. Madrid, España: Editorial Paraninfo S.A.
- [85] Little, L. H. (1966). *Infrared spectra of adsorbed species*. Academic Press.
- [86] Fagundes, C., Pérez-Gago, M. B., Monteiro, A. R., & Palou, L. (2013). Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. *International journal of food microbiology*, 166(3), 391-398.
- [87] Karaca, H., Pérez-Gago, M. B., Taberner, V., & Palou, L. (2014). Evaluating food additives as antifungal agents against *Monilinia fructicola* in vitro and in hydroxypropyl methylcellulose–lipid composite edible coatings for plums. *International journal of food microbiology*, 179, 72-79.
- [88] Levenspiel, O. (1985). *El omnilibro de los reactores químicos*. Madrid, España: Editorial Reverté.
- [89] de Peña, Y. P., & Rondón, W. (2013). Linde type a zeolite and type Y faujasite as a solid-phase for lead, cadmium, nickel and cobalt preconcentration and determination using a flow injection system coupled to flame atomic absorption spectrometry. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4(08), 387.
- [90] Said, A., Nouali, H., Limousy, L., Dutournié, P., Josien, L., Toufaily, J., ... & Daou, T. J. (2016). Synthesis of mono-and bi-layer zeolite films on alumina substrates. *Comptes Rendus Chimie*, 19(4), 486-495.
- [91] Cambor, M. A., Corma, A., Díaz-Cabañas, M. J., & Baerlocher, C. (1998). Synthesis and structural characterization of MWW type zeolite ITQ-1, the pure silica analog of MCM-22 and SSZ-25. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(1), 44-51.
- [92] Sánchez, L. (2013). *Determinación de compuestos funcionales en Canela (Cinnamomum zeylanicum)* (Tesis de grado). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México, D.F.

- [93] Marqués, M. (2015). *Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica* (Tesis de grado). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Valencia.
- [94] Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. M. (1996). *Introductory mycology*. New York: John Wiley & Sons.
- [95] Chander, J., Stchigel, A. M., Alastruey-Izquierdo, A., Jayant, M., Bala, K., Rani, H., ... & Monzon, A. (2015). Fungal necrotizing fasciitis, an emerging infectious disease caused by *Apophysomyces* (Mucorales). *Revista iberoamericana de micología*, 32(2), 93-98.
- [96] Tormo-Molina, R., Gonzalo-Garijo, M. A., Fernández-Rodríguez, S., & Silva-Palacios, I. (2012). Monitoring the occurrence of indoor fungi in a hospital. *Revista iberoamericana de micología*, 29(4), 227-234.
- [97] Sarrocco, S., & Vannacci, G. (2018). Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review. *Crop protection*, 110, 160-170.
- [98] Chiericatti, C., Basílico, J. C., Basílico, M. L. Z., & Zamaro, J. M. (2014). Antifungal activity of silver ions exchanged in mordenite. *Microporous and Mesoporous Materials*, 188, 118-125.
- [99] Kouachi, K., Lafaye, G., Pronier, S., Bennini, L., & Menad, S. (2014). Mo/ γ -Al₂O₃ catalysts for the Biginelli reaction. Effect of Mo loading. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 395, 210-216.
- [100] Yang, S., Dong, J., Yao, Z., Shen, C., Shi, X., Tian, Y., ... & Zhang, X. (2014). One-pot synthesis of graphene-supported monodisperse Pd nanoparticles as catalyst for formic acid electro-oxidation. *Scientific reports*, 4, 4501.
- [101] Chen, H., Xu, Z., Wan, H., Zheng, J., Yin, D., & Zheng, S. (2010). Aqueous bromate reduction by catalytic hydrogenation over Pd/Al₂O₃ catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 96(3-4), 307-313.
- [102] Swanson, H.E., Tatge, E. (1953). Standard X-ray Diffraction Powder Patterns. *National Bureau of Standards* (U.S.): Circular, 539, 1, 31.