

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA
Departamento de Ingeniería Textil y Papelera



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALENCIA

**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS BASADAS EN LA INTEGRACIÓN DE
PROCESOS FOTOQUÍMICOS SOLARES CON OTRAS TÉCNICAS AVANZADAS
PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES COMPLEJAS**

TESIS DOCTORAL

Autora:

Sara García Ballesteros

Directores:

Ana María Amat Payà (U.P.V.)

Antonio Arques Sanz (U.P.V.)

Diciembre 2017

“Nada en la vida se debe temer, sólo se
debe comprender. Ahora es el momento
de entender más para que podamos temer
menos”

Marie Curie

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Aguas residuales industriales	19
1.1.1. Aguas residuales de la industria alimentaria.....	21
1.2. Generalidades sobre la industria del corcho y sus aguas residuales.....	25
1.2.1. Propiedades del corcho	25
1.2.2. La industria del corcho	26
1.3. Tratamiento de aguas residuales industriales: Procesos de oxidación avanzada	31
1.3.1. Fotólisis con radiación UV	33
1.3.2. Ozonización	34
1.3.3. Ozono combinado con radiación.....	37
1.3.4. Fenton.....	37
1.3.5. Foto-Fenton	39
1.3.6. Proceso foto-Fenton en condiciones cercanas a la neutralidad	40
1.4. Sustancias tipo húmicas (STH)	47
1.4.1. Propiedades de las sustancias húmicas.....	47
1.4.2. Aislamiento de sustancias tipo húmicas.....	49
1.4.3. Caracterización de sustancias tipo húmicas.....	51
1.4.4. Aplicaciones de las Sustancias húmicas	52
1.4.5. Sustancias tipo-húmicas aisladas a partir de residuos sólidos urbanos para aplicación de proceso foto-Fenton en condiciones cercanas a la neutralidad	54
1.5. La industria olivarera y los residuos generados	57
1.5.1. Proceso productivo del aceite de oliva	57
2. OBJETIVOS	61
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1. Contaminantes y reactivos	67
3.1.1. Contaminantes	67

3.1.2. Reactivos.....	68
3.2. Reactores y fuentes de irradiación	70
3.2.1. Simulador solar	70
3.2.2. Fotorreactor solar CPC	70
3.2.3. Reactor ozono.....	72
3.3. Condiciones de ensayo	74
3.3.1. Ensayos en simulador solar	74
3.3.2. Ensayos en planta piloto.....	74
3.3.3. Ensayos con ozono	75
3.3.4. Aplicación de sustancia tipo húmicas en proceso foto-Fenton	76
3.3.5. Proceso de extracción de Sustancias Tipo Húmicas (STH)	76
3.4. Técnicas analíticas y equipos	80
3.4.1. Medida del Carbono Orgánico disuelto (COD)	80
3.4.2. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC).....	81
3.4.3. Medida de la fluorescencia	82
3.4.4. Medida del espectro UV-Visible	83
3.4.5. Medida del hierro en disolución.....	83
3.4.6. Medida del peróxido de hidrógeno	84
3.4.7. pH-metro- conductímetro	84
3.4.8. Cromatografía de exclusión por tamaños	85
3.4.9. Cálculo porcentaje de humedad, sólidos volátiles y sólidos totales.....	87
3.4.10. Resonancia Paramagnética electrónica (EPR)	87
3.4.11. Termogravimetría (TGA).....	88
3.4.12. Dispersión de luz dinámica (DLS).....	89
3.5. Ensayos de toxicidad	90
3.5.1. Bioensayos con el alga Pseudokirchneriella Subcapitata.....	90
3.5.2. Bioensayos con el microcrustáceo Daphnia magna	91
3.5.3. Ensayos con levaduras recombinantes: RYA (Recombinante Yeats Assad) .	92
3.6. Métodos matemáticos y estadísticos	95

3.6.1. Diseño experimental y análisis de superficies de respuesta.....	95
3.6.2. Análisis estadísticos de los bioensayos de toxicidad.....	97
3.6.3. Análisis de matrices de excitación emisión de fluorescencia (EEMs) mediante análisis de factores paralelos (PARAFAC).....	97
3.6.4. Cálculo de la constante de complejación (adaptación del modelo de Ryan y Weber).....	103
4. RESULTADOS Y DISCUSION	107
4.1. Tratamiento de contaminantes representativos de la industria alimentaria mediante fotocátalisis solar (proceso foto-Fenton)	109
4.1.1. Introducción	109
4.1.2. Experimento en simulador solar	111
4.1.3. Experimentos en planta piloto	118
4.1.4. Ensayos de toxicidad	120
4.1.5. Medidas de fluorescencia.....	122
4.2. Tratamiento de contaminantes representativos de la industria alimentaria mediante Ozono y combinación ozono- luz UVA/VIS	125
4.2.1. Introducción	125
4.2.2. Diseño de experimento	126
4.2.3. Tratamiento mediante O ₃ y combinación O ₃ /UVA-VIS	127
4.2.4. Ensayos de toxicidad	138
4.2.5. Medidas de fluorescencia.....	139
4.3. Aplicación de sustancias tipo Húmicas en proceso foto-Fenton	144
4.3.1. Introducción	144
4.3.2. Desactivación de la fluorescencia de las sustancias tipo húmicas en presencia de Fe(III) a diferentes pHs	146
4.3.3. Estudio mediante fluorescencia (EEM-PARAFAC) del empleo de sustancias tipo húmicas obtenidas a partir de residuos sólidos urbanos como auxiliares en proceso foto-Fenton	151

4.4. Valorización de residuos de la producción del aceite de oliva: obtención de sustancias tipo húmicas para su empleo en proceso foto-Fenton.	155
4.4.1. Introducción	155
4.4.2. Extracción y caracterización de las sustancias tipo húmicas (STH).....	155
4.4.3. Actividad fotocatalítica de las STH	160
4.4.4. Generación de especies reactivas	162
4.5. Desarrollo y aplicación de herramientas informáticas para el tratamiento de señales complejas (EEMs)	165
4.5.1. Introducción	165
4.5.2. La aplicación EEMlab	165
4.5.3. El set de datos de la aplicación EEMlab	169
5. CONCLUSIONES.....	175
6. BIBLIOGRAFÍA	179
7. PUBLICACIONES	205

AGRADECIMIENTOS

En la presente memoria de tesis doctoral se resumen cuatro años de trabajo el cual ha sido posible gracias al esfuerzo y al apoyo que he recibido por parte de numerosas personas. En estas líneas me gustaría expresar mi gratitud a todas y cada una de ellas.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores la Dra. Ana María Amat Payá y el Dr. Antonio Arques Sanz, por haberme dado la oportunidad de cumplir uno de mis sueños, por haber confiado en mí, por los conocimientos transmitidos y la ayuda diaria. Gracias por vuestra calidad tanto profesional como personal.

Al Departamento de Ingeniería Textil y Papelera y la Escuela Politécnica Superior de Alcoy, al departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València, al INIFTA-CONICET-UNLP de la Plata (Argentina) y al departamento de química analítica de la Università degli studi di Torino (Italia) por permitirme realizar mis trabajos de investigación en sus instalaciones.

Quiero agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad la concesión de la beca FPI asociada a un proyecto del Plan Nacional de I+D+i (BES-2013-066201) titulado “Desarrollo de nuevas estrategias basadas en la integración de procesos fotoquímicos solares con otras técnicas avanzadas para el tratamiento de aguas residuales complejas (AQUAFOTOX)”, dentro del cual se encuadra parte del trabajo recogido en esta memoria.

A la Unión Europea por la financiación aportada para la realización de las estancias internacionales.

A todos mis compañeros de Grupo de Procesos de Oxidación Avanzada por su apoyo y colaboración: Rafael Vicente, Margarita Mora, Pau Mico, Alicia Domenech, Lucas Santos Juanes y Rosa Vercher.

A mis compañeros del laboratorio: Juan Gomis y Julio Sanz, que tanto me ayudaron en el comienzo. A Paula García que llegó en el momento justo, sin ti nada hubiera sido igual, sinceramente gracias. A los que en algún momento nos acompañaron, con especial

cariño a Lorenzo Canone y Bruno Caram, por los consejos y el apoyo infinito, sobre todo en la última etapa.

A toda la gente que me acogió en cada una de mis estancias en las que tanto he aprendido y crecido. Especialmente a Fernando Sebastián García de La Plata por la paciencia y el buen trato siempre, y a Alessandra Bianco, Enzo Laurenti y Silvia Berto de Turín.

Por último, a los cuatro pilares de mi vida: mis padres y hermanas, para vosotros todas las palabras se quedan cortas y sin vosotros nada hubiera sido posible. Y a Nacho por la paciencia y apoyo incondicionales e infinitos.

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se estudió la degradación de una mezcla de ocho compuestos fenólicos mediante diferentes procesos de oxidación avanzada. Se trataron mediante proceso foto-Fenton solar donde aplicando un diseño experimental tipo Doehlert se determinó que el proceso se puede extender hasta valores por encima de pH 2.8, probablemente debido a la formación de complejos del hierro con los compuestos fenólicos. En el tratamiento mediante ozono y la combinación de ozono con luz se estudió el efecto que la concentración de contaminante, el pH y la dosis de ozono tienen sobre el proceso. En general, la combinación del ozono con la luz resultó más eficaz en los casos más desfavorables, es decir, aquellos en los que la dosis de ozono era baja y/o el pH más ácido. La mineralización resultó ser superior en la combinación de ozono con luz y se alcanzó la detoxificación de las muestras en ambos ensayos. Se analizó la toxicidad mediante diferentes bioensayos, resultando el compuesto 2,4-dinitrofenol ser el más tóxico para todos los ensayos.

Para la monitorización de los contaminantes en los tratamientos, se midieron matrices de Excitación/Emisión (EMM) de fluorescencia. En el caso del proceso foto-Fenton, a los 12 minutos, todos los cromóforos habían desaparecido. En el tratamiento con ozono, se observa la aparición de nuevos cromóforos cuya intensidad va disminuyendo con el tiempo de tratamiento sin llegar a desaparecer por completo.

Se han realizado matrices de Excitación/Emisión (EEMs) para estudiar la posible formación de complejos entre sustancias tipo húmicas (STH) y el hierro, así como los posibles cambios experimentados a lo largo del proceso foto-Fenton. Mediante análisis de factores paralelos (PARAFAC) se identificaron tres componentes. Se determinó la constante de estabilidad de los componentes con el Fe(III) a diferentes valores de pH, obteniéndose el máximo para pH 5. Los experimentos fotoquímicos empleando STH y Fe(III), en presencia y ausencia de H₂O₂, mostraron la dependencia del pH de los componentes modelados.

En vista de la capacidad de las STH aisladas a partir de residuos urbanos de actuar como complejantes del Fe, se consideró la posibilidad de emplear otro tipo de residuos como

material de partida; en concreto se empleó alperujo para la extracción de STH. Se probaron diferentes condiciones de extracción, obteniéndose los mejores resultados para valores de pH elevados y tiempos de digestión largos. Se comprobó la capacidad fotocatalítica de la STH extraídas y se profundizó en el estudio de la generación de especies radicales.

Demostrada la utilidad de las EEMs y PARAFAC para profundizar en el conocimiento de mezclas complejas y teniendo en cuenta la dificultad que supone la aplicación del análisis matemático, se decidió colaborar en el desarrollo de una interfaz gráfica de usuario que facilitara dicho análisis. La aplicación EEMlab facilita la carga, pretratamiento y análisis mediante PARAFAC de sets de datos muy numerosos. Se creó un ejemplo con muestras que contenían mezclas de compuestos conocidos en diferentes proporciones y se empleó EEMlab para la corrección, preprocesamiento y análisis de los datos, validando la utilidad de la aplicación.

RESUM

En la present Tesi Doctoral es va estudiar la degradació d'una mescla de huit compostos fenòlics per mitja de diversos processos d'oxidació avançada. Es van tractar pel procés foto-Fenton solar, on aplicant un disseny experimental del tipus Doehlert es va determinar que el procés es pot estendre fins un valor per damunt de pH 2.8, probablement a causa de la formació de complexos del ferro amb els compostos fenòlics. En el tractament per ozó i la combinació ozó amb llum, es va estudiar l'efecte que la concentració del contaminant, el pH i la dosi d'ozó tenen en el procés.

En general, la combinació d'ozó amb llum va resultar més eficaç en els casos més desfavorables, es a dir, aquells en els quals la dosi d'ozó era baixa i/o el pH més àcid. La mineralització va resultar ser superior en la combinació d'ozó amb llum i es va aconseguir la detoxificació de les mostres en ambdós assajos. Es va analitzar la toxicitat mitjançant diferents bioassajos, resultant el compost 2,4-dinitrofenol ser el més tòxic per a tot els assajos.

Per a la monitorització dels contaminants en els tractaments, es mesuraren matrius de Excitació/Emissió (EEMs) de fluorescència. En el cas del procés foto-Fenton, als 12 minuts, tots els cromòfors havien desaparegut. En el tractament amb ozó, va observar-se l'aparició de nous cromòfors, la intensitat dels quals va disminuint amb el temps de tractament, sense arribar a desaparèixer completament.

Es van realitzar matrius de Excitació/Emissió (EMMs) per estudiar la possible formació de complexos entre les substàncies tipus húmiques (STH) i el ferro, així com els possibles canvis experimentats al llarg del procés foto-Fenton. Mitjançant l'anàlisi de factors paral·lels (PARAFAC) s'identificaren tres components. Es va determinar la constant de estabilitat dels components amb el Fe(III) a diferents valors de pH, obtenint-se'n el màxim per a un pH de 5. Els experiments fotoquímics empleant STH i Fe(III), en presència i absència de H₂O₂, mostraren la dependència amb el pH dels components modelats.

En vista de la capacitat de les STH aïllades de residus orgànics urbans d'actuar com complexants del ferro, es va considerar la possibilitat d'utilitzar un altre tipus de residu com material de partida; concretament s'empleà el residu sòlid generat en l'obtenció de

l'oli d'oliva en un procés en dos fases (pinyolada) per a l'extracció de STH. Es van provar diferents condicions d'extracció, obtenint-se'n els millors resultats per a valors de pH elevats i temps de digestió llargs. Es va comprovar la capacitat fotocatalítica de les STH extretes i es va profunditzar en l'estudi de la generació d'espècies radicalàries.

Demostrada la utilitat de les EMMs i PARAFAC per a aprofundir en el coneixement de mescles complexes i comptant amb la dificultat que suposa l'aplicació de l'anàlisi matemàtic, es va decidir col·laborar en el desenvolupament d'una interfície gràfica d'usuari que facilitarà l'anàlisi. L'aplicació EMMlab facilita la càrrega, pretractament i anàlisi mitjançant PARAFAC de sets de dades molt nombrosos. Es va crear un exemple amb mostres que contenen mescles de compostos coneguts en diferents proporcions i es va emprar EEMlab per a la correcció, preprocessament i anàlisi de les dades, validant la utilitat de l'aplicació

ABSTRACT

In this Doctoral Thesis, the degradation of a mixture of eight phenolic compounds by means of different advanced oxidation processes has been studied. An experimental methodology, based in Doehlert matrixes, was employed to analyze the effect of operational parameters on photo-Fenton process, and the results show that pH range can be extended clearly above 2.8, probably due to complexation of iron with the phenolic substances. In ozonation and ozone-UVA-Vis combination, the effect of pH, ozone dose and pollutants concentration were studied. Generally, O₃/UVA-Vis was more efficient only in the experiments with worst operational conditions (low ozone dose and acid pH values). However, mineralization was better for the ozone UVA-vis combination. The toxicity was monitored along the degradation processes by means of different biotoxicity assays and in all cases a good detoxification was reached, being 2,4-dinitrophenol the most toxic pollutant.

In order to monitor the pollutants along the treatment, excitation emission fluorescence matrixes (EEM) were recorded. In photo-Fenton process, chromophores were destroyed at 12 min of treatment. In ozonation, new chromophores appeared and partially disappeared at the end of the treatment.

To gain further insight into the complexation of humic like substances (HLS) and Fe(III) and into the possible changes of the complex along the photo-Fenton process, EEMs were recorded and analyzed by PARAFAC (PARallel Analysis FACtor). Three fluorescent components were identified in all cases. The interaction of HLS with Fe(III) was characterized by determining the stability constants of the components with Fe (III) at different pH values, which reached their highest value at pH = 5. Photochemical experiments, with and without H₂O₂, showed pH-dependent trends for the modeled components.

Taking into account the ability of humic substances to act as iron complexing agents, the possibility of employing olive mill wastes as a source of HLS was considered. Different extractions conditions were tested and best results were obtained for high pH values

and long digestion times. Photocatalytic activity of the obtained substances was proved and the generation of reactive species was further studied.

EEMs and PARAFAC seems to be a useful tool to gain further insight into complex mixtures, but the mathematical analysis is not easy. Taking this into account, we decided to collaborate in the development of a graphical user interface. The EEMlab application facilitates the load, preprocess and PARAFAC analysis of big data sets. An example dataset with already known mixtures of compounds at different concentrations was created. EEMlab was used to correct, preprocess and analyze the data set in order to probe the EEMlab utility.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aguas residuales industriales

El desarrollo de la sociedad implica un elevado coste medioambiental del cual el ser humano ha empezado a ser consciente únicamente en la última década. El conocimiento cada vez más profundo de las repercusiones que la actividad humana tiene sobre el medio ambiente ha provocado la sensibilización social y ha convertido a la investigación relacionada con el medio ambiente en un campo importante. Por ello, en los últimos años se están desarrollando y aplicando gran cantidad de tecnologías de tratamiento enfocadas a minimizar el impacto derivado de los vertidos generados por las actividades humanas, ya sean sólidos, líquidos o gaseosos.

De los diferentes tipos de agresiones al medio ambiente, destacan los vertidos a los medios acuáticos naturales de efluentes líquidos procedentes de actividades urbanas e industriales. Esta ha sido uno de los campos en el que más se ha centrado la investigación en los últimos años.

El aumento de la actividad humana que requiere agua lleva implícito un aumento del volumen de aguas residuales generadas, así como de su nivel de contaminación. En todos los países, a excepción de los más desarrollados, estas aguas residuales se vierten sin ser sometidas a un tratamiento adecuado. Según el informe de las naciones unidas sobre el desarrollo de recursos hídricos de 2017, en el mundo más del 80% de las aguas residuales son vertidas sin ser tratadas (UNESCO, 2017).

En el campo de la contaminación de las aguas, la industria es uno de los principales focos. Las aguas residuales industriales son aquellas procedentes de cualquier actividad industrial que en su proceso de producción, manipulación o transformación emplee agua. Son muy variadas en cuanto a caudal y composición, ya que dependen del tipo de industria del que derivan. Además, dependiendo también del tipo del proceso industrial desarrollado, los vertidos pueden producirse de forma continuada o en determinadas horas del día o incluso épocas del año.

Las aguas residuales industriales pueden dividirse en:

- ✓ Aguas de proceso que proceden del empleo de agua como medio de transporte, lavado, refrigeración directa etc. La contaminación en este caso viene del contacto directo con los productos de fabricación.
- ✓ Aguas de drenaje que proceden principalmente de las pluviales. Su contaminación, si existe, procede de zonas de almacenaje de productos al aire libre, derrames de productos, rodadas de vehículos...; dependiendo del tipo de actividad industrial su tratamiento deberá o no ser tenido en cuenta.

En Tabla 1.1-1 se muestra una clasificación de las aguas residuales según el tipo de vertidos acuosos que generan y algunos ejemplos de las industrias más comunes de cada uno de los tipos.

*Tabla 1.1-1 Clasificación de las aguas residuales industriales según el tipo de efluente que generan.
Fuente: (LLorens, 2016)*

Aguas residuales industriales	Efluentes principalmente orgánicos	Industrias papelera y alimentaria
	Efluentes orgánicos e inorgánicos	Petroquímica y refinería Producción de fertilizantes Industria textil
	Efluentes principalmente inorgánicos	Industrias dedicadas a la limpieza y recubriendo de metales, Explotaciones mineras y salinas
	Efluentes con materiales en suspensión	Industrias dedicadas al corte y pulido de minerales y Lavaderos de mineral y carbón
	Efluentes procedentes de refrigeración	Centrales térmicas Centrales nucleares

Es muy complicado establecer parámetros medios de concentraciones de agentes contaminantes en las aguas residuales industriales, ya que, incluso dentro de un mismo sector existen diferencias entre las distintas instalaciones. De forma general se puede decir que se caracterizan por poseer una elevada carga orgánica y presencia de componentes tóxicos y/o no biodegradables.

Esta contaminación en el agua es de gran importancia puesto que los contaminantes pueden acumularse y ser transportados en ríos, lagos, presas y depósitos subterráneos, afectando a los diferentes ecosistemas y la salud del hombre. La necesidad de depurar estas aguas no es solo aconsejable, sino que se encuentra recogida en distintas legislaciones y es de carácter obligatorio en numerosos países.

1.1.1. Aguas residuales de la industria alimentaria

Dentro de las diferentes industrias que generan aguas residuales muy contaminadas con problemas de depuración se encuentran las industrias agroalimentarias. La industria alimentaria abarca un conjunto de actividades dirigidas al tratamiento, transformación, preparación, conservación y envasado de productos alimenticios. Se diferencia de otros sectores productivos en la gran dispersión territorial y la estacionalidad de las actividades que desarrollan. Una característica típica de la industria alimentaria es la gran variedad en cuanto a duración de la temporada de producción y cantidad de material procesado.

En este sector, el agua es una materia prima indispensable para el desarrollo de su actividad; de hecho, es uno de los sectores que presenta un mayor consumo y por tanto mayor generación de aguas residuales. La cantidad de agua empleada para el proceso de producción, así como la carga de residuos generados, varían enormemente según el tipo de proceso industrial del que deriva. Generalmente, los residuos procedentes de la industria alimentaria poseen elevada carga orgánica biodegradable tanto disuelta como en suspensión y aceites y grasas. Por lo tanto, los parámetros típicos de contaminación de mayor importancia son la DBO (demanda biológica de oxígeno), DQO (demanda química de oxígeno), STS (sólidos totales en suspensión), aceites y grasas y nutrientes (nitrógeno y fósforo). Además de estos, otros parámetros importantes pueden ser la cantidad de sales o cloro (por ejemplo, en el sector pesquero) o proteínas (en industrias cárnicas y lácteas). Más recientemente también se ha centrado la atención en determinados contaminantes incluyendo hormonas, pesticidas y surfactantes (Bolzonella et al., 2007).

Como ya se ha comentado, la cantidad y calidad de las aguas residuales generadas en la industria alimentaria varía enormemente de un proceso a otro. En general, en la industria se genera una media de entre 10 y 20 m³ de agua residual por tonelada de producto. El perfil contaminante de las aguas también es muy variable, por ejemplo, aguas procedentes del lavado de vegetales contienen gran cantidad de sólidos en suspensión y algunos sólidos disueltos; aguas procedentes de industrias cárnicas contienen cargas orgánicas muy elevadas; en ocasiones contienen también niveles significativos de antibióticos y hormonas y variedad de pesticidas empleados para el control de parásitos. En la Tabla 1.1-2 se muestran los valores de algunos parámetros característicos de las aguas residuales para diferentes sectores de la industria alimentaria. Además, dentro de cada sector existe también un rango muy amplio de concentración de contaminantes en el agua. La gran variabilidad que caracteriza a estas aguas afecta a la elección de un tratamiento adecuado.

Tabla 1.1-2 Características de las aguas residuales procedentes diferentes sectores de la industria alimentaria

	DQO (mg/L)	DBO ₅ (mg/L)	pH	STS (mg/L)	NTK/NT (mg/L)	N-NH ₃ (mg/L)	PT (mg/L)	P-PO ₄ (mg/L)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)
Láctea	500-102100	240-60000	4-11	60-22150	0.6-1760 (NT)		0-530	-	320-2500
Cárnica	500-15900	150-4635	4.9-8.1	260-6400	50/841 (NT)		25-200	20-100	-
Olivarera	90000-164911	89000	4.8-5	-	1050 (NTK)	1170	-	235	610
Vitivinícola	800-25000	500-6900	3-4	200-1300	-	1-200	-	300-30000	-
Pesquera	10400-34000	-	5.7-6.2	600-1900	-	400-1100	-	240-390	-
De bebidas	620-3470	728-1765	7	367-2940	8.3-62.5 (NT)	-	62.4-100.2	-	270-465
De frutas y verduras	1200-23000	800-4000	6-8.2	6000-31000	-	120-250	-	-	-

Datos tomados de: Láctea (Slavov, 2017); Cárnica (Bustillo-Lecompte & Mehrvar, 2015); Olivarera (Rivas et al., 2001)(Martinez-Garcia et al., 2007); (Rivas et al., 2001)(Martinez-Garcia et al., 2007); Vitivinícola (Petruccioli et al., 2000)(Oller et al., 2011); Pesquera (Guerrero et al., 1997); De bebidas (Amuda & Amoo, 2007); De Frutas y verduras (Mannucci et al., 2010).

EL **sector lácteo** es una de las mayores fuentes de aguas residuales en el mundo. En general, el efluente procede principalmente de las operaciones de lavado y el volumen de aguas generadas varía de dos a tres veces el volumen de leche producida dependiendo de la tipología de la planta de producción (Tocchi et al., 2013). Esta agua generada se caracteriza por poseer elevados valores de DQO y DBO y normalmente contiene grasas, nutrientes, lactosa y detergentes y desinfectantes (Kushwaha et al., 2011).

El **sector cárnico** es uno de los mayores consumidores de aguas, lo que lo convierte en un generador de aguas residuales importante. Los efluentes de este sector se caracterizan por contener cantidades considerables de fósforo total, nitrógeno total, DQO, DBO y sólidos totales en suspensión. La mayor parte de la contaminación procede de la sangre y de la mucosa gastrointestinal. Además, el agua contiene niveles elevados de compuestos orgánicos, microorganismos (patógenos y no patógenos), detergentes y desinfectantes, metales pesados, color, fármacos y turbidez entre otros (Bustillo-Lecompte & Mehrvar, 2015).

La **producción de aceite de oliva**, como ya veremos en detalle más adelante, es una de las actividades agrícolas más importante en el área mediterránea. La elevada producción de aceite de oliva lleva asociada una enorme generación de aguas residuales; la producción en el mediterráneo supera los $30 \cdot 10^6$ m³/año (Mantzavinos & Kalogerakis, 2005). La cantidad de agua generada depende en gran medida del método de extracción del aceite. El procedimiento convencional de extracción genera unos 0.5-8 m³/ tonelada de aceitunas, mientras que el volumen generado en la extracción en tres fases es de 1.18-168 m³ (Kestioğlu et al., 2005). El agua residual procedente de la extracción del aceite de oliva se caracteriza por poseer elevada carga orgánica y de sólidos, así como un pH ácido. La materia orgánica presente en estas aguas se compone principalmente de polisacáridos, azúcares, fenoles, polialcoholes, proteínas, ácidos orgánicos y aceite. EL elevado contenido fenólico hace que sea un agua difícil de tratar mediante procesos biológicos debido a la toxicidad que presentan para las bacterias comúnmente usadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales (Rizzo et al., 2008).

La **industria vitivinícola** genera de 1 a 4 m³ de aguas residuales por m³ de vino producido, que debido a su composición no pueden ser tratadas por los métodos convencionales (Andreottola et al., 2009). Estas aguas poseen concentraciones elevadas de ácidos orgánicos solubles, etanol, azúcares y alcoholes junto con compuestos recalcitrantes de elevado peso molecular (por ejemplo, polifenoles, taninos y lignina). La carga orgánica procede de la pérdida de producto, de residuos procedentes de la limpieza y de operaciones de filtrado. La naturaleza orgánica de estas aguas se cuantifica con valores elevados de DQO, DBO y cantidades variables de sólidos en suspensión.

El **sector pesquero** genera aguas residuales que contienen contaminantes orgánicos disueltos, coloidales y particulados. Dependiendo del tipo de operación, el grado de contaminación puede ser bajo (operaciones de lavado), medio (proceso de fileteado) o elevado (agua con sangre drenada de los tanques de almacenamiento de los peces). Durante la cocción y evisceración del pescado se generan aguas residuales con valores elevados de DQO, nutrientes, aceites y grasas. Los niveles de DQO varían enormemente entre factorías diferentes y con el tipo de pescado (Chowdhury et al., 2010).

Otro tipo de aguas industriales complicadas son las que proceden de la **industria del cocido del corcho**, las que se tratarán más a fondo a continuación.

1.2. Generalidades sobre la industria del corcho y sus aguas residuales.

La explotación del alcornoque se lleva a cabo desde tiempos históricos en la península, ibérica siendo el corcho el producto principal. La gran calidad de corcho para ser trabajado permite al hombre obtener diversidad de objetos (flotadores, suelas, tapones...). La hermeticidad y resistencia que este compuesto proporciona, lo convierten en el material ideal para el embotellado de los vinos. Además, se adapta perfectamente al cuello de la botella lo que hace que el descorchado sea más cómodo.

De la producción mundial del corcho, Portugal seguido de España son los mayores productores con un 50.5 y un 22.7 % respectivamente. En España la producción del corcho al año se sitúa en torno a las 85.000 toneladas de las cuales el 25% aproximadamente se destina a fábricas nacionales y el resto es exportado.

El alcornoque tiene una distribución geográfica limitada que se reduce al área mediterránea. La masa de alcornocal más grande y mejor cuidada se encentra en Portugal, en segundo lugar, en España seguida por Argelia, Marruecos, Francia, Túnez e Italia. Dentro de España, Andalucía es la comunidad autónoma con mayor superficie de alcornoques (50% del total), seguida por Extremadura (30%) y Cataluña (8%), el resto de comunidades representan el 12% aproximadamente (Sánchez, 2007).

En cuanto a la calidad del corcho, ésta generalmente disminuye al ir avanzando desde zonas más cálidas y secas hacia zonas más frías y húmedas. Sin embargo, su calidad no depende únicamente de las características del medio en el que se desarrolla.

Las ventajas de instalar industrias corcheras son diversas: se trata de un recurso natural renovable, la tecnología necesaria para su transformación es mínima, sus propiedades físicas superan a sus sustitutos sintéticos y su aprovechamiento, transporte y almacenaje son fáciles.

1.2.1. Propiedades del corcho

El corcho se compone principalmente de suberina (40%), componentes poliméricos (22%), polisacáridos (celulosa y hemicelulosa, 22%) y en menor proporción ceras,

taninos y otros componentes extraíbles. De todos ellos, la suberina además de ser el componente principal es el principal determinante de las cualidades del corcho (Sánchez, 2007).

Las propiedades físico-mecánicas del corcho son:

- ✓ baja densidad debido a que posee un elevado porcentaje de aire (89%);
- ✓ es impermeable a los líquidos y gases gracias a la suberina
- ✓ elasticidad debido a la flexibilidad de sus membranas celulares
- ✓ carácter aislante polivalente, especialmente acústico y térmico, puesto que posee una conductibilidad térmica muy baja
- ✓ capacidad de absorber humedad
- ✓ inodoro
- ✓ higiénico
- ✓ compacto
- ✓ difícil combustión y al quemarse no desprende vapores tóxicos
- ✓ estabilidad dimensional que hace que los cambios de humedad y temperatura no creen problemas de fractura o inestabilidad de los materiales.

1.2.2. La industria del corcho

Dentro de la industria del corcho hay empresas dedicadas a la preparación del mismo y empresas que se dedican exclusivamente a la transformación.

1.2.2.1. Industria preparadora del corcho

En el proceso industrial de preparación del corcho se pueden distinguir las siguientes fases:

La “saca” de corcho o descorche

Consiste en la extracción de la corteza de los alcornoques. Ésta tiene lugar durante los meses de verano (junio-agosto), periodo en el que la fase de crecimiento del alcornoque es más activa, de forma que el árbol puede crear una fina capa protectora que lo protegerá del frío en invierno.

Estabilización del corcho en bruto

Después de la extracción, las planchas cosechadas son separadas y amontonadas en función de su calidad y procedencia y se dejan a la intemperie durante unos seis meses. En esta fase, los factores atmosféricos (sol, lluvia, viento) eliminarán la mayor parte de la savia del corcho y su textura se estabiliza.

Cocido

Este proceso se encuentra normalizado y definido por el código Internacional de prácticas taponeras. Consiste básicamente en la inmersión de las planchas en calderas con agua limpia hirviendo durante como mínimo una hora, con la finalidad de limpiar el corcho, extraer las sustancias solubles, aumentar el espesor y mejorar su flexibilidad y estabilidad. Las aguas de cocido son cambiadas al menos dos veces por semana (normalmente se “cuecen” unas 8-10 calderas por día).

En esta etapa se generan grandes volúmenes de agua residual, unos 400 L por tonelada de corcho. Las aguas producidas se caracterizan por poseer unos valores medios de demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO) de 7.4 g/L y 1.3 g/L respectivamente (baja biodegradabilidad), un pH en torno a 5 y concentraciones de fenoles y polifenoles en torno a 0.6-0.9 g/L (Dias-Machado et al., 2006; Mendonça et al., 2004).

Retaceo, calibrado y escogido

Las planchas cocidas son secadas y almacenadas durante tres semanas en almacenes con los niveles de temperatura y humedad controlados. Pasado este tiempo se procede al retaceo que consiste en la separación dentro de una misma plancha de partes de diferentes calidades o espesor para finalmente obtener planchas rectangulares y homogéneas. A continuación, se separan las planchas según su espesor (calibre) y se califican según su calidad (en base a su porosidad, posibles defectos estructurales...). Por último, las planchas de igual calibre y calidad son prensadas y agrupadas en bloques para su transporte a las industrias transformadoras.

El principal núcleo de preparación del corcho de España se encuentra en Extremadura, concretamente en San Vicente de Alcántara, que además posee el 12% de la producción mundial. En esta localidad de poco más de 6000 habitantes existen cerca de 70 industrias dedicadas a tratamiento de este producto, donde se recoge y procesa el 90% de la producción regional de Extremadura (Sánchez, 2007).

1.2.2.2. La industria transformadora del corcho

Cataluña presenta el mayor número de empresas dedicadas a la transformación del corcho, siendo Andalucía y Extremadura sus principales proveedores.

Presenta una amplia actividad industrial y se divide básicamente en dos vertientes: la que se dedica a las elaboraciones de productos que precisan corcho de óptima calidad (industria corcho-taponera, de papel, discos y lanas) y las que no precisan corcho de tan alta calidad (calzado, artículos de pesca, decoración, artesanía y deportivas). Por otro lado, independiente a las anteriores y con una elevada actividad, se encuentra las empresas que utilizan residuos y desperdicios de corcho para la elaboración de granulados a partir de los cuales se obtienen aglomerados y productos químicos.

La industria más conocida y tradicional es la taponera, la cual ha tenido una profunda transformación en cuanto a los métodos empleados, que van desde un sistema manual y lento hasta la maquinaria sofisticada que alcanza grandes tiradas de piezas casi perfectas. Existen varios tipos de tapones: de una pieza, de dos o más piezas, de remate aglomerado y de aglomerado. Los dos primeros se emplean para el tapamiento de botellas y medicamentos, los segundos a la cobertura del cava o champán.

1.2.2.3. Vertidos procedentes de la industria corchera

En cuanto a la legislación aplicable a los vertidos procedentes de la industria corchera, el ordenamiento jurídico estatal (Ley de Aguas y RD 849/86, Reglamento de Dominio Público Hidráulico) establece que las empresas están obligadas a tratarlos y disponer de la correspondiente autorización de vertido. Sin embargo, estas aguas en la mayoría de los casos son vertidas al medio ambiente sin ser tratadas, otras veces el tratamiento más

común es el almacenaje en balsas de evaporación. Este proceso, además de generar malos olores, conlleva la posibilidad de contaminar aguas superficiales y subterráneas por escorrentía o infiltración (De Torres-Socías et al., 2013)

Como se explica en el apartado anterior, dentro del proceso productivo de corcho, las actividades que generan un mayor volumen de vertido son la preparación y la semitransformación del corcho, concretamente la fase de hervido. Además, se caracterizan por ser vertidos discontinuos que dependen del día semanal y del mes de campaña. Generalmente, en el periodo comprendido entre octubre-enero, se genera mayor caudal de vertidos, puesto que es en este intervalo donde se concentran la mayoría de cocidos (Figura 1.2-1).

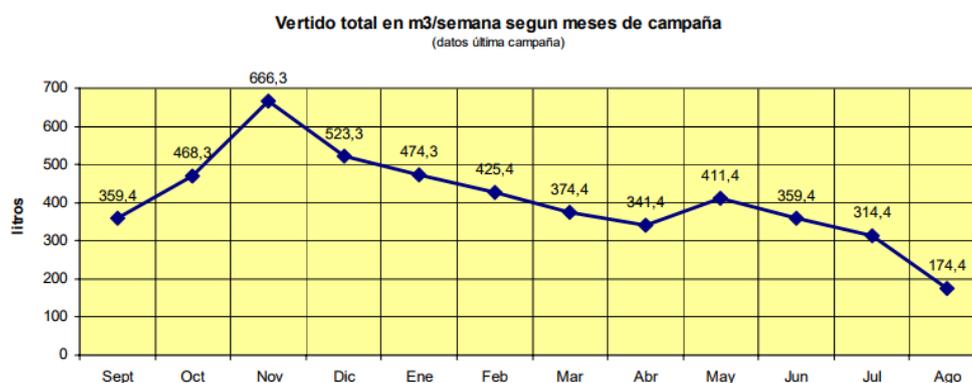


Figura 1.2-1 Ejemplo del caudal de vertidos a lo largo del año para un grupo de empresas pertenecientes a la Asociación Sanvicenteña de Empresario del Corcho (ASECOR) de un municipio de Extremadura donde se localiza la mayor explotación de corcho de España. Fuente: Estudio de vertidos procedentes del sector del corcho, ASECOR (2006)

En general se trata de vertidos a elevada temperatura que superan en muchos casos los límites legales. Además, en la Tabla 1.2-1 se recogen ejemplos de valores de determinados parámetros para aguas procedentes de 5 empresas diferentes del municipio extremeño de San Vicente de Alcántara. Como ya se ha comentado anteriormente, se trata de aguas con elevados valores de DQO, DBO y contenido fenólico, encontrándose en todos los casos los valores de estos parámetros por encima de los que permite la legislación. Además, como se observa en la tabla, también posee un pH inferior al valor de referencia y un contenido en fósforo y hierro por encima.

Tabla 1.2-1 Valores de determinados parámetros para las aguas de vertido de 5 empresas dedicadas a la industria del corcho. Fuente: Estudio de vertidos procedentes del sector del corcho, ASECOR (2006)

Parámetro	1 ^{er} cocido			2 ^o cocido		Valor referencia
	1	2	3	4	5	
pH	5.14	4.94	4.71	4.72	5.13	5.5-9
DBO5 (mg O2/L)	1137	2000	410	1800	422	1000
DQO (mg O2/L)	4118	4380	2082	6514	1908	1000
Color (PCO)	3500	3500	10	3500	5	
Fenoles totales (mg/L)	157.88	171.65	30.8	187.94	28.7	5
Fosforo total (mg/L)	47.09	42.49	11.05	39.73	15.69	30
Hierro (mg/L)	9.89	7.49	8.14	11.56	6.20	10
Detergentes (mg/L)	91.1	37.7	0	35.3	0	6
Sulfitos (mg/L)	198	248	59	348	57	2

En los últimos años el tratamiento de estos efluentes ha sido el objetivo de diversos trabajos de investigación. Se han estudiado metodologías simples y combinadas basadas principalmente en procesos físico-químicos y, en menor medida, en procesos biológicos (Ponce-Robles et al., 2017). La combinación de diferentes tecnologías podría ser una metodología prometedora en el tratamiento de este tipo de aguas; un ejemplo estudiado en varios trabajos es la combinación de fotocatalisis con oxidación biológica (De Torres-Socías et al., 2014; Oller et al., 2011; Vilar et al., 2009).

1.3. Tratamiento de aguas residuales industriales: Procesos de oxidación avanzada

Típicamente el tratamiento de las aguas residuales se divide en:

- ✓ **Pretratamiento y tratamiento primario**, en esta etapa se eliminan sólidos grandes y en suspensión mediante operaciones físicas;
- ✓ **Tratamiento secundario**, en esta etapa se eliminan compuestos orgánicos biodegradables y materiales en suspensión mediante la aplicación de tratamiento biológico;
- ✓ **Tratamiento terciario o avanzado**, este proceso es adicional al secundario y su objetivo es eliminar aquellos contaminantes que no son susceptibles de ser degradados por los organismos del tratamiento secundario.

Generalmente las aguas residuales industriales contienen gran diversidad de impurezas y contaminantes tóxicos y/o recalcitrantes que no pueden ser eliminados por los métodos convencionales puesto que resisten el tratamiento biológico, pudiendo incluso producir daños importantes sobre los microorganismos responsables de la biodepuración. Además, este tipo de aguas tienen una acción muy compleja sobre el medio ambiente, afectando al desarrollo natural de los ecosistemas. Puesto que cada sector y cada industria presenta una problemática diferente, sus aguas necesitan un tratamiento específico y un diseño personalizado para alcanzar la eficacia suficiente y cumplir con la legislación vigente en cada caso. Todo ello hace que el tratamiento de las aguas residuales industriales sea complejo.

Hace años que se vienen realizando grandes esfuerzos en investigación para encontrar soluciones en este campo. Actualmente está más que demostrado que los procesos de oxidación química y especialmente los procesos de oxidación avanzada (POA) son una técnica real y altamente eficiente frente a aguas residuales recalcitrantes. Los POA se presentan como una interesante alternativa a los tratamientos convencionales y como tratamientos complementarios, bien sea como pre o post tratamiento de los procesos

biológicos actuales, puesto que tiene la capacidad de degradar no solo los compuestos tóxicos, sino también sus intermedios.

Los procesos de oxidación avanzada (POA) se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes (Legrini et al., 1993). La degradación de aguas residuales mediante POAs teóricamente puede dar lugar a la mineralización completa de los contaminantes ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} +$ compuestos inorgánicos) o simplemente oxidarlos a moléculas más sencillas, menos tóxicas y más biodegradables. Por lo tanto, estos procesos se presentan como una técnica adecuada para eliminación de contaminantes tóxicos o difícilmente biodegradables, o para mejorar la degradación microbiológica. En general requieren instalaciones de bajo coste, pero conllevan gastos de operación elevados, derivados de la necesidad de emplear reactivos y del requerimiento energético. Pueden ser usados de forma individual o combinados entre ellos para la eliminación de compuestos que poseen alta estabilidad química y/o baja biodegradabilidad (Malato et al., 2009). Usándolos como pretratamiento delante de un proceso de degradación biológica se disminuye los costes de operación, convirtiéndose en tratamiento eficientes y económicamente viables (Cañizares et al., 2009).

La eficacia de estos procesos se debe a la generación de especies radicales transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el cual es uno de los oxidantes no selectivos más fuertes, capaz de oxidar prácticamente todo tipo de estructuras y enlaces químicos. Además, la generación de $\cdot\text{OH}$ en los POAs puede ser muy diversa y se adapta con cierta sencillez a los requerimientos de un tratamiento específico (Malato et al., 2007a).

En la actualidad existen gran cantidad de POA; este hecho, junto con la posibilidad de realizar combinaciones entre ellos hace que se puedan clasificar de diversas formas. En este caso se clasificarán atendiendo a las especies reactivas (Tabla 1.3-1).

Tabla 1.3-1 Clasificación de los procesos de oxidación avanzada según la fuente de generación de especies reactivas.

Procesos de Oxidación Avanzada	
Método de generación de especies reactivas	Procesos
Fotólisis con UV	Fotólisis directa Fotólisis indirecta
Basados en O ₃	O ₃ O ₃ + UV O ₃ + H ₂ O ₂ O ₃ + catalizador
Procesos térmicos	Oxidación Húmeda Oxidación Húmeda supercrítica Oxidación Húmeda + H ₂ O ₂
Procesos de alta energía	Ultrasonidos Tecnologías de haz de electrones Tecnologías de microondas
Basados en H ₂ O ₂	Fenton Electro-Fenton Foto-Fenton Tipo-Fenton UV/H ₂ O ₂
Fotocatálisis	Fotocatálisis heterogénea Fotocatálisis homogénea

En los subapartados siguientes se describen algunos de los POAs recogidos en la Tabla 1.3-1

1.3.1. Fotólisis con radiación UV

Este proceso se caracteriza por degradar a los compuestos por efecto de la radiación, sin necesidad de añadir reactivos químicos. En este caso la degradación puede ocurrir de formas: directa o indirecta.

Fotólisis Directa

Muchos autores han demostrado la posibilidad de degradar contaminantes empleando fotólisis directa con radiación UV. En este caso las moléculas irradiadas promocionan de un estado fundamental a estados excitados, los cuales pueden sufrir homólisis, heterólisis o fotoionización, entre otros procesos. En la mayoría de los casos la ruptura homolítica produce radicales que inician reacciones en cadena y dan lugar a productos

finales con pesos moleculares menores. En presencia de oxígeno son posibles reacciones adicionales con la generación de radical superóxido, que, aunque su poder oxidante no es muy alto, puede degradar compuestos aromáticos sustituidos (De La Cruz, 2013).

Fotólisis indirecta

En este caso, otras sustancias fotosensibles presentes en la disolución (como puede ser materia orgánica disuelta) interaccionan con la luz promocionando a estados excitados que pueden ser desactivados de varias formas. Por ejemplo, cuando ésta es transferida al oxígeno, da lugar a la formación del oxígeno singlete que puede a su vez reaccionar con los microcontaminantes. Otro camino de desactivación puede ser la reacción con el microcontaminante directamente, produciendo un radical catiónico intermedio del contaminante que podrá dar lugar a reacciones paralelas hasta ser oxidado (Buschmann et al., 2005; Wenk et al., 2011).

1.3.2. Ozonización

La ozonización es una técnica de oxidación química con una gran variedad de aplicaciones, entre las que se encuentra el tratamiento de contaminantes y microcontaminantes orgánicos recalcitrantes.

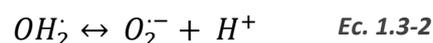
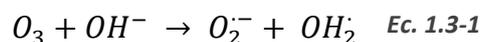
El ozono es una molécula triatómica inestable, ligeramente soluble y con elevado potencial de oxidación. Existen diferentes métodos para producir ozono, siendo el más ampliamente utilizado el de la descarga de corona, que consiste en pasar oxígeno entre dos electrodos separados por un material dieléctrico, generalmente de vidrio. Los electrodos se encuentran conectados a una fuente de alta tensión capaz de generar una descarga de corona entre ambos, que hace que el oxígeno que está en el espacio de descarga se convierta en ozono. Las moléculas de oxígeno primero se dividen en átomos y posteriormente estos se combinan con las moléculas de oxígeno restantes dando lugar a la molécula de ozono.

La degradación de contaminantes mediante ozono puede ocurrir por dos vías: la directa y la indirecta, las cuales conducen a diferentes productos de oxidación y son controladas por cinéticas de reacción diferentes.

Reacción directa: el potencial del ozono para actuar como nucleófilo, electrófilo o dipolo se debe a su estructura resonante y su capacidad para deslocalizar electrones. La degradación de los compuestos orgánicos ocurre generalmente a través de los grupos insaturados (anillos aromáticos, alquenos...) (Am Water Works Res et al., 1991) y en compuestos alifáticos con grupos funcionales específicos como aminas y sulfuros (Von Gunten, 2003). Así pues, se trata de un mecanismo bastante selectivo cuya reacción con la materia orgánica se realiza preferiblemente con compuestos aromáticos, dobles enlaces o aminas.

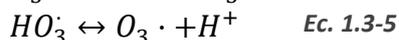
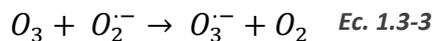
Reacción indirecta: en medio acuoso, el ion hidroxilo promueve la descomposición del ozono a través de un mecanismo complejo que da lugar a una serie posterior de reacciones que conducen a la formación del radical hidroxilo, entre otros. De esta forma, la degradación de contaminantes mediante ozono puede ocurrir también indirectamente por la acción de los radicales generados. El mecanismo de cadena es complejo y puede verse afectado por la interferencia de diferentes especies presentes en solución; incluso se ve influenciado por la concentración de los diferentes compuestos en la reacción. Se puede dividir en tres etapas (Alaton et al., 2002):

Iniciación, en esta etapa la reacción entre los iones hidróxido y el ozono da lugar a la formación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y un radical hidroperóxido (OH_2^{\cdot}) (Ec. 3.4-5) los cuales se encuentran en equilibrio (Ec. 1.3-2).

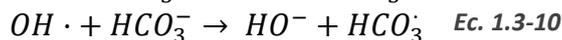
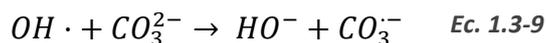


Propagación, durante la reacción en cadena el anión superóxido reacciona con el ozono para formar el anión ozónido ($O_3^{\cdot-}$), el cual se descompone inmediatamente a través del trióxido de hidrógeno (HO_3^{\cdot}) en un radical de oxígeno e hidroxilo (Ec. 1.3-3 a Ec. 1.3-6). La generación de radical hidroxilo es el principal promotor de la oxidación de la materia

orgánica. Además, puede reaccionar con el ozono dando lugar a tetraóxido de hidrogeno (HO_4), que se transforma en oxígeno y radical hidroperóxido (Ec. 1.3-7 y Ec. 1.3-8); con esto, la reccion puede volver a empezar.



Terminacion, esta etapa se produce cuando las sustaciones orgánicas o inorganicas, reaccionan con el radical hidroxilo para formar radicales secundarios que no producen radicales superoxido (Ec. 1.3-9 a Ec. 1.3-10). Estos captadores finalizan la reaccion en cadena e inhiben la descomposicion del ozono.



La reacción vía indirecta tiene lugar de forma más rápida, se acelera con el aumento del pH y como se ha visto anteriormente, da lugar a la generación de especies muy reactivas y menos selectivas ($\cdot OH$).

Por lo tanto, en la ozonización el pH juega un papel fundamental, puesto que mientras que a pH ácido predomina la vía directa, a pH básico la formación de radicales $\cdot OH$ aumenta y por tanto predomina la vía indirecta.

La ozonización en medio alcalino es una técnica efectiva para un gran número de flujos y concentraciones de contaminantes. Sin embargo, presenta la desventaja de la formación de carbonatos y otras sales que pueden actuar como capturadores de las especies radicales (Poyatos et al., 2010).

En bibliografía existen datos de gran diversidad de compuestos que han sido tratados mediante ozono, algunos ejemplos son: clorofenoles (Pera-Titus et al., 2004), pesticidas (Cruz-Alcalde et al., 2017; Souza et al., 2018), fármacos (Pera-Titus et al., 2004), efluentes textiles (Alaton et al., 2002) entre otros.

1.3.3. Ozono combinado con radiación

Cuando se combina el ozono con radiación UV, la fotólisis del ozono produce la formación de radical hidroxilo (Ec. 1.3-11). Por tanto, el efecto del ozono se ve potenciado y se produce un efecto sinérgico.



Tradicionalmente se ha empleado como fuente de radiación lámparas de baja presión de mercurio, que emiten radiación casi monocromática a 254 nm. A esta longitud de onda, el coeficiente de extinción para el ozono en fase gas es $3300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, valor mucho más elevado que el del peróxido de hidrógeno ($18.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Bonnel et al., 1990). De esta forma, con la combinación O_3/UV se obtiene una mineralización muy efectiva del carbono orgánico total que mejora la eficiencia del tratamiento. Además, se asegura la eliminación no solo de los compuestos objetivo iniciales, sino también de posibles intermedios que se forman durante el proceso de degradación y que en ocasiones pueden resultar incluso más nocivos.

Esta combinación se ha usado en la degradación de compuestos como el nitrotolueno y trinitrotolueno (Chen et al., 2007), de mezclas de contaminantes emergentes (Beltrán & Rey, 2017) e insecticidas (carbofuran) (Lau et al., 2007).

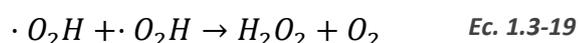
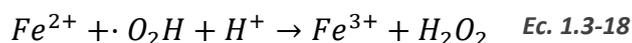
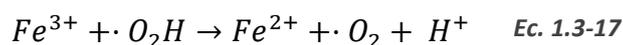
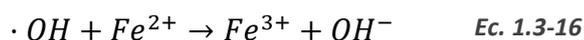
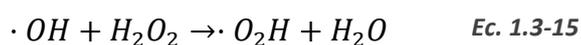
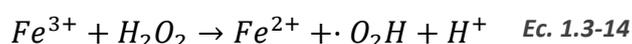
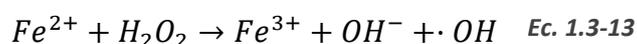
1.3.4. Fenton

EL proceso Fenton debe su nombre a su descubridor (Fenton, 1894), que realizó la oxidación del ácido tartárico añadiendo sales de $Fe(II)$ y peróxido de hidrógeno. Más tarde, en 1934 Haber y Weiss propusieron el radical hidroxilo como oxidante activo generado en esta reacción. A pesar de esto, la aplicación de dicha reacción para la destrucción de sustancias orgánicas tóxicas no comenzó a desarrollarse hasta los años 60 (Brown et al., 1964).

Comparado con otros oxidantes, el peróxido de hidrógeno no resulta excesivamente caro, es seguro, fácil de manejar y no representa una amenaza para el medio ambiente puesto que se descompone fácilmente. De igual forma, el hierro no es un compuesto

caro, es seguro y cantidades moderadas pueden ser utilizadas sin riesgos medioambientales. Por lo tanto, el proceso Fenton puede considerarse un método relativamente económico y efectivo para el tratamiento de efluentes que presenten compuestos tóxicos y/o no biodegradables.

El reactivo Fenton está formado por una mezcla de H_2O_2 e ion ferroso, que inicia y cataliza la descomposición del H_2O_2 dando lugar a la generación de radicales $\cdot OH$. Las principales reacciones que tiene lugar en cadena en el proceso en oscuridad y en ausencia de compuesto orgánicos se describen en la Ec. 3.4-5 a Ec. 1.3-19 (Neyens & Baeyens, 2003).



La necesidad de controlar el pH con el fin de evitar la precipitación de los oxihidroxidos férricos en ambiente básicos o incluso ligeramente ácidos es uno de los mayores inconvenientes del proceso Fenton, siendo generalmente el pH óptimo de 2.8 (Pignatello et al., 2006).

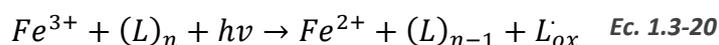
La concentración de peróxido de hidrógeno es otro de los parámetros que influyen en el proceso Fenton: si la concentración es demasiado elevada éste atraparà los radicales hidroxilos generados y si la concentración es demasiado baja no se generará la cantidad suficiente de radicales y la reacción se parará. Por ello, la adición de peróxido debe optimizarse de forma que se utilice de forma eficiente; es necesario basarse en estudios a escala de laboratorio realizados previamente (Oller, 2008).

La eficacia del proceso ha sido demostrada en la degradación de gran diversidad de compuestos orgánicos tales como antibióticos (Elmolla & Chaudhuri, 2009; Guinea et

al., 2009; Homem et al., 2010), trihalometanos (Tang & Tassos, 1997), tetracloroetileno (Yoshida et al., 2000) e hidrocarburos aromáticos (Flotron et al., 2005); también se ha demostrado su eficacia en la degradación de diésel en suelos contaminados (Watts & Dilly, 1996).

1.3.5. Foto-Fenton

Foto-Fenton es uno de los procesos de oxidación avanzada más estudiados para la eliminación de contaminantes emergentes o agrícolas. En este proceso se combina la radiación UV o UV/luz visible con la reacción de Fenton anteriormente descrita, para acelerar la degradación de los contaminantes orgánicos (Oppenländer, 2007; Pignatello, 1992). Este aumento de la velocidad de degradación está relacionada con la fotoquímica del Fe^{3+} (Ec. 1.3-20) y la descomposición del peróxido, que aumentan la generación de radicales hidroxilo. Los complejos de Fe^{3+} sufren una transferencia de carga ligando-metal que da lugar a su disociación en Fe^{2+} y el ligando oxidado, L_{ox} (Pignatello et al., 2006).



Esta reacción permite la reducción del Fe (II), cerrando el ciclo y generando a su vez nuevas especies reactivas.

Los complejos de Fe^{3+} que se suelen formar en la reacción son $Fe(OH)^{2+}$ y $Fe_2(OH)_2^{4+}$, los cuales absorben en la región del UV y visible. Estos complejos se fotoreducen generando radicales hidroxilo (Ec. 1.3-21). La especie más importante es el $Fe(OH)^{2+}$ puesto que además de poseer un alto coeficiente de absorción, su concentración relativa es alta con respecto a otras especies de Fe^{3+} . (Pignatello et al., 2006)



La oxidación de contaminantes orgánicos mediante Fenton (apartado 1.3.4) y foto-Fenton se inhibe por la presencia de iones inorgánicos (fosfato, sulfato, fluoruro, bromuro, cloruro) en mayor o menor medida dependiendo de la concentración de los mismos. Esta inhibición suele deberse a que el hierro forma complejos insolubles con

los iones y precipita, como es el caso del fosfato, o a que los iones reaccionan con los radicales hidroxilo, como ocurre con el cloruro y bromuro (Pignatello et al., 2006).

El proceso foto-Fenton ha demostrado su efectividad en la degradación de numerosos contaminantes, tales como pesticidas, clorofenoles, compuestos fenólicos y fármacos (Klavarioti et al., 2009; Malato et al., 2009; Pera-Titus et al., 2004) . Además también se ha empleado para el tratamiento de numerosos efluentes industriales, como por ejemplo de la industria farmacéutica (Adishkumar et al., 2012; Sirtori et al., 2009), de la industria textil (Kang et al., 2000; Pérez et al., 2002; Punzi et al., 2015) de la industria olivarera (Aytar et al., 2013; García & Hodaifa, 2017; Justino et al., 2010) y aguas del lavado de recipientes contenedores de plaguicidas (Malato et al., 2007b; Zapata et al., 2010).

1.3.6. Proceso foto-Fenton en condiciones cercanas a la neutralidad

Como ya se ha comentado, una de las principales desventajas que presenta el proceso foto-Fenton es la necesidad de operar en un rango estrecho de pH con óptimo a 2.8. Un control estricto del pH es necesario para evitar la precipitación de oxihidroxidos de hierro, maximizar la concentración de las especies activas del hierro (II y III) y asegurar que ejercen su papel catalítico. La Figura 1.3-1 muestra la especiación del hierro en agua: empezando por un pH de aproximadamente 1, la concentración de Fe(III) se reduce dando lugar a la formación de las especies fotoactivas FeOH^+ y $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$; a valores de pH entre 2 y 3 el porcentaje de FeOH^+ es mayoritario asegurando la máxima reactividad del sistema; a valores de pH por encima de 3 la reactividad del sistema comienza a disminuir debido a la disminución de la concentración de estas dos especies fotoactivas; por lo tanto a valores pH por encima de 4 el hierro disuelto comienza a precipitar en forma de hidróxido férrico (Clarizia et al., 2017).

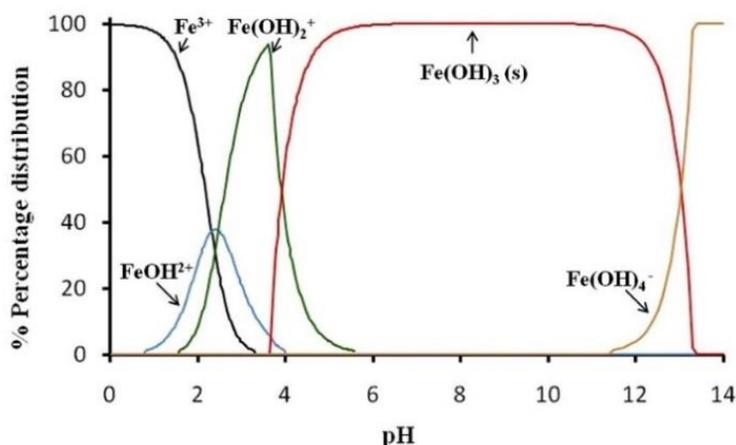


Figura 1.3-1 Diagrama de especiación de los hidróxidos de hierro en función del pH para una disolución $1 \cdot 10^{-5}$ M de Fe(III) a 25°. Fuente: (Clarizia et al., 2017)

Todo esto conlleva la necesidad de añadir reactivos acidificantes y una neutralización final que permita verter el agua, lo que supone una desventaja no solo económica, sino también medioambiental importante (De Luca et al., 2014). Por lo tanto, la posibilidad de trabajar en condiciones neutras o cercanas a la neutralidad ha despertado el interés de la comunidad científica y en los últimos años se han empleado diferentes estrategias para lograr este fin. Estas estrategias, en general se pueden dividir en dos: aquellas que intentan mantener las especies fotoquímicamente activas del hierro en disolución a valores de pH suaves y aquellas que añaden fuentes heterogéneas de hierro (aunque el hierro en disolución es el responsable total o parcial de la reacción). En la Tabla 1.3-2 se resumen las principales estrategias empleadas (Santos-Juanes et al., 2017a)

Tabla 1.3-2 Clasificación de las diferentes estrategias estudiadas para la aplicación del proceso foto-Fenton en condiciones suaves de pH (Santos-Juanes et al., 2017a)

Homógeno	Heterogéneo
Empleo de concentraciones bajas de hierro	Heterogeneización del proceso
Aprovechar la matriz del efluente	Empleo de hierro heterogéneo como reserva para dosificar constantemente hierro como fotocatalizador homogéneo.
Adición de agentes complejantes del hierro	

1.3.6.1. Foto-Fenton neutro empleando hierro a bajas concentraciones

Si nos fijamos en la Figura 1.3-1 del apartado anterior vemos como con el incremento del pH, el hierro en agua pasa de estar en forma muy soluble (Fe(III)), a muy insoluble (Fe(OH)_3); sin embargo, incluso a pH neutro una pequeña fracción de hierro permanece en disolución en parte como Fe(OH)^+ . Teniendo en cuenta esto, una de las estrategias empleadas para la aplicación de proceso foto-Fenton en condiciones de pH cercanas a la neutralidad ha sido la adición de hierro en bajas concentraciones (1 mg/L o inferiores) con la finalidad de acercarse a la cantidad de hierro que permanece activa al pH de trabajo y minimizando las pérdidas por precipitación. Esta estrategia puede ser útil principalmente en aquellos casos en los que los contaminantes se encuentran a muy bajas concentraciones, puesto que incluso una pequeña cantidad de catalizador puede generar una cantidad suficiente de especies reactivas para degradar a los contaminantes en un tiempo de irradiación aceptable (Santos-Juanes et al., 2017a). Diferentes ejemplos se pueden encontrar en literatura, De la Cruz et al. consiguieron la degradación de más del 80% de determinados microcontaminantes presentes en las aguas de una estación sin añadir más hierro que el ya presentes en el agua (1.6 mg/L), empleando H_2O_2 y luz UV (254nm), si bien es cierto que una parte de la degradación se debe a la fotólisis directa o indirecta de los compuestos (De La Cruz et al., 2013).

1.3.6.2. Foto-Fenton neutro aprovechando la matriz del efluente

En algunas ocasiones, el propio efluente puede contener sustancias que complejan el hierro manteniéndolo en disolución, otros metales en disolución o hierro a bajas concentraciones que permiten conducir el proceso foto-Fenton a pH por encima de 3.

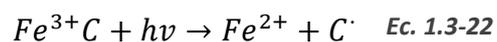
Por ejemplo, Katsumata et al. estudiaron la fotodegradación de ácidos húmicos presentes en sedimentos marinos a valores de pH en torno a 4 (Katsumata et al., 2008). Bernabeu et al. estudiaron el efecto de la matriz acuosa en la degradación de 6 contaminante emergentes, obteniendo como resultado el papel favorable que tienen los ácidos húmicos cuando la concentración de los contaminantes es elevada y

desfavorable cuando el ratio contaminantes/ácidos húmicos disminuye (Bernabeu et al., 2012).

Por otro lado, también son susceptibles de ser tratados mediante foto-Fenton neutro efluentes procedentes de industrias metalúrgicas, las cuales pueden contener hierro u otros metales en disolución. Por ejemplo, Santos-Juanes et al. emplearon efluentes procedentes de la industria de recubrimientos metálicos con una concentración elevada de cobre, para la degradación de cianuro también presente en el efluente (Bernabeu et al., 2012)

1.3.6.3. Foto-Fenton neutro mediante la adición de agentes complejantes

La capacidad de un ligando de formar complejos fuertes con el hierro Fe(III) es esencial para prevenir la precipitación del mismo en forma de hidróxido de hierro. Sin embargo, para asegurar una degradación eficiente de los contaminantes orgánicos, estos complejos deben no solo absorber luz en el rango UV-visible, sino también sufrir degradación fotolítica. En ausencia de descomposición fotolítica, el sistema parece no ser reactivo, en otras palabras, el ligando debe donar un electrón al metal permitiendo que éste se reduzca, siendo éste el primer paso de una serie compleja de reacciones (Clarizia et al., 2017).



Se trata en general de moléculas y macromoléculas con grupos carboxílicos y/o amino (Santos-Juanes et al., 2017a); algunos ejemplos son:

- ✓ Oxalato, ha sido ampliamente estudiado para la eliminación de diversos contaminantes como antibióticos (Dias et al., 2014), contaminantes emergentes presentes en aguas residuales de EDAR (Klamerth et al., 2011) o herbicidas. Así como para el tratamiento de aguas residuales, por ejemplo, de la industria vitivinícola (Monteagudo et al., 2012).
- ✓ Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) es uno de los agentes quelantes más comúnmente empleado. Se ha estudiado la eliminación de compuestos como el bisfenol A (Huang et al., 2012) o antibióticos (sulfametoxazol) (De Luca et al., 2014)

- ✓ Ácido etilendiamino-N,N'-disucínico (EDDS) empleado por ejemplo en la degradación de efluentes textiles (Soares et al., 2015) o microcontaminantes y contaminantes emergentes presentes en aguas residuales urbanas (Klamerth et al., 2013; Miralles-Cuevas et al., 2015; Papoutsakis et al., 2015)
- ✓ Ácido nitrilotriacético (NTA) ha sido empleado como complejante del hierro para la degradación de diversidad de compuestos, por ejemplo Sun et al. lo emplearon en la degradación de la carbamacepina (Sun et al., 2013).
- ✓ Citrato también ha sido empleado como ligando del hierro para la degradación de contaminantes como herbicidas (Katsumata et al., 2006; Silva et al., 2007b) o fármacos (Miralles-Cuevas et al., 2014; Trovó & Nogueira, 2011).
- ✓ Ácidos húmicos, como ya se ha comentado en el caso anterior son buenos complejantes para el hierro y su eficacia ha sido demostrada en la eliminación de contaminantes emergentes (Klamerth et al., 2013).
- ✓ Sustancias tipo húmicas poseen características similares a los ácidos húmicos y, como veremos más en profundidad en el siguiente apartado pueden extraerse de diferentes fuentes. Ha sido demostrada la eficacia de estas sustancias como complejantes del hierro para la eliminación de contaminantes emergentes y el colorante cristal violeta (Gomis et al., 2013, 2014, 2015a, 2015b). Este tema se tratará más en profundidad en el apartado 1.4.5.

A la hora de escoger un agente complejante y las condiciones de operación para aplicar el proceso foto-Fenton en condiciones cercanas a la neutralidad se ha de tener en cuenta que la adición del complejante conlleva un aumento en el TOC y normalmente un aumento en el coste de operación. Por lo tanto, la adición debe limitarse a la mínima cantidad que asegura la mayor eficiencia de degradación.

1.3.6.4. Heterogeneización del proceso

En este caso se usan superficies sólidas que contiene hierro activo como por ejemplo minerales de hierro, partículas recubiertas de hierro o especies activas de hierro inmovilizadas sobre soportes sólidos. Entre los minerales de hierro empleados con este propósito se encuentran la hematita, goetita o magnetita (Li et al., 2014; Minella et al.,

2014; Wang et al., 2015). En algunos casos estos óxidos pueden emplearse micro o nanoparticulados.

Por otro lado, se han utilizado gran cantidad de materiales para soporte del hierro; algunos ejemplos son zeolitas (Gonzalez-Olmos et al., 2012), arcillas (Barreca et al., 2014), materiales carbonosos (Ye et al., 2014), membranas (Fernandez et al., 1999) o sílice (Liu et al., 2009). Emplear materiales adsorbentes (arcilla, zeolitas o carbón activo) como soportes del hierro resulta interesante puesto que estos materiales se regeneran durante el proceso foto-Fenton. Algo parecido ocurre con las membranas, donde el proceso foto-Fenton puede ser utilizado para prevenir el fouling o tratar el retentato, donde los contaminantes se encuentran en concentraciones elevadas. En algunos casos la reacción de foto-Fenton se atribuye a pequeñas cantidades de hierro que permanece en disolución. Sin embargo, esto no debe considerarse un inconveniente, puesto que el hierro en disolución normalmente se encuentra por debajo de los límites establecidos en la legislación (Santos-Juanes et al., 2017a).

1.3.6.5. Generación del hierro “in-situ”

La dosificación continua de especies reactivas de hierro (II) o hierro (III) en disolución, es otra de las estrategias seguidas para solucionar el inconveniente de inactivación del hierro en condiciones cercanas a la neutralidad. Como ocurre en el caso anterior, materiales sólidos que contienen hierro, liberan cationes en disolución que pueden ser empleados para llevar a cabo el proceso foto-Fenton. En este sentido, la estrategia más ampliamente aplicada ha sido la corrosión de hierro cerovalente (ZVI) (Katsoyiannis et al., 2015). Actualmente algunos autores han estudiado la posibilidad de combinar procesos reductivos con procesos oxidativos aprovechando ZVI como agente reductor y su capacidad de liberar hierro a la disolución para llevar a cabo el proceso foto-Fenton. En la etapa reductiva normalmente se eliminan grupos funcionales desactivantes (nitroaromáticos); la adición posterior de peróxido de hidrógeno e irradiación se emplea para eliminar compuestos más fácilmente oxidables (aminoaromaticos). Esta estrategia ha sido utilizada por varios autores para la eliminación compuestos como el arsénico en aguas a pH neutro (Katsoyiannis et al., 2015), mezclas de compuestos persistentes (ácido

p-toluensulfónico, ácido benzoico, ácido p-nitrobenzoico, acetaminofeno y cafeico); en este caso, el ácido p-nitrobenzoico es menos susceptible de ser oxidado, sin embargo, en la fase de reducción se reduce a 4-aminobenzoico, compuesto más fácilmente oxidable (Santos-Juanes et al., 2017b) o compuestos nitroaromáticos procedentes de la producción de, 2,4-dinitroanisol (Liu et al., 2015).

1.4. Sustancias tipo húmicas (STH)

Las sustancias húmicas son seguramente los materiales de carácter orgánico más ampliamente distribuidos en la naturaleza (Tonelli et al., 1997). Se trata de un conjunto de sustancias coloreadas de elevado peso molecular formadas por procesos bioquímicos a partir de residuos de origen vegetal o animal: presentan elevada resistencia a la degradación microbiológica o química. Se encuentran formadas por complejas macromoléculas orgánicas en las que las unidades fundamentales son compuestos aromáticos de carácter fenólico. En cuanto a su composición constan aproximadamente de un 50% de carbono, entre un 35-45% de oxígeno, un 5% de hidrógeno y un 3% de nitrógeno y azufre (MacCarthy, 2001).

1.4.1. Propiedades de las sustancias húmicas

Las diferentes propiedades que presentan las sustancias húmicas puede explicarse por las variaciones en el peso molecular, tipo y número de grupos funcionales y grado de condensación. Pueden clasificarse en tres grupos según su solubilidad (Figura 1.4-3):

Ácidos húmicos (Figura 1.4-1): de color pardo oscuro, poseen diversos grupos funcionales, son solubles en medio alcalino y precipitan al acidificar. Son la mayor fracción extraíble de las sustancias húmicas.

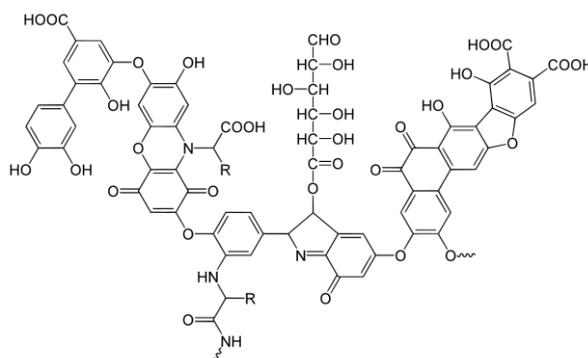


Figura 1.4-1 Estructura modelo de los ácidos húmicos

Ácidos fúlvicos (Figura 1.4-2): de color marrón amarillento, son solubles tanto en medio alcalino como ácido, poseen menor peso molecular, mayor proporción de cadenas

alifáticas y son más ricos en grupos fenólicos, hidroxílicos, carboxílicos y cetónicos. Son más abundantes en aguas naturales (Ma et al., 2001).

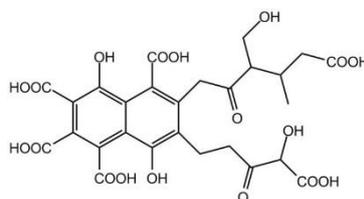


Figura 1.4-2 Estructura modelo de los ácidos fúlvicos

Huminas: de color negro, no son solubles en medio alcalino.

SUSTANCIAS HUMICAS

Ácidos Fúlvicos		Ácidos Húmicos		Huminas
Amarillo claro	Amarillo/marrón	Marrón oscuro	Gris-Negro	Negro
✓	Grado de condensación			+
2000	Peso molecular			300000
45%	Contenido de C			65%
48%	Contenido de O			30%
1400	Acidez intercambiable			500
+	Grado de solubilidad			-

Figura 1.4-3 Propiedades fisicoquímicas de las sustancias húmicas (Stevenson, 1994)

El número de moléculas precursoras de las sustancias húmicas es enorme, así como el número de combinaciones, por lo que la generación de estas sustancias puede darse por diversos mecanismos de reacción siendo uno de los más aceptados el mecanismo basado en la condensación de compuestos fenólicos y quinonas (Figura 1.4-4). En una primera etapa de este proceso tiene lugar la degradación total de carbohidratos simples y parcial de celulosa y proteínas; posteriormente, la celulosa es degradada por bacterias que sintetizan polifenoles, los cuales son oxidados a quinonas que reaccionan con compuestos nitrogenados para formar sustancias húmicas (Stevenson, 1994).

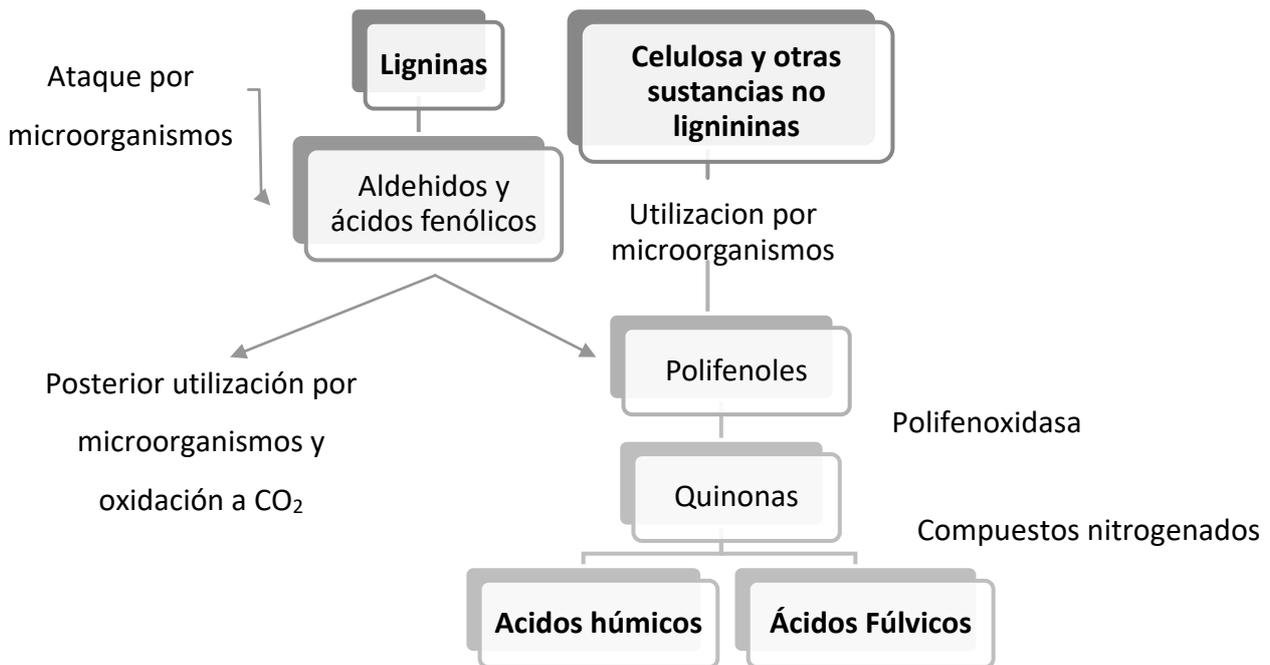


Figura 1.4-4 Teoría de los polifenoles para la formación de ácidos húmicos y fúlvicos

Si bien es el suelo el material que más ampliamente se ha empleado para obtención de sustancias húmicas, existen gran cantidad de materiales que son susceptibles de ser usados como materia prima para la obtención de sustancias tipo húmicas. Algunos ejemplos pueden ser carbones fósiles, turbas, estiércoles y compost procedentes de residuos orgánicos agropecuarios y urbanos.

1.4.2. Aislamiento de sustancias tipo húmicas

En el aislamiento de las sustancias húmicas se pueden distinguir tres procesos: extracción, fraccionamiento y purificación.

1.4.2.1. Extracción

Es el primer paso para el aislamiento de sustancias químicas y constituye la fase más crítica pues de ella depende el grado de “pureza” de las sustancias obtenidas. Debe evitarse la co-extracción de otro tipo de sustancias no húmicas, como pueden ser carbohidratos, grasas y aminoácidos (Ciavatta et al., 1990). El método de extracción idóneo debe cumplir los siguiente objetivos: no alterar la materia orgánica aislada, las sustancias húmicas obtenidas deben estar libres de impurezas inorgánicas, el peso

molecular medio de la fracción obtenida debe ser representativo de la muestra y por último, debe ser un método universal para cualquier tipo de sustrato (Stevenson, 1994).

Los factores que influyen en la extracción son:

- ✓ Concentración y tipo de disolvente de extracción: influye en la solubilidad de la materia orgánica; es importante escoger el medio que permita el mayor rendimiento posible. De todos los posibles tanto el NaOH como KOH son los más ampliamente empleados.
- ✓ Relación de extracción: relación entre el peso del sustrato y el volumen del disolvente de extracción (p/V). Esta relación influye también en la solubilidad de la materia orgánica. Depende del tipo de sustrato y debe ser adecuada para que la disolución no sature antes de que se extraiga toda la materia orgánica.
- ✓ Tiempo de extracción: según el método recomendado por la sociedad internacional de sustancias húmica (IHSS, del inglés International Humic Substance Society), 4 horas es suficiente para solubilizar la mayor parte de la materia orgánica presente en suelos.
- ✓ Temperatura de extracción: en el rendimiento de extracción, la temperatura es un factor relevante. En general, el incremento de la temperatura, independientemente del sustrato y del disolvente de extracción, mejora el rendimiento del proceso en un rango de temperatura de entre 20 y 80°C (Cegarra et al., 1994; Garcia et al., 1994).

1.4.2.2. Fraccionamiento

El principal objetivo del fraccionamiento es reducir su heterogeneidad para facilitar la aplicación de las técnicas analíticas empleadas en la caracterización de las STH. Se basa en la separación de los componentes, aprovechando alguna propiedad relacionada con su composición molecular.

Algunos de los procedimientos empleados para el fraccionamiento son:

- ✓ Variación del pH: basado en las distintas solubilidades de las sustancias según el medio sea alcalino o ácido.

- ✓ Cromatografía de elución sobre gel: se basa en la retención de los ácidos fúlvicos en un gel de resina debido a sus características fenólicas.
- ✓ Ultrafiltración y ultracentrifugación: basadas en las diferencias del tamaño molecular, estas técnicas pueden ser empleadas también en la purificación.
- ✓ Electroforesis de isoelectroenfoque e isotacoforesis: basadas en la carga eléctrica de las moléculas.

1.4.2.3. Purificación

Tiene como finalidad, la eliminación de sustancias que pueden ser co-extraídas con las sustancias húmicas, como pueden ser sales minerales, proteínas, lípidos, carbohidratos... Una opción generalizada para purificación de sustancias húmicas es someterlas a diálisis con una disolución de agua desionizada hasta que se liberen los iones cloruro, sodio y potasio (Trubetskaya et al., 2001).

1.4.3. Caracterización de sustancias tipo húmicas

Dado que la composición de estas sustancias varía en gran medida dependiendo del material y método a partir de cual son extraídas, no basta con un único método analítico para su caracterización. Además, puesto que se trata de sustancias compuestas por una mezcla compleja de moléculas, su estudio se dificulta si lo comparamos con el de moléculas discretas. Algunas de las técnicas que pueden ser empleadas para su caracterización son:

- ✓ Análisis elemental (C, H, N, S y O) combinado con la determinación de grupos funcionales (hidroxilos, carboxilos, fenólicos ...).
- ✓ Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), UV-visible, de fluorescencia.
- ✓ Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹³C.
- ✓ Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC).
- ✓ Dispersión de luz dinámica (DLS).

El primer problema de la caracterización es que la macromolécula debe fraccionarse en unidades más pequeñas; esto requiere el empleo de técnicas que son generalmente

difíciles y además alteran la estructura y algunas funciones de las sustancias húmicas. Por ello las técnicas espectroscópicas (simples y no destructivas) han sido ampliamente utilizadas para el estudio de la estructura y funcionalidad de estas sustancias (Chen et al., 2002).

1.4.4. Aplicaciones de las Sustancias húmicas

Las propiedades químicas que poseen las sustancias húmicas les permiten ser empleadas para gran diversidad de aplicaciones, algunas de las cuales son aplicaciones en agricultura, industriales, medioambientales y en biomedicina.

Aplicaciones en agricultura

Las sustancias húmicas juegan un papel importante desde un punto de vista agronómico puesto que influyen significativamente en la calidad y productividad del suelo. Además, estas sustancias muestran elevada capacidad de intercambio, cualidad muy importante en la fertilidad del suelo.

En diversos trabajos de investigación se han empleado tanto sustancias húmicas como diferentes sales y ácidos húmicos extraídos de las mismas, como aditivos en fertilizantes para aumentar la productividad agrícola y estimular el crecimiento (Albiach et al., 2001; Arancon et al., 2004; Fascella et al., 2015; Madejón et al., 2001; Sortino et al., 2013).

En el incremento de la productividad del suelo, uno de los efectos indirectos más importantes es la función de estas sustancias como quelantes del hierro, que permite que éste se encuentre disponible para las plantas. Por otro lado, en suelos pobres en materia orgánica la presencia de estas sustancias suponen un aporte importante de ésta. (Peña-Mendez et al., 2005)

Aplicaciones industriales

Existen diferentes ejemplos de aplicación de estas sustancias en diferentes sectores, algunos ejemplos son:

- como aditivos para el control del fraguado del hormigón en el sector de la construcción.

- para la preparación del cuero, inicialmente fueron empleados como colorantes y posteriormente para el curtido y como ingrediente en una disolución para el rematado del cuero.
- en carpintería se usan para la preparación de tintes y otros productos.
- en la industria cerámica se ha empleado principalmente como aditivos para mejorar la resistencia mecánica de la cerámica sin procesar, para mejorar las propiedades de fundición, para el coloreado de baldosas entre otras.
- para la producción de plásticos, como colorantes, endurecedores de espumas de poliuretano o ingredientes plastificantes para PVC.
- en la industria papelera
- en la formulación de detergentes dado su carácter surfactante (Savarino et al., 2010).
- en la industria textil para la tintura de los tejidos (Savarino et al., 2009).

Aplicaciones Biomédicas

Sustancias húmicas producidas a escala comercial son empleadas en medicina tanto veterinaria como humana. Existen diversos estudios desde hace mucho tiempo acerca de sus propiedades medicinales; este interés se ha visto incrementado en las últimas décadas. Los ácidos húmicos contienen compuestos con propiedades farmacológicas o medicinales potencialmente importantes (Peña-Mendez et al., 2005).

Aplicaciones Medioambientales

La principal tarea de las sustancias húmicas en la química medioambiental es la eliminación de metales tóxicos, contaminantes orgánicos de origen antropogénico y otros contaminantes del agua. En este sentido, las sustancias húmicas han sido ampliamente estudiadas en los últimos años para la eliminación de contaminantes de las aguas. Como se menciona en el apartado 1.3.6.3, estas sustancias han sido empleadas como complejantes de hierro para la eliminación de diversos contaminantes mediante proceso foto-Fenton a pH neutro.

1.4.5. Sustancias tipo-húmicas aisladas a partir de residuos sólidos urbanos para aplicación de proceso foto-Fenton en condiciones cercanas a la neutralidad

Se han obtenido sustancias tipo húmicas a partir de residuos sólidos urbanos. Estas sustancias están compuestas por una mezcla de macromoléculas cuyo peso molecular abarca un amplio rango de pesos moleculares medios (67-463 kg/mol) y consisten en largas cadenas alifáticas, anillos aromáticos y grupos funcionales que contienen oxígeno y nitrógeno (Montoneri et al., 2011).

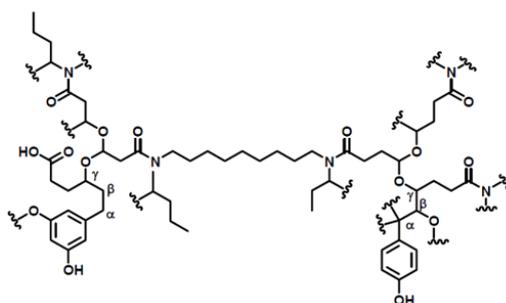


Figura 1.4-5 Aproximación a la molécula de sustancias tipo húmicas aisladas a partir de residuos sólidos urbanos

Si nos fijamos en la Figura 1.4-5 vemos que estas sustancias muestran similitudes estructurales básicas con los ácidos húmicos (Figura 1.4-1) y fúlvicos (Figura 1.4-2); que tienen un papel medioambiental muy importante, especialmente en la descontaminación de aguas. En este sentido, resulta interesante el posible uso de estas sustancias para la eliminación de contaminantes de las aguas, ya que lleva el beneficio añadido de que se estaría revalorizando un residuo. Existen trabajos recientes que han demostrado la capacidad de estas sustancias de actuar como fotocatalizadores en la degradación de clorofenoles (Avetta et al., 2013), colorantes y fármacos (Gomis et al., 2013, 2014). Esta actividad foto catalítica de las STH puede estar relacionada con el aumento de la generación de especies reactivas, sin embargo, también hay que tener en cuenta el efecto pantalla que suponen cuando se emplea como fuente de irradiación luz solar debido al color que poseen.

Otra posible aplicación de estas sustancias, teniendo en cuenta su estructura, es su empleo como complejantes del hierro en proceso foto-Fenton en condiciones de neutralidad (como se menciona en el apartado 1.3.6.3). Además, estas sustancias poseen cantidades significativas de hierro en su composición (0.1-0.8%), por lo que cabría esperar que facilitaran el proceso foto-Fenton sin la necesidad de adicionar hierro extra. Existen estudios sobre la degradación del colorante catiónico violeta cristal (Gomis et al., 2013), cuyos resultados demostraron que: a pesar de que el colorante experimenta cierta fotólisis, la adición de STH obtenidas a partir de residuos sólidos, o la de peróxido, mejoraron el proceso; que la combinación de STH y peróxido mejora aún más la degradación, (esto podría ser atribuible a un proceso tipo Fenton a pH neutro); y por último, que la adición de Fe(II) aumenta en mayor medida la velocidad de degradación, lo que indica que en este caso, el hierro presente en las STH no es suficiente para producir un proceso foto-Fenton de forma eficiente.

En otro trabajo (Gomis et al., 2015a) se estudió la degradación de una mezcla de seis contaminantes emergentes; en este caso se empleó un diseño experimental para estudiar como afectaban a la degradación de los contaminantes las variables pH, concentración de Fe y la concentración de STH. Los resultados obtenidos demostraron que la región de pH donde se podía aplicar el proceso foto-Fenton sin una pérdida significativa de eficiencia se extendía hasta valores cercanos a 5, se determinó que la concentración óptima de STH se encontraba entre 10-20 mg/L y la concentración de Fe de 5 mg/L.

Por otro lado, existen también estudios (Gomis et al., 2015b) que demuestran que los STH son relativamente estables a lo largo del proceso de oxidación, no observándose pérdidas significativas. Además, diferentes bioensayos de toxicidad han demostrado que se trata de sustancias no tóxicas y poco biodegradables.

Como hemos visto en los apartados 1.4.4 y 1.4.5 son muchas las aplicaciones que tiene las sustancias tipo húmicas. Además, también se ha visto que éstas pueden ser obtenidas a partir de residuos urbanos, lo cual les da un valor añadido, pues se está

revalorizando un residuo. Todo esto hace interesante el estudio de la posibilidad de emplear otro tipo de residuos orgánicos para la extracción de STH, como por ejemplo los derivados de la producción del aceite de oliva.

1.5. La industria olivarera y los residuos generados

El cultivo del olivo es una práctica que se ha venido desarrollando en la mayoría de los países de la ribera mediterránea desde la antigüedad hasta nuestros días. En esta zona se concentra el 99% de la superficie de olivar y se genera el 98% de la producción mundial de aceite de oliva. España destaca con un 52.63 % de la producción (Tabla 1.5-1), siendo el principal productor y exportador de este producto.

Tabla 1.5-1 Principales países productores de aceite de oliva. Fuente: Consejo Oleícola Internacional, 2016/2017

País	Producción media (miles Tm)	%
España	1311.30	52.63
Italia	243	9.75
Grecia	260	10.44
Turquía	177	7.10
Siria	110	4.42
Marruecos	110	4.42
Túnez	100	4.01
Portugal	93.6	3.76
Resto	86.5	3.47
Total mundial	2491.4	100

1.5.1. Proceso productivo del aceite de oliva

El sector olivarero es una de los cultivos agrícolas más importantes en España y la producción del aceite de oliva una de las industrias agroalimentarias de mayor relevancia.

Existen tres tipos de procesos de extracción del aceite de oliva (Figura 1.5-1): proceso de extracción tradicional, extracción en tres fases y extracción en dos fases. En todos ellos, primero se lavan las aceitunas y después se muelen con el objetivo de romper las células de la pulpa y dejar que el aceite salga. Una vez molidas, la pasta obtenida debe ser agitada lentamente (batido) con el objetivo de aumentar el tamaño de las gotas de aceite y romper las emulsiones aceite/agua para facilitar su posterior separación.

En el proceso de extracción tradicional, después del batido se separa la fase líquida (aceite + agua de vegetación) de la fase sólida de las aceitunas por presión, y finalmente

se separa el aceite de oliva del agua por decantación. Este proceso se encuentra en desuso en la actualidad.

En el proceso en tres fases, tras el batido se añade agua a la pasta y se centrifuga para separar la fase sólida de las fases líquidas; de esta forma se obtiene por un lado la fase sólida (orujo) y por otro, dos fases líquidas (aceite con una pequeña proporción de agua y agua con una pequeña proporción de aceite). Por último, ambas fases líquidas son sometidas a centrifugación de nuevo con el fin de recuperar la parte de aceite que acompaña a la fase acuosa y eliminar la humedad que contiene la fase oleosa. El mayor inconveniente que presenta el proceso de extracción en tres fases es que genera grandes cantidades de aguas residuales (alpechín).

En el proceso de separación en dos fases, la pasta procedente del batido es centrifugada sin adicionar agua previamente; de esta forma se obtiene por un lado el aceite de oliva y por otro lado la pulpa y agua de vegetación (alperujo). EL aceite obtenido se debe centrifugar de nuevo con el fin de eliminar por completo la humedad. En este caso el volumen de agua consumida y agua residual generada es mucho menor que en el caso de separación en tres fases.

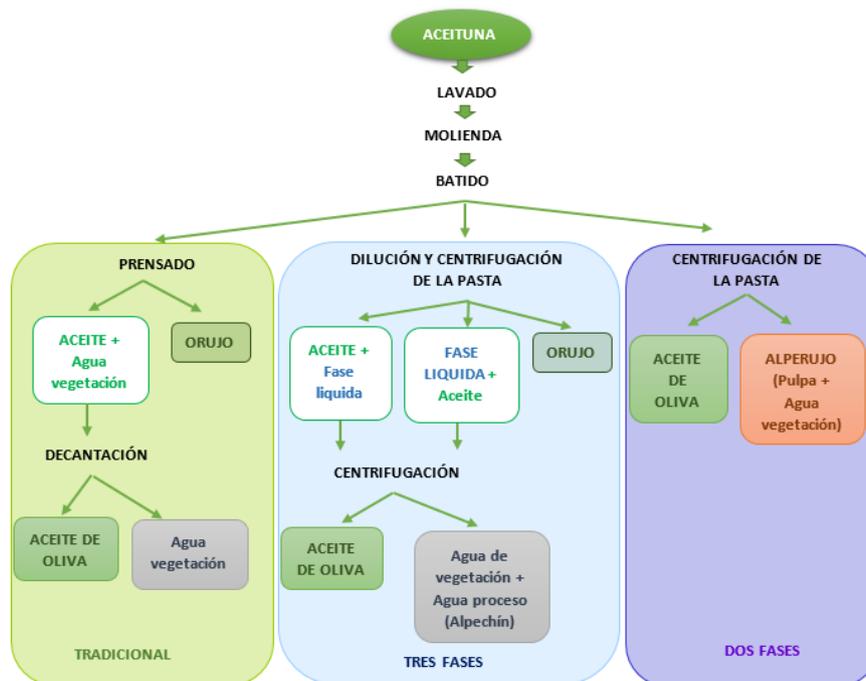


Figura 1.5-1 Esquema resumen de los diferentes procesos de obtención del aceite de oliva

1.5.1.1. Alpechín

Como se describe en el apartado anterior, el alpechín es el agua residual generada en el proceso de extracción del aceite de oliva (especialmente en el de tres fases y en pequeña cantidad en el de dos). Se trata de un agua ligeramente ácida de color negro rojizo cuya composición varía cualitativa y cuantitativamente con el tipo de aceituna, las condiciones climáticas, el tipo de cultivo y el tipo de proceso de extracción del aceite empleado.

Se caracterizan por poseer valores elevados DQO y DBO (valores mayores de 110 y 170 g/L respectivamente) (Stasinakis et al., 2008). Los componentes principales presentes en estas aguas son compuestos fenólicos, azúcares y ácidos grasos (Dermeche et al., 2013).

Se trata de aguas tóxicas, cuya degradación en la naturaleza o en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) resulta complicada y en el caso de ser vertidas sin ser sometidas a un tratamiento adecuado, pueden generar un elevado impacto ambiental, que va desde colorear las aguas naturales y efectos tóxicos sobre los ecosistemas acuáticos hasta contaminar las aguas superficiales y subterráneas.

Los alpechines se generan principalmente durante los meses de noviembre a marzo (periodo en el que tiene lugar la producción del aceite).

1.5.1.2. Alperujo

Como se ha comentado anteriormente, el alperujo es el residuo o subproducto generado en la producción en dos fases del aceite de oliva que se compone del residuo sólido (pulpa) y agua de vegetación. Se caracteriza por poseer un alto contenido en humedad (en torno al 56%), un pH ligeramente ácido (cerca de 5), un elevado contenido en materia orgánica (en torno al 90%), contenido graso (10%), de polifenoles hidrosolubles (0.9%), notable contenido de nitrógeno total y carbono orgánico total y contenido en potasio, fósforo, micronutrientes y metales pesados relativamente bajos (Alburquerque et al., 2004, 2006).

Generalmente el alperujo se emplea para obtener aceite mediante una segunda centrifugación que genera un aceite homologado como de primera extracción. Sin embargo, dadas las características especiales del alperujo (elevada humedad, alto contenido de sólidos finos y azúcares, ácidos orgánicos y polialcoholes, presencia de hidrocarburos policíclicos en el aceite extraído del orujo) para su consumo es necesario aplicarle un procesado y un estricto refinado que incrementa considerablemente los costes de producción. De ahí surge la necesidad de aprovechamientos alternativos de este residuo.

Algunos ejemplos de aprovechamientos alternativos son:

- ✓ Aprovechamiento energético: incluye la combustión directa del orujillo y del hueso de la aceituna para la generación de energía térmica, la generación de energía eléctrica en ciclos de vapor (el residuo se quema, el vapor generado es conducido a una turbina que lo transforma en electricidad) y la producción de metano mediante la digestión anaerobia del residuo.
- ✓ Empleo en preparación de alimento para animales
- ✓ Aplicación directa al suelo como remedio frente a la erosión y sustrato para la producción de hongos comestibles.
- ✓ Fuente de hemicelulosas mediante tratamiento alcalino para su uso como agentes espesantes, estabilizadores o emulsiones de uso en cosméticos e industria farmacéutica y alimentaria (Derriche & Berrahmoune, 2007)
- ✓ Vermicompostaje y compostaje dado su elevado contenido en materia orgánica (con un alto grado de humificación), su estabilidad y sus contenidos minerales (Caravaca et al., 2006; González Vicente, 2005; Kohler et al., 2008).

2. OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca dentro de los siguientes proyectos de investigación: “Desarrollo de nuevas estrategias basadas en la integración de procesos fotoquímicos solares con otras técnicas avanzadas para el tratamiento de aguas residuales complejas (AQUAFOTOX)” financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad dentro del programa de solicitudes de ayuda para proyectos de investigación, subprograma de proyectos de investigación fundamental no orientada (CTQ2012-38754-C03); “Isolation, characterization and screening of environmental applications of bio-organic substances obtained from urban biomasses” (ENVIRONBOS, PIRSES-GA-2010-269128) financiado por la Unión Europea y “Enhancing water quality by developing novel materials for organic pollutant removal in tertiary water treatments” (MAT4TREAT, H2020-MSCA-RISE-2014) financiado también por la Unión Europea.

Los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral son profundizar en el tratamiento de contaminantes comúnmente encontrados en los efluentes de la industria alimentaria, así como la posibilidad de valorizar residuos orgánicos para su utilización en la eliminación de contaminantes.

Para desarrollar los objetivos generales se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Comparar a escala de laboratorio la eficacia de diferentes procesos de oxidación avanzada en la eliminación de contaminantes representativos de la industria alimentaria: compuestos fenólicos y polifenoles.
- Evaluar los riesgos ambientales de dichos contaminantes antes, durante y después de ser sometidos a los tratamientos de oxidación, determinando su posible efecto tóxico sobre organismos pertenecientes a distintos niveles tróficos, así como sobre biomarcadores moleculares.
- Caracterizar mediante técnicas de fluorescencia sustancias tipo húmicas empleada en el proceso foto-Fenton.
- Valorizar residuos procedentes de la industria olivarera a través de la extracción de sustancias tipo húmicas (STH) para conducir el proceso foto-Fenton en

condiciones más suaves de pH, caracterizar dichas sustancias y mejorar el proceso de obtención.

- Estudiar los efectos de la aplicación de los STH en procesos de fotooxidación (foto-Fenton a pH próximo a la neutralidad).
- Colaborar en el desarrollo herramientas informáticas y matemáticas que faciliten la manipulación y análisis de datos de fluorescencia (matrices de Excitación Emisión) con objeto de conocer la composición de muestras complejas a partir de dichos datos.

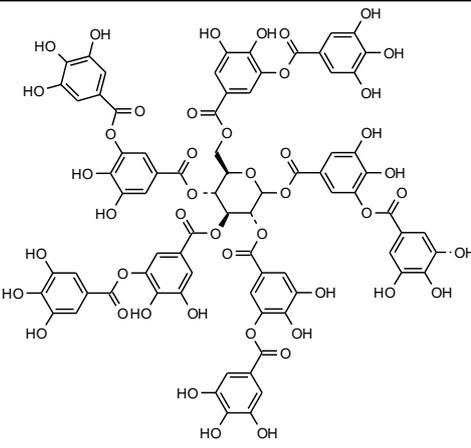
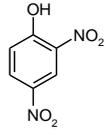
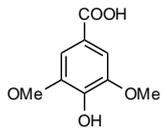
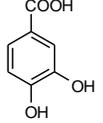
3. MATERIAL Y MÉTODOS

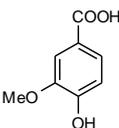
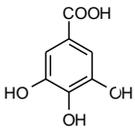
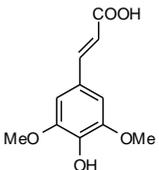
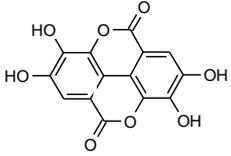
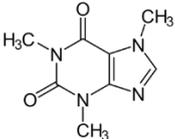
3.1. Contaminantes y reactivos

3.1.1. Contaminantes

En la presente tesis doctoral se han empleado una mezcla de fenoles y polifenoles comúnmente encontrados en aguas residuales procedentes de la industria alimentaria (por ejemplo, aguas procedentes de la producción del vino o aceite, de la industria conservera o del cocido del corcho) y cafeína. En la Tabla 3.1-1 se resumen el nombre del contaminante modelo, su estructura química y el porcentaje de pureza. Los compuestos puros para poder trabajar con aguas preparadas han sido adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich.

Tabla 3.1-1 Nombre, estructura química y riqueza de los contaminantes empleados en la presente tesis.

Compuesto	Estructura química	Riqueza (%)
Ácido Tánico		98
2,4-Dinitrofenol		99.4
Ácido Siríngico		98
Ácido Protocateuico		98

Ácido Vanílico		99
Ácido Gálico		97
Ácido Sinápico		98
Ácido Elágico		95
Cafeína		99

3.1.2. Reactivos

En la Tabla 3.1-2 se encuentran recogidos los reactivos y disolventes químicos empleados en la presente tesis, se incluye su fórmula química, procedencia comercial, grado de pureza.

Tabla 3.1-2 Reactivos y disolventes químicos generales empleados en la presente tesis.

Producto	Fórmula Química	Procedencia	Riqueza
Agua ultra pura grado Mili-Q	-	-	-
Acetonitrilo	CH ₃ CN	Panreac	Grado cromatográfico
Metanol	CH ₃ OH	Panreac	Grado cromatográfico
Ácido fórmico	HCOOH	Panreac	85%
Sulfato ferroso	FeSO ₄ ·7H ₂ O		99%
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Panreac	30% (p/v)
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	Panreac	85%
Hidróxido de Sodio	NaOH	Panreac	99.9%
Cloruro de hierro	FeCl ₃ ·6H ₂ O	Panreac	99%
Tiras de peróxidos	-	MQuant	-

1,10-fenantrolina	C ₁₂ H ₈ N ₂	Sigma-Aldrich	99%
Acetato de amonio	C ₂ H ₇ NO ₂	Merk	99%
Ácido acético	CH ₃ COOH	Merk	100%
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Merk	99%
Metavanadato de amonio	NH ₄ VO ₃	Sigma-Aldrich	99.9%
Medio de cultivo BBM (Bold's Basal Medium)	-	Preparado en laboratorio	-
Medio de Reconstitución	-	Preparado en laboratorio	-
Medio de cultivo selectivo	-	Preparado en laboratorio	-
YPER (Reactivo de extracción de proteína de levadura)	-	ThermoFisher	-
MU-Gal		Sigma-Aldrich	99%
DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-oxido)	C ₆ H ₁₁ NO	Sigma-Aldrich	97%
TMP (2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona)	C ₉ H ₁₇ NO	Sigma-Aldrich	98%
Bromuro de Potasio	KBr	Sigma-Aldrich	99.9%

3.2. Reactores y fuentes de irradiación

3.2.1. Simulador solar

Para los experimentos a escala de laboratorio se empleó un simulador solar de la casa comercial de ABET Technologies, modelo 11014 Sun 2000 (Figura 3.2-1). Este simulador se encuentra equipado con una lámpara de xenón de 550 w que genera un espectro uniforme similar al que llega a la superficie de la tierra procedente de la radiación solar. El equipo cuenta con un reflector elipsoidal capaz de recoger el 70% de la radiación que produce la lámpara y posteriormente se focaliza mediante un integrador óptico. Así se consigue un haz de luz divergente que es recogido por las lentes que la unen en un área de 160x160 mm.

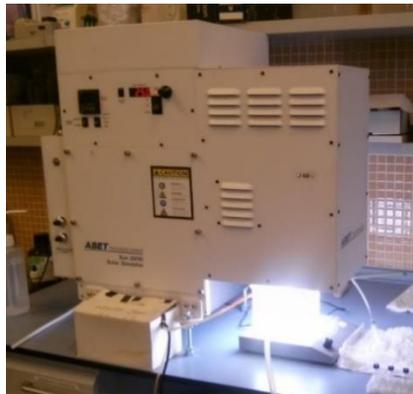


Figura 3.2-1 Simulador solar de laboratorio

3.2.2. Fotorreactor solar CPC

Los captadores parabólicos compuestos (CPC) son los reactores más comúnmente empleados para aplicar la radiación solar al tratamiento de aguas residuales. Se trata de una combinación entre captadores parabólicos y sistemas planos estáticos. Están formados por rectores tubulares cilíndricos rodeados por una superficie de aluminio altamente anodizado. Los CPC además de proporcionar concentración solar mediante dispositivos estáticos, proporcionan las mejores ópticas para sistemas de baja concentración y pueden ser diseñados con un rango de concentración cercano a uno

(FC)=1, de forma que pueden captar toda la radiación UV que alcanza el área de apertura del CPC (tanto la directa como la difusa) y reconducirla al reactor (Figura 3.2-2).

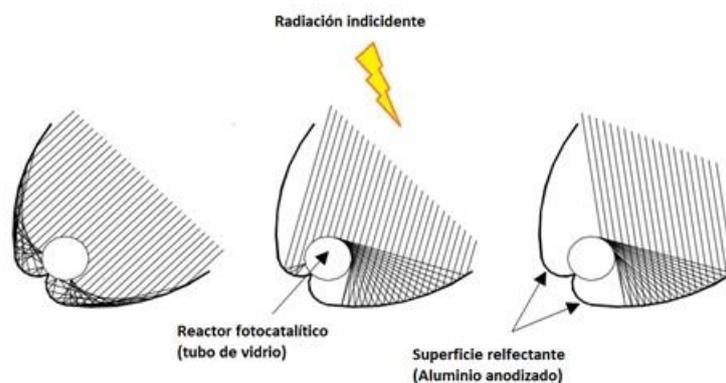


Figura 3.2-2 Radiación solar reflejada en un captador parabólico compuesto (FC=1). Tomado de (Blanco, 2002)

La configuración más usual en el fotorreactor es la tubular debido a la sencillez de manejo del fluido. Dentro de la misma uno de los parámetros más importantes es el diámetro del tubo puesto que se ha de garantizar una adecuada relación entre la distribución de la iluminación, la concentración del catalizador y la eficiencia del proceso catalítico. Los diámetros más habituales en este tipo de reactores se encuentran entre 25 y 50 mm. Un diámetro mayor dejaría más volumen de fluido sin iluminar y provocaría una disminución en la eficiencia del proceso, mientras que diámetros menores conllevarían un aumento de las pérdidas de carga. Otro factor que influye de forma importante es la forma en la que la radiación incide y la longitud del camino óptico que recorre ésta en su interior.

La superficie reflectante dirige y refleja la luz hacia el interior del reactor para conseguir el máximo aprovechamiento de ésta y evitar pérdidas. Los materiales empleados para la superficie reflectante en los reactores empleados para procesos fotocatalíticos han de tener elevada transmittancia en el UV y resistencia a la degradación, los más empleados son: fluoropolímeros, materiales acrílicos, varios tipos de vidrio, aluminio anodizado y cuarzo.

Para los ensayos con luz solar real se empleó una planta piloto de la casa comercial ECOSYSTEM modelo SOLARDETOX® ARCADUS-2005/0.25 de 4 litros de capacidad. La planta dispone de un depósito desde el cual se impulsa la muestra mediante una bomba centrífuga PanWorld 5PX-Z con rotor cerrado de polipropileno y fibra de vidrio. El volumen mínimo requerido por la planta es de 3.5 L para evitar la formación de burbujas de aire que dificultan un correcto funcionamiento y el volumen máximo que se puede emplear es de 5 L. La planta se compone de 4 tubos de borosilicato de 32 mm de diámetro y 750 mm de longitud, siendo el volumen total irradiado de 1.8 L. Los tubos están situados sobre concentradores tipo CPC de aluminio anodizado; la estructura se encuentra instalada con una inclinación de 30°, de acuerdo con la latitud local. La superficie útil irradiada es de 0.257 m² y la temperatura máxima de trabajo 55°C. Además, se encuentra equipada con un radiómetro ACADUS 85 que permite medir tanto la radiación instantánea (W*m²) como acumulada (W*h).



Figura 3.2-3 Planta pilo de fotocatalisis solar de 4L.

3.2.3. Reactor ozono

Para los experimentos con ozono se empleó un generador de ozono Ozogas, T.R.C.E. 4000 (Figura 3.2-4 izquierda), capaz de producir hasta 8 g/h cuando se alimenta con oxígeno y una producción de aproximadamente la mitad cuando es alimentado con aire. En nuestro caso es alimentado con oxígeno comercial (Praxair), ajustándose la dosis de ozono a la indicada en cada experimento.

Las reacciones se llevaron a cabo en un reactor cilíndrico de vidrio (Figura 3.2-4 derecha) de 1L de capacidad con funda interior de cuarzo. El reactor posee una placa porosa en

la base, que permite obtener un tamaño adecuado de las burbujas de gas en el líquido, favoreciendo una buena transferencia de materia. El reactor cuenta con cuatro salidas que pueden emplearse para la eliminación de gases, toma de muestras, sondas de temperatura etc. Además, está provisto de una doble camisa que permite la recirculación de agua para el control de la temperatura.



Figura 3.2-4 Generador de ozono Ozogas T.R.C.E. 4000 (izquierda) y reactor cilíndrico de vidrio con lámpara de xenón de inmersión axial sumergida (derecha)

3.3. Condiciones de ensayo

3.3.1. Ensayos en simulador solar

Se emplearon como reactores, vasos de precipitados de 250 ml de capacidad con agitación magnética suave continua y refrigeración para mantener la temperatura en torno a 30-35°C. Se aplicó un filtro pyrex para eliminar la radiación por debajo de 300 nm.

En el estudio de la degradación de los compuestos fenólicos la concentración inicial de cada uno de los contaminantes empleados fue de 1 mg/L. Como fuente de hierro(II) se empleó sulfato ferroso, con una concentración inicial desde 1 hasta 5 mg/L según experimento. El pH se ajustó mediante la adición de ácido sulfúrico diluido o hidróxido de sodio. Finalmente se añadió el peróxido de hidrógeno con una concentración inicial en el rango de 13.8 – 96.7 mg/L dependiendo del experimento (que se corresponden con 1/4 y 7/4 de la cantidad estequiometría necesaria para oxidar completamente todos los contaminantes).

Para el estudio del comportamiento de aplicación de sustancias tipo húmicas en proceso foto Fenton se empleó como fuente de Fe (III) cloruro de hierro, con una concentración inicial de 5 mg/L. El pH se ajustó a 5 mediante la adición de ácido sulfúrico diluido. Finalmente se añadió H₂O₂ con una concentración 2 mM.

Por último, en la comprobación de la actividad fotocatalítica de STH asiladas a partir de alperujo se empleó como contaminante modelo cafeína. La concentración inicial fue de 5 mg/L. Se empleó sulfato ferroso como fuente de Fe (II), a una concentración inicial de 5 mg/L. Se ajustó el pH a 5 mediante la adición de ácido sulfúrico diluido. Por último, se añadieron 60 mg/L de peróxido de hidrógeno (cantidad estequiométrica).

3.3.2. Ensayos en planta piloto

Al igual que en caso de los experimentos en simulador solar, para los ensayos en planta piloto se empleó una concentración inicial de 1 mg/L de cada uno de los contaminantes. La concentración de Fe(II) fue de 3 mg/L y el pH se ajustó a 3.9 mediante la adición de

ácido sulfúrico concentrado. A lo largo del proceso se controló la cantidad de H₂O₂ mediante kits de medición de peróxido, y se dosificó de forma controlada para evitar su presencia en las muestras que posteriormente se usaron para la realización de ensayos de toxicidad.

3.3.2.1. Método para la medición de la radiación solar

Como se ha comentado anteriormente la planta solar cuenta con un radiómetro modelo ARCADUS 85 que nos permite medir tanto la radiación instantánea en cada momento como la acumulada a lo largo del tiempo que dura el tratamiento.

Dada la variación intrínseca de la radiación solar, resulta imprescindible aplicar un parámetro capaz de corregir este efecto. En este trabajo se ha empleado el parámetro t_{30w} , que se define como el tiempo necesario para alcanzar la radiación acumulada medida en cada caso, suponiendo que se ha tenido una radiación constante de 30w/m². Así, dicho parámetro se ha calculado a través de la Ec. 3.3-1.

$$t_{30w} \text{ (min)} = \frac{R_{ac} \times 60(\text{min/h}) \times V_i}{R_m \times A \times V_T} \quad \text{Ec. 3.3-1}$$

Donde R_{ac} es la radiación acumulada en W·h; V_i es el volumen irradiado en L; R_m es la radiación media considerada (30 w/m² en este caso); A es el área irradiada en m²; y V_T es el volumen total tratado en la planta.

3.3.3. Ensayos con ozono

Se emplearon 250 ml de disolución con una concentración inicial de los contaminantes de entre 1 y 6 mg/L dependiendo del experimento. El pH inicial fue ajustado al valor inicial correspondiente a cada experimento mediante a la adición de ácido sulfúrico o hidróxido de sodio diluidos. El flujo de gas se mantuvo en 5 LN/min y la dosis de ozono se varió en el rango de 0.1 a 1 g/h según experimento.

En las degradaciones en las que se combinó el ozono con la luz UVA-visible se acopló una lámpara de inmersión axial dentro del reactor cilíndrico. Se trata de una lámpara de

xenón de 150 w de la casa comercial Peschl UV Consulting. Para ser sumergida en la disolución la lámpara se introduce previamente en una funda de vidrio. Se empleó agua para termostatar la reacción.

3.3.4. Aplicación de sustancia tipo húmicas en proceso foto-Fenton

Se combinaron disoluciones de 20 mg/L de sustancias tipo húmicas (STH) con disoluciones de Fe (III) a diferentes concentraciones (1-10 mg/L) para el estudio de la desactivación de la fluorescencia. Para el ajuste del pH se empleó ácido sulfúrico diluido en el caso de los experimentos a pH 3 e hidróxido de sodio en los casos de los experimentos a pH 5 y 7. Para los estudios de la evolución de las STH se combinó una disolución de 20 mg/L de STH una disolución de 5 mg/L de Fe(III) y se irradió la mezcla en simulador solar en presencia (2.2 mmol) y ausencia de H₂O₂.

3.3.5. Proceso de extracción de Sustancias Tipo Húmicas (STH)

Para la obtención de las sustancias tipo húmicas se ha empleado como residuo de partida alperujo procedente de la extracción del aceite de oliva en dos fases de una almazara en el municipio de Millena (provincia de Alicante). Dicho residuo se ha empleado directamente, sin ser sometido a ningún tipo de fermentación o maduración.

En primer lugar, se lleva a cabo una **digestión básica**. Se toman 0.125 kg en peso seco del material de partida y añade 0.5 L de una disolución de KOH de concentración variable según el pH deseado (entre 7 y 13). Como reactor se emplea un vaso de precipitados pyrex de 1 L de capacidad. La mezcla se calienta a 65°C empleando un agitador magnético con calefacción y placa calefactora de vitrocerámica IKA® C-MAG HS 7 equipado con un termómetro de contacto IKA® ETS-DE (Figura 3.3-1). Se mantiene a esa temperatura y en agitación (aproximadamente 400 rpm) durante diferentes tiempos (4 y 24 horas). Transcurrido este tiempo se paran la agitación y el calentamiento y se deja la mezcla en reposo durante toda la noche.



Figura 3.3-1 Agitador magnético con calefacción IKA® C-MAG HS 7 equipado con un termómetro de contacto IKA® ETS-DE

La mezcla procedente de la digestión se somete a un primer **filtrado de gruesos** con la finalidad de eliminar la fracción insoluble que aún permanece en la mezcla. Se emplea una bomba de vacío modelo VWR VCP 80 conectada a un Matraz quitasatos con un embudo Buchner. Se emplean filtros de diferentes tamaños de poro, siendo el más pequeño de 100 μ m. Los sólidos retenidos en el filtro se lavan con 5 litros de disolución de KOH a la misma concentración empleada en la digestión con el fin de arrastrar y terminar de extraer todos los sólidos de menor tamaño.



Figura 3.3-2 bomba de vacío VWR VCP 80

A continuación, se someten los 5 litros de solución a **ultrafiltración**. Para ello se emplean membranas cerámicas de la casa comercial TAMI Industries con tamaños de poro de 300 kg/mol, 150 kg/mol y 50 kg/mol. Estas membranas tienen 10 mm de diámetro interno, 250 mm de longitud y 0.0132 m² de área de permeado. Operan a T^{as} menores de 250 °C, presiones menores de 10 bares y soportan un rango de pH de 2 a 14. El montaje

experimental se muestra en la Figura 3.3-3. Consta de un depósito desde el cual la muestra es impulsada a través de la membrana con la ayuda de una bomba centrífuga CAT PUMPS 3C91241. La membrana opera en flujo tangencial de 4.L/m²h a 2 bares de presión y temperatura de 25 grados. Tras la filtración se obtiene aproximadamente 0.5 L de retentato (10% del volumen inicial).



Figura 3.3-3 montaje experimental empleado para la ultrafiltración. Derecha: Depósito con resistencia para el control de la temperatura, caudalímetro, soporte con la membrana y recipiente receptor del filtrado. Izquierda: bomba con manómetro para la impulsión del fluido y filtro de seguridad.

El filtrado procedente de las membranas de mayor tamaño de poro (300 kg/mol y 150 kg/mol) se pasa por el siguiente tamaño de poro (150 kg/mol y 50 kg/mol respectivamente) y el procedente de la membrana de menor tamaño de poro es descartado.

El filtrado procedente de las membranas de mayor tamaño de poro (300 kg/mol y 150 kg/mol) se pasa por el siguiente tamaño de poro (150 kg/mol y 50 kg/mol respectivamente) y el procedente de la membrana de menor tamaño de poro es descartado. Por último, la materia húmeda procedente de la ultrafiltración (retentato) se **seca** en estufa a unos 65°C durante 48hs

En las sustancias obtenidas se observó cierto contenido inorgánico, probablemente debido a la presencia de sales procedentes del KOH. Por ello se decidió someterlas a un proceso de **diálisis**. Se emplearon membranas de celulosa con un tamaño de poro de 12000 Da, adquiridas de sigma aldrich. Se preparó una disolución muy concentra de la muestra (aproximadamente 2g en 15 mL) y se introdujo en la membrana. Una vez sellada la membrana se introdujo en un vaso de precipitados con agua mili-Q (Figura 3.3-4). Se midió la conductividad del agua y se paró el proceso cuando la gráfica del valor de la conductividad frente al tiempo se hizo asintótica (Figura 3.3-5). La solución en el interior de la membrana se secó en estufa a unos 65°C hasta eliminar todo el contenido acuoso. Se obtuvieron aproximadamente 0.8 gr de sustancia tras la diálisis.



Figura 3.3-4 membrana de diálisis

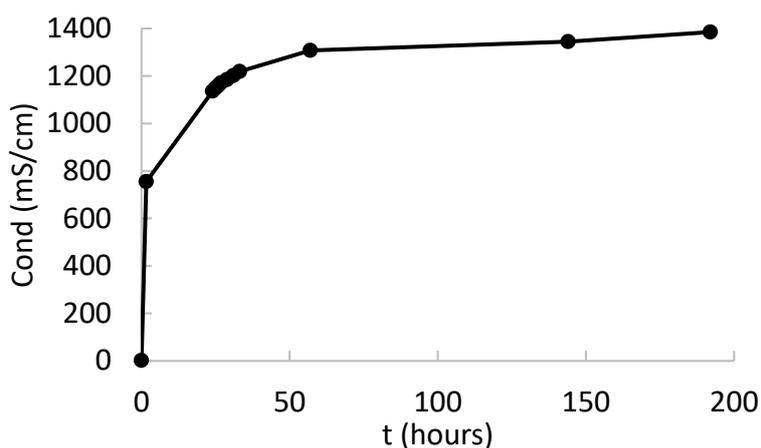


Figura 3.3-5 conductividad frente a tiempo durante el proceso de diálisis

3.4. Técnicas analíticas y equipos

3.4.1. Medida del Carbono Orgánico disuelto (COD)

La determinación del COD nos permite evaluar el grado de mineralización de los contaminantes durante el proceso de degradación. Para ello se ha empleado un analizador de carbono orgánico total Shimadzu modelo TOC-VCSH equipado con automuestreador modelo ASI-V (Figura 3.4-1). Este equipo mide el carbono total (CT) y el carbono inorgánico total (CIT) disueltos en el agua, el carbono orgánico disuelto (COD) viene proporcionado por la diferencia entre ambas medidas.



Figura 3.4-1 Analizador de Carbono Orgánico Total

Se realiza el análisis del CT mediante la combustión de las muestras a 680 °C; para ello emplea un catalizador de platino soportado sobre esferas de alúmina. De esta forma el CT se oxida a CO₂, el cual es arrastrado por aire de alta pureza, enfriado y secado mediante un deshumificador. Posteriormente, este CO₂ generado durante la combustión es medido mediante un detector de infrarrojo no dispersivo (NDIR) dando lugar a un pico cuya área es proporcional a la cantidad de carbono presente en la muestra.

Para la medida del CIT la muestra es introducida en un recipiente de reacción que contiene ácido fosfórico (25% p/V) y se burbujea aire. De esta forma, se genera CO₂ procedente de la descomposición de los carbonatos y bicarbonatos, el cual es arrastrado por el aire de alta pureza y medido en el NDIR al igual que en el caso del CT.

La medida del COD requiere un acondicionamiento previo de las muestras, consistente en la eliminación de sólidos en suspensión. Para ello se toman unos 20 mL de muestra y se filtran a través de filtros de PTFE de 0.45 μm .

3.4.2. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC)

El seguimiento de la concentración de los contaminantes durante los procesos de degradación se realiza mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC). Esta técnica es ampliamente empleada gracias a la alta sensibilidad que presenta y a su idoneidad para separar especies no volátiles o termolábiles. Además, se trata de un método que permite la inyección directa de la muestra acuosa.

En este caso, se ha empleado un cromatógrafo modelo Flexar UHPLC FX-10 (Figura 3.4-2) de la marca PERKIN-ELMER que trabaja en fase reversa, siendo la columna Brownlee Analytical DV C18 1.9 μm 30x2.1 mm termostatzada. El equipo dispone de automuestreador con control de temperatura (S200 Autosampler Comm KIT-1022 PUS), dos bombas independientes (Flexar FX 10 UHO PUMP), desgasificador de eluyentes (desgasificador de vacío de 3 canales, FL) y detector UV (UV/VIS KIT-UHPLC Detector Tubing).



Figura 3.4-2 Cromatógrafo de ultra alta resolución (UHPLC)

Previamente a la medida, las muestras fueron filtradas mediante filtros de jeringa de polipropileno de 0.45 μm con el fin de eliminar posibles sólidos en suspensión. Además, en el caso del proceso foto-Fenton, se adicionó metanol a las muestras con el fin de detener la reacción de degradación en el tiempo deseado.

El programa en gradiente empleado para la determinación de los compuestos fenólicos y la cafeína se muestra en las Tabla 3.4-1 y Tabla 3.4-2 respectivamente. En la Tabla 3.4-3 se recogen las longitudes de onda empleadas y los tiempos de retención de cada compuesto.

Tabla 3.4-1 Gradiente empleado en el HPLC para la detección de los compuestos fenólicos

Etapa	Tipo de etapa	Tiempo (min)	% Acetonitrilo	% Ácido Fórmico (10 mM)	Flujo (mL/min)
0	Equilibrado	4	0	100	0.3
1	Gradiente	2.5	5	95	0.3
2	Gradiente	4	50	50	0.3
3	Gradiente	2	50	50	0.3

Tabla 3.4-2 Gradiente empleado en el HPLC para la detección de la cafeína

Etapa	Tipo de etapa	Tiempo (min)	% Acetonitrilo	% Ácido Fórmico (10 mM)	Flujo (mL/min)
0	Equilibrado	4	3	97	0.3
1	Gradiente	2.5	10	90	0.3
2	Gradiente	4	70	30	0.3
3	Gradiente	2	3	97	0.3

Tabla 3.4-3 Longitud de onda de detección y tiempo de retención al que aparecen cada uno de los compuestos fenólicos en los cromatogramas

Compuesto	Longitud de onda (nm)	Tiempo de retención (min)
Ácido gálico	230	1.24
Ácido protocateuico	230	3.88
Ácido vanílico	230	4.61
Ácido siríngico	230	4.83
Ácido sinápico	230	5.46
2,4-dinitrofenol	230	6.26
Cafeína	275	3.9

3.4.3. Medida de la fluorescencia

Para la obtención de matrices de excitación emisión (EMMs) se utilizó un espectrofluorímetro modular de la casa Photon Technology Internacional (PTI) equipado con una lámpara de Xenón de 75 w dotado de un detector de recuento de fotones

individuales entre 200 y 900 nm. Para el análisis se emplearon cubetas de cuarzo de cuatro caras transparentes.



Figura 3.4-3 Fluorímetro

3.4.4. Medida del espectro UV-Visible

Se empleó un espectrofotómetro UV-visible de la marca HITACHI modelo UH5300 (Figura 3.4-4). El equipo está provisto de una lámpara de flash de Xenón y un sistema óptico de doble haz.

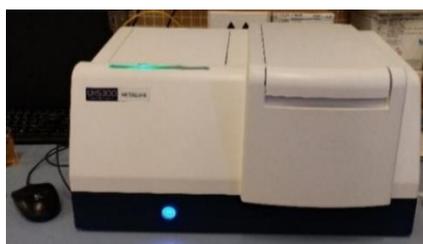


Figura 3.4-4 Espectrofotómetro UV-VIS

3.4.5. Medida del hierro en disolución

El ion ferroso en disolución reacciona con tres moléculas de 1,10-fenantrolina dando lugar a la formación de un complejo anaranjado que absorbe a 510 nm para un valor de pH de entre 2 y 9. Sin embargo, mediante el uso de una disolución tampón que mantenga el pH estable en un valor de 3/3.5, la formación del complejo es más rápida al mismo tiempo que se asegura su cuantificación. La absorción del compuesto por tanto es proporcional a la concentración de ion ferroso (APHA-AWWA-WEFF, 1998).

Ha de tenerse en cuenta que la presencia de agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno interfieren en la medida del hierro mediante este método, ya que oxidan el ion ferroso a férrico y éste no reacciona con la fenantrolina. Este problema se soluciona añadiendo ácido ascórbico en exceso, el cual reduce todo el Fe(III) a Fe(II).

Para la medida del hierro se toman 4 mL de muestra, se añade 1 mL de una disolución de 1,10-fenantrolina (0.1% p/v en agua destilada), 1 mL de disolución tampón (250 g/L de acetato de amonio y 700 ml/L de ácido acético en agua destilada) y una punta de espátula de ácido ascórbico. Se agita la mezcla y transcurrido un minuto se mide la absorbancia en el espectrofotómetro. Además, se prepara un blanco añadiendo 4 mL de agua destilada en lugar de muestra.

3.4.6. Medida del peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno reacciona con el metavanadato dando lugar al catión VO_2^{3+} de color amarillento, cuya absorción (450 nm) es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno. Este catión es sumamente estable a temperatura ambiente siempre y cuando la concentración de H_2O_2 sea menor a 3 mM.

Para la realización de este ensayo se toman 5 mL de muestra y se añaden 1.03 mL de metavanadato de amonio (0.06 M de metavanadato de amonio en 0.36 de ácido sulfúrico), 3.97 mL de agua destilada y se mide la absorbancia. El blanco se prepara añadiendo la misma cantidad de metavanadato a 8.97 mL de agua destilada.

La concentración de H_2O_2 se calcula con la siguiente Ec. 3.4-1 asumiendo que todo el metavanadato es oxidado.

$$C_{H_2O_2} (mol L^{-1}) = \frac{V_t Abs}{V_m 283} \quad Ec. 3.4-1$$

donde V_t son los 10 ml que suman reactivos más muestra, V_m es el volumen de muestra añadida, Abs es la absorbancia obtenida en cada caso (a 450 nm) y 283 es el coeficiente de extinción molar en mol/L cm (Pupo Nogueira & Guimarães, 2000)

3.4.7. pH-metro- conductímetro

Para las medidas de pH y conductividad se empleó un pH-metro pHenomenal® MU6100L de la casa comercial VWR (Figura 3.4-5).



Figura 3.4-5 pH-metro-conductímetro

3.4.8. Cromatografía de exclusión por tamaños

La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) se empleó para la determinación de tamaños moleculares de sustancias tipo húmicas (STH). Se trata de un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es un material poroso que permite la elución diferencial de los solutos en función de su tamaño molecular.

En este caso se empleó un cromatógrafo Hitachi Chromaster de la casa comercial VWR equipado con una columna de metacrilato marca Shodex modelo OHpak SB-805 HQ termostaticada, automuestreador (Chromaster 5210), bomba (Chromaster 5110), detector UV (Chromaster 5410) y detector de fluorescencia (Chromaster 5440).



Figura 3.4-6 Cromatógrafo de exclusión por tamaños (SEC)

El programa en isocrático empleado para la determinación de la distribución de tamaños se muestra en la Tabla 3.4-4

Tabla 3.4-4 Programa empleado en el SEC para la determinación de tamaños moleculares

% Acetonitrilo	30
% Tampón fosfato (pH=7,2)	70
Flujo (mL/min)	0.8
Longitud de onda (nm)	260

Se prepararon disoluciones a 20 mg/L de patrones de PSS (Poli (sodio 4-estirensulfonato)). con diferentes pesos moleculares (M_w) y se midieron obteniéndose un tiempo de elución (t_e) para cada patrón. Se calculó el tiempo total de la columna (t_T) mediante el uso de una disolución de 20 mg/L de KNO_3 ; así como el tiempo muerto (t_0) mediante el empleo de una disolución acuosa de Pullulan a 20 mg/L, obteniéndose un valor de 6.07 minutos. Con esto se calculó el tiempo de retención (t_R) para cada uno de los patrones mediante la Ec. 3.4-2. En la Tabla 3.4-5 se recogen los pesos moleculares, tiempo de elución y de retención de cada uno de los patrones.

$$t_R = \frac{t_e}{t_0} \quad \text{Ec. 3.4-2}$$

Tabla 3.4-5 Distribución de pesos moleculares de los patrones de PSS empleados, tiempo de elución de y tiempo de retención de cada uno de ellos

PSS (M_w)	Log M_w	t_e (min)	t_R
145000	5.16	9.50	1.56
77400	4.89	10.21	1.68
29100	4.46	10.87	1.81
9680	3.99	11.50	1.89
6520	3.81	11.85	1.95
4230	3.62	12.43	2.05

Mediante la representación del tiempo de retención frente al log M_w de cada uno de los patrones se obtuvo una recta de calibrado (Ec. 3.4-5). Con la recta de calibrado se calcularon los pesos moleculares (M_i) de las STH.

$$\log M_w = 3.43t_R + 10.58 \quad \text{Ec. 3.4-3}$$

$$R^2 = 0.981$$

Finalmente se calcularon el peso molecular medio (M_w), el peso molecular medio numérico (M_n) y la polidispersidad (p) empleando las ecuaciones Ec. 3.4-4, Ec. 3.4-6 y Ec. 3.4-7 respectivamente. Donde h_i es la altura del pico.

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^N h_i}{\sum_{i=1}^N h_i / M_i} \quad \text{Ec. 3.4-4}$$

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^N h_i M_i}{\sum_{i=1}^N h_i} \quad \text{Ec. 3.4-5}$$

$$\rho = \frac{M_w}{M_n} \quad \text{Ec. 3.4-6}$$

3.4.9. Cálculo porcentaje de humedad, sólidos volátiles y sólidos totales

La determinación se realizó mediante la técnica gravimétrica de acuerdo con el método normalizado 2540 (APHA-AWWA-WEFF, 1998). Para ello se colocaron y pesaron las muestras en crisoles de porcelana. Para la determinación del porcentaje de humedad se secaron las muestras en estufa (Figura 3.4-7 izquierda) a $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5$ durante 24 horas, la humedad se calcula por diferencia de pesada. A continuación, se procede a la incineración de las muestras en horno mufla (Figura 3.4-7-derecha) a $550 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5$ durante dos horas. Tras la incineración se calcula el contenido de sólidos volátiles y totales por diferencia de pesada.



Figura 3.4-7 Estufa marca BINDER (izquierda) y horno mufla marca Nabertherm

3.4.10. Resonancia Paramagnética electrónica (EPR)

La resonancia paramagnética es una técnica espectroscópica que permite detectar especies con electrones desapareados. Se trata de una técnica complementaria a otras técnicas analíticas que permite la detección directa de radicales libres.

Los espectros de resonancia paramagnética (EPR) se midieron con un espectrómetro Bruker ESR 300E que opera en la banda X (Figura 3.4-8 Espectrómetro de resonancia paramagnética Bruker ESR 300E). Como agentes de captura se emplearon DMPO (5,5-

dimetil-1-pirrolina-N-óxido) 17 mM para el radical hidroxilo y TMP (2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona) 45 mM para el oxígeno singlete. Las muestras se colocaron en capilares de cuarzo y se midieron a temperatura ambiente. Los parámetros de EPR se fijaron en los siguientes valores:

- Frecuencia de microondas 9.78 GHz
- Potencia de microondas 5 mW
- Frecuencia de modulación 100 KHz
- Amplitud de modulación 0.4 Gauss
- Tiempo constante 40 mseg
- Ganancia 1×10^5

Todos los experimentos se realizaron añadiendo el capturador (DMPO o TMP según la especie reactiva) a la célula junto con la muestra antes de irradiar y los espectros se midieron inmediatamente después de la irradiación. El tiempo de irradiación fue de 3 minutos para el caso de radical OH y 15 minutos para el oxígeno singlete.



Figura 3.4-8 Espectrómetro de resonancia paramagnética Bruker ESR 300E

3.4.11. Termogravimetría (TGA)

La termogravimetría se basa en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando se somete a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Esta variación puede ser una pérdida o ganancia de masa.

Para las medidas de TGA se empleó un equipo TA Q600 (TA instruments). El análisis térmico se realizó con una rampa de temperatura de 10°C/min desde la temperatura ambiente hasta 800°C en atmósfera de aire.

3.4.12. Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica es una técnica físico-química para la determinación de la distribución de tamaños de las partículas en suspensión o macromoléculas en solución, dentro del rango 10^{-9} a 10^{-6} m. Esta medida determina la velocidad con la que las partículas se difunden en un solvente debido al movimiento Browniano. Para ello se mide las fluctuaciones de la intensidad del haz de luz dispersa con el tiempo. Su intensidad varía constantemente dependiendo del tamaño de partícula debido a la fase de adición de las partículas en movimiento. La velocidad de difusión Browniana es inversamente proporcional al tamaño de partícula, y se expresa como el radio hidrodinámico R_H de acuerdo a la ecuación de Einstein

$$R_H = \frac{2kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Ec. 3.4-7}$$

donde D es el coeficiente de difusión translacional; k es la constante de Boltzmann; T es la temperatura absoluta; y η es la viscosidad del solvente puro.

Se prepararon disoluciones de 300 mg/L para cada una de las muestras y se realizaron 4 medidas por muestra empleando un equipo medidor de la dispersión de luz dinámica ALV-NIBS (Figura 3.4-9) equipado con un láser Ne-He y un correlador digital tau ALV-5000. La intensidad de la luz dispersada se midió durante al menos 20 segundos a 298 K. El equipo nos da el valor del radio hidrodinámico y anchura de las partículas y el índice de polidispersión (P.D.I.). El P.D.I. nos da idea de la homogeneidad de la muestra, cuanto mayor es su valor, menos homogénea es la muestra.



Figura 3.4-9 Equipo para la medida de la dispersión de luz dinámica

3.5. Ensayos de toxicidad

3.5.1. Bioensayos con el alga *Pseudokirchneriella Subcapitata*

P. Subcapitata es un alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eu u oligotróficos. Cuando las células son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos, su reproducción se ve afectada, alterando la tasa de crecimiento de la población.

La ISO 8692:2012 describe un método para la determinación de la inhibición del crecimiento del alga debido a la presencia de sustancias contaminantes presentes en las aguas. De acuerdo con esto, los test de toxicidad se han llevado a cabo en micro placas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA).

El procedimiento seguido se resume a continuación:

1º/ inmovilización del alga → el alga inmovilizada se agita y centrifuga varias veces en un medio de disolución (*matrix dissolving medium*) y se resuspende en 250 mL de medio de cultivo BBM (Bold's Basal Medium).

2º/ Cultivo del alga hasta llegar a la fase exponencial → la disolución madre obtenida en el paso anterior se mantiene en una cámara climatizada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 12h, bajo una intensidad luminosa de 1100 lux y en agitación continua mediante agitador orbital.

3º/ Ajuste de pH de las muestras a un valor de entre 7-8 mediante la adición de NaOH (1M) o HCl (1M).

4º/ Llenado automático de las microplacas con las muestras y el cultivo (10^4 cel/mL): cada ensayo consta de 8 réplicas de control negativo (medio de cultivo + algas), ocho réplicas de cada dilución (muestra + medio de cultivo + algas) y ocho blancos (medio de cultivo)(Figura 3.5-1). El volumen total de ensayo en cada pocillo es de 300 μL .

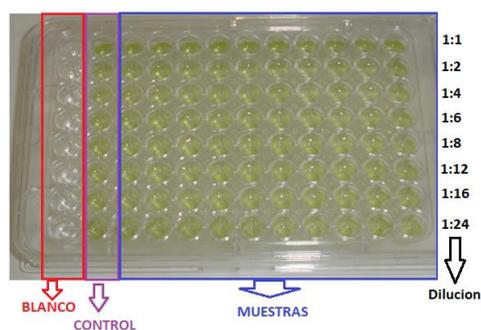


Figura 3.5-1 Ejemplo de llenado de la microplaca de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA).

5º Una vez llena cada placa, es introducida en una bolsa de plástico, saturada con CO₂, sellada e incubada a 22±2°C en la misma cámara empleada para el cultivo del alga y con las mismas condiciones.

6º Se mide el crecimiento del alga cada 24 h (hasta un total de 72 h) a través de la medición de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila (a las longitudes de onda de 430 nm de excitación y 663 nm de emisión); para ello se emplea un lector de placas Tecan Infinite M200.

3.5.2. Bioensayos con el microcrustáceo *Daphnia magna*

D. Magna es un microcrustáceo perteneciente al orden de los cladóceros comúnmente empleado como bioindicador ambiental de toxicidad en efluente dulceacuícolas. En el presente trabajo se ha realizado el ensayo según el protocolo normalizado descrito en la ISO 6341:2012. Los pasos incluidos dentro del mismo se describen a continuación:

1º/ Cuatro días antes a la realización del ensayo se hace eclosionar huevos de resistencia (epifias) suministrados por la empresa ExoTest S.L. Para ello se vacía el contenido de un vial de epifias en un tamiz, se lava abundantemente con agua corriente para eliminar cualquier posible traza procedente de medio de almacenamiento y se transfieren a una placa de Petri de 9-10 cm de diámetro que contiene 12 ml de solución de reconstitución. A continuación, se incuban a 22±2°C bajo iluminación constante durante unas 72 h. Transcurrido este tiempo los neonatos están listos para comenzar el ensayo.

2º/ Se ajusta el pH de las muestras a un valor de 7-8 mediante la acción de NaOH (1M) o HCl (1M).

3º/ En placas de fondo plano de 12 pocillos. Se preparan 6 diluciones (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, y 1:30) por cuadruplicado de cada una de las muestras a evaluar, 8 réplicas de control con medio de cultivo y se llenan los pocillos con un volumen total de 10 mL. A cada pocillo se añaden 5 individuos neonatos de *D. Magna*.

4º/ Los individuos se mantienen en contacto con la muestra, sin alimentar y en oscuridad durante 48 h; transcurrido ese tiempo se realiza un recuento de número de individuos inmóviles en cada placa.

3.5.3. Ensayos con levaduras recombinantes: RYA (Recombinante Yeats Assad)

El ensayo RYA está basado en una cepa de levadura *Saccharomices cerevisiae* modificada genéticamente y tiene como finalidad evaluar el potencial de disrupción endocrina de una sustancia o muestra.

El procedimiento seguido tanto para la evaluación de la actividad estrogénica como *dioxin-like* es básicamente el mismo, con ligeras diferencias que se comentan a continuación. Para la medida de la estrogenicidad se emplea la cepa BY4741 (ER) y para determinar la actividad *dioxin-like*, la cepa YCM1 (AhR) de la levadura.

1º/ Cultivo de la levadura: a partir de criocultivos, se siembran placas con medio de cultivo y se incuban a 30°C durante 24-48 h; así se obtiene lo que denominamos como cultivos stock. A partir de los cultivos stock, se siembran placas con medio de cultivo selectivo según la cepa y se incuban a 30°C durante 24 h. A continuación, se toma una colonia de cada placa y se inoculan en tubos de ensayo con medio de cultivo líquido; los tubos se incuban a 30°C con agitación suave durante aproximadamente 17 h (una noche). Transcurrido ese tiempo, se toma un volumen adecuado de cultivo que contenga una cantidad de células en la fase exponencial de crecimiento y se inoculan matraces elenmeyer de 50 ml que contienen el medio de cultivo específico de cada cepa.

2º/ Llenado de las placas multipocillo de polipropileno (NUNCTM, THERMO Scientific). La primera columna se llena con el cultivo de la levadura y la muestra preconcentrada con una dilución 1:20 v/v; a continuación, se realizan diluciones 1:2 sucesivas a lo largo de la placa hasta llegar a la columna 9. En la placa se incluyen también un control positivo y un control negativo de toxicidad (Figura 3.5-2).

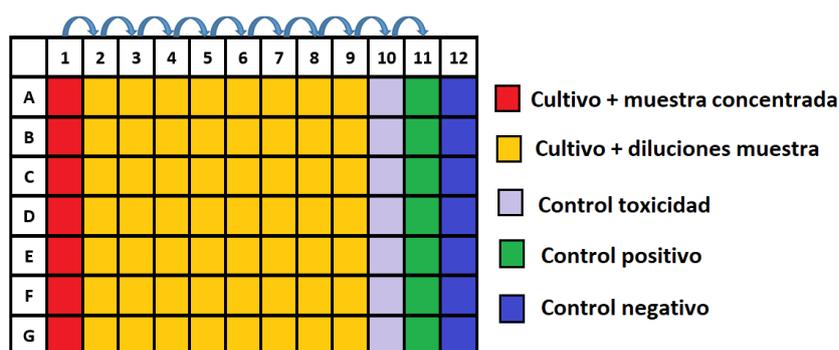


Figura 3.5-2 Disposición de las distintas diluciones de la muestra y los controles en la microplaca de polipropileno (NUNCTM, THERMO Scientific).

3º/ Se incuban las placas a 30°C durante 6 h y con agitación orbital a 120 rpm. Transcurrido este tiempo de incubación se añade YPER (Yeast Protein Extraction Agent) a todos los pocillos de la placa; este tampón de lisis permeabilizará la pared de la levadura y hará posible la extracción de las proteínas solubles. Se vuelven a incubar las placas a 30°C durante 30 min más.

4º/ Finalizada la incubación se añade el sustrato fluorescente MU-Gal para la detección de la β -galactosidasa a cada uno de los pocillos; se deja reposar la placa durante 5 min con el fin de que los restos celulares se depositen.

5º/ Se procede a la lectura de la placa. Se mide la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 460 nm cada 42 segundos durante 20 minutos empleando el lector Tecan Infinite M200. La intensidad de fluorescencia que se produce a lo largo de este tiempo corresponde a la actividad de la enzima. Dicha actividad es proporcional a la cantidad de enzima que a su vez es proporcional a la cantidad de complejo ligando-receptor que se forma. La actividad máxima será la del control positivo y la mínima la del control negativo. La actividad de la β -galactosidasa se calcula a partir

de la pendiente de las rectas obtenidas al representar la intensidad de fluorescencia frente al tiempo.

RYA no proporciona una medida directa de la concentración de contaminantes potencialmente tóxicos, sino de sus actividades. Los resultados se calcularon como equivalentes E2 (EEQ, para la actividad estrogénica) o β -NF (BNFEQ, para la actividad *dioxin-like*), definidos como la concentraciones (ng/L) de estándar que debería estar presente para obtener una respuesta similar a la observada en la muestra (Noguerol et al., 2006)

3.6. Métodos matemáticos y estadísticos

3.6.1. Diseño experimental y análisis de superficies de respuesta

Los métodos estadísticos han demostrado ser una herramienta muy útil en la optimización de procesos industriales; entre éstos, destacan los de superficie de respuesta, puesto que permiten estudiar el efecto de diferentes variables, así como sus interacciones en un número reducido de experimentos. En la presente tesis se ha empleado el diseño experimental tipo Doehlert.

En el diseño Doehlert, los puntos experimentales están uniformemente distribuidos y equidistantes de un punto central (Ferreira et al., 2004). El número de experimentos (N) viene definido por la Ec. 3.6-1, donde k es el número de variables o factores analizados.

$$N = k^2 + k + 1 \quad \text{Ec. 3.6-1}$$

En nuestro caso, el número de factores estudiados fue de 3, con lo que sustituyendo en la ecuación y sumando dos réplicas del punto central, quedan un total de 15 experimentos. Es importante realizar réplicas del punto central puesto que luego nos permitirán calcular la varianza. Esta distribución espacial de los experimentos forma un cubooctaedro, figura sólida de ocho vértices simétricamente truncados, de forma que se producen ocho triángulos equiláteros cuyos bordes son iguales a los de los cuatros restantes. En la Figura 3.6-1 se muestra la distribución espacial de los puntos experimentales y proyección de sección transversal del diseño.

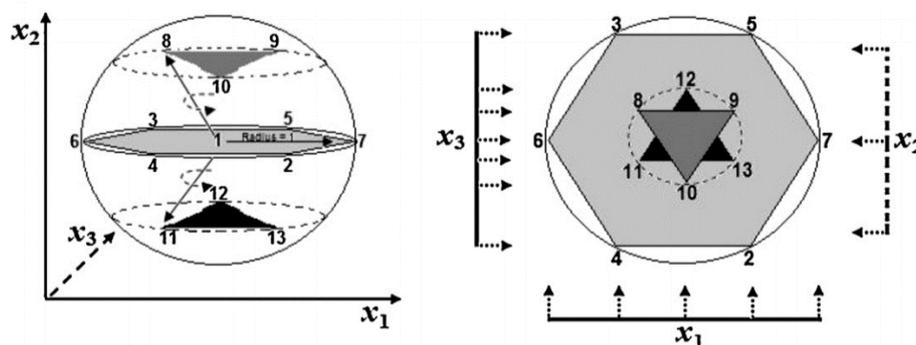


Figura 3.6-1 Distribución espacial de los puntos experimentales en un diseño experimental tipo Doehlert para tres factores (izquierda) y proyección de la sección transversal de la esfera (derecha).

Tomado de (Araujo & Janagap, 2012)

A cada factor se le asignan un número de niveles de acuerdo con la geometría del diseño: 5 niveles para el factor x1, tres niveles para el factor x2 y 7 niveles al factor x3. Dependiendo del caso de estudio, se escogerán los factores o variables y se le asignará mayor número de niveles a la que mayor efecto tenga sobre el proceso.

Las variables codificadas son las coordenadas de la figura del diseño experimental y a partir de ellas se calculan los valores reales que tendrán las variables o factores seleccionados empleando la Ec. 3.6-1

$$X_i = U_{i0} + \Delta U \times X \quad \text{Ec. 3.6-1}$$

Donde X_i es el valor real para el factor i ; U_{i0} es el valor de U_i (Ec. 3.6-2) en el centro de la región experimental; ΔU (Ec. 3.6-3) es el incremento del valor real y X es el valor codificado para cada factor.

$$U_{i0} = \frac{(U_{imax} + U_{imin})}{2} \quad \text{Ec. 3.6-2}$$

$$\Delta U_i = \frac{(U_{imax} - U_{imin})}{2} \quad \text{Ec. 3.6-3}$$

Tabla 3.6-1 Matriz de los valores codificados para un diseño experimental Doehlert con tres factores o variables

Nº Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0.5	0.866	0
4	0.5	0.289	0.817
5	-1	0	0
6	-0.5	-0.866	0
7	-1	-0.289	-0.817
8	-0.5	-0.866	0
9	0.5	-0.289	-0.817
10	-0.5	0.866	0
11	0	0.577	-0.817
12	-0.5	0.289	0.817
13	0	-0.577	0.817

Una vez se lleva a cabo el diseño se escoge la variable respuesta y se construyen y analizan las **superficies de respuesta**. Se trata de una superficie n-dimensional en el (n

+ 1) espacio dimensional. La finalidad de este proceso analítico es obtener una información más útil a partir de la interpretación de los gráficos en 3D o 2D (superficie de contorno) obtenidos. En el caso de que el proceso dependa de más de dos variables, en las superficies de contorno es necesario fijar el valor de una o más de estas variables. Para el modelado de las superficies de respuesta en este trabajo se ha empleado el software Statgraphics Centurion XVI y se han obtenido mediante el método de mínimos cuadrados.

3.6.2. Análisis estadísticos de los bioensayos de toxicidad

Con los datos procedentes de los ensayos de toxicidad se calculó el valor MID (dilución requerida para producir un 50% de efecto) de cada una de las muestras. Éste parámetro se determinó mediante análisis Probit, utilizando en software SPSS (versión 16.0).

Además, se ha aplicado en análisis de la varianza ANOVA para conocer el efecto del tiempo de tratamiento en el proceso de degradación. Se tomó $p < 0.05$ como indicativo de significancia estadística.

3.6.3. Análisis de matrices de excitación emisión de fluorescencia (EEMs) mediante análisis de factores paralelos (PARAFAC)

Las matrices de emisión excitación de fluorescencia (EEMs) se presentan en la actualidad como una técnica prometedora en el análisis de moléculas orgánicas complejas puesto que se trata de un técnica sencilla, no destructiva y elevada sensibilidad comúnmente empleada en el análisis de materia orgánica disuelta que proporciona gran información acerca de la estructura molecular, grupos funcionales así como interacciones intra e intermoleculares con iones metálicos (Berkovic et al., 2013). Por otro lado, las técnicas de análisis multivalente de datos se usan para obtener información cuantitativa de las EEMS. Siendo PARAFAC la más ampliamente utilizada en los últimos años.

3.6.3.1. PARAFAC

EL análisis paralelo de factores, PARAFAC (PARAllel FACTor analysis) es un método de descomposición de matrices tridimensionales que puede ser comparado al PCA (análisis

de componentes principales) bilineal; inicialmente surge como un método de análisis multivalentes en el campo de la psicometría (Bro, 1997). Se trata de un método robusto y muy eficiente que tiene la capacidad de procesar un gran número de muestras. Un modelo PARAFAC de una matriz tridimensional viene por tanto definido por tres matrices bidimensionales A, B y C, con elementos a_{ij} , b_{ij} y c_{ij} (Ec. 3.6-4), donde los índices i , j y k representan la dimensión de la matriz y f es el número de factores del modelo. En la Figura 3.6-2 cada color representaría a una de las dimensiones de la matriz (i , j y k) y E correspondería a los residuos (Bro, 1997) (Andersen & Bro, 2003).

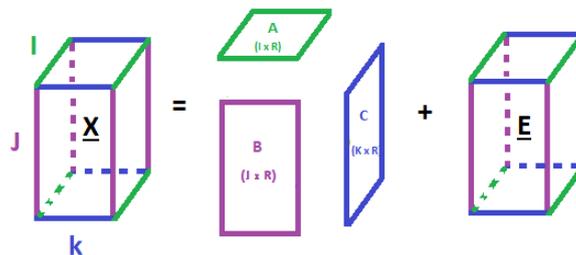


Figura 3.6-2 Descomposición PARAFAC de una matriz X ($I \times J \times K$) vista como el producto de las tres matrices de carga obtenidas.

En la descomposición PARAFAC cada componente viene definido por los tres vectores de carga (a , b y c), los cuales indican el comportamiento de los componentes en cada una de las tres dimensiones.

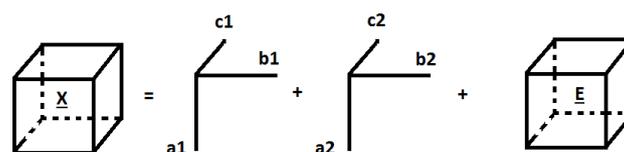


Figura 3.6-3 Representación de un modelo de dos componentes obtenido mediante PARAFAC para la matriz tridimensional de datos X

Matemáticamente se puede decir que PARAFAC busca el mejor modelo trilinear que minimiza la suma de los cuadrados de los residuales e_{ij} en el modelo (Ec. 3.6-4)

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{ir} b_{jr} c_{kr} + e_{ijk} \quad \text{Ec. 3.6-4}$$

donde $i = 1 \dots I$; $j = 1 \dots J$; $k = 1 \dots K$

PARAFAC proporciona una solución única, lo que significa que, aparte de variaciones triviales de escala y orden de columna, no son necesarias restricciones a la hora de aplicar el modelo. A diferencia de otros modelos (por ejemplo, PCA) PARAFAC no se puede aplicar de forma secuencial, es necesario reestimar todo el modelo si se quiere probar un nuevo número de factores.

3.6.3.2. PARAFAC aplicado a datos de fluorescencia

Las matrices de excitación emisión (EEMs) se obtienen combinando espectros de emisión de fluorescencia medidos para un rango de longitudes de onda de excitación. De esta forma, los datos se adaptan a un modelo trilineal, siendo los vectores asociados a cada factor (o componente) la concentración, emisión y excitación (Figura 3.6-2)

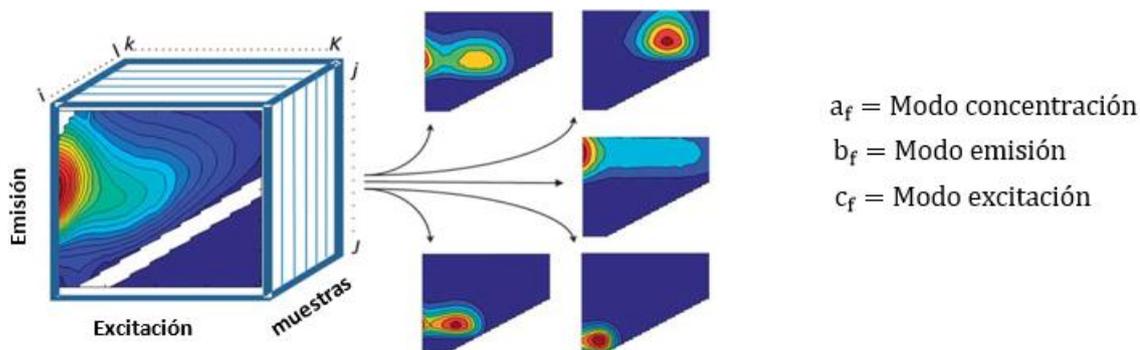


Figura 3.6-4 set de datos compuesto por EEMs organizado en una estructura tridimensional descompuesto en 5 componentes mediante PARAFAC. Tomado y adaptado de (Murphy et al., 2013)

En el análisis de EEMs mediante PARAFAC, como ya se ha comentado anteriormente, se obtiene una solución única sin ambigüedad rotacional y se consigue un modelo válido, compuesto por factores que tiene interpretación química directa.

En el presente trabajo se ha usado el software MATLAB2015b, con las toolbox n-way y drEEM (Andersson & Bro, 2000) (Murphy et al., 2013) para la aplicación de PARAFAC en el análisis de EEMs.

Una vez obtenidas las EMMs que componían el conjunto de datos, se han seguido los siguientes pasos a la hora de implementar PARAFAC:

Importación de datos

Cada una de las matrices tanto de las muestras como de los blancos (agua MilliQ, en nuestro caso) en formato *.txt generadas por el fluorímetro son cargadas en MATLAB. Así mismo se cargarán los espectros de absorbancia, necesarios para las correcciones previas a PARAFAC que veremos a continuación.

Preprocesamiento

En este paso se llevan a cabo una serie de correcciones que tienen como objetivo corregir cualquier tipo de sesgo sistemático en el conjunto de datos, eliminar señales que no están relacionadas con la fluorescencia y normalizar el conjunto de datos cuando las diferencias de fluorescencia entre muestras son muy grandes (Murphy et al., 2013). En nuestro caso estas correcciones consistieron en:

Corrección de filtro interno

El filtro interno ocurre cuando la radiación es absorbida por las partículas presentes en la muestra o en su camino hacia o desde la cubeta, de forma que se reduce la cantidad de radiación de excitación que llega a los cromóforos y, por ende, la cantidad de radiación emitida por los mismos. Este efecto influye en muestras que contienen gran cantidad de fluoróforos. (Murphy et al., 2013). Existen varios métodos para corregir este efecto. En este caso, se ha hecho mediante el empleo de la absorbancia de la muestra; con los espectros de absorbancia de cada una de las muestras se ha construido una matriz de factores de corrección, con un factor de corrección por separado correspondiente a cada par de longitudes de onda en la EEM (Figura 3.6-5). De esta forma, cada EEM se multiplica por la matriz de corrección. En los casos en los que la

absorbancia de la muestra fue mayor a 2, la muestra se diluyó hasta obtener valores menores de 2 con el fin de asegurar el ajuste de esta corrección.

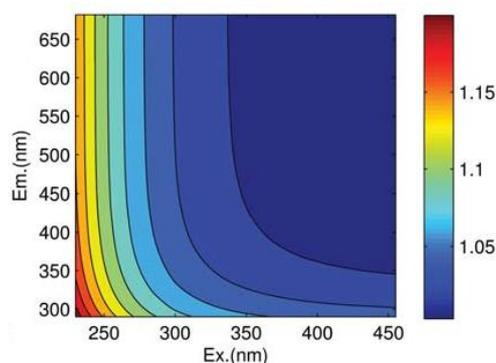


Figura 3.6-5 Ejemplo de matriz de factores de corrección calculada a partir de la absorbancia de una muestra de materia orgánica disuelta. Tomado de (Murphy et al., 2013)

Eliminación de la dispersión

Puesto que el modelado mediante PARAFAC se ve afectado por la presencia de picos de dispersión diagonal, éstos deben ser eliminados. En las matrices de fluorescencia se dan dos dispersiones características: la de Rayleigh (de primer y segundo orden), que normalmente es de mayor intensidad que la fluorescencia y la de Raman (de primer y segundo orden) que es de menor intensidad. La dispersión de Rayleigh de primer orden aparece cuando la longitud de onda de excitación es igual a la de emisión y la de segundo orden cuando la longitud de onda de la emisión es el doble que la de excitación. Las dispersiones de Raman aparecen a longitudes de onda ligeramente superiores a las anteriores.

Para la eliminación de la dispersión, en primer lugar, se ha restado a cada una de las EEM la EEM del blanco que le corresponde (en nuestro caso el blanco es agua MiliQ, que es el solvente empleado). La matriz EEM del blanco se ha medido aproximadamente cada 6 horas; es decir, entre 1 o 2 veces al día dependiendo del tiempo de medida. Sin embargo, en la mayoría de los casos esto no ha sido suficiente (puesto que la dispersión depende también de la composición de la propia muestra). Por ello, posteriormente a la resta del blanco, se han sustituido los valores correspondientes a las bandas de

dispersión por valores perdidos, empleando para ello la función *smootheem* de la toolbox drEEM. De esta forma, estas zonas no son tenidas en cuenta en el modelado.

Normalización

PARAFAC puede ya ser implementado con el preprocesamiento anteriormente descrito. Sin embargo, en casos en los que el set de datos contiene elevados gradientes de intensidad, las muestras con mayor intensidad tienen más peso que aquellas con baja intensidad y es necesario un paso adicional en el preprocesado de las muestras. Normalizando cada muestra por su señal total se iguala el peso de todas las matrices, permitiendo al modelo centrarse en las variaciones químicas entre muestras antes que en la magnitud total de la señal. Esta normalización se puede deshacer después de validar el modelo, multiplicando por el mismo número.

Fase exploratoria

Esta fase tiene la finalidad de establecer el mejor conjunto de datos posible para el modelado y obtener una idea preliminar del número correcto de componentes del modelo. Incluye la identificación de datos poco representativos o de baja calidad, que denominaremos *outliers*, tanto muestras como longitudes de onda. Una vez identificados, se examinan individualmente para determinar el motivo más probable de su diferencia y en determinados casos se eliminan del set de datos. Este paso forma parte del “arte” de PARAFAC, es crucial y en muchas ocasiones es necesario realizarlo varias veces.

Para llevar a cabo la identificación de *outliers* se examinaron en profundidad las matrices de los residuos, los cuales deben distribuirse aleatoriamente o al menos no contener estructuras obvias. Además, se examinó la influencia (*leverage*) de cada muestra y cada longitud de onda sobre el modelo. El *leverage* es un número entre 0 y 1 que expresa la desviación con respecto a la media al resto del conjunto de datos, de forma que las muestras/longitudes de onda que son poco diferentes al resto, tendrán un *leverage* cercano a 0 y viceversa.

Validación del modelo

Existen muchos criterios para evaluar si en un modelo obtenido mediante PARAFAC se han escogido el número correcto de componentes (factores). A la hora de validar el modelo se han de tener en cuenta el máximo número de criterios de evaluación posibles puesto que cierto grado de subjetividad es inevitable. En el presente trabajo los criterios tenidos en cuenta a la hora de validar los modelos han sido:

- Aleatoriedad de las matrices de los residuos.
- Estudio de los espectros de excitación y emisión de los componentes.
- Diagnóstico de consistencia del núcleo (core consistency).
- *Split-half analysis* (se divide el conjunto de datos en varias mitades que se modelan con el mismo número de componentes, a continuación, se evalúa la concordancia que existe entre los modelos de las diferentes mitades y del conjunto de datos completo).

3.6.4. Cálculo de la constante de complejación (adaptación del modelo de Ryan y Weber)

En el estudio de los parámetros de complejación entre las sustancias tipo húmicas y el Fe(III), tras obtener los componentes mediante PARAFAC, se calculó la constante de complejación entre ambos usando una modificación del modelo descrito por Ryan y Weber (Ryan & Weber, 1982). Este modelo ha sido ampliamente usado para la descripción de la complejación (Ohno et al., 2008; Plaza et al., 2006). PARAFAC descompone la mezcla compleja de sustancias tipo húmicas en fluoróforos independientes; por lo tanto, la aplicación de un modelo de complejación a los componentes individuales obtenidos mediante PARAFAC resulta más descriptiva que la aplicación de la ecuación a un solo punto a una longitud de excitación/emisión concreta. Aplicando PARAFAC a las sustancias tipo húmicas en presencia de diferentes concentraciones de Fe(III) se observó que, dentro del dominio experimental analizado, los perfiles de emisión relativa de los componentes más significativos se podían describir asumiendo dos contribuciones a la fluorescencia:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{I_q}{I_0}(1 - f) + \frac{I_{nq}}{I_0} \quad \text{Ec. 3.6-5}$$

donde I_0 es la intensidad de las disoluciones conteniendo STH sin Fe(III), I es la intensidad obtenida a una concentración determinada de Fe(III), I_q es la intensidad de fluorescencia que puede ser desactivada por los iones férricos, f es la fracción de I_q desactivada para una concentración de metal determinada, e I_{nq} es la intensidad de fluorescencia que no se ve afectada por la presencia de hierro.

Para obtener la dependencia de f con la concentración de hierro, asumimos que la fluorescencia susceptible de ser desactivada es debida a la formación de complejos 1:1 entre los iones férricos y los sitios donde se encuentra enlaces activos en las STH.

$$K = \frac{[MH]}{[M][H]} \quad \text{Ec. 3.6-6}$$

donde K es la constante de estabilidad condicional a un pH determinado y una fuerza iónica, $[MH]$ es la concentración molar de los sitios de complejación activos; $[M]$ es la concentración de los cationes férricos no complejados con los sitios activos de las STH, y $[H]$ es la concentración de fluorescencia susceptible de ser desactivada procedente de los sitios activos de las STH no complejadas con cationes férricos. Por lo tanto, f se puede describir de la siguiente forma:

$$f = \frac{[MH]}{[H]_0} \quad \text{Ec. 3.6-7}$$

donde H_0 es la concentración total de sitios fluorescentes activos de las STH. Teniendo en cuenta la ecuación de balance de masa para ambos, el metal y los sitios activos que están accesibles a los cationes de hierro, puede decirse que el valor de f viene dado por:

$$f = \frac{(K(H_0 + M_0) + 1) - \sqrt{(K(H_0 + M_0) + 1)^2 - 4K^2H_0M_0}}{2KH_0} \quad \text{Ec. 3.6-8}$$

donde M_0 es la concentración del metal. Combinando las ecuaciones Ec. 3.6-5 y Ec. 3.6-8 se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{I}{I_0} = 1 + \left(\frac{I_{nq}}{I_0} - 1 \right) \frac{(K(H_0 + M_0) + 1) - \sqrt{(K(H_0 + M_0) + 1)^2 - 4K^2H_0M_0}}{2KH_0} \quad \text{Ec. 3.6-9}$$

Se aplicó un ajuste no lineal a los datos de fluorescencia obtenidos para diferentes concentraciones de Fe(III) para estimar los valores de K, H₀ e I_{qn}

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Tratamiento de contaminantes representativos de la industria alimentaria mediante fotocátalisis solar (proceso foto-Fenton)

4.1.1. Introducción

Tal como se ha indicado en la introducción de esta tesis, las aguas residuales procedentes de la industria alimentaria (como las de la producción de vino, aceite de oliva, conservas o preparación del corcho) suponen una preocupación ambiental importante. Presentan composiciones complejas que incluyen sales, azúcares, macromoléculas biológicas, ácidos grasos y fenoles o polifenoles en concentraciones variables. En particular, los fenoles y compuestos relacionados como los taninos son difíciles de eliminar por métodos convencionales puesto que se trata de compuestos poco biodegradables o incluso tóxicos e inhiben la degradación de la fracción biodegradable (Ioannou et al., 2015; Santos et al., 2013).

Los procesos de oxidación avanzan (POAs) se presentan como una técnica alternativa prometedora para la eliminación de este tipo de compuestos. Numerosos estudios han demostrado la capacidad de los POAs para eliminar este tipo de compuestos tanto en disoluciones modelo sintéticas (Juretic et al., 2012a, 2013), como en efluentes reales (De Torres-Socías et al., 2013; Kavitha & Palanivelu, 2005a, 2005b; Michael et al., 2014; Silva et al., 2007a). Curiosamente los POAs presentan cierta selectividad por los compuestos fenólicos frente a otros compuestos orgánicos más biodegradables, como se observó en el tratamiento de efluentes de la industria papelera (Amat et al., 2005a, 2005b); esta es una ventaja importante, puesto que el empleo de POA como pretratamiento en la eliminación de la fracción no biodegradable para el tratamiento posterior mediante procesos biológicos es una estrategia muy interesante para los efluentes de la industria alimentaria (Mantzavinos & Psillakis, 2004; Oller et al., 2011).

El uso de luz solar en los POAs fotoquímicos, representa una mejora en la sostenibilidad de los mismos. El foto-Fenton es uno de los procesos en los que se puede emplear luz solar como fuente de radiación. Este proceso, dependiente del pH (como hemos visto en el apartado 1.3.5) ha sido empleado para la eliminación de compuestos fenólicos de

efluentes reales procedentes de la industria (Malato et al., 2009; Oller et al., 2011). De forma resumida, el mecanismo de oxidación de esta familia de compuestos por radicales hidroxilo implica una mayor hidroxilación de los anillos aromáticos, la formación de quinonas y, por último, la rotura del anillo aromático para formar compuestos carboxílicos, como se ha descrito para el caso de nitrofenoles (Kavitha & Palanivelu, 2005a). Sin embargo, aún quedan algunas cuestiones que se tienen que estudiar más en profundidad. Por ejemplo, la eliminación de la toxicidad asociada a compuestos fenólicos es una de las metas de los tratamientos foto-oxidativos. En este sentido resulta interesante evaluar la detoxificación combinando diferentes ensayos de toxicidad, puesto que los resultados varían según la especie empleada (Crane et al., 2006). Además, resulta muy interesante el seguimiento del comportamiento disruptor endocrino de estas sustancias a lo largo del proceso de degradación ya que este efecto no se detecta en los ensayos de toxicidad clásicos (Futran Fuhrman et al., 2015).

Por otro lado, el papel de pH en la aplicación del proceso foto Fenton a efluentes complejos es otro tema en el que hay que profundizar. Se sabe que las sustancias que son capaces de modificar la esfera de coordinación del hierro puede cambiar el pH óptimo de este proceso (Gomis et al., 2015a; Machulek et al., 2007). De hecho, recientemente se han publicado trabajos en los que se ha aplicado foto Fenton a pH=5 para el tratamiento de aguas residuales procedentes de la producción del aceite de oliva, observándose diferencias muy ligeras en cuanto a efectividad si se compara con el proceso a pH = 2.8 (Michael et al., 2014). En este sentido, resulta también interesante la aplicación de nuevas técnicas que permitan conocer mejor el comportamiento de sistemas complejos. En este contexto, las matrices de excitación emisión de fluorescencia (EEMs) pueden ser una herramienta muy útil. Las EEMs han sido comúnmente empleadas para la caracterización de materia orgánica disuelta (DOM) (Nebbioso & Piccolo, 2013; Yang et al., 2015). Sin embargo actualmente su uso se ha extendido a otros campos (Azcarate et al., 2015). Por lo tanto, es interesante comprobar si las EEMs pueden proporcionar información útil acerca del comportamiento de los compuestos fenólicos cuando se someten a POAs, como paso previo al desarrollo de herramientas para el modelado matemático del proceso.

Con el fin de profundizar en todas estas cuestiones, en este trabajo se ha estudiado la degradación de una mezcla de 8 contaminantes comúnmente encontrados en la industria alimentaria (ácido tánico, elágico, sinápico, siríngico, gálico, protocateuico, vanílico y 2,4-dinitrofenol) mediante el proceso foto-Fenton. El tratamiento se ha llevado a cabo primero en simulador solar y después en planta piloto. Con el fin de analizar el efecto que tienen sobre el proceso, las concentraciones de Fe(II) y H₂O₂, así como el pH, se empleó el diseño experimental tipo Doehlert. Además, se han utilizado medidas de fluorescencia (EEMs) para obtener información completaría del proceso. Por último, para evaluar los riesgos ambientales asociados a la mezcla de contaminantes antes, durante y después de ser sometida al tratamiento, se han realizado diferentes bioensayos de toxicidad:

- 1) Ensayos de toxicidad con el alga *Pseudokirchneriella subcapitata*
- 2) Ensayos de toxicidad con el crustáceo marino *Daphnia Magna*.
- 3) Ensayo RYA (del inglés Recombinant Yeast Assay) para la medida de las actividades estrogénica y dioxin-like.

4.1.2. Experimento en simulador solar

Se ha aplicado un diseño con 15 experimentos (k^2+k+1 , siendo k el número de variables analizadas, más dos réplicas del punto central). En la Tabla 4.1-1 se muestran los valores de las variables estudiadas en el presente trabajo. En este caso se le asignaron siete valores a la variable concentración de H₂O₂, cinco a la variable concentración de Fe(II) y tres a la variable pH.

Tabla 4.1-1 Variables empleadas en el diseño experimenta Doehlert y sus niveles

Variable	Niveles	Valor mínimo	Valor máximo	incremento
[H ₂ O ₂] mg/L	7	13.8	96.7	13.81
[Fe(II)] mg/L	5	2	6	1
pH	3	2.8	5	1.1

El tiempo de tratamiento necesario para degradar cada uno de los contaminantes al 75% ($t_{75\%}$) de la concentración inicial fue utilizado como respuesta. En la Tabla 4.1-2 se

muestran las condiciones experimentales de todos los experimentos, así como el valor de $t_{75\%}$ obtenido en cada caso.

Tabla 4.1-2 Puntos experimentales empleados para obtener las superficies de respuesta (matriz Doehlert)

Nº experimento	[Fe(II)] (mg/L)	[H ₂ O ₂] (mg/L)	pH	[Fe(II)]/[H ₂ O ₂] ratio molar	$t_{75\%}$ (min)
1	3	55.3	3.9	30	1.90
2	5	55.3	3.9	18	2.48
3	4	96.7	3.9	40	2.85
4	4	69.1	5	28	1.55
5	1	55.3	3.9	91	3.39
6	2	13.8	3.9	11	17.89
7	2	41.4	2.8	64	4.03
8	4	13.8	3.9	6	8.27
9	4	41.4	2.8	17	4.65
10	2	96.7	3.9	80	1.49
11	3	82.9	2.8	46	4.37
12	2	69.1	5	57	10.60
13	3	27.6	5	15	19.46
14	3	55.3	3.9	30	1.65
15	3	55.3	3.9	30	1.84

La concentración inicial fue de 1mg/L para cada uno de los contaminantes. Dos de estos (el ácido tánico y elálgico) no se pudieron seguir mediante UHPLC, probablemente debido a su elevado tamaño molecular. La Figura 4.1-1 muestra un ejemplo de la disminución de la concentración relativa de cada uno de los contaminantes con el tiempo de irradiación. En todos los experimentos se observa una degradación muy rápida de todos los contaminantes, sin embargo, se pueden apreciar algunas diferencias entre los diferentes compuestos, los cuales en general siguen la siguiente tendencia en la velocidad de desaparición: ácido gálico > ácido sinápico >> ácido siríngico = ácido protocateuico > ácido vanílico > 2,4-dinitrofenol. Este orden se rige por la sustitución de anillos aromáticos ya que la reacción del radical hidroxilo con anillos aromáticos implica una ataque electrofílico del $\cdot\text{OH}$ a los anillos, como fue descrito en el caso del nitrofenol (Kavitha & Palanivelu, 2005a). Debido a esto, los compuestos que presentan tres grupos activantes unidos al anillo aromático (hidroxi o metoxi) reaccionan más rápido que

aquellos que sólo poseen dos; dinitrofenol es el compuesto más resistente puesto que en este caso el anillo aromático contiene dos grupos nitro, fuertes desactivantes del ataque al anillo. En trabajos previos se ha observado esta tendencia en la oxidación de compuestos fenólicos mediante diferentes POAs (Juretic et al., 2012b; Sánchez-Avila et al., 2011).

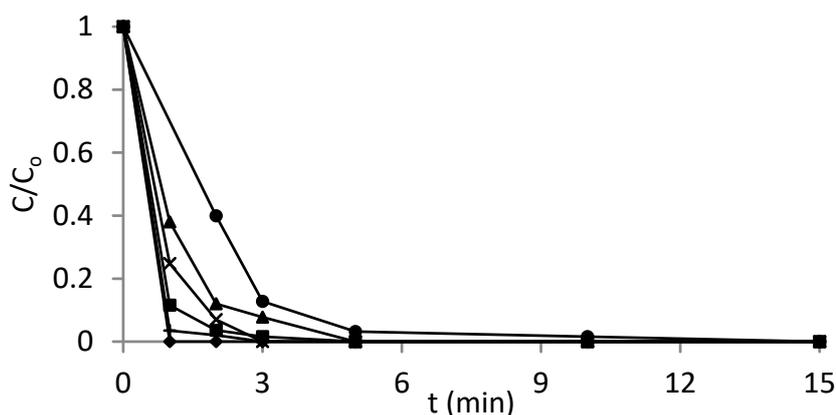


Figura 4.1-1 Proceso foto-Fenton para la eliminación de una mezcla de compuestos fenólicos de acuerdo a las siguientes condiciones experimentales: concentración inicial de cada uno de los contaminantes: 1 mg/L; ; $[H_2O_2] = 55.5$ mg/L, $[Fe(II)]_0 = 3$ mg/L y pH 0 3.9. Se representa la concentración relativa de cada uno de los contaminantes vs tiempo de tratamiento: ácido gálico (◆); ácido protocateúico (■); ácido vanílico (▲); ácido sináptico (+); ácido siríngico (×) y 2,4-dinitrofenol (●).

Puesto que, como se ha comentado anteriormente, el compuesto más recalcitrante entre todos los analizados resultó ser el 2,4-dinitrofenol y la eliminación del resto de compuestos fue demasiado rápida ($t_{75\%} < 1$ minuto en la mayoría de los experimentos), el tiempo necesario para reducir en un 75% la concentración inicial de 2,4-dinitrofenol fue empleado como respuesta para el análisis estadístico. Además, el 2,4-dinitrofenol muestra una toxicidad mayor que el resto de compuestos (ver apartado 4.1.3). Basándonos en el $t_{75\%}$, se obtuvo un modelo cuadrático de superficie de respuesta tridimensional (Ec. 4.1-1)

$$t_{75\%} = 18.62 + 5.3 \cdot [Fe^{2+}] - 0.25 \cdot [H_2O_2] - 9.5 \cdot pH + 0.28 \cdot [Fe^{2+}]^2 \quad \text{Ec. 4.1-1} \\ + 0.07 \cdot [Fe^{2+}] \cdot [H_2O_2] - 3.03 \cdot [Fe^{2+}] \cdot pH \\ + 0.03 \cdot [H_2O_2]^2 - 0.11 \cdot [H_2O_2] \cdot pH + 3.49 \cdot pH^2$$

El valor del coeficiente de correlación (R^2) fue de 0.97, lo que indica una buena concordancia entre los valores experimentales y los calculados. En cada caso, se

distribuyeron aleatoriamente los valores residuales como función de los valores medidos. Los diagramas de Pareto (Figura 4.1-2) muestran que todas las variables fueron significativas a excepción de la variable $[\text{Fe(II)}]^2$.

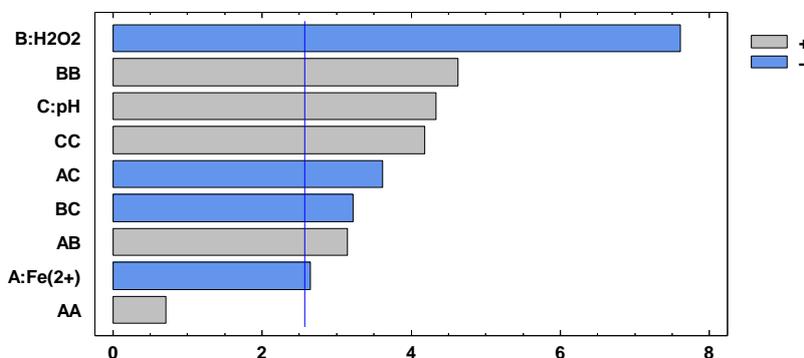


Figura 4.1-2 Diagrama de Pareto, efecto estandarizado para t75% del compuesto 2,4-dinitrofenol

Para entender mejor el efecto de las variables operacionales, se representaron curvas de superficie de respuesta bidimensionales fijando cada uno de los parámetros en valores altos, intermedios y bajos. En la Figura 4.1-3 se representan los resultados obtenidos al fijar los valores de pH a 2.8, 3.9 y 5. La gráfica obtenida para pH=3.9 muestra como la velocidad de reacción aumenta con la cantidad de H_2O_2 , observándose una ligera aceleración a concentraciones de Fe(II) altas. Por otro lado, a concentraciones de H_2O_2 alrededor de 40-60 mg/L la velocidad de reacción es tan elevada que una adición extra de reactivo no tiene efecto positivo en la degradación. A pH=2.8, la velocidad de reacción es ligeramente mas rápida que a pH=3.9 para concentraciones bajas de peróxido, mientras que a concentraciones elevadas de este reactivo se observa una cierta pérdida de eficiencia. Esto puede deberse a que, la rápida generación de especies reactivas (ej radical hidroxilo), se traduce en la recombinación de las mismas, disminuyendo por tanto la probabilidad de que reaccionen con los contaminantes (Santos-Juanes et al., 2011). A pH=5, el proceso resultó ser menos eficiente, obteniéndose mejores resultados a concentraciones elevadas de H_2O_2 .

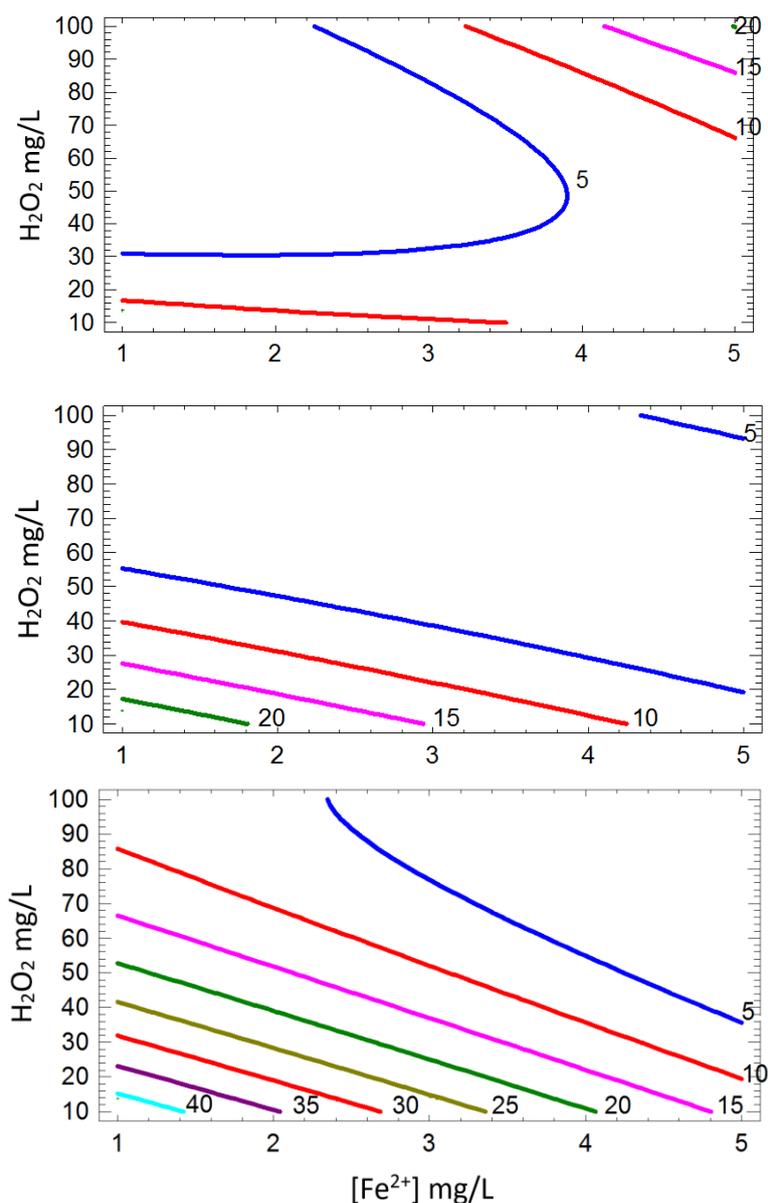


Figura 4.1-3 Superficies de respuesta obtenidas para la eliminación de 2,4-dinitrofenol a 3 valores de pH diferentes: 2.8 (arriba), 3.9 (medio) y 5.0 (abajo). Se representan graficas de contornos para $t_{75\%}$ vs. concentración de H_2O_2 y $Fe(II)$.

Con respecto a la concentración de $Fe(II)$ (Figura 4.1-4), se obtuvieron valores de $t_{75\%}$ menores a 5 minutos para valores de $[H_2O_2] > 40$ mg/L para todas las concentraciones de hierro. Sin embargo, el efecto del pH fue diferente en cada uno de los casos. Para $[Fe(II)] = 1$ mg/L, la velocidad de reacción disminuye conforme aumenta el pH, a $[Fe(II)] = 3$ mg/L se observa un aumento en el $t_{75\%}$ a valores de $pH < 4$ y para $[Fe(II)] = 5$ mg/L el valor del pH no afecta a la velocidad de reacción dentro del rango estudiado. Estos resultados

pueden ser debidos a la disponibilidad del hierro, cuando la concentración de hierro es elevada, el proceso es eficiente incluso a pH cercano a 5, mientras que cuando la concentración es baja se necesitan valores de pH cercanos al óptimo (2.8).

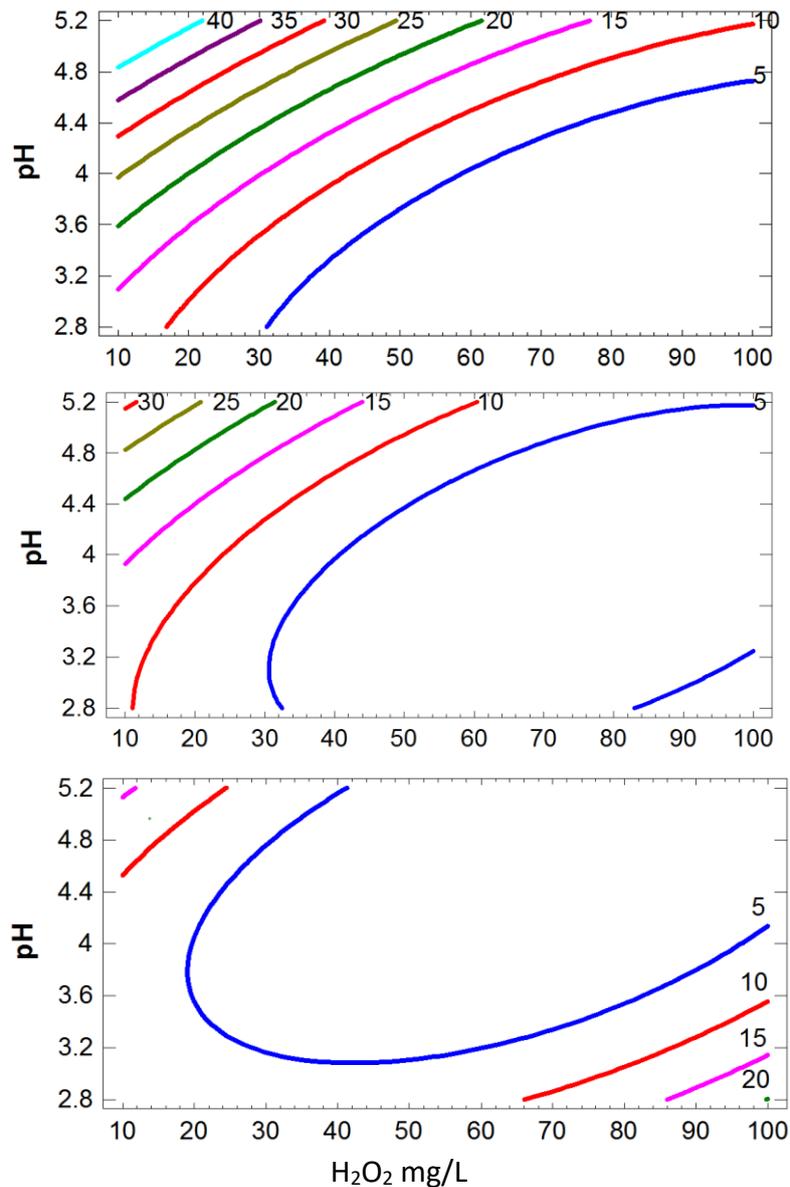


Figura 4.1-4 Superficies de respuesta obtenidas para la eliminación de 2,4-dinitrofenol a 3 valores de [Fe] diferentes: 1 mg/L (arriba), 3 mg/L (medio) y 5 mg/L (abajo). Se representan graficas de contornos para t_{75%} vs. Concentración de H₂O₂ y pH.

Al fijar la cantidad de H₂O₂ (Figura 4.1-5) en su valor central (55.3 mg/L), la reacción ocurre de forma muy rápida para valores bajos de pH (t_{75%} por debajo de 5 min hasta valores de pH cercanos a 4) y para concentraciones de hierro elevadas la disminución de la velocidad de reacción es despreciable hasta pH=5. A concentraciones bajas de [H₂O₂],

la reacción es mas lenta ($t_{75\%} > 5\text{min}$), seguramente debido a que la disponibilidad de agente oxidante es baja, y se obtienen mejores resultados a pH bajos y elevadas concentraciones de hierro. Por otro lado, cuando fijamos la cantidad de H_2O_2 en un valor elevado ocurre una tendencia opuesta: la eficiencia del tratamiento aumenta incluso a valores elevados de pH (4.5 o incluso superiores cuando a concentración de hierro es elevada) mientras que a pH bajo y elevadad $[\text{Fe}]$ se da una perdida en la eficiencia de tratamiento que puede atribuirse a la recombinación de $\cdot\text{OH}$ con el peróxido de hidrógeno, debido al exceso de agente oxidante.

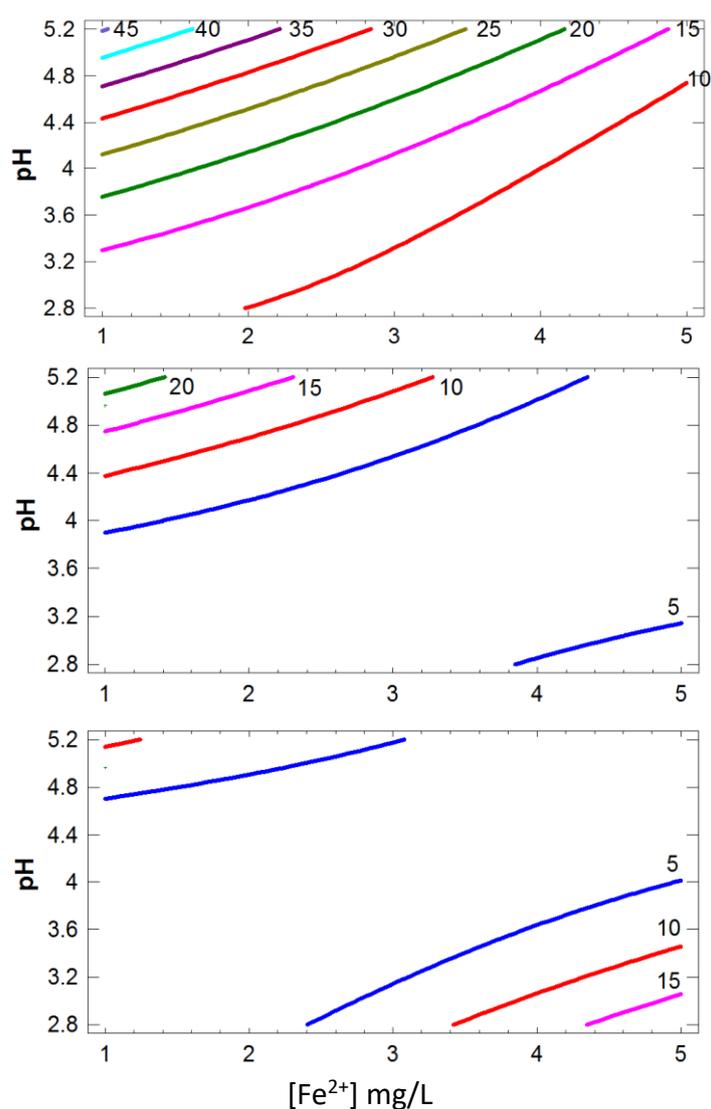


Figura 4.1-5 Superficies de respuesta obtenidas para la eliminación de 2,4-dinitrofenol a 3 valores de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ diferentes: 13.8 mg/L (arriba), 55.3 mg/L (medio) y 96.7 mg/L (abajo). Se representan graficas de contornos para $t_{75\%}$ vs. Concentración de Fe y pH.

De los resultados obtenidos anteriormente se deduce que: la $[H_2O_2]$ debe ser ligeramente menor a 40 mg/L (una mayor cantidad de reactivo no se traduce en un aumento de la velocidad de reacción) y el valor del pH se puede extender hasta valores cercanos a 4 si la cantidad de hierro disponible es suficiente. Por esto, se puede decir que la combinación pH=3.9, $[H_2O_2] = 55$ mg/L y $[Fe^{2+}] = 3$ mg/L (punto central del diseño experimental empleado en este estudio) se encuentra dentro de la región más conveniente para llevar cabo este proceso. Que el proceso foto-Fenton sea eficiente a pH 3.9 puede ser debido a la complejación del hierro con los compuestos fenólicos, puesto que trabajos anteriores han demostrado que el pH óptimo se puede extender a valores mayores debido a cambios en la esfera de complejación del hierro (Gomis et al., 2015a). En este caso, los compuestos fenólicos pueden formar complejos con el hierro, lo cual explicaría este resultado aparentemente anómalo. De hecho, recientemente se ha publicado que los ácidos cinámicos pueden ser eficientemente degradados a pH cercano a 5 mediante un proceso foto-Fenton en una disolución de sacarosa debido a la capacidad que tienen estos compuestos para formar complejos con el hierro (Nguyen et al., 2015).

La mineralización alcanzada después de los 120 min de irradiación fue en la mayoría de los casos del 50-65%, incluido el punto central, en el cual se alcanza una mineralización entorno al 60%. Se obtuvieron valores por debajo del 50% sólo en algunos experimentos en los que las concentraciones de hierro y peróxido eran bajas y los valores de pH altos. Esto nos indica que a pesar de que el proceso foto-Fenton es capaz de degradar de forma eficiente los compuestos fenólicos analizados, permanecen en el medio de reacción cantidades importantes de compuestos orgánicos, ya sea procedentes de los productos de degradación de los compuestos iniciales o de los polifenoles que no se pudieron analizar por UHPLC, (ácido tánico o elágico). Por lo tanto, para evaluar el rendimiento real del proceso serían necesarios más ensayos.

4.1.3. Experimentos en planta piloto

Se llevaron a cabo experimentos bajo radiación solar real en una planta piloto para la detoxificación de aguas residuales; el pH fue 3.9, la cantidad de hierro 3 mg/L y se analizó

la cantidad de peróxido a lo largo del proceso y se añadió cuando fue necesario. La Figura 4.1-6 muestra la degradación de cada contaminante, el COD, la cantidad de hierro en disolución y el consumo de H_2O_2 . La degradación de los contaminantes ocurre de manera rápida, incluso el compuesto más recalcitrante, 2,4-dinitrofenol, deja de detectarse a un t_{30w} de 2 min. A pesar de que la mineralización también tiene lugar (se elimina aproximadamente un 50% del COD después de 4 minutos de irradiación), cuando la mayoría de los contaminantes fueron eliminados aún quedaba en disolución aproximadamente un 70% del COD inicial. Respecto al hierro en disolución se observa algo de precipitación, pero a pesar de esto para un $t_{30w} = 65$ min aún tenemos cerca de 2mg/L en disolución. Por último, el consumo de peróxido es elevado en la primera parte del proceso (50 mg/L en los primeros 15 min); después la velocidad de consumo disminuye. El ratio entre el H_2O_2 consumido y la disminución de COD se calculó como indicador alternativo de la eficiencia del proceso, puesto que muestra la cantidad de agente oxidante que se necesita para eliminar 1 mg/L de DOC (cuanto mayor sea el ratio, menor es la eficiencia). Al inicio, la eficiencia fue alta (se necesitaron menos de 15 mg de H_2O_2 por mg de DOC para t_{30w} por debajo de 10 min), pero a $t_{30w} = 50$ min el consumo estuvo por encima de los 200 mg de H_2O_2 por mg de COD.

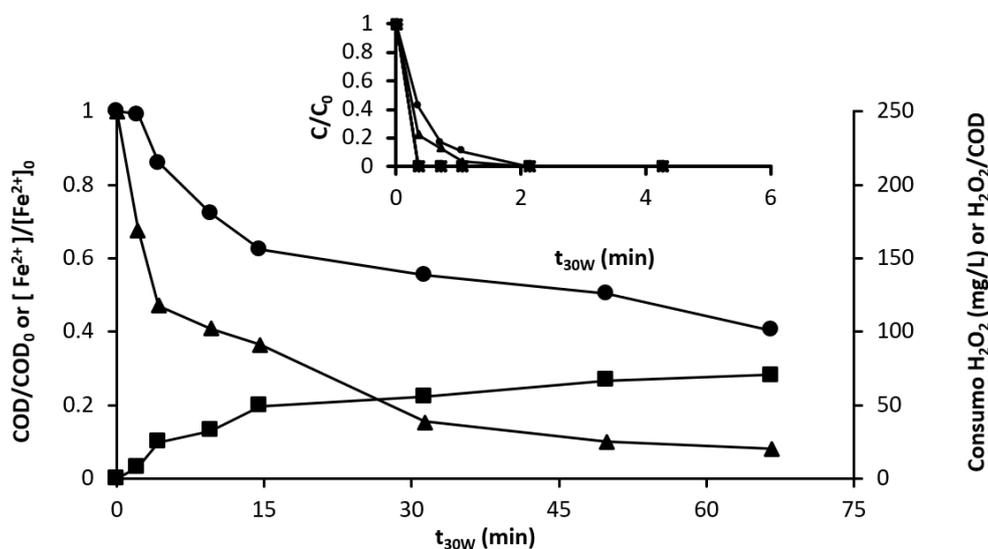


Figura 4.1-6 Tratamiento mediante proceso foto-Fenton de una mezcla de compuestos fenólicos empleando luz solar real: (●) concentración relativa de hierro, (▲) concentración relativa de COD y consumo de H_2O_2 (■). Inset: degradación de los compuestos fenólicos: (●) 2,4-dinitrofenol, (▲) ácido vanílico. Todos los demás compuestos desaparecieron en el primer tiempo de muestreo.

Puesto que una cantidad importante de COD permanece en la disolución, es necesario realizar nuevos experimentos para conocer mejor la naturaleza y biocompatibilidad de estos compuestos orgánicos. Se empleó la cromatografía de gases con detector de masas para identificar los principales compuestos presentes en la muestra, pero fue imposible obtener una identificación fiable de los foto-productos, puesto que se obtuvieron cromatogramas con muchos picos de baja intensidad. Esto se debe a la complejidad de la muestra inicial: una mezcla de 8 compuestos, dos de ellos polifenoles. Por tanto, es necesario emplear métodos analíticos más sofisticados, o bien buscar una nueva metodología para trabajar con este tipo de mezclas complejas; para ello se combinó la realización de una batería de bioensayos para evaluar la biocompatibilidad de la muestra tratada con las matrices de fluorescencia (EEM) con objeto de intentar conocer mejor los compuestos orgánicos que permanecen en la disolución. Estas medidas se encuentran detalladas en las secciones 4.1.4 y 4.1.5 respectivamente.

4.1.4. Ensayos de toxicidad

Puesto que no se alcanzó la mineralización completa de la mezcla, pero en poco tiempo de tratamiento se eliminaron los compuestos fenólicos principales, se consideró interesante monitorizar los cambios en la toxicidad de la mezcla para descartar la formación de productos de degradación tóxicos. Se realizó una batería de bioensayos preliminar con los compuestos puros para establecer su toxicidad: *P. subcapitata*, *D. magna*, así como sus actividades estrogénica y dioxin-like. 2,4-dinitrofenol resultó ser el compuesto más tóxico (EC_{50} de 0.7 y 12.4 mg/L para *P. subcapitata* y *D. magna* respectivamente), seguido del ácido protocateúico y los dos polifenoles, ácidos tánico y elálgico, para los cuales la EC_{50} obtenida para *P. subcapitata* fue de 10-20 mg/L y cerca de 50 mg/L para *D. magna*; la toxicidad del resto de compuestos fenólicos fue significativamente menor. Con respecto a la disrupción endocrina, es de nuevo el compuesto 2,4-dinitrofenol el que tiene mayor efecto (3.2 ng/L E2 equivalentes). Los ácidos protocateúico, tánico y vanílico también mostraron algún efecto estrogénico (ligeramente por debajo de 1 ng/L). Para la actividad dioxin-like el valor más elevado fue obtenido una vez más para el 2,4-dinitrofenol. De esta forma se demuestra, de acuerdo

a los resultados de todos los métodos, que este es el compuesto más peligroso de todos los presentes en la mezcla.

Se siguió la toxicidad a lo largo del proceso foto-Fenton como se describe en la sección de material y métodos. Para obtener muestras sin H₂O₂ se añadió una cantidad inicial controlada y se irradió la muestra en la planta solar hasta agotar completamente el H₂O₂. Como la irradiación exacta no se pudo obtener debido a la falta de H₂O₂, en este proceso la cantidad de COD de las muestras fue comparada con el COD vs tiempo obtenido en la sección 4.1.3 (Figura 4.1-6) para estimar el t_{30w} equivalente. La Tabla 4.1-3 muestra que se obtuvieron toxicidades elevadas para las muestras sin tratar tanto para los ensayos con *D. magna* como con *P. subcapitata* (65 y 71 % respectivamente). Se produce una detoxificación muy rápida al principio del proceso, coincidiendo con la desaparición de los compuestos primarios; a partir de este punto se observaron ciertas oscilaciones en los valores de la toxicidad, aunque se mantuvo en valores bajos. Esta toxicidad remanente puede deberse los productos de degradación de los ácidos tánico y eláxico. Un comportamiento similar se observa para la actividad estrogénica; la muestra no tratada resultó demasiado tóxica y no se pudo medir este parámetro. La primera muestra tratada tuvo una actividad estrogénica equivalente a 7 ng/L de E2 y la muestra dos (t_{30w} = 6min) de 1.2 ng/L. Después de t_{30w} = 15 min se obtuvieron valores por debajo de 2 ng/L. Estos niveles pueden causar disrupción endocrina en diferentes especies acuáticas. Efectos adversos se observaron en experimentos *in vivo* tanto en sistemas estáticos como en flujo. Se observaron (Jobling et al., 1996) efectos en la producción vitelogénica y crecimiento testicular en machos sexualmente maduros de la trucha arcoiris expuestos durante 3 semanas a concentraciones de 2 ng/L E2.

Por último, en los ensayos de la actividad dioxin-like, se observó una disminución inicial y un aumento al final del tratamiento. Esto puede atribuirse de nuevo a la persistencia de pequeñas cantidades de productos de degradación de los polifenoles presentes en la mezcla. El efecto de los compuestos dioxin-like en vertebrados incluye parámetros neurológicos, inmunológicos y reproductivos (White & Birnbaum, 2009). Así, esto supone una preocupación que debería ser estudiada en trabajos futuros.

Tabla 4.1-3 Riesgo biológico asociado a la mezcla de compuestos fenólicos a lo largo del tratamiento mediante proceso foto-Fenton en planta piloto a pH 3.9: toxicidad, actividad estrogénica y comportamiento dioxin-like.

Numero de muestra	t_{30w} (min)	Toxicidad (%)		Actividad estrogénica E2 (ng/L)	Comportamiento dioxin-like (ng/L)
		<i>D. magna</i>	<i>P. subcapitata</i>		
0	0	65	71.3	Muy tóxica	88
1	2.5	0	4.2	7.0	67
2	6	25	12.6	1.2	23
3	22	15	15.6	0.6	67
4	34	0	21.9	0.2	82
5	51	0	13.6	0.5	70

4.1.5. Medidas de fluorescencia

Como se ha indicado anteriormente, el uso de la espectroscopia de masas conlleva una preparación adecuada de las muestras y la necesidad de un equipamiento sofisticado si se quieren obtener resultados fiables. Esto se traduce también en un aumento del tiempo necesario para realizar el análisis. Por ello, resulta interesante considerar la espectroscopía de fluorescencia como herramienta alternativa para profundizar en la composición de la mezcla, así como en los cambios que tienen lugar a lo largo del proceso foto-Fenton.

Se midieron matrices de excitación emisión de fluorescencia (EEMs) de cada uno de los 8 compuestos (Figura 4.1-7). En general, los ácidos fenólicos muestran excitación en el rango 250-280 nm y emisión a 300-370 nm, alcanzando en algunos casos 400nm (ácido siríngico); la señal del 2,4-dinitrofenol se encuentra también dentro de esta región; el ácido sinápico, probablemente debido a la presencia de enlaces dobles exocíclicos, tiene una banda de excitación entre los 270 y 310 nm y emite a 400-450 nm; para el ácido tánico, la excitación se encuentra entre los 250-290 y la emisión entre los 310-340. Por último, el ácido elálgico presenta la banda de excitación por debajo de los 280 nm y tiene dos bandas de emisión, una por debajo de los 290 nm y otra entre los 390 y 430nm.

Se midieron EEM a lo largo del proceso foto-Fenton a diferentes tiempos de muestreo (Figura 4.1-8). En la muestra no tratada se satura la señal en la región $\lambda_{ex} < 300$ nm y λ_{em}

< 430 nm. Esto es el resultado de la suma de las contribuciones de cada uno de los compuestos. A lo largo del tratamiento se da una rápida disminución de la señal, que se puede ver claramente desde la muestra tomada a 0.4 min de tratamiento. Esto demuestra la eficiencia del proceso foto-Fenton bajo las condiciones estudiadas. Las diferencias en la reactividad descritas en la sección 4.1.2 se pueden apreciar también en las EEMs. Por ejemplo, los picos atribuidos al ácido sinápico desaparecen por completo a $t = 1.1$ min, mientras que los atribuidos al ácido siríntrico permanecen hasta $t = 3.2$ min. Con respecto a los polifenoles, se produce un incremento de la emisión en el área atribuida al ácido elágico, lo cual puede deberse a la liberación de pequeñas fracciones con cromóforos similares como consecuencia de la oxidación del ácido tánico. En cualquier caso, todos los cromóforos desaparecen en tiempos de irradiaciones superiores a 12 min, lo cual demuestra la desaparición de fracciones complejas en la mezcla (por ejemplo, aromaticidad).

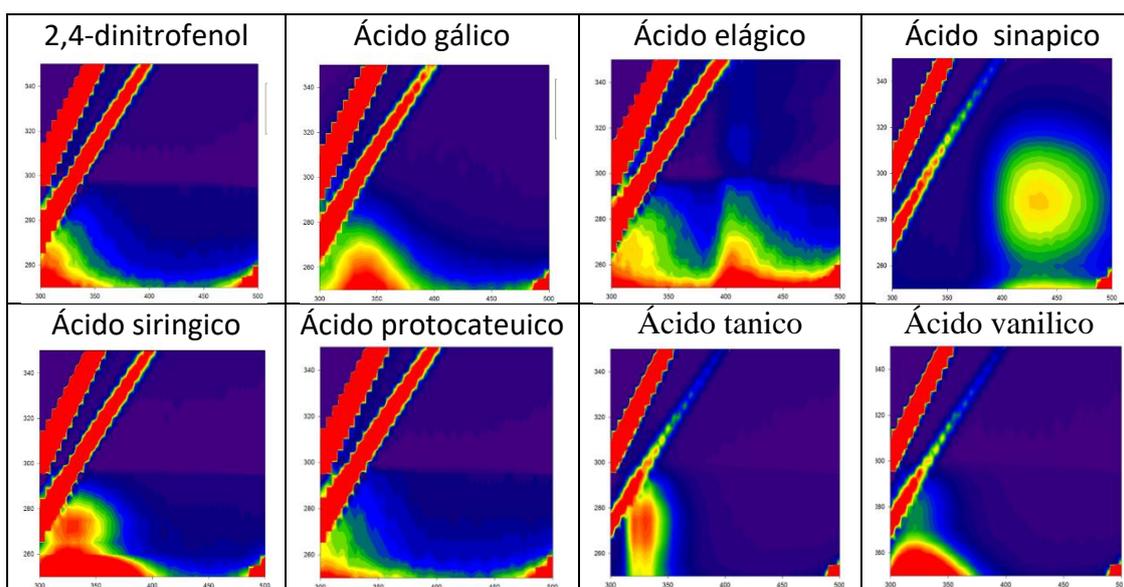


Figura 4.1-7 EEM obtenidas para los 8 compuesto fenólicos empleados en el presente estudio a una concentración de 1 mg/L. Las figuras muestran la emisión de fluorescencia en el eje x (en el rango de 300 a 500 nm) para las longitudes de onda de excitación indicadas en el eje Y (de 250 a 350 nm). Los colores rojos se corresponden con las intensidades más altas y los azules con las más bajas.

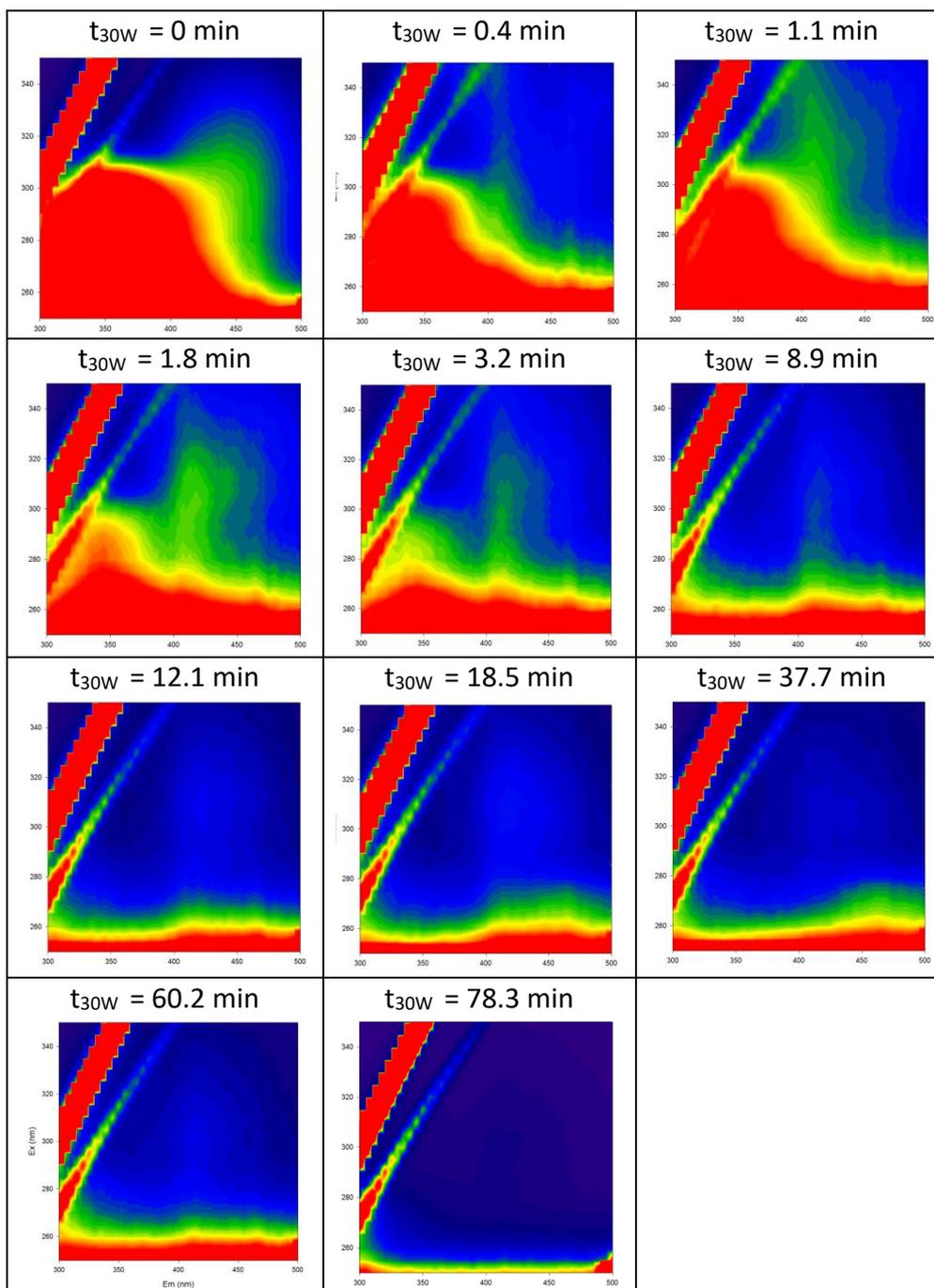


Figura 4.1-8 EEM medidas a lo largo del tratamiento foto-Fenton para la mezcla de compuestos fenólicos. Las figuras muestran la emisión de fluorescencia en el eje x (en el rango de 300 a 500 nm) para las longitudes de onda de excitación indicadas en el eje Y (de 250 a 350 nm). Los colores rojos se corresponden con las intensidades más altas y los azules con las más bajas.

4.2. Tratamiento de contaminantes representativos de la industria alimentaria mediante Ozono y combinación ozono- luz UVA/VIS

4.2.1. Introducción

El tratamiento mediante ozono resulta de gran interés puesto que, como se ha indicado anteriormente, implica no solo la acción directa del ozono, sino también la acción indirecta del radical hidroxilo (Beltrán, 2003; Dodd et al., 2009). El predominio de un mecanismo u otro depende del pH. En medio básico existe una elevada concentración de radicales hidroxilo, que son menos selectivos y reaccionan a mayor velocidad (10^6 - 10^{12} veces más rápido) que el ozono por mecanismo directo (Ikehata & El-Din, 2004). Estas diferencias mecánicas explican que la ozonización de compuestos orgánicos a valores elevados de pH sea más eficiente que a pHs bajos (Luis et al., 2011).

La principal dificultad de la ozonización, al igual que ocurre con otros tratamientos de oxidación avanzada, es conseguir la mineralización completa de los contaminantes una vez que estos han sufrido las oxidaciones iniciales (Ribeiro et al., 2015). Existen varios trabajos que demuestran que, aunque el ozono es eficiente para degradar contaminantes, generalmente no se consigue la mineralización de la muestra, quedando en disolución una mezcla de intermedios difíciles de degradar. La oxidación parcial de algunos contaminantes genera intermedios, como los ácidos carboxílicos, que impiden la mineralización completa de las aguas (Agustina et al., 2005) y que generalmente aumentan su toxicidad (Šojić et al., 2012). En cambio cuando la ozonización se produce a pH más altos, la mineralización aumenta a causa de esta mayor generación de radicales hidroxilo (Beltrán, 2003).

Otra forma de incrementar la generación de radicales hidroxilo es la combinación del proceso de ozonización con luz. Ambos procesos tienen limitaciones importantes: la fotólisis es un proceso lento y poco eficiente para degradar contaminantes orgánicos, mientras que los procesos de ozonización son muy selectivos y no consiguen oxidar a todos los compuestos. La aplicación simultánea de ambos evita algunas de estas dificultades y mejora el rendimiento, permitiendo el tratamiento de aguas complejas de

modo económicamente ventajoso (Zou & Zhu, 2008). Esto se debe a que las tasa de reacción de los procesos combinados son más altas y es posible acercarse a una mineralización completa (Mecha et al., 2016). Algunos ejemplos recientes demuestran la eficacia de estos procesos combinados en contaminantes difícilmente oxidables como los parabenos (Cuerda-Correa et al., 2016) o algunas mezclas complejas de contaminantes refractarios a otros tratamientos (Quiñones et al., 2015).

Una ventaja adicional de esta combinación es que se mejora el rendimiento del proceso, especialmente en las condiciones de pH más desfavorables para la ozonización (pH ácido) (Chávez et al., 2016). Además, otra ventaja añadida es que la luz UV se puede aplicar tanto con lámpara de luz UV-Vis, como aprovechando la energía del sol, con rendimientos muy semejantes (Márquez et al., 2014; Quiñones et al., 2015). Algunos estudios recientes con un solo contaminante (cafeína) realizados mediante metodología de diseño experimental y utilizando superficies de respuesta han determinado que la mineralización se aumenta con el pH y que la intensidad de la luz tiene un efecto muy pequeño (Souza & Féris, 2015).

Con todo esto, en este apartado se estudia la degradación de la misma mezcla de contaminantes empleada en el apartado anterior (ácido tánico, elágico, sinápico, siríngico, gálico, protocateuico, vanílico y 2,4-dinitrofenol) mediante ozonización y la combinación de ésta con luz UVA-Vis. En este caso la metodología basada en el diseño experimental tipo Doehlert se ha empleado para el análisis del efecto que las variables pH, dosis de ozono y concentración inicial de contaminante tienen sobre el proceso. Se ha realizado medidas de fluorescencia para la obtención de información complementaria, así como bioensayos de toxicidad para la evaluación de los riesgos ambientales asociados a la mezcla.

4.2.2. Diseño de experimento

Se realizó un diseño experimental tipo Doehlert con 15 experimentos. En la Tabla 4.2-1 se muestran los valores de las tres variables empleadas. Se asignaron siete niveles a la variable pH, cinco niveles a la dosis de ozono y tres niveles a la concentración inicial de los contaminantes.

Tabla 4.2-1 Variables empleadas en el diseño experimental Doehlert para el estudio del tratamiento con O₃ y sus niveles

Variable	Niveles	Valor mínimo	Valor máximo	incremento
pH	7	3	12	1.5
D-O ₃ g/h	5	0.2	1	0.2
[C] mg/L	3	1	6	2.5

Las condiciones experimentales de cada uno de los experimentos se recogen en la Tabla 4.2-2. El mismo diseño con las mismas condiciones fue empleado tanto para el caso de tratamiento con ozono como para la combinación de ozono con luz UVA-Vis.

Tabla 4.2-2 Valores experimentales de la matriz Doehlert usados para obtener las superficies de respuesta

Nº experimento	D-O ₃ g/h	pH	[C] mg/L
1	0.6	7.5	3.5
2	1	7.5	3.5
3	0.8	12	3.5
4	0.8	9	6
5	0.2	7.5	3.5
6	0.4	3	3.5
7	0.4	6	1
8	0.8	3	3.5
9	0.8	6	1
10	0.4	12	3.5
11	0.6	10.5	1
12	0.4	9	6
13	0.6	4.5	6
14	0.6	7.5	3.5
15	0.6	7.5	3.5

4.2.3. Tratamiento mediante O₃ y combinación O₃/UVA-VIS

Se obtuvieron gráficas de la concentración relativa de cada uno de los 6 compuestos medidos por HPLC (al igual que en el caso del proceso foto-Fenton) frente al tiempo de tratamiento, para cada uno de los experimentos. Las Figura 4.2-1 y Figura 4.2-2 se muestran como ejemplo de uno de los experimentos con ozono y con la combinación ozono luz UVA-Vis respectivamente.

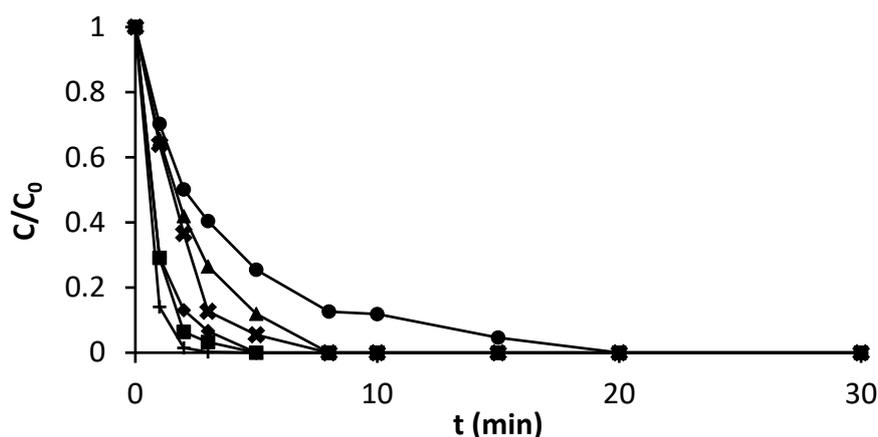


Figura 4.2-1 Eliminación de seis compuestos fenólicos mediante tratamiento con ozono : concentración inicial de cada contaminante = 3.5 mg/L; Dosis de ozono = 0.2 g/h y pH = 7. Se representa la concentración relativa de cada compuesto frente al tiempo de tratamiento: ácido gálico (◆); ácido protocateuico (■); ácido vanílico (▲); ácido sinápico (+); ácido siríngico (×) y 2,4-dinitrofenol (●)

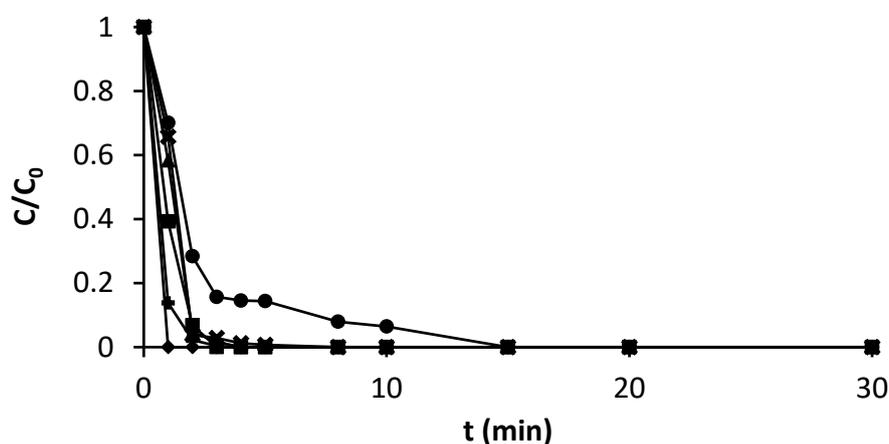


Figura 4.2-2 Eliminación de seis compuestos fenólicos mediante tratamiento combinando ozono con luz UVA/VIS (b): concentración inicial de cada contaminante = 3.5 mg/L; Dosis de ozono = 0.2 g/h y pH = 7. Se representa la concentración relativa de cada compuesto frente al tiempo de tratamiento: ácido gálico (◆); ácido protocateuico (■); ácido vanílico (▲); ácido sinápico (+); ácido siríngico (×) y 2,4-dinitrofenol (●)

En general, se observa una rápida eliminación de los contaminantes para ambos tratamientos, siendo el ácido sinápico el compuesto que desaparece en primer lugar y el 2,4- dinitrofenol el compuesto que requiere más tiempo para ser eliminado (unos 20 minutos de ozonización). Esto probablemente se deba a la presencia de doble enlace en la cadena lateral, más susceptible de ser atacado por el ozono que los anillos aromáticos. Este efecto ya se ha observado con anterioridad en compuestos fenólicos como el eugenol y guaiacol (Amat et al., 2005b).

Dada la rápida eliminación de los contaminantes, se escogió el tiempo necesario para reducir en un 80% ($t_{80\%}$) la concentración de la suma de los seis contaminantes que se siguen por HPLC como variable respuesta. En la Tabla 4.2-3 se muestran los resultados obtenidos en los 15 experimentos de tratamiento con ozono y en los 15 experimentos en que se combinó el ozono con la luz UVA-Vis.

Tabla 4.2-3 Valores de la variable respuesta obtenidos para cada uno de los puntos experimentales de la matriz Doehlert y empleados para la obtención de las superficies de respuesta

Nº experimento	$t_{80\%} O_3$ (min)	$t_{80\%} O_3/UVA-VIS$ (min)
1	1.54	1.65
2	1.29	0.91
3	0.95	1.03
4	1	1.06
5	2.34	1.73
6	6.26	3.10
7	1.53	1.72
8	2.44	2.97
9	0.99	1.8
10	0.97	1.37
11	0.85	1.57
12	1.38	1.53
13	2.93	3.15
14	0.93	1.42
15	0.9	1.35

Basándonos en el $t_{80\%}$ obtenido se diseñó un modelo cuadrático de superficie de respuesta tridimensional para cada uno de los tratamientos Ec. 4.2-1 para el tratamiento con ozono y Ec. 4.2-2 para la combinación de ozono y luz.

$$t_{80\%} = 12.36 - 13.31 \cdot DO_3 - 1.86 \cdot pH + 0.83 \cdot [C] + 4.32 \cdot DO_3^2 + 1.05 \cdot DO_3 \cdot pH - 0.55 \cdot DO_3 \cdot [C] + 0.07 \cdot pH^2 - 0.03 \cdot pH \cdot [C] - 0.015 \cdot [C]^2 \quad \text{Ec. 4.2-1}$$

$$t_{80\%} = 3.22 - 0.78 \cdot DO_3 - 0.46 \cdot pH + 0.38 \cdot [C] - 0.96 \cdot DO_3^2 - 0.06 \cdot DO_3 \cdot pH - 0.03 \cdot DO_3 \cdot [C] + 0.03 \cdot pH^2 - 0.06 \cdot pH \cdot [C] - 0.038 \cdot [C]^2 \quad \text{Ec. 4.2-2}$$

El valor del coeficiente de determinación (R^2) es elevado para ambos modelos (0.92 en el caso del ozono y 0.99 en el caso de la combinación con luz), lo que indica una buena correspondencia entre los valores experimentales y los calculados con el modelo para la variable respuesta $t_{80\%}$. Los diagramas de Pareto (Figura 4.2-3) muestran que en ambos tratamientos la variable que tiene mayor influencia en el $t_{80\%}$ es el pH, como era de esperar, se obtienen degradaciones más rápidas a pH básicos. Todos los factores son significativos excepto la concentración inicial de los contaminantes en el caso del tratamiento mediante ozono.

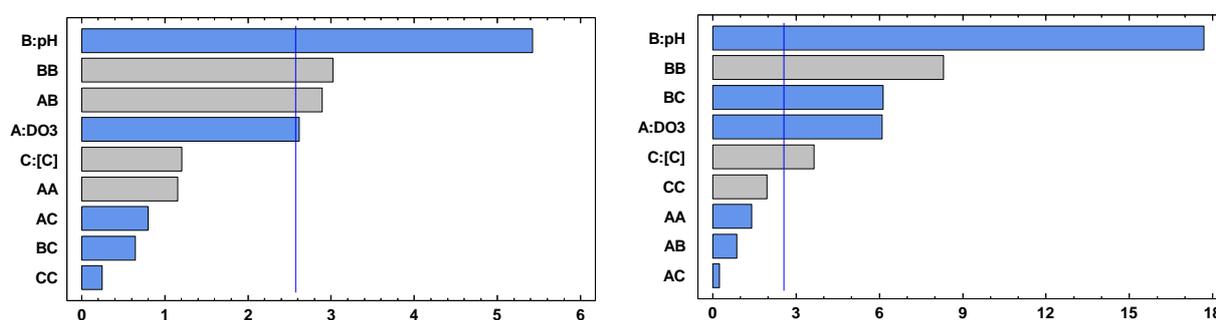


Figura 4.2-3 Diagramas de Pareto obtenidos para la variable respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidos para el tratamiento mediante ozono (derecha) y mediante la combinación de ozono y luz (izquierda) para la degradación de una mezcla de seis compuestos fenólicos.

Teniendo en cuenta esto las Ec. 4.2-1 y Ec. 4.2-2 se pueden reformular de la siguiente forma (Ec. 4.2-3 y Ec. 4.2-4 respectivamente):

$$t_{80\%} = 12.36 - 13.31 \cdot DO_3 + 4.32 \cdot DO_3^2 + 1.05 \cdot DO_3 \cdot pH + 0.07 \cdot pH^2 \quad \text{Ec. 4.2-3}$$

$$t_{80\%} = 3.22 - 0.78 \cdot DO_3 - 0.46 \cdot pH + 0.38 \cdot [C] + 0.03 \cdot pH^2 - 0.06 \cdot pH \cdot [C] \quad \text{Ec. 4.2-4}$$

Para profundizar en el estudio de la influencia de las variables en la degradación, se contruyeron gráficas de superficie de respuesta fijando una de las variables a diferentes valores. En el caso del tratamiento mediante ozono se fijó primero el pH a un valor bajo, 5 concretamente (Figura 4.2-4 arriba) y alto, 10 (Figura 4.2-4 abajo). Como podemos comprobar, cuando el pH es bajo, el tiempo necesario para degradar los contaminantes disminuye conforme aumenta la dosis de ozono, mientras que cuando el valor del pH es elevado la degradación es más rápida para concentraciones medias bajas de contaminantes y dosis de ozono medias/bajas. Sin embargo, para dosis elevadas de

ozono la degradación es más rápida a medida que aumenta la concentración de contaminantes. Este resultado probablemente se debe a los diferentes mecanismos que operan en ambos medios: mientras que a pH bajo predomina el ataque molecular del ozono, a pH = 10 predomina la descomposición del ozono en radicales hidroxilo. Cuando tiene lugar el mecanismo más eficiente (radicales hidroxilo) se necesita menos ozono.

Si observamos en detalle la superficie obtenida a pH = 10, vemos que se pueden distinguir dos regiones donde la tasa de reacción es más baja: una a dosis de ozono bajas y concentraciones de contaminante altas, seguramente debido a la falta de agente oxidante; y otra a dosis de ozono elevadas. En este caso la recombinación de radicales puede disminuir la eficiencia del proceso de ozonización

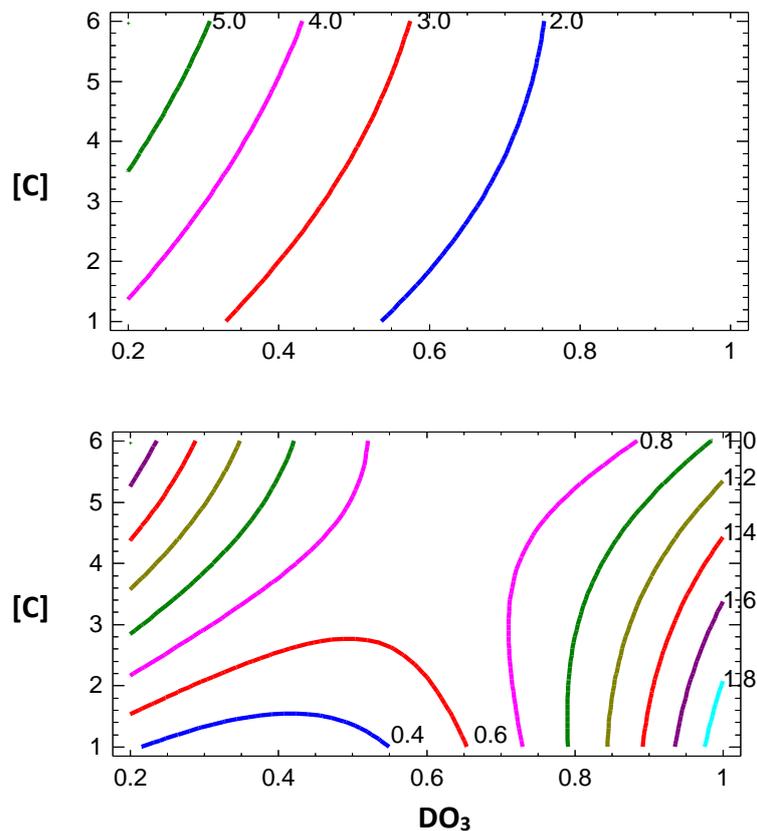


Figura 4.2-4 Graficas de contorno para la respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidas de la degradación de seis compuesto fenólicos mediante Ozono. Valor de pH = 5 (arriba) y 10 (abajo).

Se obtuvo también la gráfica de contorno fijando el valor de la concentración inicial de los contaminantes en el punto medio, 3.5 mg/L (Figura 4.2-5). En este caso se observa la misma tendencia: el proceso es más eficiente a valores de pH altos debido al predominio del mecanismo radicalario; a dosis de ozono bajas se necesitan valores de pH elevado; por último, para dosis elevadas de ozono y pH básicos se da una ligera disminución de la eficiencia, probablemente debido a la recombinación de radicales.

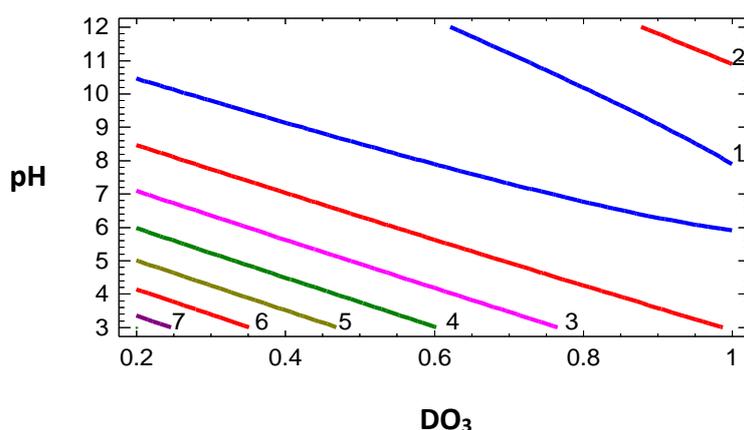


Figura 4.2-5 Gráficas de contorno para la respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidas de la degradación de seis compuesto fenólicos mediante Ozono. Valor de $[C] = 3.5$ mg/L.

Por último, se fijó la dosis de ozono en 0.3 g/h (Figura 4.2-6 arriba) y 0.8 g/h (Figura 4.2-6 abajo). De igual forma que en los casos anteriores, el efecto del pH predomina, siendo la reacción más rápida a valores de pH básicos. Sin embargo, se pueden apreciar algunas diferencias: cuando la dosis de ozono es baja, el incremento del pH acelera el proceso de degradación en todo el dominio estudiado y la concentración de contaminantes tiene un ligero efecto en el proceso (al incrementar la concentración de contaminantes, se necesitan valores de pH más elevados para alcanzar la misma velocidad de degradación); por otro lado, cuando la dosis de ozono es elevada, la concentración inicial de contaminante no es relevante y el pH tiene menos efecto; la eficiencia disminuye a valores de pH elevados, de nuevo debido a la recombinación de radicales.

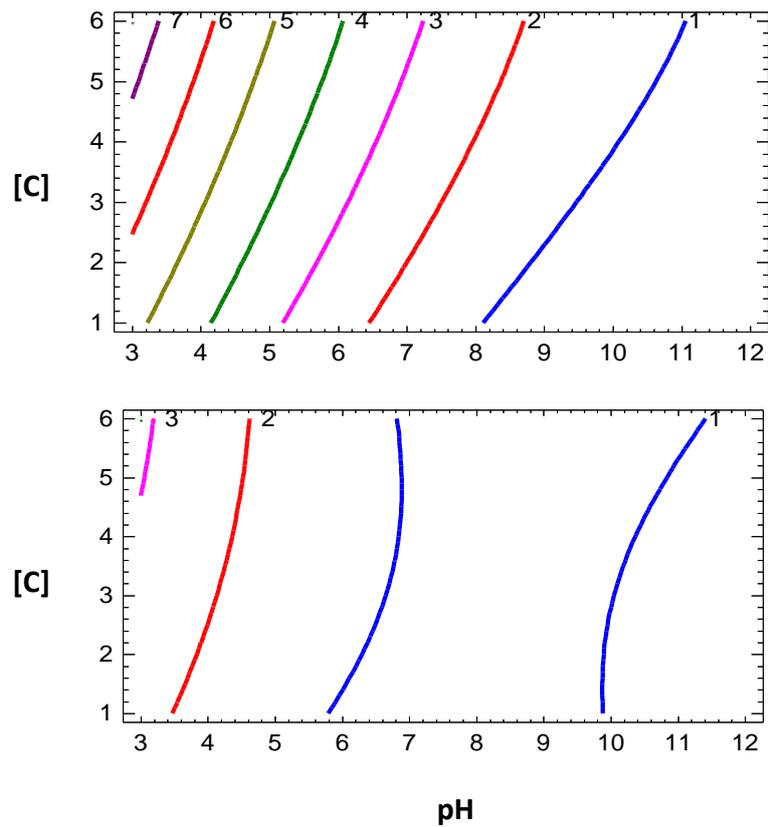


Figura 4.2-6 Graficas de contorno para la respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidas de la degradación de seis compuesto fenólicos mediante Ozono. Valor de $DO_3 = 0.3$ g/h (arriba) y 0.8 (abajo).

De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones: a dosis de ozono bajas y pHs ácidos, la reacción no es eficiente; el incremento de los valores de ambos parámetros aumenta la eficiencia del proceso; por último, valores de pH elevados combinados con dosis altas de ozono se traducen en una disminución de la eficiencia.

En caso del tratamiento combinando ozono y luz se obtuvieron graficas de superficie de respuesta fijando cada una de las variables en su valor intermedio (Figura 4.2-7). Fijando la concentración de contaminantes (Figura 4.2-7 arriba), para valores de pH más ácidos la dosis de ozono prácticamente no influye en el tiempo de degradación, mientras que para valores de pH por encima de 7, el tiempo necesario para reducir la concentración inicial de los contaminantes en un 80% aumenta con la dosis de ozono. Cuando fijamos el valor del pH en un punto intermedio (Figura 4.2-7 centro) el tiempo de degradación disminuye con el aumento de la dosis de ozono. Por último, fijando la dosis de ozono en una punto intermedio (Figura 4.2-7 abajo) la degradación ocurre generalmente de forma más rápida conforme aumenta el valor del pH.

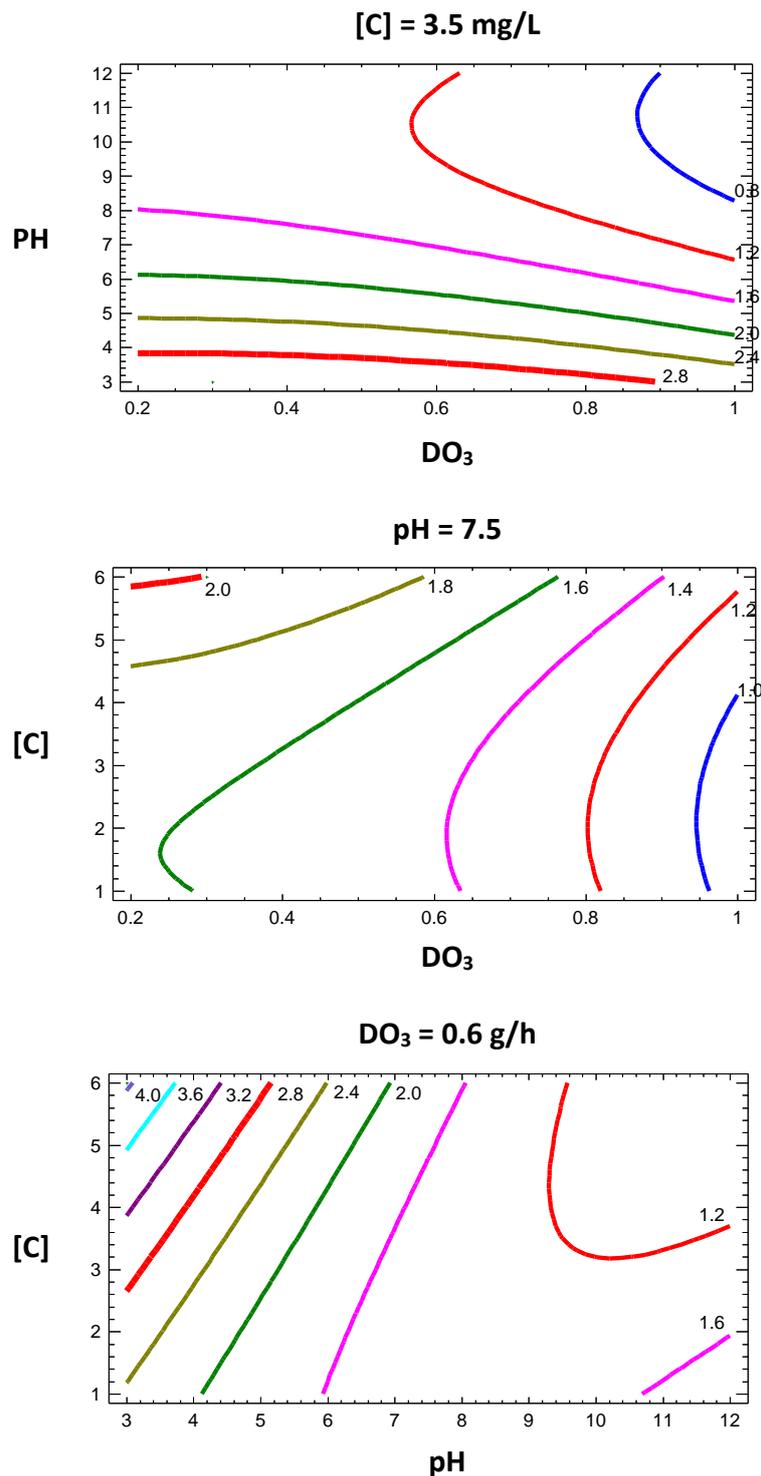


Figura 4.2-7 Graficas de contorno para la respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidas de la degradación de seis compuesto fenólicos mediante la combinación de Ozono y luz UVA/VIS. Valor de [C] = 3.5 mg/L (arriba), pH= 7.5 (centro) y $DO_3 = 0.6$ g/h (abajo).

Para comparar los resultados obtenidos mediante ambos tratamientos a los valores del $t_{80\%}$ obtenidos para el tratamiento sólo con ozono se le restaron los obtenidos mediante

la combinación de ozono y luz UVA-Vis. De esta forma tenemos una nueva variable respuesta (Tabla 4.2-4).

Tabla 4.2-4 Valores de la variable respuesta obtenida de la resta de la variable respuesta obtenida mediante el tratamiento combinando O₃/luzUVA-VIS la respuesta obtenida mediante el tratamiento con O₃.

Nº experimento	t_{80%} O₃/UVA-VIS - t_{80%} O₃
1	0.11
2	-0.37
3	0.08
4	0.06
5	-0.61
6	-3.16
7	0.19
8	0.52
9	0.39
10	0.39
11	0.72
12	0.77
13	0.23
14	0.49
15	0.46

Basándonos en esta nueva variable se obtuvo un nuevo modelo y se construyeron gráficas de superficie de respuesta fijando cada uno de los factores en el punto intermedio (Figura 4.2-8). En caso de fijar la [C] (Figura 4.2-8 arriba izquierda) se observa que, como era de esperar, la combinación del ozono con luz UVA-Vis favorece la degradación cuando la dosis de ozono es baja y el pH ácido (es decir, condiciones más desfavorables). Además, también favorece la degradación cuando la dosis de ozono es elevada (mayor de 0.8) y el valor del pH mayor de 10. Si fijamos el valor del pH en el punto intermedio (Figura 4.2-8 arriba derecha) vemos que la combinación de ozono/Luz UVA-VIS resulta beneficiosa cuando la dosis de ozono es pequeña (por debajo de 0.35 g/h aproximadamente), independientemente de la concentración inicial de los contaminantes. Por último, al fijar la dosis de ozono en el punto intermedio (Figura 4.2-8 abajo) observamos que la degradación es más rápida combinando el ozono y la luz UVA-

Vis para valores de pH por debajo de 5 aproximadamente, de nuevo independientemente de la concentración inicial de los contaminantes.

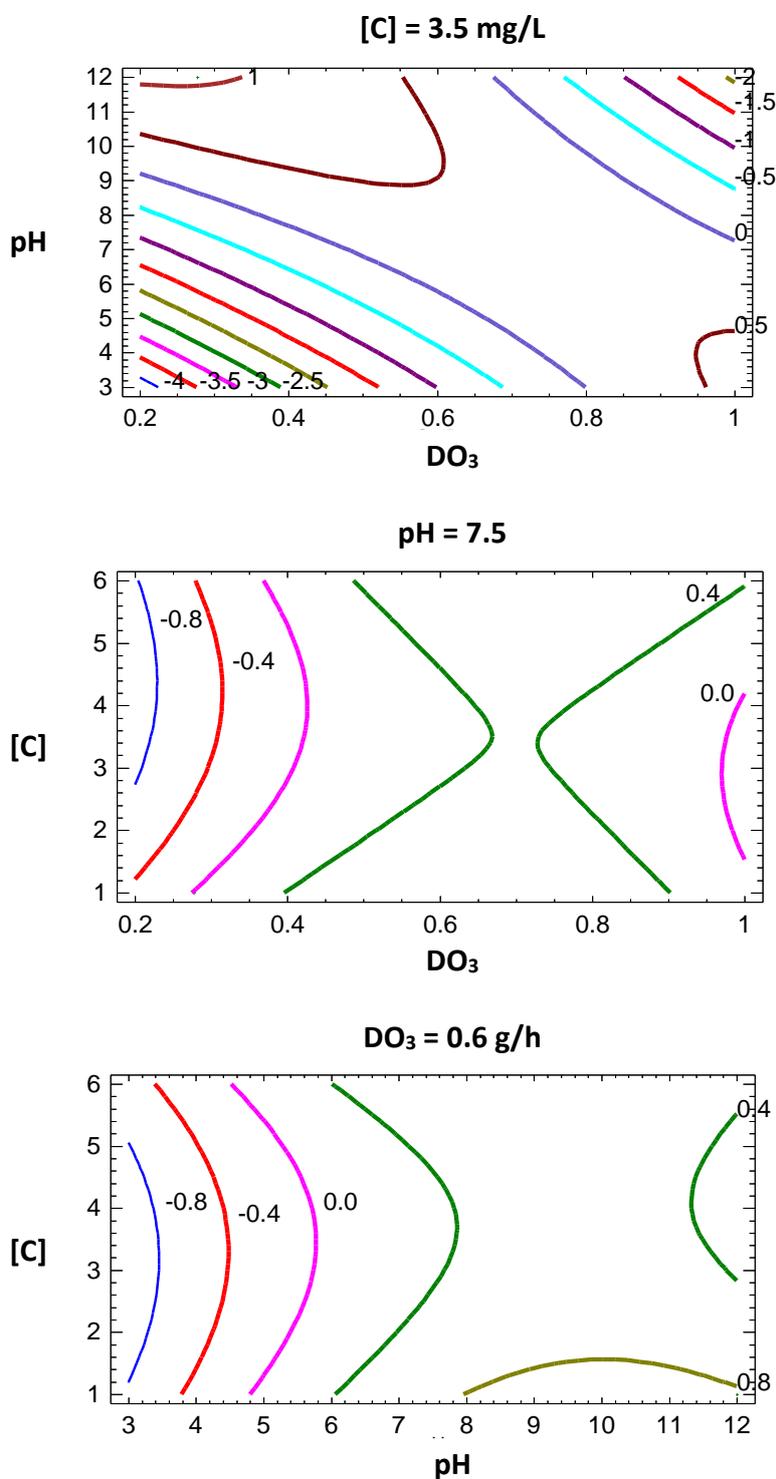


Figura 4.2-8 Graficas de contorno para la respuesta de $t_{80\%}$ (min) obtenido mediante la combinación $\text{O}_3/\text{UVA-VIS}$ menos $t_{80\%}$ (min) obtenido mediante el tratamiento con ozono de la degradación de seis compuesto. Valor de $[C] = 3.5 \text{ mg/L}$ (arriba); $\text{pH} = 7.5$ (centro) y $\text{DO}_3 = 0.6 \text{ g/h}$ (abajo).

Con el fin de comprobar que lo que ocurre no es fotólisis se realizaron tres pruebas de degradación sólo con luz a tres valores de pH: 3, 7.5 y 9 (Figura 4.2-9 arriba, centro y abajo respectivamente).

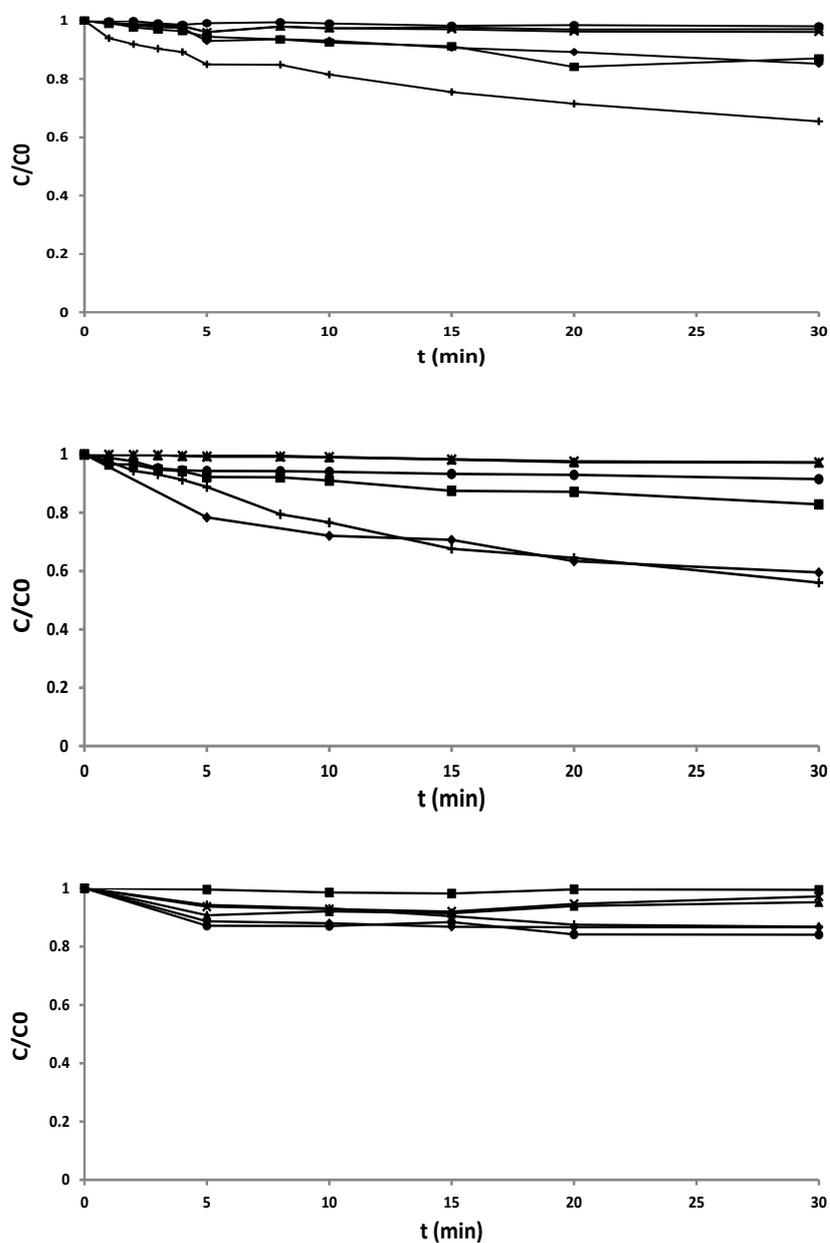


Figura 4.2-9 Fotólisis de una mezcla de 6 compuestos fenólicos con una concentración inicial de 3.5 mg/L de cada uno de ellos a tres valores diferentes de pH: 3 (arriba), 7.5 (centro) y 9 (abajo). Se representa la concentración relativa de cada uno de los contaminantes frente al tiempo de tratamiento: ácido gálico (◆); ácido protocateuico (■); ácido vanílico (▲); ácido sinápico (+); ácido sirínigico (×) y 2,4-dinitrofenol (●)

La mineralización alcanzada después de los 30 min de tratamiento en ambos casos fue en la mayoría de los experimentos del 20-50%, incluido el punto central, en el cual se alcanza una mineralización entorno al 30% para el caso del ozono y entorno al 40% para la combinación ozono-Luz UVA-Vis (datos no incluidos). En general se consigue una eliminación de TOC superior con la combinación de ozono con luz UVA-Vis y en ningún caso se alcanza la mineralización completa para ninguno de los dos tratamientos. Esto nos indica que a pesar de que ambos procesos son capaces de degradar de forma eficiente los compuestos fenólicos monitorizados, cantidades importantes de compuestos orgánicos permanecen en el medio de reacción, ya sea procedentes de los productos de degradación de los compuestos iniciales o de los polifenoles que no se pudieron monitorizar por UHPLC, (ácido tánico o elágico). Por lo tanto, para evaluar el rendimiento real del proceso serían necesarios más ensayos.

4.2.4. Ensayos de toxicidad

Debido a que no se alcanzó la mineralización completa de la mezcla en ningún caso, pero en poco tiempo de tratamiento se eliminaron los compuestos fenólicos principales, resultó interesante la monitorización de los cambios en la toxicidad de la mezcla para descartar la formación de productos de degradación tóxicos.

Puesto que es el tratamiento con ozono con el que se alcanzan valores menores de mineralización, se siguió la toxicidad a lo largo de este proceso como se describe en la sección de material y métodos. Se emplearon las condiciones de ensayo correspondientes al punto 4 del diseño experimental ($[C]= 6 \text{ mg/L}$, $\text{pH} = 9$ y $\text{DO}_3 = 0.2 \text{ g/h}$) puesto que en este caso a los 10 minutos de tratamiento se han conseguido eliminar todos los contaminantes, pero a los 30 minutos aún queda un 70% de TOC en la muestra. La Tabla 4.2-5 muestra que se obtuvieron toxicidades muy elevadas para las muestras sin tratar, tanto para los ensayos con *D. magna* como con *P. subcapitata* (100% en ambos casos). Se produce una detoxificación muy rápida al principio del proceso, a partir de este punto los valores se mantienen en torno a 20-25 y en el caso de *P. Subcapitata* disminuye hasta un 3%. Esta toxicidad remanente puede deberse a la bio-actividad de los productos de degradación de los ácidos tánico y elágico. Un comportamiento similar se observa para las actividades estrogénica y dioxin-like; la muestra no tratada resultó

demasiada tóxica y no se pudo medir este parámetro en el caso de la actividad estrogénica. En ambos casos se observa un aumento de la actividad en la muestra 3 ($t = 5$ min) y después vuelve a disminuir hasta ser eliminada por completo en el caso de la actividad estrogénica. En el caso de la actividad *dioxin-like* al final del tratamiento aún se observan valores de 107.5 ng/L. Esto puede atribuirse al remanente de productos de degradación de los polifenoles presentes en la mezcla. El efecto de los compuesto dioxin-like en vertebrados incluye parametros neurológicos, inmunológicos y reproductivos (White & Birnbaum, 2009).

Tabla 4.2-5 Riesgo biológico asociado a la mezcla de compuestos fenólicos a lo largo del tratamiento mediante ozono a pH 9: toxicidad, actividad estrogénica y comportamiento dioxin-like

Numero de muestra	t (min)	Toxicidad (%)		Actividad estrogénica E2 (ng/L)	Comportamiento dioxin-like (ng/L)
		D. magna	P. subcapitata		
0	0	100	100	Muy tóxica	11342
1	1	5	30	75.7	14464
2	2	50	20	11.4	22,5
3	5	30	25	45.3	82,4
4	10	20	26	7.3	166,2
5	30	25	3	--	107,5

4.2.5. Medidas de fluorescencia

Al igual que en caso del estudio de la degradación mediante foto-Fenton, en este caso también se han empleado EEMs para monitorizar los cambios principales que tienen lugar en la fracción orgánica.

Se midieron EEMs tanto a lo largo del proceso de ozonización como de la combinación de ozono con luz UVA-Vis (Figura 4.2-10 y Figura 4.2-11 respectivamente). Como podemos observar, a lo largo de ambos tratamientos se da una disminución progresiva de la fluorescencia en la región $\lambda_{ex} < 300$ nm y $\lambda_{em} < 400$ nm aproximadamente. En la

región λ_{ex} 300-350 y λ_{em} 420-470 aproximadamente, se observa un aumento en los primeros minutos de tratamiento (efecto más acusado en el caso del tratamiento con ozono) y una posterior disminución hasta la desaparición casi completa de la fluorescencia en ambos tratamientos.

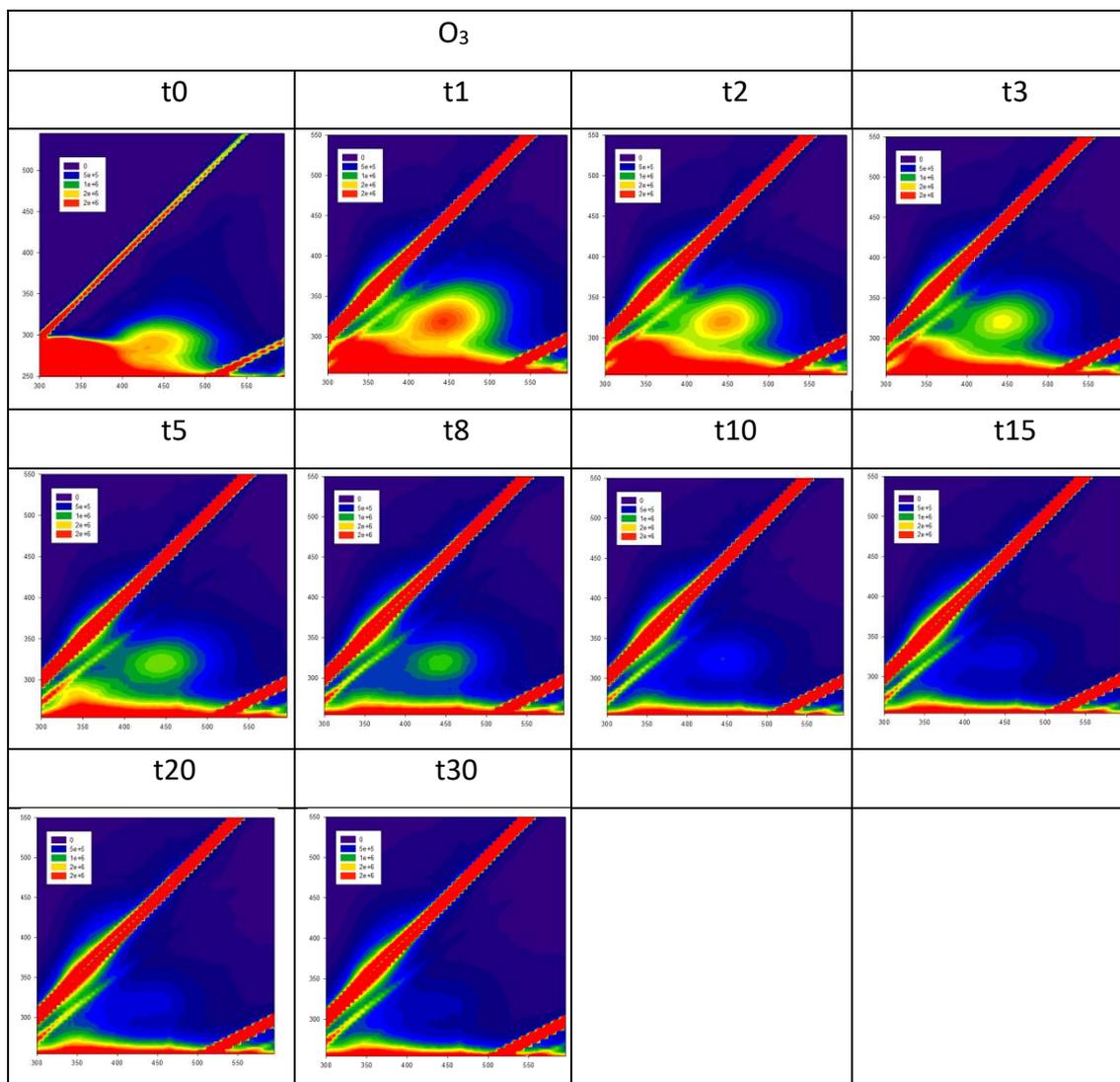


Figura 4.2-10 EEMs medidas a lo largo del tratamiento mediante ozono de una mezcla de 8 compuesto fenólicos. Las figuras muestran la emisión de fluorescencia en el X (en el rango de 300 a 500 nm) para las longitudes de onda de excitación indicada en el eje Y (de 250 a 350 nm). Los colores rojos corresponden a intensidades más altas y los azules a más bajas.

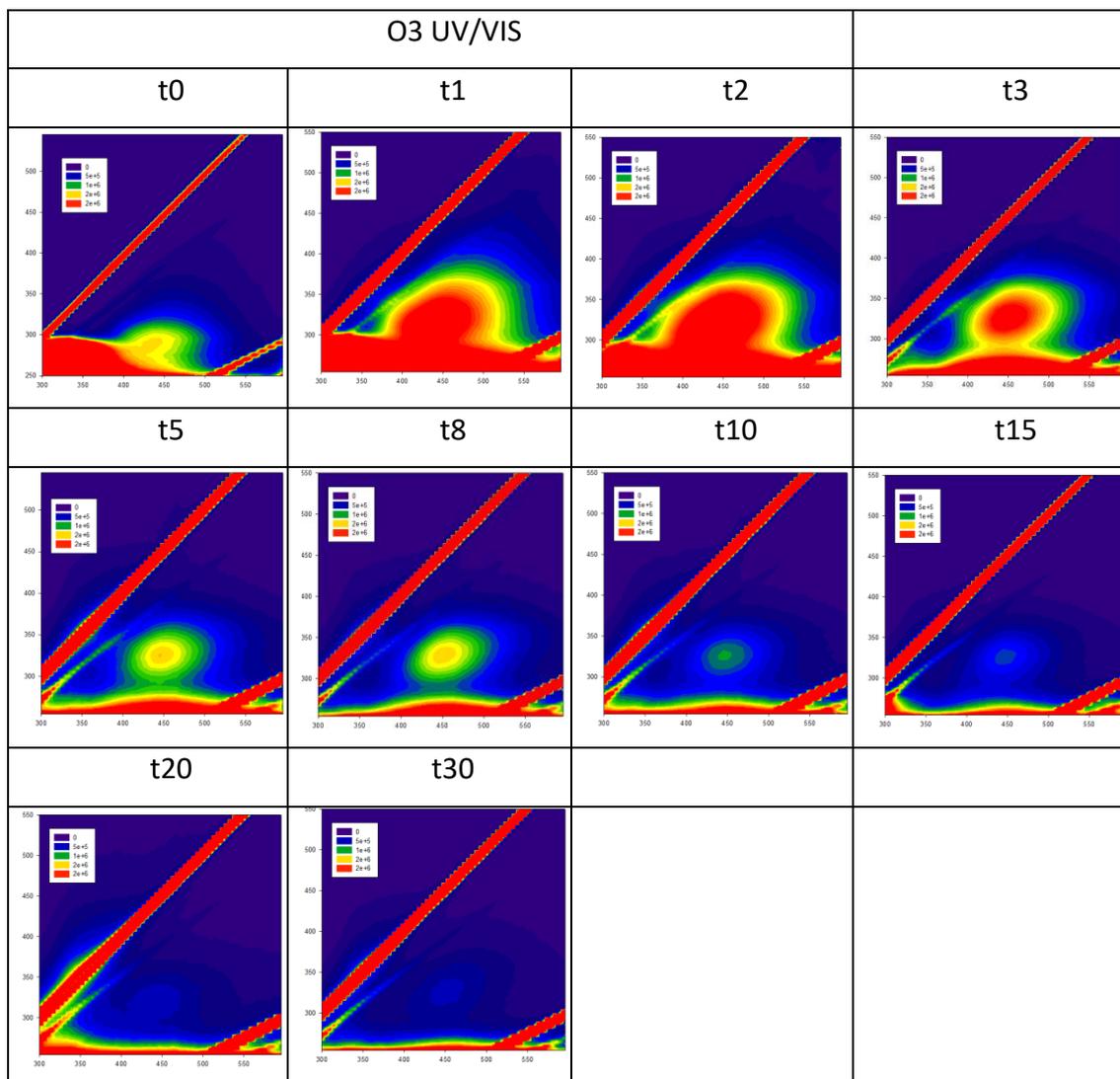


Figura 4.2-11 EEMs medidas a lo largo del tratamiento mediante la combinación de ozono con luz UV de una mezcla de 8 compuesto fenólicos. Las figuras muestran la emisión de fluorescencia en el X (en el rango de 300 a 500 nm) para las longitudes de onda de excitación indicada en el eje Y (de 250 a 350 nm). Los colores rojos corresponden a intensidades más altas y los azules a más bajas.

Para profundizar en el conocimiento del proceso, se decidió realizar en análisis de las EEMs mediante PARAFAC. Para ello se creó un set de datos incluyendo las procedentes de la degradación mediante ozono y las procedentes de la degradación mediante la combinación ozono luz UVA-Vis. Tras corregir y preprocesar las EEMs se testaron modelos de 3 a 8 componentes, obteniendo los mejores resultados para el modelo de 4 componentes. Hay que tener en cuenta que el número de matrices que componen el set de datos (20 en este caso, 10 de cada uno de los tratamientos) es factor limitante; además los compuestos empleados en este estudio poseen máximos de fluorescencia

muy cercanos y diferencias de intensidades importantes por lo que llegar a identificar 8 componentes es muy complicado. En la Tabla 4.2-6 se muestran los máximos de excitación/emisión para los 4 componentes obtenidos mediante PARAFAC.

Tabla 4.2-6 Características de los 4 componentes obtenidos mediante PARAFAC de las EEMs de los procesos de degradación

Componente	Max Ex/Em
C1	300/350
C2	340/455
C3	315/445
C4	285/340

A continuación, para ver como evoluciona cada componente a lo largo del proceso de degradación, se representó el “score” de cada uno de los componentes para cada una de las EEM

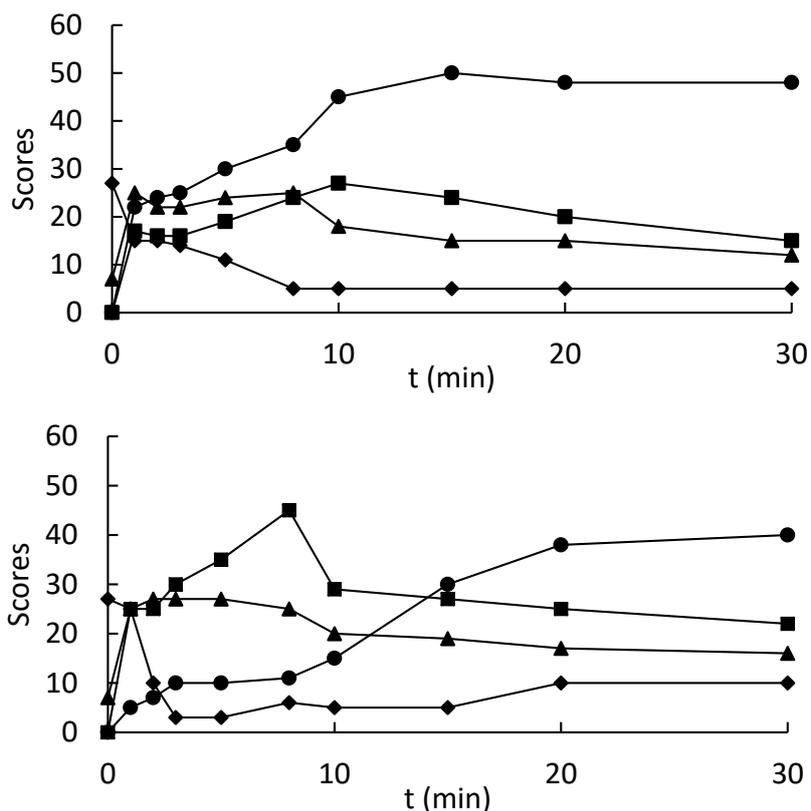


Figura 4.2-12 Evolución de los 4 componentes obtenidos mediante PARAFAC a lo largo del tratamiento mediante ozono (arriba) y mediante la combinación de ozono con Luz/UVA-Vis (abajo). C1 (●), C2 (■), C3 (▲) y C4 (◆)

Los máximos obtenidos para el C1 se encuentran muy cercanos a la zona de la dispersión de Raman; en esta zona se acumula mucho error y la información es de menor calidad

por lo que podría no tratarse de un fluoróforo presente en la muestra. En cuanto a C2 y C3, se observa primero un aumento y posteriormente una disminución, pudiendo tratarse de un intermediario de la reacción. Por último, C4 cuyos máximos coinciden en la zona de máxima fluorescencia de la mezcla, disminuye a lo largo del tratamiento. La tendencia es la misma para ambos tratamientos, si bien para la última EEM el peso (score) de todos los componentes es mayor para el caso de la combinación de ozono con luz UVA-Vis.

.

4.3. Aplicación de sustancias tipo Húmicas en proceso foto-Fenton

4.3.1. Introducción

En los últimos años ha aumentado el interés en la aplicación del proceso foto Fenton en condiciones cercanas a la neutralidad. Como se detalla en el apartado 1.3.6, una de las estrategias empleadas para este fin es el empleo de agentes complejantes. Se ha demostrado que el Fe(III) puede formar complejos fuertes con diferentes ligandos polidentados (De Luca et al., 2015). Debido a la capacidad para complejar el hierro, las sustancias húmicas (SH) se encuentran entre los materiales empleados como complejantes (Bernabeu et al., 2012; Klamerth et al., 2011). Por otro lado, resultados experimentales demuestran que las SH bajo irradiación UV-Visible pueden mejorar la degradación de contaminantes directamente acelerando el ciclo redox del hierro. Esto se debe a las reacciones de transferencias de carga ligando-metal (LMCT) de los complejos férricos, acelerando de esta forma también el proceso foto-Fenton (De La Cruz et al., 2012; Voelker et al., 1997). Sin embargo, aún no se conoce completamente el papel que desempeñan las SH en el mecanismo de oxidación.

Recientemente, sustancias tipo húmicas (STH), en particular las aisladas a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (SBOs, del inglés soluble bio-organics substances), se han empleado como agentes complejantes del hierro en proceso foto-Fenton a valores de pH ligeramente ácidos (Gomis et al., 2013, 2015a). De hecho, el proceso foto-Fenton solar en presencia de estas sustancias ha demostrado su capacidad para degradar una mezcla de contaminantes emergentes a pH = 5.2, con una pérdida aceptable de la eficiencia cuando se compara con el proceso a pH = 2.8 en ausencia de SBO (Gomis et al., 2014). La capacidad de las STH de aumentar el rango de pH del proceso foto-Fenton hasta valores cercanos a 5 probablemente se debe a la interacción de estas sustancias con el Fe(III). También la transformación de las mismas bajo irradiación UV-Vis puede jugar un papel importante en la eficiencia del proceso, puesto que se han observado cambios en la estructura de estas sustancias (Avetta et al., 2015). De hecho experimentos preliminares llevados a cabo con SBO a lo largo del proceso foto-Fenton muestran cambios significativos en su estructura, lo que se traduce en cierta

variación en su capacidad de llevar a cabo el proceso foto-Fenton a pH suave (Gomis et al., 2015b). Sin embargo, profundizar en los aspectos mecanísticos de sistemas donde están involucradas STH no resulta fácil, debido a que la complejidad intrínseca de estas sustancias no permite la aplicación de métodos analíticos rutinarios.

En este contexto, las matrices de excitación emisión de fluorescencia (EEMs) se presentan como una alternativa prometedora cuando se trata de moléculas orgánicas complejas. La espectroscopía de fluorescencia es una técnica analítica simple, sensible y no destructiva, comúnmente empleada en el análisis de materia orgánica disuelta (DOM), que proporciona información importante acerca de la estructura molecular, grupos funcionales, así como de las interacciones intra e intermoleculares con iones metálicos (Berkovic et al., 2013). Las técnicas de análisis de datos multivariantes se emplean cada vez más para obtener información cualitativa de las EEMs. La más ampliamente utilizada es el análisis de factores paralelos (PARAFAC), la cual deconvoluciona EEMs complejas en componentes fluorescentes independientes que representan grupos de fluoróforos similares, tanto para análisis cualitativos como cuantitativos (Stedmon & Bro, 2008). La técnica EEM-PARAFAC ha sido empleada para caracterizar materia orgánica disuelta en ecosistemas acuáticos naturales y en aguas residuales (Stephanie et al., 2012; Su et al., 2015). En particular, Yang et al. emplearon EEM-PARAFAC para estudiar los cambios producidos con la salinidad de fluoróforos de materia orgánica de aguas residuales. Esta técnica puede resultar interesante para estudiar los cambios que se producen en las STH cuando se someten a procesos de fotodegradación, como se muestra en trabajos anteriores (Avetta et al., 2015). Por otro lado, la combinación de valoraciones de desactivación de la fluorescencia con EEM-PARAFAC es una técnica potencialmente útil en la evaluación de las constantes de interacción entre metales disueltos y DOM (Wu et al., 2011; Yamashita & Jaffé, 2008)

Con todo esto, el objetivo de este estudio es investigar la utilidad de la fluorescencia y EEM-PARAFAC como herramienta para analizar la complejación del hierro con macromoléculas orgánicas. Esto ayudaría a entender aspectos mecanísticos del proceso

foto-Fenton en condiciones cercanas a la neutralidad en presencia de estas sustancias. En concreto se estudió la interacción de STH con el Fe(III) y la transformación de estas sustancias durante el proceso foto-Fenton a diferentes pHs.

4.3.2. Desactivación de la fluorescencia de las sustancias tipo húmicas en presencia de Fe(III) a diferentes pHs

Se obtuvieron matrices de excitación-emisión de fluorescencia (EEM) de disoluciones conteniendo sustancias tipo húmicas a pH 3, 5 y 7 (Figura 4.3-1). Las EEM obtenidas son similares para los tres valores de pH. Todas ellas presentan un pico bien definido a las longitudes de onda de excitación/emisión (Ex/Em) de 320/430 nm. Sin embargo, a pesar de que no se observan cambios en la posición del pico sí que se observan variaciones en cuanto a la intensidad del mismo, siendo ésta mayor a pH 5. Esto demuestra una clara dependencia de la fluorescencia de las STH con el pH. En otros trabajos se ha observado comportamientos similares para la fluorescencia de materia orgánica natural (Yan et al., 2013).

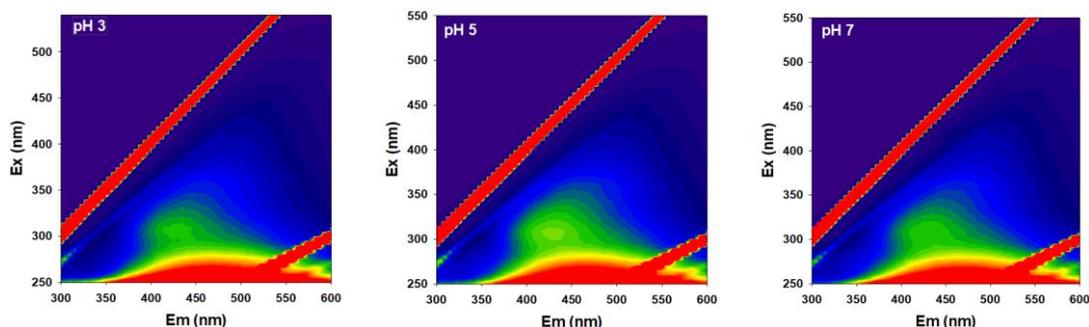


Figura 4.3-1 EEMs de fluorescencia de STH (20 mg/L) a diferentes pH

A pesar de que no se conocen en profundidad los efectos intrínsecos de desactivación y reforzamiento de la fluorescencia de las sustancias húmicas con el pH, está generalmente aceptado que a pH entre 3 y 5 predominan los cromóforos carboxílicos, mientras que a valores entre 8 y 10 predominan los cromóforos fenólicos (Dryer et al., 2008). Además, se sabe que la estructura de sustancias húmicas y tipo húmicas cambia con el pH, pudiéndose dar fenómenos de precipitación a pH por debajo de 3, lo que

también se traducirá en un cambio en las intensidades de fluorescencia (Avetta et al., 2015; Ghosh & Schnitzer, 1981).

Para el estudio del efecto de la adición de Fe(III), se prepararon soluciones conteniendo 20 mg/L de STH y se combinaron con soluciones de Fe(III) a diferentes concentraciones (1-6 mg/L). Se prepararon las mismas combinaciones a pH 3, 5 y 7 y se midieron las EEMs de cada una de ellas. Se observó la disminución de la intensidad de fluorescencia de las STH con el aumento de la concentración de Fe(III) para los tres valores de pH estudiados, lo que demuestra que existe una interacción entre ambos. Resulta interesante profundizar en el estudio de dicha interacción, ya que podría afectar al rendimiento del proceso foto-Fenton cuando se emplean las STH. Para ello se realizó la deconvolución mediante PARAFAC tanto del conjunto de datos completo, como para cada valor de pH. En todos los casos se obtuvieron modelos de tres componentes. Las EEMs de los componentes (C1, C2 y C3) a pH 3, 5 y 7, junto la posición sus máximos se muestran en la Figura 4.3-2. Cada uno de los componentes se puede relacionar con una fracción de la materia orgánica según datos bibliográficos:

- C1 se puede asociar a productos de degradación biológica procedentes de compuestos húmicos terrestres (Lyon et al., 2014)
- C2 puede asimilarse a sustancias tipo húmicas procedentes de materia orgánica terrestre (Yang et al., 2014).
- C3 es similar al triptófano procedente de materia orgánica presente en aguas residuales (Wu et al., 2011)

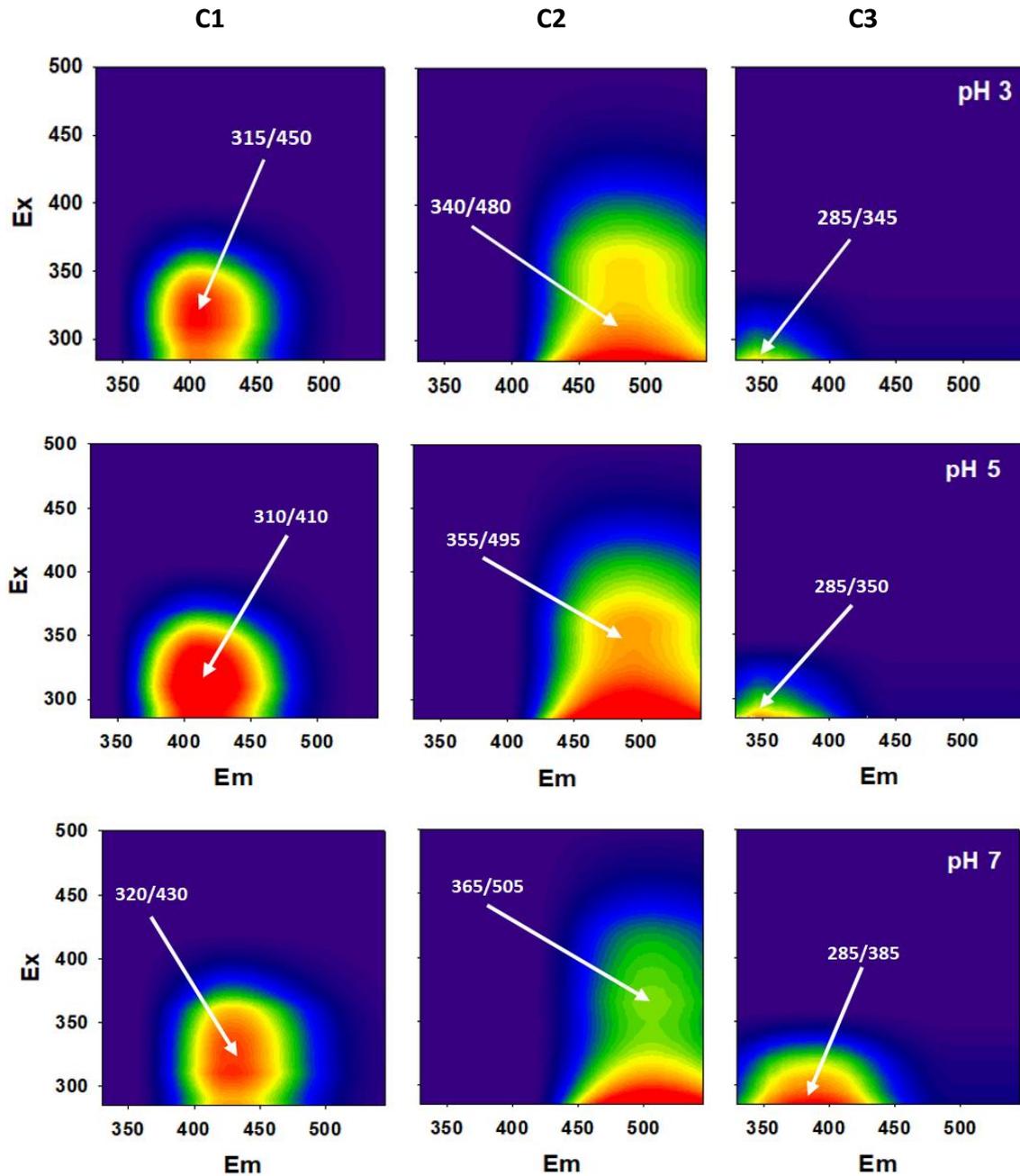


Figura 4.3-2 EEM de fluorescencia de los componentes obtenidos mediante PARAFAC a cada uno de los pH estudiados.

De acuerdo con resultados obtenidos anteriormente (Stephanie et al., 2012), la diferencia entre C1 y C2, desde un punto de vista estructural, se puede relacionar con la presencia de compuestos de gran tamaño molecular y probablemente de carácter más hidrofóbico en el caso del C2. La EEM del C3, como se ha comentado, muestra picos similares al triptófano procedente de la materia orgánica presente en aguas residuales (Wu et al., 2011). Esta identificación resulta lógica teniendo en cuenta que se trata de

sustancias procedentes de la digestión de residuos orgánicos. Por último, se observa un ligero desplazamiento de la posición del pico de excitación/emisión con el aumento del pH (Tabla 4.3-1).

Tabla 4.3-1 características de los componentes obtenidos mediante PARAFAC de las EEMs a cada uno de los pH.

Componente	pH 3 (Ex/Em)	pH 5 (Ex/Em)	pH 7 (Ex/Em)	Descripción
C1	315/405	310/410	320/430	Sustancias tipo húmico procedentes de materia orgánica procedente de degradación microbiana
C2	340/480	355/495	365/505	Sustancias tipo húmico procedente de materia orgánica terrestre
C3	285/345	285/350	285/385	Aminoácidos (tipo triptófano)

La

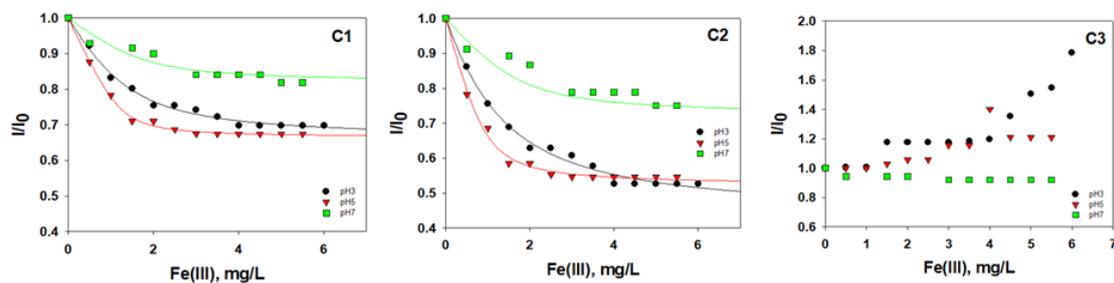


Figura 4.3-3 muestra las curvas de desactivación de la fluorescencia para cada uno de los componentes con la adición de Fe(III) para los tres valores de pH estudiados. A pesar de que se observan diferencias en cuanto a la fluorescencia entre los componentes C1 y C2, las curvas de desactivación con Fe(III) resultaron similares para ambos, mostrando en ambos casos una mayor pendiente inicial para pH = 5. Desde un punto de vista cuantitativo la desactivación es más intensa en el caso del C2. El elevado nivel de desactivación observado para el C2 puede ser el resultado tanto de una mayor complejación del hierro por parte de los fluoróforos tipo húmicos, como de la gran sensibilidad de estos fluoróforos a la desactivación de la fluorescencia. Resultados

similares se pueden encontrar en bibliografía, Poulin *et al.* observaron que regiones de las EEMs asociadas a la materia orgánica disuelta (MOD) son más susceptibles a la desactivación de la fluorescencia por parte del hierro.

En el caso del C3 (tipo proteico) se observó la tendencia opuesta; se sabe que la fluorescencia de sustancias de tipo proteico es desactivada o aumentada por la complejación con iones metálicos. Sin embargo, el método de la desactivación de la fluorescencia apenas se ha empleado para caracterizar el potencial de unión entre metales pesados y sustancias específicas de tipo proteico (Wu *et al.*, 2011).

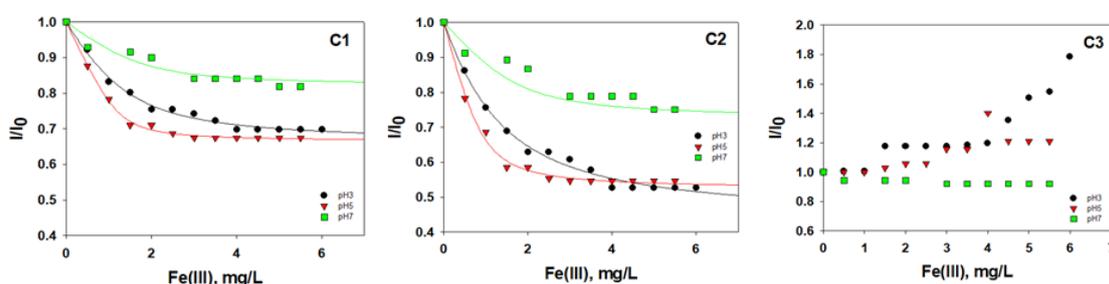


Figura 4.3-3 evolución de la intensidad de fluorescencia relativa de los tres componentes obtenidos mediante PARAFAC con la adición de Fe(III) a pH 3, 5 y 7. Las líneas en el caso de C1 y C2 muestra el ajuste de la ecuación de Ryan-Weber

Los parámetros de complejación entre el hierro y los componentes obtenidos mediante PARAFAC se determinaron empleando una modificación del modelo de complejación propuesto por Ryan and Weber. Se calculó el valor de la constante de estabilidad ($\log K_M$) para los componentes C1 y C2 a pH 3, 5 y 7 (Tabla 4.3-2). El valor de $\log K_M$ varía entre 5.18 y 6.77. Estos valores son ligeramente mayores a los que se pueden encontrar en bibliografía para el complejo MOD-Fe(III): se determinaron valores de $\log K_M$ entre 4.9-5.3 para MOD procedente de un lago eutrofizado con alto contenido en algas a pH 6 o valores de $\log K_M$ de 0.5 y 5.6 a pH 4 para la fracción de ácidos fúlvicos obtenidos a partir del compostaje de lodos de depuradora, residuos urbanos y residuos de origen ganadero (Esteves Da Silva *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2013). Por otro lado, otros autores también obtuvieron que el valor de la constante de estabilidad entre ácidos fúlvicos procedentes del río Suwanee y el Fe(III) a pH 4, calculada mediante el modelo de Ryan y Weber es de 5.09 (Zhao & Nelson, 2005). El valor de la constante para el complejo STH-Fe(III) debería aumentar con el aumento del pH de 3 a 7, teniendo en cuenta que los grupos carboxílicos están involucrados en la formación del complejo. Sin embargo, en

nuestro caso el máximo se obtienen a pH 5 (Tabla 4.3-2); esto se puede explicar teniendo en cuenta las diferencias en la especiación del hierro. El incremento del valor del pH favorece la formación de hidróxidos de hierro poco solubles. De hecho, estudios realizados previamente (Mikutta & Kretzschmar, 2011) demuestran que el hierro en complejos STH-Fe(III) a pH neutro se encuentra presente de forma mayoritaria como grupos oligoméricos de Fe(III). Teniendo en cuenta esto, que el valor de $\log K_M$ sea menor a pH 7 que a pH 5 puede atribuirse a la baja afinidad de las especies oligoméricas de Fe(III) por los grupos carboxílicos de las STH o al obstáculo que suponen estas moléculas voluminosas. De hecho, en la fracción de fluoróforos que no se desactivan con el Fe(III), el valor de la intensidad dividido por la intensidad inicial (I_{nq}/I_0) es mayor a pH 7, lo que quiere decir que hay más fracción de fluoróforos no desactivados. Por último, puede esperarse también un menor efecto de desactivación de las especies oligoméricas de Fe(III) en comparación con las especies monoméricas.

Tabla 4.3-2 Valores de $\log K$ y f_q para C1 y C2 con Fe(III) a pH 3, 5 y 7 determinados mediante una modificación del modelo de Ryan and Weber.

pH	C1		C2	
	Log K	I_{nq}/I_0	Log K	I_{nq}/I_0
3	5.79 ± 0.08	0.43 ± 0.02	6.04 ± 0.09	0.65 ± 0.08
5	6.57 ± 0.06	0.52 ± 0.01	6.77 ± 0.08	0.67 ± 0.02
7	5.18 ± 0.16	0.73 ± 0.07	5.18 ± 0.19	0.82 ± 0.09

4.3.3. Estudio mediante fluorescencia (EEM-PARAFAC) del empleo de sustancias tipo húmicas obtenidas a partir de residuos sólidos urbanos como auxiliares en proceso foto-Fenton

Resulta interesante el estudio mediante EEM-PARAFAC del comportamiento de las STH cuando se utilizan en el proceso foto-Fenton. De hecho, en estudios previos, espectros de absorbancia combinados con carbono orgánico, demanda química de oxígenos y baterías de bioensayos, han demostrado que el proceso oxidativo produce una ligera modificación de las STH, las cuales se transforman en macromoléculas más grandes,

hidrofílicas y biocompatibles (Gomis et al., 2015b). En este estudio, se midieron las EEMs de disoluciones de STH y Fe(III), en presencia y ausencia de H₂O₂ a diferentes tiempos de irradiación. Posteriormente los diferentes sets de datos (EEMs) se analizaron mediante PARAFAC.

En la Figura 4.3-4 se muestra el cambio de la intensidad de fluorescencia de los tres componentes obtenidos mediante PARAFAC con el tiempo de irradiación, a pH 3, 5 y 7, en ausencia (derecha) y presencia (izquierda) de peróxido de hidrógeno. Puesto que el proceso foto-Fenton degrada las STH, los experimentos en ausencia de H₂O₂ se realizaron con el fin de profundizar en el conocimiento de los primeros pasos fotoquímicos que involucran sólo el complejo STH-Fe(III). A pH 3 y sin H₂O₂, la intensidad de fluorescencia de los tres componentes disminuye con el tiempo de irradiación. En estos casos se observó la formación de un precipitado marrón en la disolución que puede ser el motivo de la disminución en la intensidad de fluorescencia. Además, la desactivación de la fluorescencia por la agregación de ácidos húmicos en presencia de cationes unidos es bien conocida (Orsetti et al., 2013). Por otro lado, a pH3 también se observó una gran disminución del carbono orgánico disuelto (aproximadamente un 60% en 10 h) lo cual podría explicar la formación de los precipitados. Esta precipitación foto-inducida del complejo STH-Fe(III) a pH 3 se puede explicar teniendo en cuenta el incremento de la proporción de grupos carboxílicos como resultado de la irradiación, los cuales aumentan la capacidad del hierro para flocular STH a pH cercano a 3. A pH 5 y 7 no se observa precipitación, seguramente debido que el tamaño de los agregados de STH a estos pHs es menor que a pH 3. Por otra parte, a pH 5 y 7 en ausencia de H₂O₂, tiene lugar un incremento de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de irradiación para cada uno de los componentes, lo que sugiere la disminución de la desactivación de la fluorescencia de las STH debida al Fe (III). A pesar de la complejidad del sistema, una posible explicación para este comportamiento es que los complejos STH-Fe(III), bajo irradiación de simulador solar, pueden experimentar reacciones de transferencia de carga que dan lugar a la formación de Fe(II). Este favorecimiento de los ciclos redox del hierro es compatible con la capacidad de las STH de conducir el proceso foto-Fenton a pH por encima de 3. Además, en contraste con los resultados obtenidos a pH 3, las

concentraciones de carbono orgánico disuelto a pH 5 y 7 permanecen constantes durante todo el proceso de irradiación, seguramente debido a la mayor solubilidad de las STH en estos rangos de pH.

A pH 3, en presencia de H₂O₂ (Figura 4.3-4 izquierda), la intensidad de fluorescencia de los tres componentes disminuye más rápido que en ausencia (Figura 4.3-4 derecha). Por otra parte, en este caso no se observó precipitación. Esto se puede atribuir a que el H₂O₂ induce la formación de radicales OH que da lugar a una degradación de las STH en una escala de tiempo mucho más corta que la asociada a la precipitación. En cambio, a pH 5 y 7, únicamente se observa una disminución de 20% después de 7 h, lo que indica que a pesar de que los fluoróforos se han degradado, material orgánico no fluorescente permanece en disolución. Estos resultados se pueden interpretar como un ataque selectivo de las especies reactivas hacia los fluoróforos (ej. fracciones aromáticas), generando grupos no fluorescentes más hidrofílicos, concretamente grupos carboxílicos. El incremento en la intensidad de fluorescencia en la región del C1 y C2 puede estar conectada con la reducción de Fe(III) a Fe(II) del complejo Fe(III)-STH como se ha descrito anteriormente. De esta forma, la posición del máximo de C1 y C2 que aparece antes a pH 5 que a pH 7, puede indicar que la reducción del Fe(III) ocurre de forma más rápida a pH 5. Puesto que las especies oligoméricas del Fe(III) son menos reactivas que las monoméricas (Lopes et al., 2002), los resultados obtenidos son consistentes con la hipótesis de que a pH 7, agrupaciones oligoméricas de Fe(III) son las principales especies presentes en la solución con STH. Todos estos resultados son coherentes con la pérdida de eficiencia del proceso foto-Fenton por encima de pH 5, lo que sugiere que este es el límite de pH que puede alcanzarse siguiendo esta aproximación (Gomis et al., 2015a).

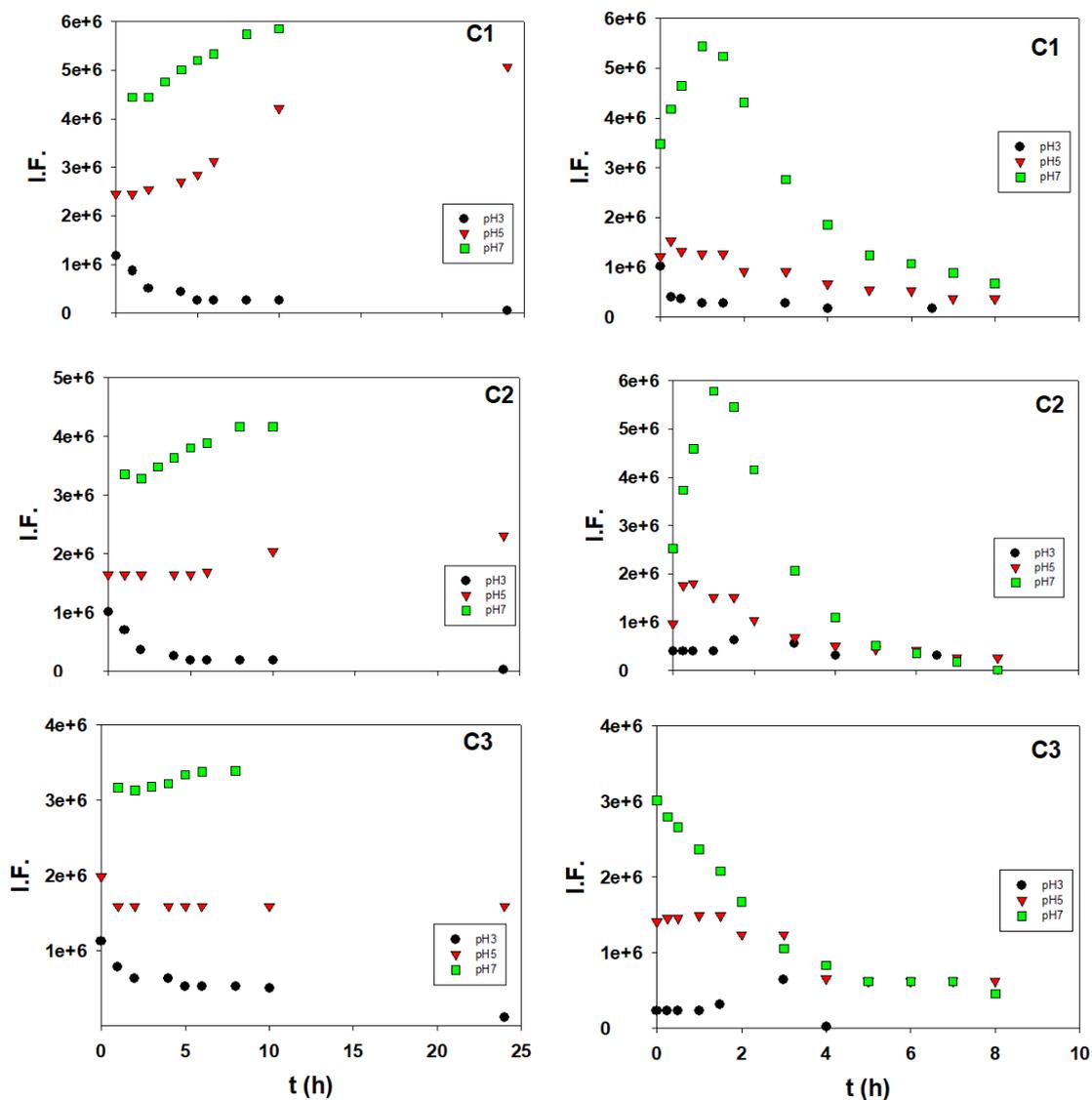


Figura 4.3-4 cambios de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los componentes obtenidos mediante PARAFAC con el tiempo de irradiación para STH con Fe(III) a pH 3, 5 y 7 en ausencia (derecha) y presencia (izquierda) de H₂O₂. [STH]₀ = 20 mg/L, [Fe(III)]₀ = 5 mg/L y [H₂O₂]₀ = 2.2 mmol.

Por último, con el fin de descartar posibles cambios en la fluorescencia debidos a procesos no foto-inducidos, se llevaron a cabo experimentos en oscuridad. Se midieron EEMs de muestras con 20 mg/L de STH y 5 mg/L de Fe(III), con y sin H₂O₂ (2.2 mmol) mantenidas en agitación y oscuridad durante 24 H a pH 3, 5 y 7. No se apreciaron diferencias entre los tres valores de pH estudiados, ni en presencia ni en ausencia de H₂O₂. Estos resultados demuestran que los complejos entre el Fe(III) y STH permanecen

estables en ausencia de irradiación y sugieren que únicamente se dan pequeños cambios estructurales debidos a la baja eficiencia del proceso Fenton en oscuridad.

4.4. Valorización de residuos de la producción del aceite de oliva: obtención de sustancias tipo húmicas para su empleo en proceso foto-Fenton.

4.4.1. Introducción

En capítulos anteriores se ha visto la capacidad de las STH aisladas a partir de residuos sólidos urbanos de actuar como agente complejantes del hierro en el proceso foto-Fenton a valores de pH en torno a 5. Con esto se consideró la posibilidad de emplear otros tipos de residuos como material de partida para la obtención de estas sustancias. Teniendo en cuenta que, como se ha comentado, España es uno de los principales países productores de aceite de oliva, se decidió emplear alperujo (residuo procedente de la extracción del aceite de oliva en dos fases) para la extracción de STH. Se estudió la influencia que el pH y el tiempo de digestión tienen en la extracción. Se caracterizaron las sustancias obtenidas mediante análisis termogravimétrico, de contenido de carbono, cromatografía de exclusión por tamaños, dispersión de luz dinámica y espectroscopia de fluorescencia. Por otro lado, se comprobó la capacidad fotolítica de las STH empleando cafeína como compuesto modelo. Por último, mediante espectroscopía paramagnética electrónica se estudió la capacidad de las STH para generar especies reactivas.

4.4.2. Extracción y caracterización de las sustancias tipo húmicas (STH)

Se obtuvieron STH a partir de alperujo (que nombraremos como A-STH), residuo procedente de la producción del aceite de oliva, no sometido a ningún proceso de fermentación previo. El porcentaje de humedad del material de partida fue de un 60% aproximadamente, mientras que la carga de sólidos volátiles fue del 95%, lo que confirma el carácter principalmente orgánico de la muestra. El residuo fue sometido a una digestión básica con el fin de solubilizar las sustancias tipo húmicas. Para ello se disolvieron 125 g de muestras seca (aproximadamente 300 g de producto húmedo) en

500 mL de una solución de KOH. Para la extracción se probaron tres condiciones diferentes:

- a) Digestión a pH=13 durante 1 día
- b) Digestión a pH=13 durante 4 horas
- c) Digestión a pH=11.7 por un día.

En las digestiones a pH 13 no se observaron cambios de pH durante el proceso, sin embargo, para el caso de pH 11,7 se observó una disminución del mismo a 7.8. El digestato obtenido en este primer paso se filtró por un tamaño de poro de 100 μm con el fin de eliminar los sólidos gruesos en suspensión. A continuación, se filtró la muestra a través de tres membranas cerámicas con tamaño de poro de 300 kg/mol, 150 kg/mol y 50 kg/mol. El retentato obtenido en cada una de las membranas se secó en estufa con el fin de eliminar la humedad de la muestra. Los pesos de cada una de las muestras se recogen en la Tabla 4.4-1.

Tabla 4.4-1 Peso del retentato de cada una de las membranas para cada una de las condiciones de digestión después de ser secados en estufa. Entre paréntesis se muestra el %de sólidos volátiles.

	300 kg/mol	150 kg/mol	50 kg/mol	Total
pH = 13.0, 24 horas	32.1 g (39%)	17.5 g (20%)	13.0 g (42%)	62.6 g
pH = 13.0, 4 horas	19.9 g (25%)	7.0 g (20%)	4.7 g (35%)	31.6 g
pH = 11.7, 24 horas	5.4 g (42%)	1.9 g (53%)	1.1 g (40%)	8.4 g

Como se puede observar, cuanto más fuertes son las condiciones en el proceso de digestión mayor cantidad de producto final se obtiene, especialmente en la fracción de menor peso molecular (entre 50 y 150 kg/mol). En las digestiones a valores de pH medios o tiempos de digestión menores el fraccionamiento alcanzado es menor, permaneciendo la mayor parte de la materia como gruesos sólidos en suspensión y, por lo tanto, se eliminan en la primera filtración.

El rendimiento del proceso se puede calcular a partir de la cantidad total de sólido seco obtenido. Teniendo en cuenta los 125 g de material seco de partida, para cada una de las condiciones estudiadas éste sería del 51%, 25% y 7%. Sin embargo, estos resultados

pueden ser engañosos pues se espera que una cantidad importante de sales derivadas del KOH se incorporen al producto final. De hecho, en la Tabla 4.4-1 se puede observar que el porcentaje de sólidos volátiles obtenido en cada caso se encuentra en el rango del 20-50%, en contraste con el 95% del material de partida. Por ello, el rendimiento se calculó también considerando sólo los sólidos volátiles. Basándonos en estos resultados, está claro que se requieren valores de pH muy básicos y tiempos de digestión largos.

Con el fin de confirmar la naturaleza de los materiales obtenidos se realizaron medidas espectroscópicas. Las matrices de excitación-emisión son una herramienta muy útil para el análisis de muestras complejas que contienen materia orgánica. La Figura 4.4-1 muestra las EEMs del retentado de las membranas de 50 y 150 kg/mol, así como las EEMs de cuatro sustancias (tipo) húmicas: las denominadas como sustancias húmicas comerciales y obtenidas de Aldrich, dos sustancias húmicas estándar (Ácido húmico de turba Pahokee y leonardita) y STH obtenidas a partir de residuos sólidos urbanos (CVT-230). En todos los casos se obtienen EEMs muy similares, con señales fuertes en el área correspondiente a las sustancias húmicas (250-400 nm en excitación y 380-550 nm en emisión) (Chen et al., 2003). Las EEMs se asemejan más a las de las STH obtenidas a partir de residuos urbanos, resultado lógico puesto que el procedimiento de extracción es muy similar al empleado en el presente trabajo.

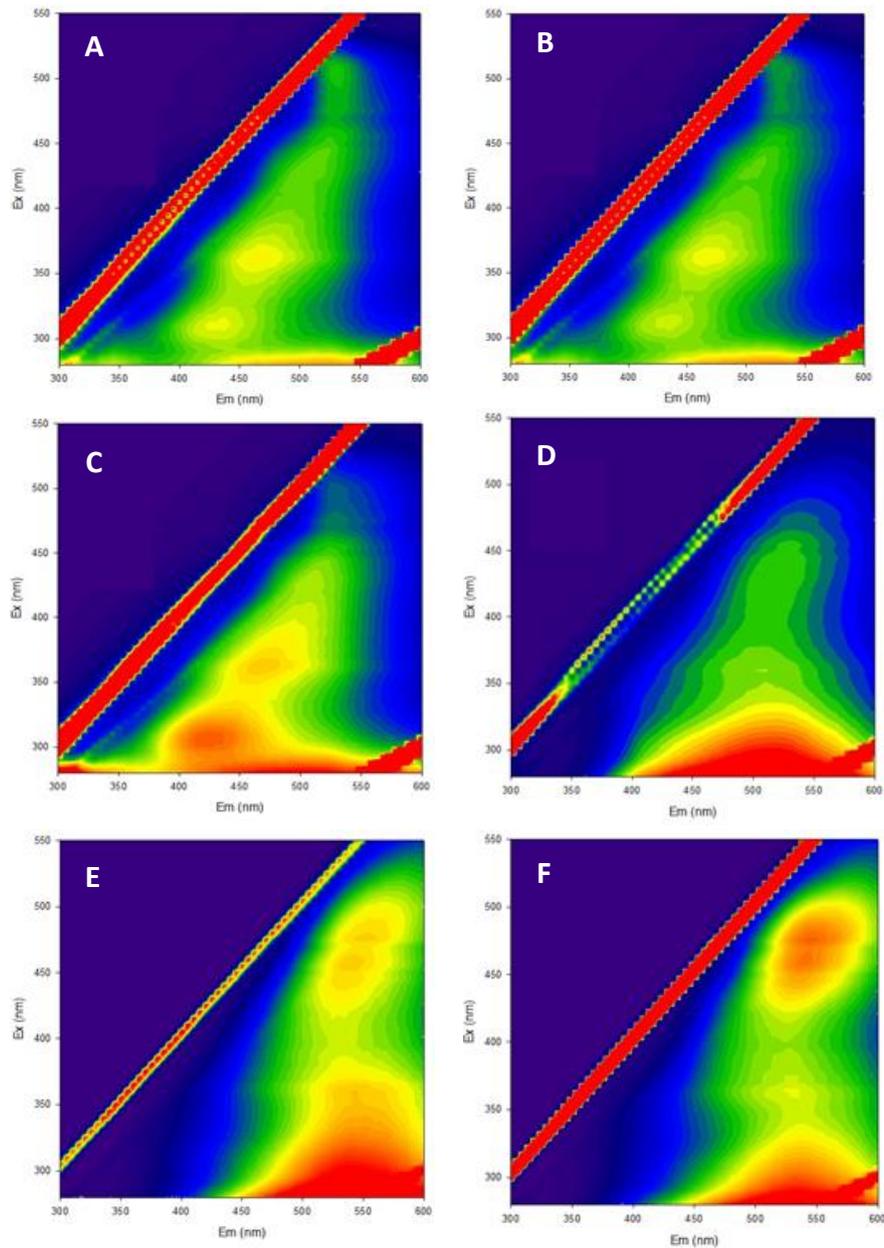


Figura 4.4-1 EEMs de diferentes sustancias húmicas o tipo húmicas: a) retentato obtenido de la filtración del digestato por la membrana de 150 kg/mol, b) retentato obtenido de la filtración del digestato por la membrana de 50 kg/mol, c) Sustancias tipo húmicas obtenidas a partir de residuos sólidos urbanos, d) ácidos húmicos comerciales de sigma aldrich, e) ácido humico de turba Pahokee, y f) ácido húmico de leonardita

Debido a la presencia de materia inorgánica, el material obtenido se sometió a una purificación adicional para su análisis. Para ello se dializó el material empleando una membrana de diálisis de tamaño de poro de 12000 Da. La cantidad de carbono orgánico aumentó del 12% al 67%. Esto se confirmó también mediante medidas termogravimétricas: en la muestra inicial se obtuvo un 17% de materia orgánica y un

14% de humedad, mientras que la muestra para la muestra dializada se obtuvo cerca de un 80% de materia orgánica y un 6% de humedad.

El peso molecular se calculó empleando cromatografía de exclusión por tamaños (Figura 4.4-2). Se obtuvo un máximo de la distribución del peso molecular de unos 4600 Da en el caso de las STH obtenidas a partir del alperujo, este valor aumentó hasta 6000 Da para las muestras dializadas. Se midió también el tamaño de los ácidos húmicos de sigma Aldrich, obteniéndose un valor de 4200 Da, el cual coincide con datos encontrados en bibliografía (Chin et al., 1994). Estos resultados concuerdan con la mayoría de los publicados en literatura para sustancias húmicas de origen acuático (Perminova et al., 2003). Este peso molecular, relativamente bajo, resulta contradictorio teniendo en cuenta el tamaño de poro de las membranas empleadas en la extracción (50-300 kD). Sin embargo, este resultado aparentemente anómalo se pudo entender teniendo en cuenta la capacidad de las sustancias tipo húmicas para formar agregados moleculares que incrementan el tamaño de las STH. De hecho, el tamaño de los agregados se caracterizó mediante medidas de la dispersión de luz dinámica (DLS). Este método permite determinar el radio hidrodinámico (R_h) de las partículas. Se obtuvo un valor de R_h de aproximadamente 400 nm para una disolución de STH de 300 mg/L, tanto para las no dializadas como para las dializadas (420 nm y 380 nm respectivamente). Este valor es ligeramente superior al obtenido para sustancias bio-orgánicas solubles obtenidas de residuos urbanos, el cual fue de unos 135 nm (Avetta et al., 2015).

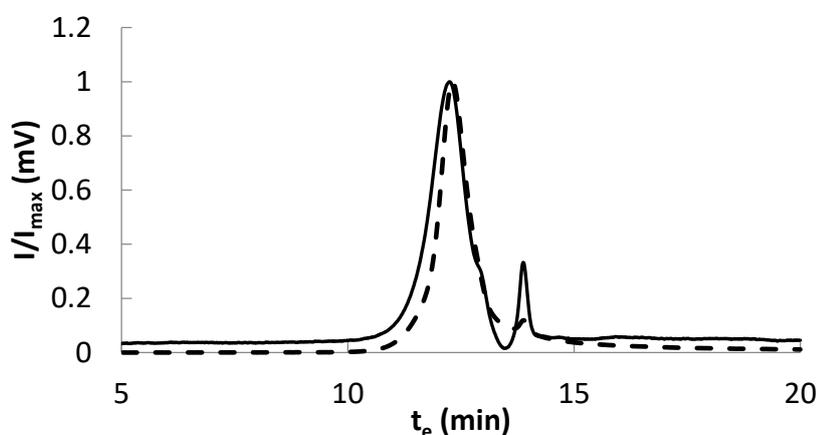


Figura 4.4-2 Cromatogramas de exclusión por tamaños de las A-STH (línea sólida) y un ácido húmico comercial

4.4.3. Actividad fotocatalítica de las STH

Para comprobar la posibilidad de emplear las STH como fotocatalizadores se empleó la cafeína como molécula de prueba. La Figura 4.4-3 y Figura 4.4-4 muestran el perfil de concentración relativa de cafeína frente al tiempo de irradiación. Como se puede ver mediante proceso foto-Fenton a pH=5 en ausencia de STH (10 mg/L) se consigue degradar parte de la cafeína, sin embargo, en presencia de STH la degradación es mayor. Mediante el proceso tipo foto Fenton a pH=5 en presencia de STH extraídas a partir de alperujo (A-STH) se alcanzó una degradación de más del 95% de la cantidad inicial de cafeína en 10 minutos de irradiación. Resultados muy similares se obtuvieron con las muestras dializadas, lo que demuestra que la diálisis de A-STH probablemente no es necesaria para este propósito. Los resultados muestran que A-STH son buenos agentes complejantes del hierro para aplicar el proceso foto-Fenton en condiciones cercanas a la neutralidad. De hecho, su eficacia es ligeramente mejor que la obtenida con CVT-230, que son las STH más ampliamente utilizadas para este fin.

Sin embargo, cuando se aumentó la concentración de A-STH se observó una disminución en la velocidad de la reacción (Figura 4.4-4). El mismo efecto se observó para CVT-230 en trabajos anteriores (Gomis et al., 2015a) y fue atribuido a dos factores diferentes: por un lado debido al efecto de filtro interno debido a la superposición del espectro de absorción de las STH y la irradiación de la fuente, este efecto se ha estudiado en detalle con ácidos húmicos (Fukushima et al., 2001); por otro lado, debido a la competencia entre las STH y el compuesto por las especies reactivas generadas.

Sin embargo, las A-STH no fueron capaces de degradar la cafeína bajo irradiación lo que indica que no son buenos fotosensibilizadores. Resultados similares se han observado para CVT-230 (Avetta et al., 2013), donde fueron necesarias concentraciones muy elevadas de estas sustancias y tiempo de irradiación muy largos para degradar clorofenoles bajo irradiación UV. La combinación de A-STH y peróxido de hidrógeno tampoco resultó ser eficiente. A pesar de que se encontró cierta cantidad de hierro en la composición de las A-STH (0.011% p/p en la muestra sin dializar y 0.12% para la

dializada), con esta cantidad no es posible realizar un proceso tipo foto Fenton. Estos valores se encuentran lejos del 0.7% obtenido para las CVT-230; esta diferencia es lógica teniendo en cuenta el residuo del que proceden, las CVT-230 se aislaron a partir de residuos urbanos, que tienen más probabilidad de contener hierro que el alperujo.

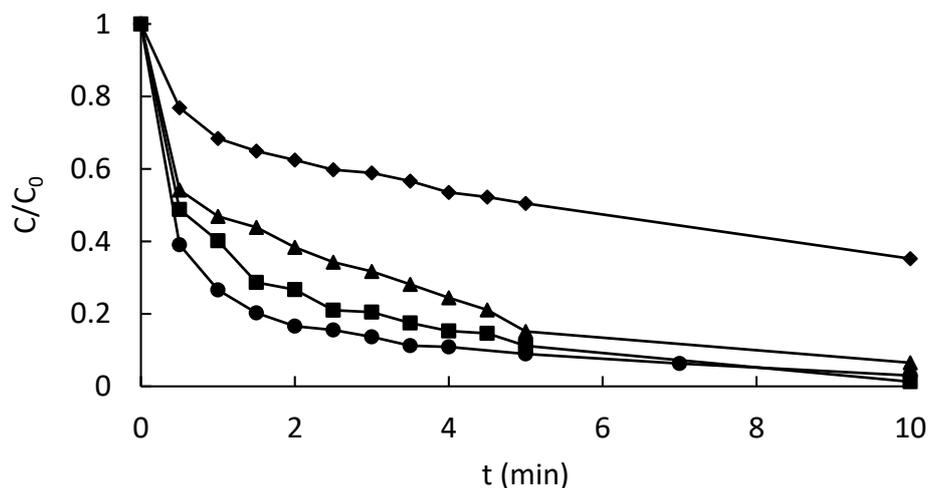


Figura 4.4-3 Fotodegradación de cafeína (5 mg/L) en simulador solar a pH=5, $[Fe^{2+}] = 5 \text{ mg/L}$ y concentración estequiométrica de H_2O_2 en ausencia de STH (◆), en presencia de 10 mg/L de CVT-230 (▲); 10 mg/L de A-STH (■); y 10 mg/L de A-STH dializadas (●)

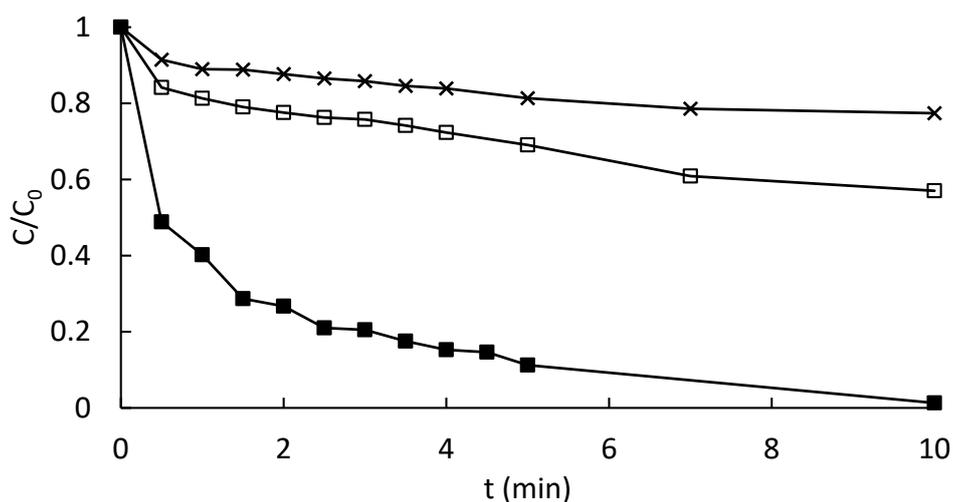


Figura 4.4-4 Fotodegradación de cafeína (5 mg/L) en simulador solar a pH=5, $[Fe^{2+}] = 5 \text{ mg/L}$ y concentración estequiométrica de H_2O_2 en presencia de diferentes concentraciones de A-STH: 10 mg/L (■); 30 mg/L (□) y 60 mg/L (x)

4.4.4. Generación de especies reactivas

Con el fin de explicar los resultados descritos en el apartado anterior, se realizaron experimentos mecanísticos basados en medidas de resonancia paramagnética electrónica (EPR) para investigar la capacidad de las A-STH de generar especies reactivas. La formación de oxígeno singlete fue estudiada empleando TMP como captador. La Figura 4.4-5 muestra como a medida que incrementamos la concentración de A-STH aumenta la intensidad de la señal, lo que indica que estas sustancias son capaces de sensibilizar la generación de oxígeno singlete. Lo mismo se observó también para el CVT-230. A pesar de la capacidad de estos materiales para generar oxígeno singlete de forma eficiente, la reactividad limitada de esta especie podría explicar la baja eficiencia de las sustancias como fotocatalizadores. De hecho, como ya se ha indicado, experimentos llevados a cabo con CVT-230 demostraron que, a pesar de que las sustancias fueron capaces de catalizar la degradación de clorofenoles, se necesitaron elevadas concentraciones (del orden de g/L) y tiempo de irradiación largos (Avetta et al., 2013). Esto se encuentra también de acuerdo con estudios recientes en los que se ha demostrado que el oxígeno singlete juega un papel minoritario en la degradación fotoquímica de xenobióticos en ambientes catalizados por materia orgánica natural

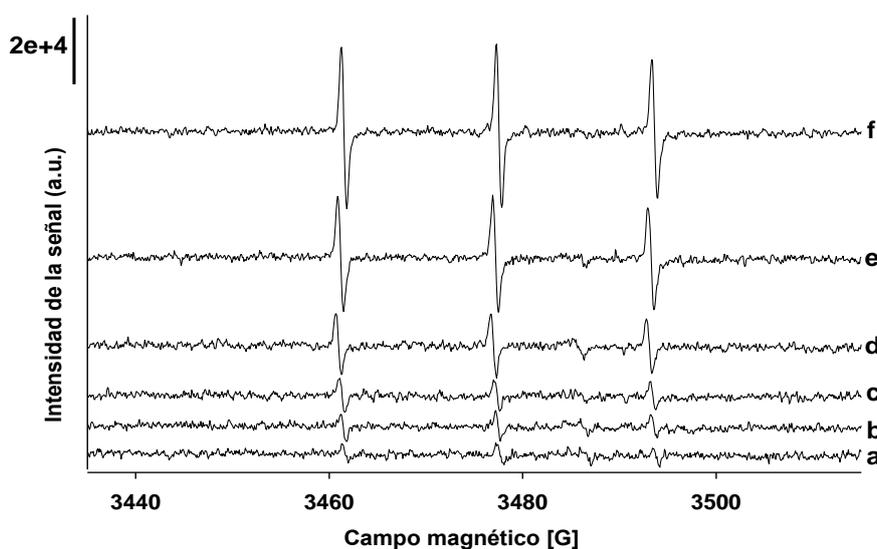


Figura 4.4-5 Espectro EPR medido a temperatura ambiente para la intensidad de la señal del aducto TMP-oxígeno singlete después de irradiar durante 15 min en solar box en presencia de

concentraciones crecientes de A-STH: a) 50 mg/L; b) 100 mg/L; c) 500 mg/L; d) 2000 mg/L; e) 6000 g/L; y f) 10000 mg/L

Para estudiar la formación de radical hidroxilo se llevaron a cabo experimentos empleando el DMPO como capturador. Se preparó una disolución de 200 mg/L de A-STH y se irradió durante 3 minutos en presencia de DMPO, la señal correspondiente al radical aducto DMPO-OH obtenida fue muy baja. Esto indica que las A-STH nos son buenas generadoras de radical OH. Sin embargo, cuando se añadieron Fe^{2+} (2 mg/L) y H_2O_2 la señal incremento considerablemente, indicando una mayor generación del radical $\cdot\text{OH}$. Además, la señal fue mucho mayor que la obtenida cuando se empleó únicamente Fe^{2+} (2 mg/L) y H_2O_2 , en ausencia de A-STH. Los resultados concuerdan con la necesidad de estos materiales para mejorar la eficacia del proceso foto-Fenton a $\text{pH}=5$, comentada anteriormente. Así mismo, se observó el efecto perjudicial que tiene un exceso de A-STH: se observó una disminución de la señal al aumentar la concentración de estas sustancias de 20 mg/L a 200 mg/L.

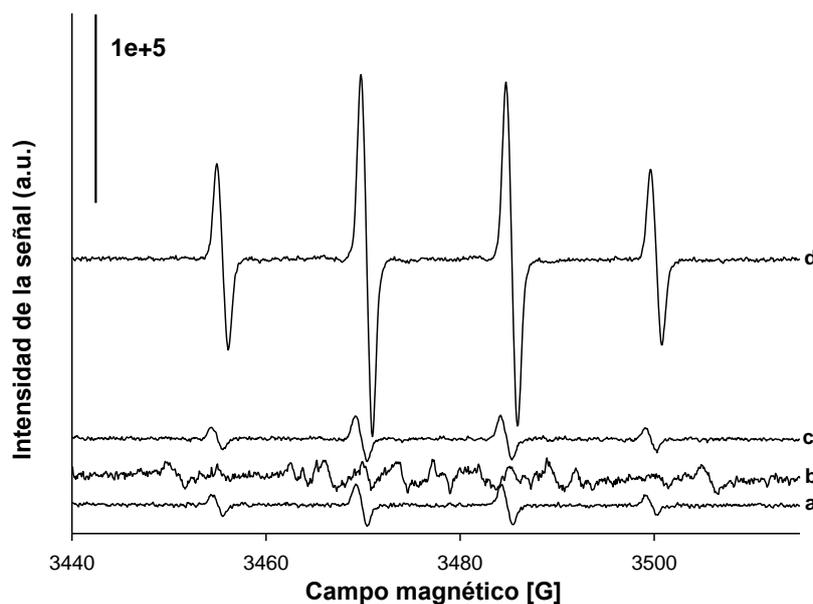


Figura 4.4-6 Espectro EPR medido a temperatura ambiente después de irradiar en solar box durante 3 minutos DMPO (17 mM) a $\text{pH}=5$ bajo las siguientes condiciones experimentales: a) H_2O_2 (2 mg/L) + Fe^{2+} (2 mg/L); b) A-STH (200 mg/L); c) A-STH (200 mg/L) + H_2O_2 (2 mg/L) + Fe^{2+} (2 mg/L); d) A-STH (20 mg/L) + H_2O_2 (2 mg/L) + Fe^{2+} (2 mg/L)

4.5. Desarrollo y aplicación de herramientas informáticas para el tratamiento de señales complejas (EEMs)

4.5.1. Introducción

En diferentes capítulos de la presente tesis se ha demostrado la utilidad de la fluorescencia para profundizar en el conocimiento y análisis de sustancias y mezclas complejas. Mediante el análisis de factores paralelos (PARAFAC) de las matrices de excitación-emisión (EEMs) se puede obtener gran cantidad de información. En los últimos años, se han desarrollado *toolbox* para el software Matlab®, como la drEEM que facilitan la aplicación de PARAFAC. Sin embargo, el principal inconveniente que presenta es la complicada preparación de los datos y la carga computacional que conlleva que requiere tener ciertos conocimientos de programación MATLAB. En este sentido, resulta interesante el desarrollo de herramientas informáticas que faciliten tanto el tratamiento previo como el análisis de los datos.

Durante el trabajo experimental abordado para esta Tesis se ha colaborado en el desarrollo de EEMlab, una interfaz gráfica de usuario (GUI) que facilita la carga y pretratamiento de los datos, el análisis de los mismos mediante PARAFAC y validación de los modelos obtenidos.

4.5.2. La aplicación EEMlab

La *toolbox* drEEM es una colección de funciones de Matlab® que incluyen no sólo PARAFAC si no también la carga, corrección y preprocesado del set de datos. En la actualidad se puede decir que drEEM es la herramienta de referencia en la aplicación de EEM-PARAFAC. El guion de la *toolbox*, la descripción con las instrucciones para su uso con datos de fluorescencia y un set de datos de ejemplo se encuentran disponibles en (Murphy et al., 2013). El ejemplo que presenta drEEM está orientado a destacar la importancia que tienen la corrección y preprocesado de los datos a la hora de aplicar PARAFAC a datos de fluorescencia. A pesar de la indiscutible utilidad de esta

herramienta, presenta el inconveniente que ya hemos comentado, implica la necesidad de tener conocimientos de programación con Matlab®.

EEMlab es una interfaz gráfica de usuario desarrollada con el lenguaje de programación Matlab® que gestiona la *toolbox* drEEM. La aplicación está orientada a facilitar al usuario el empleo de PARAFAC sin necesidad de tener conocimientos previos de Matlab.

El flujo de trabajo que sigue la aplicación se resume en la Figura 4.5-1. Como se puede comprobar, los pasos son básicamente los mismos que se siguen a la hora de aplicar PARAFAC y que se explican en el capítulo de material y métodos.

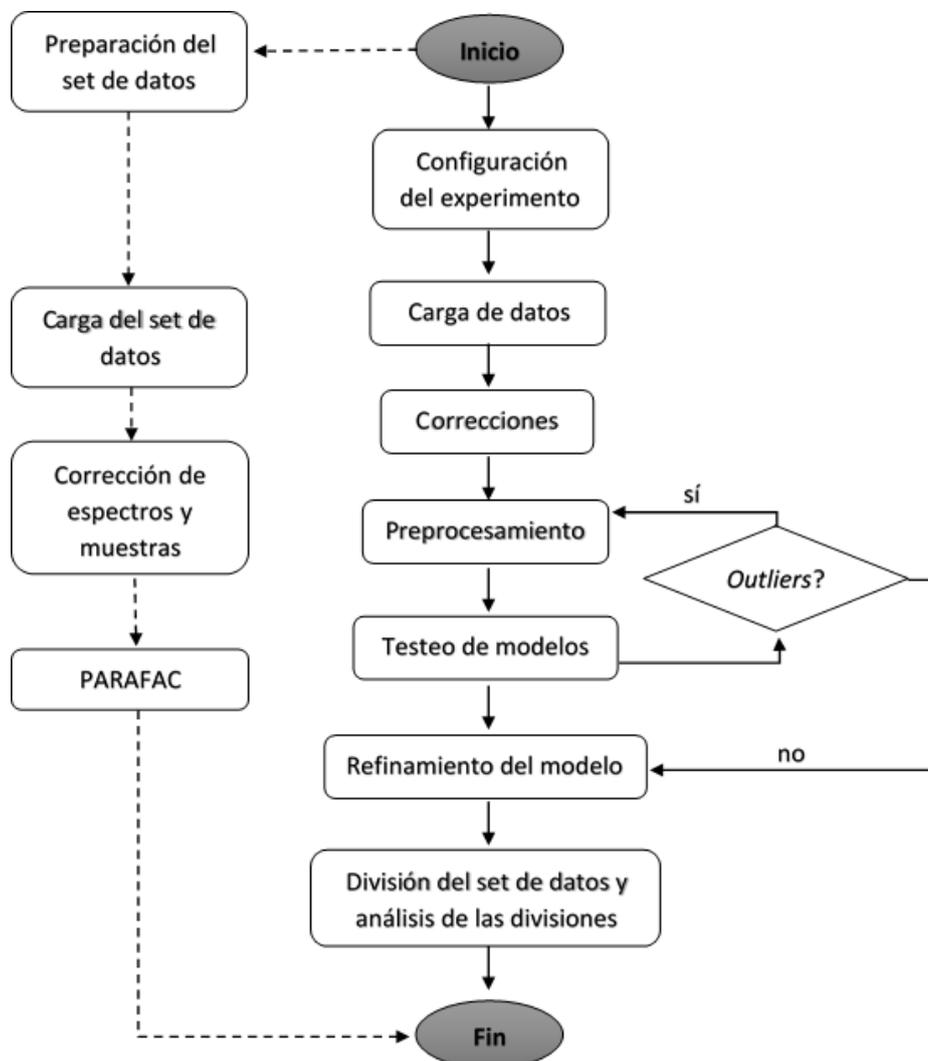


Figura 4.5-1 Flujo de trabajo de la aplicación EEMlab

Mejoras que aporta EEMlab

La aplicación EEMlab a parte de facilitar el uso de PARAFAC al usuario presenta las siguientes mejoras:

Configuración de los experimentos: al tratarse de experimentos que contienen gran cantidad de datos, la configuración de los mismos en muchas ocasiones supone un problema. EEMlab incluye un asistente para la configuración de toda la información que define el experimento. Al cargar el experimento, a parte de todos los archivos correspondientes a las medidas de fluorescencia y absorbancia, la aplicación pide un archivo de metadatos en formato Excel en el que se incluye toda la información del experimento.

Carga de datos: la aplicación reconoce automáticamente los tipos de datos con extensión CSV y TXT y relaciona cada archivo con la información contenida en el archivo de metadatos. Una vez cargados todos los archivos de un experimento ofrece la posibilidad de guardarlos en un solo archivo con formato MAT (de Matlab) y posteriormente trabajar con ellos.

Programación: EEMlab da la opción de corregir cada EEM de forma individual con su correspondiente archivo de corrección de espectro, de acuerdo con la información contenida en el archivo de metadatos.

Validación: a la hora de realizar la validación a través del *Split-half analysis* la aplicación permite modificar el valor del coeficiente de correlación de Trucker con el que se quiere validar, en la *toolbox* drEEM este valor viene predeterminado en 0.95. Esto afectaría a la validación tanto de las partes como del modelo general. Esta opción es una ventaja sobre todo cuando los datos son muy complejos y el número de matrices, factor limitante en este tipo de análisis, es escaso.

Archivo de registro: en el análisis de experimentos complejos en los que es necesario realizar muchas iteraciones y el procesamiento conlleva varios pasos, es muy importante tener un informe de todos los pasos seguidos para que el análisis sea reproducible. En

este sentido EEMlab crea automáticamente un informe que recoge toda esta información. En dicho informe se recogen también todos los mensajes de error que han surgido en el procesamiento de los datos. Además, este archivo es editable tanto dentro de EEMlab como fuera, permitiendo al usuario añadir cualquier tipo de información personal, anotaciones, comentarios... que le permita tener un mejor conocimiento del experimento.

Manejo de los errores: en la aplicación se incluye una función de comprobación de errores de forma que cuando un error evidente es detectado el experimento se anula. Toda la información acerca del error (ubicación y causa) se recogen en el archivo de registro.

Creación de gráficos: a través de EEMlab se pueden crear las gráficas tanto del conjunto de datos como las resultantes del modelado de varias formas. Por un lado, los resultados numéricos se muestran en Matlab y se guardan en el archivo del experimento. Las gráficas 2D y 3D son compatibles con la interfaz gráfica.

Las gráficas de muestras individuales están integradas en la aplicación. Las gráficas de colecciones de muestras se muestran fuera de la aplicación (a través de Matlab).

Componentes de EEMlab

La aplicación se compone de un núcleo de procesamiento (*toolbox* drEEM, que es pública y se puede descargar de Murphy, Stedmon, Graeber, & Bro, 2013), el paquete de la interfaz gráfica de usuario, dos sets de datos de entrenamiento y un tutorial. Todo ello se puede descargar de pabmitor.webs.upv.es/eemlab.

Una vez descargado, el único requisito para trabajar con la aplicación es incluir todos los componentes de la misma en el path de Matlab. Respecto a los sets de datos de entrenamiento, el primero es el ejemplo de la *toolbox* drEEM, el original se puede conseguir directamente de los autores en <http://www.models.life.ku.dk/drEEM> o descargarlo desde la web de EEMlab. El segundo se ha creado a partir de muestras conocidas para validar la aplicación y a continuación, se explica en detalle.

4.5.3. El set de datos de la aplicación EEMlab

El set de datos se crea con el objetivo de verificar el rendimiento de la deconvolución mediante PARAFAC en un entorno controlado. Para ello se ha diseñado manualmente un conjunto de datos a partir de muestras con una composición conocida. Por otro lado, con este set de datos se pretende demostrar también la capacidad de la aplicación de trabajar con diferentes formatos, puesto que los equipos (fluorímetro y espectrofotómetro) con los que se han medido estas muestras, devuelven los resultados con formato diferente a como lo hacen los equipos empleados en el set de datos de drEEM.

El set de datos de EEMlab está compuesto por 34 EEMs (una por cada muestra), 34 espectros de absorbancia, 11 EEMs procedentes del blanco (de diferentes días de medida), 11 espectros para el Raman (medidos a una longitud y el valor de la pendiente de una serie de diluciones de sulfato de quinina. Tanto los espectros Raman como la pendiente del sulfato de quinina se emplean para normalizar las EEMs con el fin de hacer comparables las muestras medidas en diferentes días y/o diferentes laboratorios. Las EEMs del set de datos proceden de disoluciones que contenían cuatro compuestos fenólicos (ácidos elálgico, tánico, sinápico y siríngico) a diferentes concentraciones (desde 0.5 a 4 mg/L).

Procesamiento del set de datos de EEMlab

Los pasos seguidos en el procesamiento de set de datos son:

1º se crea el nuevo experimento con la configuración deseada y se cargan todos los archivos procedentes de los diferentes equipos de medida.

2º se normalizan los datos con el valor de la pendiente de la serie de sulfato de quinina y se realizan las correcciones de filtro interno y resta del blanco. En nuestro caso no es necesario realizar correcciones de los espectros de excitación y emisión porque el mismo equipo ya realiza esas correcciones.

3º se eliminan las diferentes dispersiones y se examinan las EEMs una a una con la finalidad de valorar si la eliminación de la dispersión es correcta y si es necesario recortar alguna longitud de onda en excitación o emisión (esta es una valoración que se realiza varias veces durante el análisis). Se normalizan cada EEMs con su valor máximo con el fin de que todas las matrices tengan el mismo peso a la hora de modelar.

4º se comienza con la fase exploratoria y se testean modelos de 3 a 6 componentes. Durante esta fase se decide recortar las matrices, se eliminan las longitudes de onda de excitación por debajo de 285 y por encima de 400 y las de emisión por debajo de 320 y por encima de 470. Esta decisión se toma analizando la distribución de los errores residuales y la gráfica de *leverages* en diferentes modelos. Un ejemplo se muestra en la Figura 4.5-2.

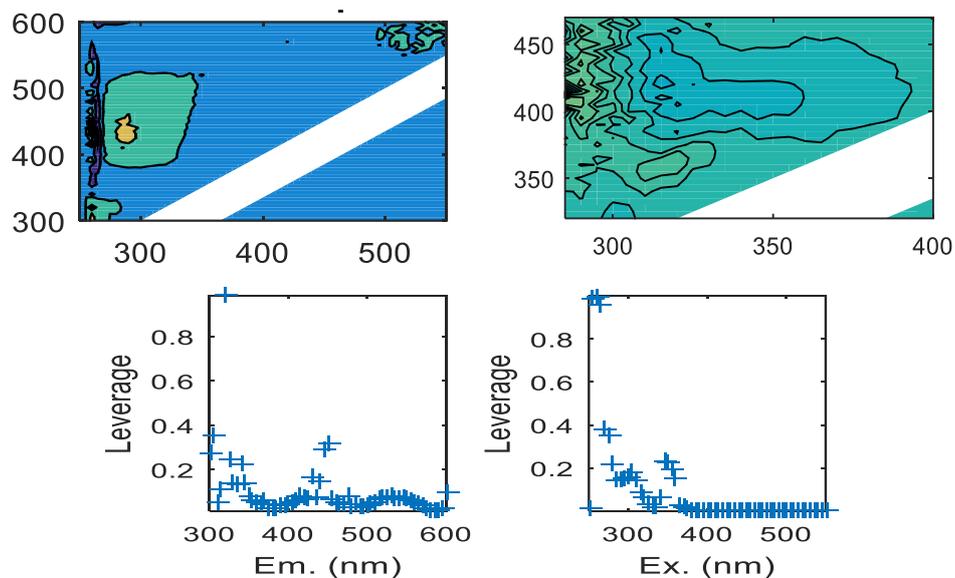


Figura 4.5-2 Distribución de los residuos para una muestra mal modelada (arriba a la izquierda) y una muestra modelada más adecuadamente (arriba derecha). Graficas de leverage mostrando longitudes de onda de emisión cercanas a 315 (abajo izquierda) y de excitación entre 250 y 270 nm (abajo derecha) con gran influencia (cerca de 315 nm) sobre el modelo con respecto al resto de longitudes de onda.

5º una vez finalizada la fase exploratoria se decide que el número correcto de componentes es 4; esta decisión se toma combinando el análisis de la distribución de los residuos y el significado físico de los espectros de excitación y emisión obtenidos

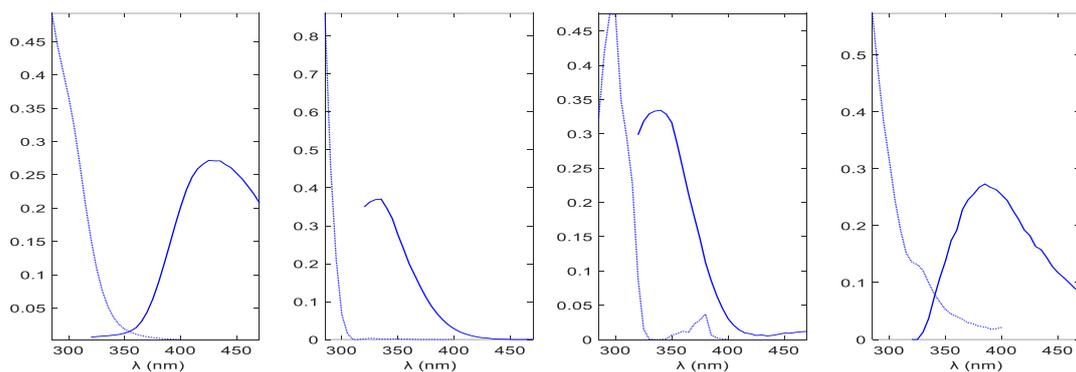


Figura 4.5-3 espectros de excitación (línea a puntos) y emisión (línea sólida) para los cuatro componentes obtenidos mediante PARAFAC del set de datos de EEMlab.

6º se valida el modelo empleando el análisis *Split-half*. Para ello se divide el conjunto de datos en 4 (A, B, C y D) y se combinan en 6 mitades diferentes (AB, AC, AD, BC, BD y CD). Cada una de estas mitades es modelada con 4 componentes y validada comparando los espectros de excitación y emisión. Por último, se valida el modelo comparando los espectros de excitación y emisión de las mitades con los del modelo del conjunto de datos completo. En este caso se valida el modelo con las mitades “AC” y “BC” con un coeficiente de correlación de Trucker de 0.9 (Figura 4.5-4). Lo ideal sería validar para todas las mitades, pero hay que tener en cuenta que en este caso el número de matrices y la proximidad de la fluorescencia de los compuestos empleados son factores limitantes.

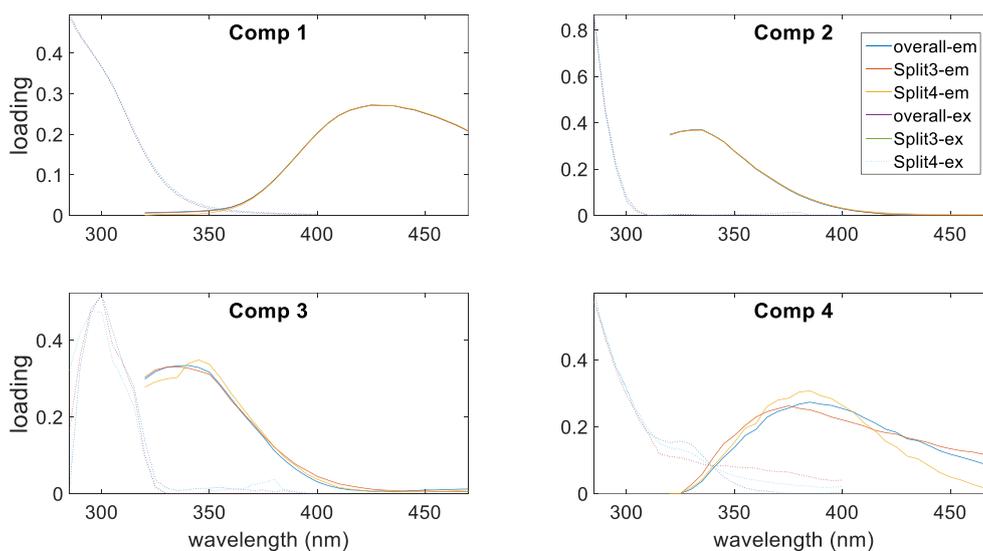


Figura 4.5-4 validación del modelo de 4 componentes obtenido mediante PARAFAC con dos mitades del conjunto de datos creadas aleatoriamente.

Una vez seleccionado el número de componentes y teniendo en cuenta que el set de datos procede de disoluciones con mezclas de compuestos conocidos comparamos las EEMs de los cuatro componentes obtenidos mediante PARAFAC (Figura 4.5-5) con las de los compuestos a 1mg/L (Figura 4.5-6). Como se puede observar y tenido en cuenta la complejidad del sistema dado que se trata de compuestos muy cercanos, las EEMs son bastante similares. Siendo especialmente similares la de ácido sinápico (comparada con la del componente 1) y la del ácido siríngico (comparada con el componente 2).

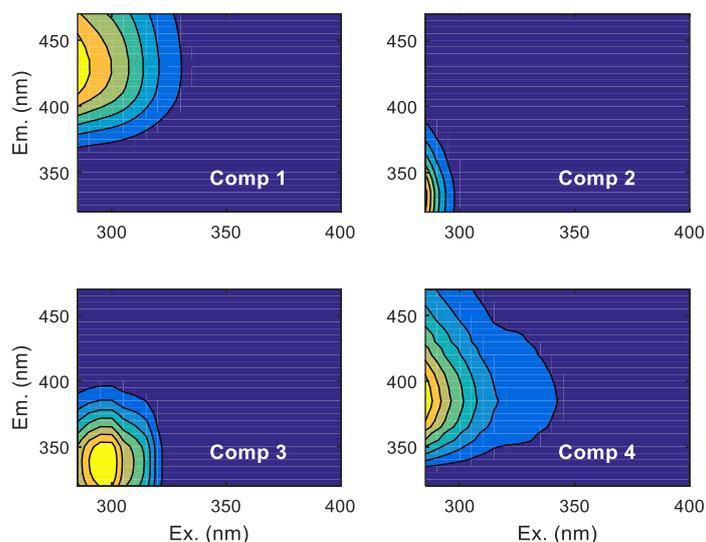


Figura 4.5-5 EEMs de los componentes obtenidos mediante PARAFAC para el conjunto de datos de EEMlab

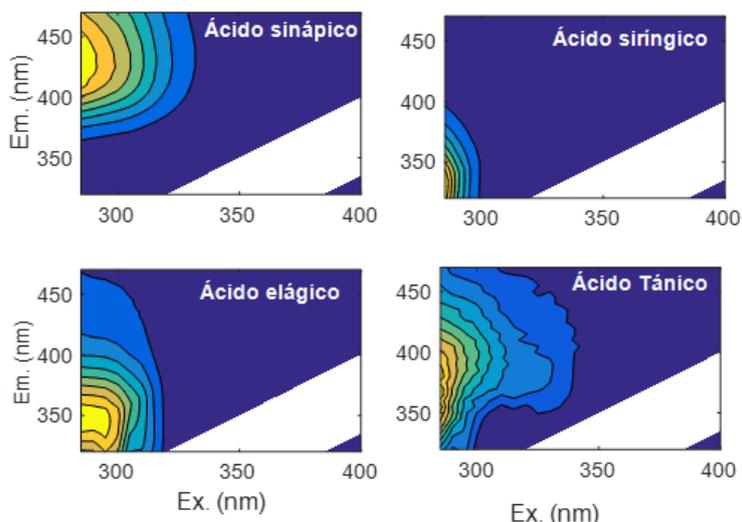


Figura 4.5-6 EEMs de los compuestos puros a 1mg/L empleados en la creación del conjunto de datos de EEMlab.

Por último, dado que los mejores resultados se han obtenido para el ácido sinápico y el siríngico, se realiza la comparación de los pesos de estos componentes obtenidos mediante PARAFAC en cada una de las EEMs del conjunto de datos con las concentraciones reales de los mismos en cada una de ellos (Figura 4.5-7). Como se observa, los pesos (scores) de los componentes 1 y 2 en cada una de las muestras coinciden prácticamente de forma perfecta con las concentraciones de los ácidos sinápico y siríngico respectivamente.

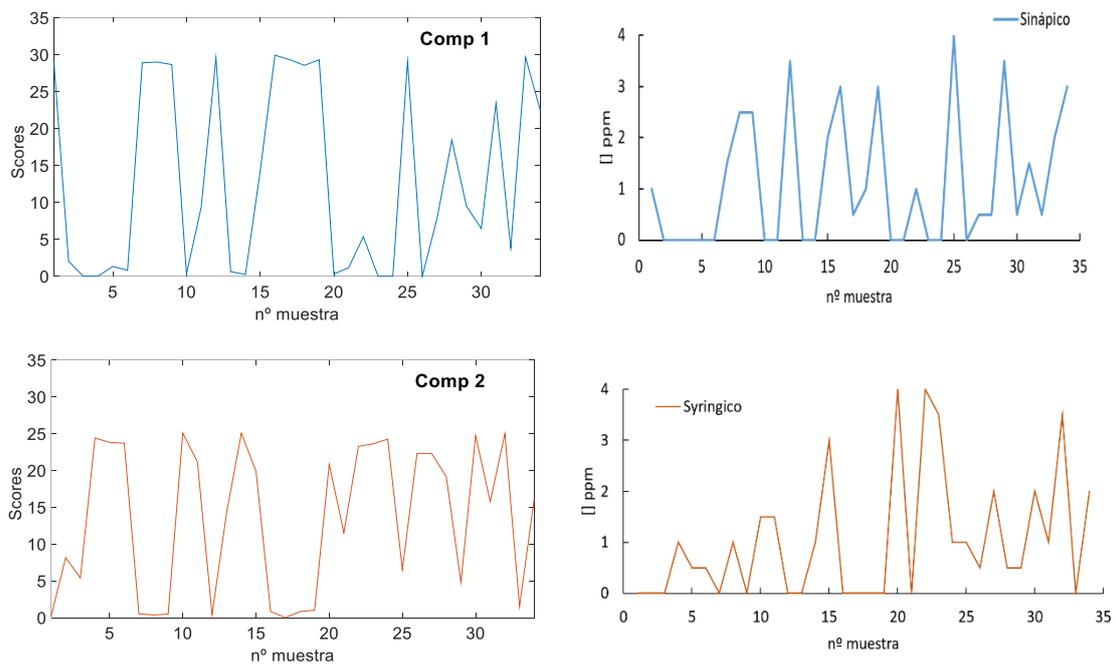


Figura 4.5-7 Derecha: peso de los componentes 1 (arriba) y dos (abajo) obtenidos mediante PARAFAC para el set de datos de EEMlab. Izquierda: concentración del ácido sinápico (arriba) y ácido siríngico (abajo) en cada una de las muestras que componen el set de datos de EEMlab

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivan de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

Tanto el proceso foto-Fenton como el ozono y su combinación con luz UVA-Vis han demostrado ser técnicas eficientes en la degradación de compuestos fenólicos. El tratamiento mediante foto-Fenton se puede llevar a cabo a valores intermedios de pH (en torno a 4), seguramente debido a la complejación del hierro con los grupos fenólicos. Dado que la presencia de compuestos fenólicos en aguas residuales es habitual, evaluar el efecto del pH resulta interesante puesto que en algunos casos pueden obtenerse buenos rendimientos de degradación a pH superiores al óptimo del foto-Fenton (2.8), lo que disminuiría los costes asociados a la modificación del pH en el tratamiento.

No se aprecian diferencias significativas en la velocidad de degradación de contaminantes fenólicos con ozono y con ozono combinado con luz UV-A, excepto para aquellos casos en los que las condiciones de ensayo son más desfavorables (pH ácidos y dosis de ozono bajas), en los que se aprecia una mejora de rendimiento por el efecto sinérgico de la luz UV-A. Sin embargo, siempre se consiguen mineralizaciones mayores mediante la combinación de ozono con Luz UVA-Vis.

Tanto los tratamientos con ozono, como los realizados mediante el proceso foto-Fenton, consiguen buenas detoxificaciones de las aguas tratadas en ensayos realizados con diferentes tipos de microorganismos.

EEM-PARAFAC ha demostrado ser una herramienta muy útil para estudios mecanísticos en los que están involucradas moléculas orgánicas como las STH. Se ha determinado que a pH 5 se forman complejos STH-Fe(III) fuertes. Esto se debe a que, en condiciones ácidas, la complejación se encuentra limitada por la protonación de los grupos carboxílicos y a pH neutro la especiación química del Fe(III) dificulta su interacción con STH. El sistema Fe(III)-STH bajo irradiación a pH 3 y en presencia de H₂O₂ se rige por la elevada producción de radicales ·OH, así como por la baja solubilidad de las STH en estas condiciones. A pH 5 y 7 se da un incremento inicial en la fluorescencia que puede relacionarse con la foto reducción del Fe(III) a Fe(II), favoreciendo de esta forma el

proceso foto-Fenton. Dicho incremento se da más rápido a pH 5 que a pH 7. La disminución de la eficiencia observada para el proceso foto-Fenton en presencia de STH a valores de pH por encima 5 puede atribuirse a la baja complejación de Fe(III) a pH elevado, junto con la mayor limitación de la posibilidad de que ocurran procesos de foto reducción del hierro. Los resultados sugieren que el pH óptimo para la degradación mediante proceso foto-Fenton de contaminantes emergentes en presencia de STH, está íntimamente relacionado con la estabilidad de los complejos Fe(III)-STH formados a los diferentes valores de pH.

Se ha conseguido extraer con éxito sustancias tipo húmicas a partir de residuos generados en la producción del aceite de oliva. En cuanto a las condiciones de extracción, los mejores resultados se obtuvieron para tiempos de digestión largos y valores de pH elevados. Se comprobó la actividad fotocatalítica de las STH en la degradación de cafeína mediante proceso foto-Fenton a pH 5. Al aumentar la concentración de STH se observó una disminución en la eficiencia del proceso, probablemente debida a un doble efecto: por un lado, la competición de las STH con el compuesto por las especies reactivas y por otro, efectos de filtro interno. Se ha comprobado la capacidad de estas sustancias para generar especies reactivas. Al aumentar la concentración de STH aumentó la generación de oxígeno singlete, aunque esta especie no es eficiente en la eliminación de contaminantes. En condiciones de foto-Fenton (es decir, en presencia de H_2O_2 y Fe^{2+}), los resultados obtenidos demostraron que las STH aumentan la generación de radicales $\cdot\text{OH}$, si bien un exceso de sustancia resulta perjudicial

La interfaz de usuario EEMlab ha demostrado su utilidad a la hora de facilitar el uso de *toolbox* empleadas para en análisis de datos de fluorescencia. La aplicación no solo incluye todas las funciones que ofrece drEEM, sino que además incluye funciones que facilitan la carga de datos, la identificación y resolución de errores y la obtención de gráficas. El flujo de trabajo que sigue EEMlab permite la realización del análisis de forma muy clara, identificando cada una de las etapas. Mediante el análisis del set de datos procedente de muestras sintéticas se ha conseguido validar la utilidad de la aplicación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adishkumar, S., Sivajothi, S., & Rajesh Banu, J. (2012). Coupled solar photo-fenton process with aerobic sequential batch reactor for treatment of pharmaceutical wastewater. *Desalination and Water Treatment*, *48*, 89–95.
- Agustina, T. E., Ang, H. M., & Vareek, V. K. (2005). A review of synergistic effect of photocatalysis and ozonation on wastewater treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, *6*, 264–273.
- Alaton, I. A., Balcioglu, I. A., & Bahnemann, D. W. (2002). Advanced oxidation of a reactive dye bath effluent: Comparison of O₃, H₂O₂/UV-C and TiO₂/UV-A processes. *Water Research*, *36*, 1143–1154.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., & Ingelmo, F. (2001). Organic matter components and aggregate stability after the application of different amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology*, *76*, 125–129.
- Alburquerque, J. A., González, J., García, D., & Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, *91*, 195–200.
- Alburquerque, J. A., González, J., García, D., & Cegarra, J. (2006). Measuring detoxification and maturity in compost made from “alperujo”, the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere*, *64*, 470–477.
- Amat, A. M., Arques, A., López, F., & Miranda, M. A. (2005a). Solar photo-catalysis to remove paper mill wastewater pollutants. *Solar Energy*, *79*, 393–401.
- Amat, A. M., Arques, A., Miranda, M. A., & López, F. (2005b). Use of ozone and/or UV in the treatment of effluents from board paper industry. *Chemosphere*, *60*, 1111–1117.
- Am Water Works Res, F., Langlais, B., Reckhow, D. A., & Brink, D. R. (1991). *Ozone in water treatment: application and engineering*. CRC press.

- Amuda, O. S., & Amoo, I. A. (2007). Coagulation/flocculation process and sludge conditioning in beverage industrial wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, *141*, 778–783.
- Andersen, C. M., & Bro, R. (2003). Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data. *Journal of Chemometrics*, *17*, 200–215.
- Andersson, C. A., & Bro, R. (2000). The N-way Toolbox for MATLAB. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *52*, 1–4.
- Andreottola, G., Foladori, P., & Ziglio, G. (2009). Biological treatment of winery wastewater: An overview. *Water Science and Technology*, *60*, 1117–1125.
- APHA-AWWA-WEFF. (1998). Standard Methods for the examination of Water and Waste Water. 20th Edition. In *United Book Press Inc.* Maryland.
- Arancon, N. Q., Edwards, C. A., Bierman, P., Welch, C., & Metzger, J. D. (2004). Influences of vermicomposts on field strawberries: 1. Effects on growth and yields. *Bioresource Technology*, *93*, 145–153.
- Araujo, P., & Janagap, S. (2012). Doehlert uniform shell designs and chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *910*, 14–21.
- Avetta, P., Bella, F., Bianco Prevot, A., Laurenti, E., Montoneri, E., Arques, A., & Carlos, L. (2013). Waste cleaning waste: Photodegradation of monochlorophenols in the presence of waste-derived photosensitizer. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *1*, 1545–1550.
- Avetta, P., Berto, S., Bianco Prevot, A., Minella, M., Montoneri, E., Persico, D., Vione, D., Gonzalez, M. C., Mártire, D. O., Carlos, L., & Arques, A. (2015). Photoinduced transformation of waste-derived soluble bio-based substances. *Chemical Engineering Journal*, *274*, 247–255.
- Aytar, P., Gedikli, S., Sam, M., Farizoğlu, B., & Çabuk, A. (2013). Sequential treatment of

-
- olive oil mill wastewater with adsorption and biological and photo-Fenton oxidation. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 3060–3067.
- Azcarate, S. M., De Araújo Gomes, A., Alcaraz, M. R., Ugulino De Araújo, M. C., Camiña, J. M., & Goicoechea, H. C. (2015). Modeling excitation-emission fluorescence matrices with pattern recognition algorithms for classification of Argentine white wines according grape variety. *Food Chemistry*, 184, 214–219.
- Barreca, S., Colmenares, J. J. V., Pace, A., Orecchio, S., & Pulgarin, C. (2014). Neutral solar photo-Fenton degradation of 4-nitrophenol on iron-enriched hybrid montmorillonite-alginate beads (Fe-MABs). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 282, 33–40.
- Beltrán, F. (2003). *Ozone Reaction Kinetics for Water and Wastewater Systems*. Lewis Publishers (a CRC Press Company), Boca Raton, FL. doi:10.1201/9780203509173
- Beltrán, F. J., & Rey, A. (2017). Solar or UVA-Visible Photocatalytic Ozonation of Water Contaminants. *Molecules*, 22, 1177.
- Berkovic, A. M., García Einschlag, F. S., Gonzalez, M. C., Pis Diez, R., & Mártire, D. O. (2013). Evaluation of the Hg²⁺ binding potential of fulvic acids from fluorescence excitation–emission matrices. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 12, 384–392.
- Bernabeu, A., Palacios, S., Vicente, R., Vercher, R. F., Malato, S., Arques, A., & Amat, A. M. (2012). Solar photo-Fenton at mild conditions to treat a mixture of six emerging pollutants. *Chemical Engineering Journal*, 198–199, 65–72.
- Blanco, J. (2002). *DESARROLLO DE COLECTORES SOLARES SIN CONCENTRACIÓN PARA APLICACIONES FOTOQUÍMICAS DE DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES PERSISTENTES EN AGUA*. Retrieved from https://www.psa.es/es/areas/tsa/docs/Tesis_Julian_Blanco.pdf
- Bolzonella, D., Cecchi, F., Pavan, P., & Waldron, K. (2007). Treatment of food processing wastewater. In *Handbook of waste management and co-product recovery in food processing* (Vol. 1, pp. 573–596).

- Bonnel, C., De Laat, J., & Dor??, M. (1990). Oxidation Of Parachloronitrobenzene In Dilute Aqueous Solution by O₃ + UV And H₂O₂ + UV: A Comparative Study. *Ozone: Science & Engineering*, 12, 73–94.
- Bro, R. (1997). PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38, 149–171.
- Brown, R. F., Jamison, S. E., Pandit, U. K., Pinkus, J., White, G. R., & Braendlin, H. P. (1964). The Reaction of Fenton's Reagent with Phenoxyacetic Acid and Some Halogen-Substituted Phenoxyacetic Acids. *Journal of Organic Chemistry*, 29, 146–153.
- Buschmann, J., Canonica, S., Lindauer, U., Hug, S. J., & Sigg, L. (2005). Photoirradiation of dissolved humic acid induces arsenic(III) oxidation. *Environmental Science and Technology*, 39, 9541–9546.
- Bustillo-Lecompte, C. F., & Mehrvar, M. (2015). Slaughterhouse wastewater characteristics, treatment, and management in the meat processing industry: A review on trends and advances. *Journal of Environmental Management*, 161, 287–302.
- Cañizares, P., Paz, R., Sáez, C., & Rodrigo, M. A. (2009). Costs of the electrochemical oxidation of wastewaters: A comparison with ozonation and Fenton oxidation processes. *Journal of Environmental Management*, 90, 410–420.
- Caravaca, F., Tortosa, G., Carrasco, L., Cegarra, J., & Roldán, A. (2006). Interaction between AM fungi and a liquid organic amendment with respect to enhancement of the performance of the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa*. *Biology and Fertility of Soils*, 43, 30–38.
- Cegarra, J., Garcia, D., Navarro, A., & Bernal, M. P. (1994). Effects of heat on the alkali extraction of humic substances from peat. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25, 2685–2695.
- Chávez, A. M., Rey, A., Beltrán, F. J., & Álvarez, P. M. (2016). Solar photo-ozonation: A

-
- novel treatment method for the degradation of water pollutants. *Journal of Hazardous Materials*, 317, 36–43.
- Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E. J., Pan, H., & Dai, S. (2002). Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 48, 59–68.
- Chen, W. S., Juan, C. N., & Wei, K. M. (2007). Decomposition of dinitrotoluene isomers and 2,4,6-trinitrotoluene in spent acid from toluene nitration process by ozonation and photo-ozonation. *Journal of Hazardous Materials*, 147, 97–104.
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A., & Booksh, K. (2003). Fluorescence Excitation-Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter. *Environmental Science and Technology*, 37, 5701–5710.
- Chin, Y.-P., Aiken, G., & O’Loughlin, E. (1994). Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environmental Science & Technology*, 28, 1853–1858.
- Chowdhury, P., Viraraghavan, T., & Srinivasan, A. (2010). Biological treatment processes for fish processing wastewater--a review. *Bioresource Technology*, 101, 439–449.
- Ciavatta, C., Govi, M., Antisari, L. V., & Sequi, P. (1990). An Enzymatic Approach to the Determination of the Degree of Stabilization of Organic-Carbon in Fertilizers. *Fertilizer Research*, 25, 167–174.
- Clarizia, L., Russo, D., Di Somma, I., Marotta, R., & Andreozzi, R. (2017). Homogeneous photo-Fenton processes at near neutral pH: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 209, 358–371.
- Crane, M., Watts, C., & Boucard, T. (2006). Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 367, 23–41.
- Cruz-Alcalde, A., Sans, C., & Esplugas, S. (2017). Priority pesticides abatement by advanced water technologies: The case of acetamiprid removal by ozonation.

Science of the Total Environment, 599–600, 1454–1461.

Cuerda-Correa, E. M., Domínguez, J. R., Muñoz-Peña, M. J., & González, T. (2016). Degradation of Parabens in Different Aqueous Matrices by Several O₃-Derived Advanced Oxidation Processes. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 55, 5161–5172.

De La Cruz, N. (2013). *Estudio de la eliminación de contaminantes emergentes en aguas mediante procesos de oxidación avanzados*. Universitat de Barcelona. Retrieved from <http://ccuc.cbuc.cat/record=b5848746~S23%2Acat>

De La Cruz, N., Esquius, L., Grandjean, D., Magnet, A., Tungler, A., de Alencastro, L. F., & Pulgarin, C. (2013). Degradation of emergent contaminants by UV, UV/H₂O₂ and neutral photo-Fenton at pilot scale in a domestic wastewater treatment plant. *Water Research*, 47, 5836–2545.

De La Cruz, N., Giménez, J., Esplugas, S., Grandjean, D., De Alencastro, L. F., & Pulgarin, C. (2012). Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. *Water Research*, 46, 1947–1957.

De Luca, A., Dantas, R. F., & Esplugas, S. (2014). Assessment of iron chelates efficiency for photo-Fenton at neutral pH. *Water Research*, 61, 232–242.

De Luca, A., Dantas, R. F., & Esplugas, S. (2015). Study of Fe(III)-NTA chelates stability for applicability in photo-Fenton at neutral pH. *Applied Catalysis B: Environmental*, 179, 372–379.

De Torres-Socías, E., Cabrera-Reina, A., Trinidad-Lozano, M. J., Yuste, F. J., Oller, I., & Malato, S. (2014). Dynamic modelling for cork boiling wastewater treatment at pilot plant scale. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 12182–12189.

De Torres-Socías, E., Fernández-Calderero, I., Oller, I., Trinidad-Lozano, M. J., Yuste, F. J., & Malato, S. (2013). Cork boiling wastewater treatment at pilot plant scale: Comparison of solar photo-Fenton and ozone (O₃, O₃/H₂O₂). Toxicity and

-
- biodegradability assessment. *Chemical Engineering Journal*, 234, 232–239.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48, 1532–1552.
- Derriche, R., & Berrahmoune, K. S. (2007). Valorisation of olive oil cake by extraction of hemicelluloses. *Journal of Food Engineering*, 78, 1149–1154.
- Dias-Machado, M., Madeira, L. M., Nogales, B., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2006). Treatment of cork boiling wastewater using chemical oxidation and biodegradation. *Chemosphere*, 64, 455–461.
- Dias, I. N., Souza, B. S., Pereira, J. H. O. S., Moreira, F. C., Dezotti, M., Boaventura, R. A., & Vilar, V. J. P. (2014). Enhancement of the photo-Fenton reaction at near neutral pH through the use of ferrioxalate complexes: A case study on trimethoprim and sulfamethoxazole antibiotics removal from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 247, 302–313.
- Dodd, M. C., Kohler, H. P. E., & Gunten, U. Von. (2009). Oxidation of antibacterial compounds by ozone and hydroxyl radical: Elimination of biological activity during aqueous ozonation processes. *Environmental Science and Technology*, 43, 2498–2504.
- Dryer, D. J., Korshin, G. V., & Fabricino, M. (2008). In situ examination of the protonation behavior of fulvic acids using differential absorbance spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 42, 6644–6649.
- Elmolla, E., & Chaudhuri, M. (2009). Optimization of Fenton process for treatment of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 170, 666–672.
- Esteves Da Silva, J. C. G., MacHado, A. A. S. C., Oliveira, C. J. S., & Pinto, M. S. S. D. S. (1998). Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu(II), Fe(III) and UO₂/2+. *Talanta*, 45, 1155–1165.

- Fascella, G., Montoneri, E., Ginepro, M., & Francavilla, M. (2015). Effect of urban biowaste derived soluble substances on growth, photosynthesis and ornamental value of *Euphorbia x lomi*. *Scientia Horticulturae*, *197*, 90–98.
- Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.*, *65*, 899–910.
- Fernandez, J., Bandara, J., Lopez, A., Buffat, P., & Kiwi, J. (1999). Photoassisted Fenton degradation of nonbiodegradable azo dye (Orange II) in Fe-free solutions mediated by cation transfer membranes. *Langmuir*, *15*, 185–192.
- Ferreira, S. L. C., Dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., Neto, B. B., & Bosque-Sendra, J. M. (2004). Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry - Review. *Talanta*, *63*, 1061–1067.
- Flotron, V., Delteil, C., Padellec, Y., & Camel, V. (2005). Removal of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent process. *Chemosphere*, *59*, 1427–1437.
- Fukushima, M., Tatsumi, K., & Nagao, S. (2001). Degradation characteristics of humic acid during photo-Fenton processes. *Environmental Science and Technology*, *35*, 3683–3690.
- Futran Fuhrman, V., Tal, A., & Arnon, S. (2015). Why endocrine disrupting chemicals (EDCs) challenge traditional risk assessment and how to respond. *Journal of Hazardous Materials*, *286*, 589–611.
- García, C. A., & Hodaifa, G. (2017). Real olive oil mill wastewater treatment by photo-Fenton system using artificial ultraviolet light lamps. *Journal of Cleaner Production*, *162*, 743–753.
- Garcia, D., Cegarra, J., Roig, A., & Abad, M. (1994). Effects of the extraction temperature on the characteristics of a humic fertilizer obtained from lignite. *Bioresource Technology*, *47*, 103–106.

-
- Ghosh, K., & Schnitzer, M. (1981). Fluorescence excitation spectra and viscosity behavior of a fulvic acid and its copper and iron complexes [Humic substances in soil]. *Journal of the Soil Science Society of America (USA)*, 45, 25–29.
- Gomis, J., Bianco Prevot, A., Montoneri, E., Gonzalez, M. C., Amat, A. M., Mártire, D. O., Arques, A., & Carlos, L. (2014). Waste sourced bio-based substances for solar-driven wastewater remediation: Photodegradation of emerging pollutants. *Chemical Engineering Journal*, 235, 236–243.
- Gomis, J., Carlos, L., Bianco Prevot, A., Teixeira, A. C. S. C., Mora, M., Amat, A. M., Vicente, R., & Arques, A. (2015a). Bio-based substances from urban waste as auxiliaries for solar photo-Fenton treatment under mild conditions: Optimization of operational variables. *Catalysis Today*, 240, 39–45.
- Gomis, J., Gonçalves, M. G., Vercher, R. F., Sabater, C., Castillo, M. A., Bianco Prevot, A., Amat, A. M., & Arques, A. (2015b). Determination of photostability, biocompatibility and efficiency as photo-Fenton auxiliaries of three different types of soluble bio-based substances (SBO). *Catalysis Today*, 252, 177–183.
- Gomis, J., Vercher, R. F., Amat, A. M., Mártire, D. O., Gonzalez, M. C., Bianco Prevot, A., Montoneri, E., Arques, A., & Carlos, L. (2013). Application of soluble bio-organic substances (SBO) as photocatalysts for wastewater treatment: Sensitizing effect and photo-Fenton-like process. *Catalysis Today*, 209, 176–180.
- Gonzalez-Olmos, R., Martin, M. J., Georgi, A., Kopinke, F. D., Oller, I., & Malato, S. (2012). Fe-zeolites as heterogeneous catalysts in solar Fenton-like reactions at neutral pH. *Applied Catalysis B: Environmental*, 125, 51–58.
- González Vicente, J. (2005). *Estudio del compostaje de orujo de oliva de dos fases y de la materia orgánica soluble extraída durante el proceso / José González Vicente ; dirección Juan Cegarra Rosique, Diego García Blaya*. Universidad de Murcia.
- Guerrero, L., Omil, F., Méndez, R., & Lema, J. M. (1997). Treatment of saline wastewaters from fish meal factories in an anaerobic filter under extreme ammonia

- concentrations. *Bioresource Technology*, *61*, 69–78.
- Guinea, E., Brillas, E., Centellas, F., Cañizares, P., Rodrigo, M. A., & Sáez, C. (2009). Oxidation of enrofloxacin with conductive-diamond electrochemical oxidation, ozonation and Fenton oxidation. A comparison. *Water Research*, *43*, 2131–2138.
- Homem, V., Alves, A., & Santos, L. (2010). Amoxicillin degradation at ppb levels by Fenton's oxidation using design of experiments. *Science of the Total Environment*, *408*, 6272–6280.
- Huang, W., Brigante, M., Wu, F., Hanna, K., & Mailhot, G. (2012). Development of a new homogenous photo-Fenton process using Fe(III)-EDDS complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *239*, 17–23.
- Ikehata, K., & El-Din, M. G. (2004). Degradation of recalcitrant surfactants in wastewater by ozonation and advanced oxidation processes: A review. *Ozone: Science and Engineering*, *26*, 327–343.
- Ioannou, L. A., Li Puma, G., & Fatta-Kassinos, D. (2015). Treatment of winery wastewater by physicochemical, biological and advanced processes: A review. *Journal of Hazardous Materials*, *286*, 343–368.
- Jobling, S., Sumpter, J. P., Sheahan, D., Osborne, J. A., & Matthiessen, P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *15*, 194–202.
- Juretic, D., Kusic, H., Dionysiou, D. D., & Bozic, A. L. (2013). Environmental aspects of photooxidative treatment of phenolic compounds. *Journal of Hazardous Materials*, *262*, 377–386.
- Juretic, D., Kusic, H., Koprivanac, N., & Loncaric Bozic, A. (2012a). Photooxidation of benzene-structured compounds: Influence of substituent type on degradation kinetic and sum water parameters. *Water Research*, *46*, 3074–3084.

- Juretic, D., Kusic, H., Koprivanac, N., Loncaric Bozic, A., White, S. S., Birnbaum, L. S., Kavitha, V., Palanivelu, K., ... Lacorte, S. (2012b). Photooxidation of benzene-structured compounds: Influence of substituent type on degradation kinetic and sum water parameters. *Water Research*, *46*, 3074–3084.
- Justino, C., Marques, A. G., Duarte, K. R., Duarte, A. C., Pereira, R., Rocha-Santos, T., & Freitas, A. C. (2010). Degradation of phenols in olive oil mill wastewater by biological, enzymatic, and photo-Fenton oxidation. *Environmental Science and Pollution Research*, *17*, 650–656.
- Kang, S. F., Liao, C. H., & Po, S. T. (2000). Decolorization of textile wastewater by photo-fenton oxidation technology. *Chemosphere*, *41*, 1287–1294.
- Katsoyiannis, I. A., Voegelin, A., Zouboulis, A. I., & Hug, S. J. (2015). Enhanced As(III) oxidation and removal by combined use of zero valent iron and hydrogen peroxide in aerated waters at neutral pH values. *Journal of Hazardous Materials*, *297*, 1–7.
- Katsumata, H., Kaneco, S., Suzuki, T., Ohta, K., & Yobiko, Y. (2006). Photo-Fenton degradation of alachlor in the presence of citrate solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *180*, 38–45.
- Katsumata, H., Sada, M., Kaneco, S., Suzuki, T., Ohta, K., & Yobiko, Y. (2008). Humic acid degradation in aqueous solution by the photo-Fenton process. *Chemical Engineering Journal*, *137*, 225–230.
- Kavitha, V., & Palanivelu, K. (2005a). Degradation of nitrophenols by Fenton and photo-Fenton processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *170*, 83–95.
- Kavitha, V., & Palanivelu, K. (2005b). Destruction of cresols by Fenton oxidation process. *Water Research*, *39*, 3062–3072.
- Kestioglu, K., Yonar, T., & Azbar, N. (2005). Feasibility of physico-chemical treatment and Advanced Oxidation Processes (AOPs) as a means of pretreatment of olive mill effluent (OME). *Process Biochemistry*, *40*, 2409–2416.

- Klamerth, N., Malato, S., Agüera, A., & Fernández-Alba, A. R. (2013). Photo-Fenton and modified photo-Fenton at neutral pH for the treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plant effluents: A comparison. *Water Research*, *47*, 833–840.
- Klamerth, N., Malato, S., Maldonado, M. I., Agüera, A., & Fernández-Alba, A. R. (2011). Modified photo-Fenton for degradation of emerging contaminants in municipal wastewater effluents. *Catalysis Today*, *161*, 241–246.
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., & Kassinos, D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*, *35*, 402–417.
- Kohler, J., Tortosa, G., Cegarra, J., Caravaca, F., & Roldán, A. (2008). Impact of DOM from composted “alperujo” on soil structure, AM fungi, microbial activity and growth of *Medicago sativa*. *Waste Management*, *28*, 1423–1431.
- Kushwaha, J. P., Srivastava, V. C., & Mall, I. D. (2011). An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *51*, 442–452.
- Lau, T. K., Chu, W., & Graham, N. (2007). Degradation of the endocrine disruptor carbofuran by UV, O₃ and O₃/UV. *Water Science and Technology*, *55*, 275–280.
- Legrini, O., Oliveros, E., & Braun, A. M. (1993). Photochemical Processes for Water Treatment. *Chemical Reviews*, *93*, 671–698.
- Li, W., Wang, Y., & Irini, A. (2014). Effect of pH and H₂O₂ dosage on catechol oxidation in nano-Fe₃O₄ catalyzing UV-Fenton and identification of reactive oxygen species. *Chemical Engineering Journal*, *244*, 1–8.
- Liu, J., Ou, C., Han, W., Faheem, Shen, J., Bi, H., Sun, X., Li, J., & Wang, L. (2015). Selective removal of nitroaromatic compounds from wastewater in an integrated zero valent iron (ZVI) reduction and ZVI/H₂O₂ oxidation process. *RSC Adv.*, *5*, 57444–57452.

-
- Liu, T., You, H., & Chen, Q. (2009). Heterogeneous photo-Fenton degradation of polyacrylamide in aqueous solution over Fe(III)-SiO₂ catalyst. *Journal of Hazardous Materials*, *162*, 860–865.
- LLorens, M. (2016). Alternativas para el tratamiento de efluentes industriales. In *Jornadas "Agua y en procesos productivos de cuencas deficiarias."* Murcia.
- Lopes, L., De Laat, J., & Legube, B. (2002). Charge transfer of iron(III) monomeric and oligomeric aqua hydroxo complexes: Semiempirical investigation into photoactivity. *Inorganic Chemistry*, *41*, 2505–2517.
- Luis, P., Saquib, M., Vinckier, C., & Van Der Bruggen, B. (2011). Effect of membrane filtration on ozonation efficiency for removal of atrazine from surface water. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *50*, 8686–8692.
- Lyon, B. A., Cory, R. M., & Weinberg, H. S. (2014). Changes in dissolved organic matter fluorescence and disinfection byproduct formation from UV and subsequent chlorination/chloramination. *Journal of Hazardous Materials*, *264*, 411–419.
- Ma, H., Allen, H. E., & Yin, Y. (2001). Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Water Research*, *35*, 985–996.
- MacCarthy, P. (2001). The principles of humic substances: An introduction to the first principle. *Special Publication-Royal Society of Chemistry*, *273*, 19–30.
- Machulek, A., Moraes, J. E. F., Vautier-Giongo, C., Silverio, C. A., Friedrich, L. C., Nascimento, C. A. O., Gonzalez, M. C., & Quina, F. H. (2007). Abatement of the inhibitory effect of chloride anions on the photo-fenton process. *Environmental Science and Technology*, *41*, 8459–8463.
- Madejón, E., López, R., Murillo, J. M., & Cabrera, F. (2001). Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: Effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *84*, 55–65.

- Malato, S., Blanco, J., Alarcón, D. C., Maldonado, M. I., Fernández-Ibáñez, P., & Gernjak, W. (2007a). Photocatalytic decontamination and disinfection of water with solar collectors. *Catalysis Today*, *122*, 137–149.
- Malato, S., Blanco, J., Maldonado, M. I., Oller, I., Gernjak, W., & Pérez-Estrada, L. (2007b). Coupling solar photo-Fenton and biotreatment at industrial scale: Main results of a demonstration plant. *Journal of Hazardous Materials*, *146*, 440–446.
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M. I., Blanco, J., & Gernjak, W. (2009). Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, *147*, 1–59.
- Mannucci, A., Munz, G., Mori, G., & Lubello, C. (2010). Anaerobic treatment of vegetable tannery wastewaters: A review. *Desalination*, *264*, 1–8.
- Mantzavinos, D., & Kalogerakis, N. (2005). Treatment of olive mill effluents: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes - An overview. *Environment International*, *31*, 289–295.
- Mantzavinos, D., & Psillakis, E. (2004). Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *79*, 431–454.
- Márquez, G., Rodríguez, E. M., Beltrán, F. J., & Álvarez, P. M. (2014). Solar photocatalytic ozonation of a mixture of pharmaceutical compounds in water. *Chemosphere*, *113*, 71–78.
- Martinez-Garcia, G., Johnson, A. C., Bachmann, R. T., Williams, C. J., Burgoyne, A., & Edyvean, R. G. J. (2007). Two-stage biological treatment of olive mill wastewater with whey as co-substrate. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *59*, 273–282.
- Mecha, A. C., Onyango, M. S., Ochieng, A., Fourie, C. J. S., & Momba, M. N. B. (2016). Synergistic effect of UV–vis and solar photocatalytic ozonation on the degradation of phenol in municipal wastewater: A comparative study. *Journal of Catalysis*, *341*,

116–125.

- Mendonça, E., Pereira, P., Martins, A., & Anselmo, A. M. (2004). Fungal biodegradation and detoxification of cork boiling wastewaters. *Engineering in Life Sciences, 4*, 144–149.
- Michael, I., Panagi, A., Ioannou, L. A., Frontistis, Z., & Fatta-Kassinos, D. (2014). Utilizing solar energy for the purification of olive mill wastewater using a pilot-scale photocatalytic reactor after coagulation-flocculation. *Water Research, 60*, 28–40.
- Mikutta, C., & Kretzschmar, R. (2011). Spectroscopic evidence for ternary complex formation between arsenate and ferric iron complexes of humic substances. *Environmental Science & Technology, 45*, 9550–9557.
- Minella, M., Marchetti, G., De Laurentiis, E., Malandrino, M., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., & Hanna, K. (2014). Photo-Fenton oxidation of phenol with magnetite as iron source. *Applied Catalysis B: Environmental, 154–155*, 102–109.
- Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Ponce-Robles, L., Pérez, J. A. S., & Malato, S. (2015). Removal of microcontaminants from MWTP effluents by combination of membrane technologies and solar photo-Fenton at neutral pH. *Catalysis Today, 252*, 78–83.
- Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Pérez, J. A. S., & Malato, S. (2014). Removal of pharmaceuticals from MWTP effluent by nanofiltration and solar photo-Fenton using two different iron complexes at neutral pH. *Water Research, 64*, 23–31.
- Monteagudo, J. M., Durán, A., Corral, J. M., Carnicer, A., Frades, J., & Alonso, M. A. (2012). Ferrioxalate-induced solar photo-Fenton system for the treatment of winery wastewaters. *Chemical Engineering Journal, 181–182*, 281–288.
- Montoneri, E., Mainero, D., Boffa, V., Perrone, D. G., & Montoneri, C. (2011). Biochemenergy: a project to turn an urban wastes treatment plant into biorefinery for the production of energy, chemicals and consumer's products with friendly environmental impact. *International Journal of Global Environmental Issues, 11*,

170.

Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Graeber, D., & Bro, R. (2013). Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. *Analytical Methods*, 5, 6557.

Nebbioso, A., & Piccolo, A. (2013). Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 109–124.

Neyens, E., & Baeyens, J. (2003). A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials*, 98, 33–50.

Nguyen, D. M. T., Zhang, Z., & Doherty, W. O. S. (2015). Degradation of hydroxycinnamic acid mixtures in aqueous sucrose solutions by the fenton process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 1582–1592.

Noguerol, T. N., Boronat, S., Jarque, S., Barceló, D., & Piña, B. (2006). Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta*, 69, 351–358.

Ohno, T., Amirbahman, A., & Bro, R. (2008). Parallel factor analysis of excitation-emission matrix fluorescence spectra of water soluble soil organic matter as basis for the determination of conditional metal binding parameters. *Environmental Science and Technology*, 42, 186–192.

Oller, I. (2008). *Depuración de aguas contaminadas con tóxicos persistentes mediante combinación de fotocatalisis solar y oxidación biológica.*

Oller, I., Malato, S., & Sánchez Pérez, J. A. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination—A review. *Science of The Total Environment*, 409, 4141–4166.

Oppenländer, T. (2007). Photochemical Processes of Water Treatment. In *Photochemical Purification of Water and Air: Advanced Oxidation Processes (AOPs) - Principles, Reaction Mechanisms, Reactor Concepts* (p. 383).

Orsetti, S., Marco-brown, J. L., Andrade, E. M., & Molina, F. V. (2013). Pb (II) binding to

-
- humic substances : an equilibrium and spectroscopic study. *Environmental Science & Technology*, 47, 8325–8333.
- Papoutsakis, S., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Garcia Sanchez, J. L., Pulgarin, C., & Malato, S. (2015). Microcontaminant degradation in municipal wastewater treatment plant secondary effluent by EDDS assisted photo-Fenton at near-neutral pH: An experimental design approach. *Catalysis Today*, 252, 61–69.
- Peña-Mendez, E. M., Havel, J., & Patocka, J. (2005). Humic substances-compounds of still unknown structure : applications in agriculture , industry , environment ... *Journal of Applied Biomedicine*, 3, 13–24.
- Pera-Titus, M., García-Molina, V., Baños, M. A., Giménez, J., & Esplugas, S. (2004). Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: A general review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 47, 219–256.
- Pérez, M., Torrades, F., Domènech, X., & Peral, J. (2002). Fenton and photo-Fenton oxidation of textile effluents. *Water Research*, 36, 2703–2710.
- Perminova, I. V., Frimmel, F. H., Kudryavtsev, A. V., Kulikova, N. A., Abbt-Braun, G., Hesse, S., & Petrosyan, V. S. (2003). Molecular weight characteristics of humic substances from different environments as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation. *Environmental Science and Technology*, 37, 2477–2485.
- Petrucchioli, M., Duarte, J., & Federic, F. (2000). High-rate aerobic treatment of winery wastewater using bioreactors with free and immobilized activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 381–386.
- Pignatello, J. J., Oliveros, E., & MacKay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36, 1–84.
- Plaza, C., Brunetti, G., Senesi, N., & Polo, A. (2006). Molecular and quantitative analysis of metal ion binding to humic acids from sewage sludge and sludge-amended soils

- by fluorescence spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 40, 917–923.
- Plgnatello, J. J. (1992). Dark and Photoassisted Fe³⁺-Catalyzed Degradation of Chlorophenoxy Herbicides by Hydrogen Peroxide. *Environmental Science and Technology*, 26, 944–951.
- Ponce-Robles, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Trinidad-Lozano, M. J., Yuste, F. J., & Malato, S. (2017). Cork boiling wastewater treatment and reuse through combination of advanced oxidation technologies. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 6317–6328.
- Poulin, B. A., Ryan, J. N., & Aiken, G. R. (2014). Effects of iron on optical properties of dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*, 48, 10098–10106.
- Poyatos, J. M., Muñio, M. M., Almecija, M. C., Torres, J. C., Hontoria, E., & Osorio, F. (2010). Advanced oxidation processes for wastewater treatment: State of the art. *Water, Air, and Soil Pollution*, 205, 187–204.
- Punzi, M., Anbalagan, A., Aragão Börner, R., Svensson, B. M., Jonstrup, M., & Mattiasson, B. (2015). Degradation of a textile azo dye using biological treatment followed by photo-Fenton oxidation: Evaluation of toxicity and microbial community structure. *Chemical Engineering Journal*, 270, 290–299.
- Pupo Nogueira, R. F., & Guimarães, J. R. (2000). Photodegradation of dichloroacetic acid and 2,4-dichlorophenol by ferrioxalate/H₂O₂ system. *Water Research*, 34, 895–901.
- Quiñones, D. H., Álvarez, P. M., Rey, A., Contreras, S., & Beltrán, F. J. (2015). Application of solar photocatalytic ozonation for the degradation of emerging contaminants in water in a pilot plant. *Chemical Engineering Journal*, 260, 399–410.
- Ribeiro, A. R., Nunes, O. C., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2015). An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. *Environment International*, 75, 33–51.

-
- Rivas, F. J., Beltrán, F. J., Gimeno, O., & Frades, J. (2001). Treatment of olive oil mill wastewater by Fenton's reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 1873–1880.
- Rizzo, L., Lofrano, G., Grassi, M., & Belgiorno, V. (2008). Pre-treatment of olive mill wastewater by chitosan coagulation and advanced oxidation processes. *Separation and Purification Technology*, *63*, 648–653.
- Ryan, D. K., & Weber, J. H. (1982). Fluorescence Quenching Titration for Determination of Complexing Capacities and Stability Constants of Fulvic Acid. *Analytical Chemistry*, *54*, 986–990.
- Sánchez-Avila, J., Fernandez-Sanjuan, M., Vicente, J., & Lacorte, S. (2011). Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 6799–6811.
- Sánchez, F. (2007). *Tratamientos combinados físico-químicos y de oxidación para la depuración de aguas residuales de la industria corchera*.
- Santos-Juanes, L., Amat, A. M., & Arques, A. (2017a). Strategies to Drive Photo-Fenton Process at Mild Conditions for the Removal of Xenobiotics from Aqueous Systems. *Current Organic Chemistry*, *21*, 1074–1083.
- Santos-Juanes, L., García Einschlag, F. S., Amat, A. M., & Arques, A. (2017b). Combining ZVI reduction with photo-Fenton process for the removal of persistent pollutants. *Chemical Engineering Journal*, *310*, 484–490.
- Santos-Juanes, L., Garcia Sanchez, J. L., López, J. L. C., Oller, I., Malato, S., & Sánchez Pérez, J. A. (2011). Dissolved oxygen concentration: A key parameter in monitoring the photo-Fenton process. *Applied Catalysis B: Environmental*, *104*, 316–323.
- Santos, D. C., Silva, L., Albuquerque, A., Simões, R., & Gomes, A. C. (2013). Biodegradability enhancement and detoxification of cork processing wastewater molecular size fractions by ozone. *Bioresource Technology*, *147*, 143–151.
-

- Savarino, P., Montoneri, E., Bottigliengo, S., Boffa, V., Guizzetti, T., Perrone, D. G., & Mendichi, R. (2009). Biosurfactants from urban wastes as auxiliaries for textile dyeing. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *48*, 3738–3748.
- Savarino, P., Montoneri, E., Musso, G., & Boffa, V. (2010). Biosurfactants from urban wastes for detergent formulation: Surface activity and washing performance. *Journal of Surfactants and Detergents*, *13*, 59–68.
- Silva, A. M. T., Nouli, E., Carmo-Apolinário, Â. C., Xekoukoulotakis, N. P., & Mantzavinos, D. (2007a). Sonophotocatalytic/H₂O₂ degradation of phenolic compounds in agro-industrial effluents. *Catalysis Today*, *124*, 232–239.
- Silva, M. R. A., Trovó, A. G., & Nogueira, R. F. P. (2007b). Degradation of the herbicide tebutiuron using solar photo-Fenton process and ferric citrate complex at circumneutral pH. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *191*, 187–192.
- Sirtori, C., Zapata, A., Oller, I., Gernjak, W., Agüera, A., & Malato, S. (2009). Decontamination industrial pharmaceutical wastewater by combining solar photo-Fenton and biological treatment. *Water Research*, *43*, 661–668.
- Slavov, A. K. (2017). General characteristics and treatment possibilities of dairy wastewater -a review. *Food Technology and Biotechnology*, *55*, 14–28.
- Soares, P. A., Batalha, M., Souza, S. M. A. G. U., Boaventura, R. A., & Vilar, V. J. P. (2015). Enhancement of a solar photo-Fenton reaction with ferric-organic ligands for the treatment of acrylic-textile dyeing wastewater. *Journal of Environmental Management*, *152*, 120–131.
- Šojić, D., Despotović, V., Orčić, D., Szabó, E., Arany, E., Armaković, S., Illés, E., Gajda-Schranz, K., ... Abramović, B. (2012). Degradation of thiamethoxam and metoprolol by UV, O₃ and UV/O₃ hybrid processes: Kinetics, degradation intermediates and toxicity. *Journal of Hydrology*, *472–473*, 314–327.
- Sortino, O., Dipasquale, M., Montoneri, E., Tomasso, L., Avetta, P., & Bianco Prevot, A.

-
- (2013). 90 % yield increase of red pepper with unexpectedly low doses of compost soluble substances. *Agronomy for Sustainable Development*, 33, 433–441.
- Souza, F. S., & Féris, L. A. (2015). Degradation of Caffeine by Advanced Oxidative Processes: O₃ and O₃/UV. *Ozone: Science & Engineering*, 37, 379–384.
- Souza, L. P. de, Faroni, L. R. D. A., Heleno, F. F., Pinto, F. G., Queiroz, M. E. L. R. de, & Prates, L. H. F. (2018). Ozone treatment for pesticide removal from carrots: Optimization by response surface methodology. *Food Chemistry*, 243, 435–441.
- Stasinakis, A. S., Elia, I., Petalas, A. V., & Halvadakis, C. P. (2008). Removal of total phenols from olive-mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace. *Journal of Hazardous Materials*, 160, 408–413.
- Stedmon, C. A., & Bro, R. (2008). Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnology and Oceanography: Methods*, 6, 572–579.
- Stephanie, K. L., Ishii, Boyer, T. H., Ishii, S. K. L., Boyer, T. H., Stephanie, K. L., Ishii, & Boyer, T. H. (2012). Behavior of Reoccurring PARAFAC Components in Fluorescent Dissolved Organic Matter in Natural and Engineered Systems: A CriticalCritical Review. *Environmental Science and Technology*, 46, 2006–2017.
- Stevenson, F. . (1994). Humus chemistry. *Genesis, Composition, Reactions*, 443.
- Su, Y., Chen, F., & Liu, Z. (2015). Comparison of optical properties of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in alpine lakes above or below the tree line: insights into sources of CDOM. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 14, 1047–62.
- Sun, S. P., Zeng, X., & Lemley, A. T. (2013). Kinetics and mechanism of carbamazepine degradation by a modified Fenton-like reaction with ferric-nitrilotriacetate complexes. *Journal of Hazardous Materials*, 252–253, 155–165.
- Tang, W. Z., & Tassos, S. (1997). Oxidation kinetics and mechanisms of trihalomethanes by Fenton's reagent. *Water Research*, 31, 1117–1125.
-

- Tocchi, C., Federici, E., Scargetta, S., D'Annibale, A., & Petruccioli, M. (2013). Dairy wastewater polluting load and treatment performances of an industrial three-cascade-reactor plant. *Process Biochemistry*, *48*, 941–944.
- Tonelli, D., Seeber, R., Ciavatta, C., & Gessa, C. (1997). Extraction of humic acids from a natural matrix by alkaline pyrophosphate. Evaluation of the molecular weight of fractions obtained by ultrafiltration. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *359*, 555–560.
- Trovó, A. G., & Nogueira, R. F. P. (2011). Diclofenac abatement using modified solar photo-Fenton process with ammonium iron(III) citrate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *22*, 1033–1039.
- Trubetskaya, O. E., Trubetskoj, O. A., & Ciavatta, C. (2001). Evaluation of the transformation of organic matter to humic substances in compost by coupling seepage. *Bioresource Technology*, *77*, 51–56.
- UNESCO. (2017). *Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017*.
- Vilar, V. J. P., Maldonado, M. I., Oller, I., Malato, S., & Boaventura, R. A. (2009). Solar treatment of cork boiling and bleaching wastewaters in a pilot plant. *Water Research*, *43*, 4050–4062.
- Voelker, B. M., Morel, F. M. M., & Sulzberger, B. (1997). Iron redox cycling in surface waters: Effects of humic substances and light. *Environmental Science and Technology*, *31*, 1004–1011.
- Von Gunten, U. (2003, April 1). Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research*. Pergamon.
- Wang, Y., Sun, Y., Li, W., Tian, W., & Irini, A. (2015). High performance of nanoscaled Fe₂O₃ catalyzing UV-Fenton under neutral condition with a low stoichiometry of H₂O₂: Kinetic study and mechanism. *Chemical Engineering Journal*, *267*, 1–8.

-
- Watts, R. J., & Dilly, S. E. (1996). Evaluation of iron catalysts for the Fenton-like remediation of diesel-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, *51*, 209–224.
- Wenk, J., von Gunten, U., & Canonica, S. (2011). Effect of Dissolved Organic Matter on the Transformation of Contaminants Induced by Excited Triplet States and the Hydroxyl Radical. *Environ. Sci. Technol.*, *45*, 1334–1340.
- White, S. S., & Birnbaum, L. S. (2009). An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, *27*, 197–211.
- Wu, J., Zhang, H., He, P. J., & Shao, L. M. (2011). Insight into the heavy metal binding potential of dissolved organic matter in MSW leachate using EEM quenching combined with PARAFAC analysis. *Water Research*, *45*, 1711–1719.
- Xu, H., Yan, Z., Cai, H., Yu, G., Yang, L., & Jiang, H. (2013). Heterogeneity in metal binding by individual fluorescent components in a eutrophic algae-rich lake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *98*, 266–272.
- Yamashita, Y., & Jaffé, R. (2008). Characterizing the interactions between trace metals and dissolved organic matter using excitation-emission matrix and parallel factor analysis. *Environmental Science and Technology*, *42*, 7374–7379.
- Yan, M., Fu, Q., Li, D., Gao, G., & Wang, D. (2013). Study of the pH influence on the optical properties of dissolved organic matter using fluorescence excitation-emission matrix and parallel factor analysis. *Journal of Luminescence*, *142*, 103–109.
- Yang, L., Hur, J., & Zhuang, W. (2015). Occurrence and behaviors of fluorescence EEM-PARAFAC components in drinking water and wastewater treatment systems and their applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*, 6500–6510.
- Yang, X., Meng, F., Huang, G., Sun, L., & Lin, Z. (2014). Sunlight-induced changes in

- chromophores and fluorophores of wastewater-derived organic matter in receiving waters - The role of salinity. *Water Research*, 62, 281–292.
- Ye, X., Cui, Y., & Wang, X. (2014). Ferrocene-modified carbon nitride for direct oxidation of benzene to phenol with visible light. *ChemSusChem*, 7, 738–742.
- Yoshida, M., Lee, B. D., & Hosomi, M. (2000). Decomposition of aqueous tetrachloroethylene by Fenton oxidation treatment. *Water Science and Technology*, 42, 203–208.
- Zapata, A., Oller, I., Sirtori, C., Rodríguez, A., Sánchez Pérez, J. A., López, A., Mezcuá, M., & Malato, S. (2010). Decontamination of industrial wastewater containing pesticides by combining large-scale homogeneous solar photocatalysis and biological treatment. *Chemical Engineering Journal*, 160, 447–456.
- Zhao, J., & Nelson, D. J. (2005). Fluorescence study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with metal ions and Al³⁺-metal ion competition. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 383–396.
- Zou, L., & Zhu, B. (2008). The synergistic effect of ozonation and photocatalysis on color removal from reused water. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 196, 24–32.

7. PUBLICACIONES

1. S. García-Ballesteros, M. Mora, R. Vicente, C.Sabater, M.A. Castillo, A. Arques, A.M. Amat. (2016) *"Gainig further insight into photo-Fenton treatment of phenolic compounds commonly found in food processing industry"* Chemical Engineering Journal. 288, 126-136
2. S. García-Ballesteros, M.Costante, R. Vicente, M. Mora, A.M. Amat, A.Arques, L. Carlos, F.S. García Einschlag.(2017) *"Humic-like substances from urban waste as auxiliaries for photo-Fenton treatment: a fluorescence EEM-PARAFAC study"* Photochemical & Photobiological Sciences. 16, 38-45
3. S. García-Ballesteros, M. Mora, R. Vicente, C. Sabater, M.A. Castillo, A. M. Amat, A. Arques. *"Degradation of eight phenolic compounds: a comparision between ozonisation and ozonisation UVA-VIS combination"* Chemical Engineering Journal. (en fase evaluación)
4. S. García-Ballesteros, A.M. Amat, A. Arques *"A new route valorisation of oil mil wastes: isolation of humic like substances to be employed in solar driven processes for pollutants removal"* ACS sustainable Chem.Eng. (Enviada)
5. P. Micó, S. García-Ballesteros. M. Mora, R.Vicente, A.M. Amat, A. Arques. *"EEMlab: a graphical user-firnely interface for fluorimetry experiments based on the drEEM toolbox"* Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (en fase evaluación)

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1-1 Clasificación de las aguas residuales industriales según el tipo de efluente que generan. Fuente: (Llorens, 2016)	20
Tabla 1.1-2 Características de las aguas residuales procedentes diferentes sectores de la industria alimentaria.....	22
Tabla 1.2-1 Valores de determinados parámetros para las aguas de vertido de 5 empresas dedicadas a la industria del corcho. Fuente: Estudio de vertidos procedentes del sector del corcho, ASECOR (2006).....	30
Tabla 1.3-1 Clasificación de los procesos de oxidación avanzada según la fuente de generación de especies reactivas.....	33
Tabla 1.3-2 Clasificación de las diferentes estrategias estudiadas para la aplicación del proceso foto-Fenton en condiciones suaves de pH (Santos-Juanes et al., 2017a) 41	
Tabla 1.5-1 Principales países productores de aceite de oliva. Fuente: Consejo Oleícola Internacional, 2016/2017	57
Tabla 3.1-1 Nombre, estructura química y riqueza de los contaminantes empleados en la presente tesis.....	67
Tabla 3.1-2 Reactivos y disolventes químicos genéricos empleados en la presente tesis.	68
Tabla 3.4-1 Gradiente empleado en el HPLC para la detección de los compuestos fenólicos.....	82
Tabla 3.4-2 Gradiente empleado en el HPLC para la detección de la cafeína	82
Tabla 3.4-3 Longitud de onda de detección y tiempo de retención al que aparecen cada uno de los compuestos fenólicos en los cromatogramas	82
Tabla 3.4-4 Programa empleado en el SEC para la determinación de tamaños moleculares	85
Tabla 3.4-5 Distribución de pesos moleculares de los patrones de PSS empleados, tiempo de elución de y tiempo de retención de cada uno de ellos	86
Tabla 3.6-1 Matriz de los valores codificados para un diseño experimental Doehlert con tres factores o variables	96
Tabla 4.1-1 Variables empleadas en el diseño experimental Doehlert y sus niveles ...	111

Tabla 4.1-2 Puntos experimentales empleados para obtener las superficies de respuesta (matriz Doehlert)	112
Tabla 4.1-3 Riesgo biológico asociado a la mezcla de compuestos fenólicos a lo largo del tratamiento mediante proceso foto-Fenton en planta piloto a pH 3.9: toxicidad, actividad estrogénica y comportamiento dioxin-like.	122
Tabla 4.2-1 Variables empleadas en el diseño experimental Doehlert para el estudio del tratamiento con O ₃ y sus niveles	127
Tabla 4.2-2 Valores experimentales de la matriz Doehlert usados para obtener las superficies de respuesta	127
Tabla 4.2-3 Valores de la variable respuesta obtenidos para cada uno de los puntos experimentales de la matriz Doehlert y empleados para la obtención de las superficies de respuesta	129
Tabla 4.2-4 Valores de la variable respuesta obtenida de la resta de la variable respuesta obtenida mediante el tratamiento combinando O ₃ /luzUVA-VIS la respuesta obtenida mediante el tratamiento con O ₃	135
Tabla 4.2-5 Riesgo biológico asociado a la mezcla de compuestos fenólicos a lo largo del tratamiento mediante ozono a pH 9: toxicidad, actividad estrogénica y comportamiento dioxin-like	139
Tabla 4.2-6 Características de los 4 componentes obtenidos mediante PARAFAC de las EEMs de los procesos de degradación	142
Tabla 4.3-1 características de los componentes obtenidos mediante PARAFAC de las EEMs a cada uno de los pH.	149
Tabla 4.3-2 Valores de log K y f _q para C1 y C2 con Fe(III) a pH 3, 5 y 7 determinados mediante una modificación del modelo de Ryan and Weber.....	151
Tabla 4.4-1 Peso del retentado de cada una de las membranas para cada una de las condiciones de digestión después de ser secados en estufa. Entre paréntesis se muestra el %de sólidos volátiles.	156

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.2-1 Ejemplo del caudal de vertidos a lo largo del año para un grupo de empresas pertenecientes a la Asociación Sanvicenteña de Empresario del Corcho (ASECOR) de un municipio de Extremadura donde se localiza la mayor explotación de corcho de España. Fuente: Estudio de vertidos procedentes del sector del corcho, ASECOR (2006).....	29
Figura 1.3-1 Diagrama de especiación de los hidróxidos de hierro en función del pH para una disolución $1 \cdot 10^{-5}$ M de Fe(III) a 25°. Fuente: (Clarizia et al., 2017)	41
Figura 1.4-1 Estructura modelo de los ácidos húmicos.....	47
Figura 1.4-2 Estructura modelo de los ácidos fúlvicos	48
Figura 1.4-3 Propiedades fisicoquímicas de las sustancias húmicas (Stevenson, 1994)	48
Figura 1.4-4 Teoría de los polifenoles para la formación de ácidos húmicos y fúlvicos	49
Figura 1.4-5 Aproximación a la molécula de sustancias tipo húmicas asiladas a partir de residuos sólidos urbanos	54
Figura 1.5-1 Esquema resumen de los diferentes procesos de obtención del aceite de oliva	58
Figura 3.2-1 Simulador solar de laboratorio.....	70
Figura 3.2-2 Radiación solar reflejada en un captador parabólico compuesto (FC=1). Tomado de (Blanco, 2002).....	71
Figura 3.2-3 Planta pila de fotocátalisis solar de 4L.	72
Figura 3.2-4 Generador de ozono Ozogas T.R.C.E. 4000 (izquierda) y reactor cilíndrico de vidrio con lámpara de xenón de inmersión axial sumergida (derecha)	73
Figura 3.3-1 Agitador magnético con calefacción IKA® C-MAG HS 7 equipado con un termómetro de contacto IKA® ETS-DE	77
Figura 3.3-2 bomba de vacío VWR VCP 80	77
Figura 3.3-3 montaje experimental empleado para la ultrafiltración. Derecha: Depósito con resistencia para el control de la temperatura, caudalímetro, soporte con la membrana y recipiente receptor del filtrado. Izquierda: bomba con manómetro para la impulsión del fluido y filtro de seguridad.....	78
Figura 3.3-4 membrana de diálisis	79

Figura 3.3-5 conductividad frente a tiempo durante el proceso de diálisis	79
Figura 3.4-1 Analizador de Carbono Orgánico Total	80
Figura 3.4-2 Cromatógrafo de ultra alta resolución (UHPLC).....	81
Figura 3.4-3 Fluorímetro.....	83
Figura 3.4-4 Espectrofotómetro UV-VIS	83
Figura 3.4-5 pH-metro-conductímetro	85
Figura 3.4-6 Cromatógrafo de exclusión por tamaños (SEC)	85
Figura 3.4-7 Estufa marca BINDER (izquierda) y horno mufla marca Nobertherm	87
Figura 3.4-8 Espectrómetro de resonancia paramagnética Bruker ESR 300E	88
Figura 3.4-9 Equipo para la medida de la dispersión de luz dinámica	89
Figura 3.5-1 Ejemplo de llenado de la microplaca de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA).....	91
Figura 3.5-2 Disposición de las distintas diluciones de la muestra y los controles en la microplaca de polipropileno (NUNCTM, THERMO Scientific).	93
Figura 3.6-1 Distribución espacial de los puntos experimentales en un diseño experimental tipo Doehlert para tres factores (izquierda) y proyección de la sección transversal de la esfera (derecha). Tomado de (Araujo & Janagap, 2012).....	95
Figura 3.6-2 Descomposición PARAFAC de una matriz X (I x J x K) vista como el producto de las tres matrices de carga obtenidas.	98
Figura 3.6-3 Representación de un modelo de dos componentes obtenido mediante PARAFAC para la matriz tridimensional de datos X	98
Figura 3.6-4 set de datos compuesto por EEMs organizado en una estructura tridimensional descompuesto en 5 componentes mediante PARAFAC. Tomado y adaptado de (Murphy et al., 2013)	99
Figura 3.6-5 Ejemplo de matriz de factores de corrección calculada a partir de la absorbancia de una muestra de materia orgánica disuelta. Tomado de (Murphy et al., 2013)	101
Figura 4.1-1 Proceso foto-Fenton para la eliminación de una mezcla de compuestos fenólicos de acuerdo a las siguientes condiciones experimentales: concentración inicial de cada uno de los contaminantes: 1 mg/L; [H ₂ O ₂] = 55.5 mg/L, [Fe(II)] ₀ = 3 mg/L y pH 0 3.9. Se representa la concentración relativa de cada uno de los	

contaminantes vs tiempo de tratamiento: ácido gálico (◆); ácido protocateuico (■); ácido vanílico (▲); ácido sinápico (+); ácido siríngico (×) y 2,4-dinitrofenol (●).....	113
Figura 4.1-2 Diagrama de Pareto, efecto estandarizado para t _{75%} del compuesto 2,4-dinitrofenol.....	114
Figura 4.1-3 Superficies de respuesta obtenidas para la eliminación de 2,4-dinitrofenol a 3 valores de pH diferentes: 2.8 (arriba), 3.9 (medio) y 5.0 (abajo). Se representan graficas de contornos para t _{75%} vs. concentración de H ₂ O ₂ y Fe(II).	115
Figura 4.1-4 Superficies de respuesta obtenidas para la eliminación de 2,4-dinitrofenol a 3 valores de [Fe] diferentes: 1 mg/L (arriba), 3 mg/L (medio) y 5 mg/L (abajo). Se representan graficas de contornos para t _{75%} vs. Concentración de H ₂ O ₂ y pH.	116
Figura 4.1-5 Superficies de respuesta obtenidas para la eliminación de 2,4-dinitrofenol a 3 valores de [H ₂ O ₂] diferentes: 13.8 mg/L (arriba), 55.3 mg/L (medio) y 96.7 mg/L (abajo). Se representan graficas de contornos para t _{75%} vs. Concentración de Fe y pH.	117
Figura 4.1-6 Tratamiento mediante proceso foto-Fenton de una mezcla de compuestos fenólicos empleando luz solar real: (●) concentración relativa de hierro, (▲) concentración relativa de COD y consumo de H ₂ O ₂ (■). Inset: degradación de los compuestos fenólicos: (●) 2,4-dinitrofenol, (▲) ácido vanílico. Todos los demás compuestos desaparecieron en el primer tiempo de muestreo.	119
Figura 4.1-7 EEM obtenidas para los 8 compuesto fenólicos empleados en el presente estudio a una concentración de 1 mg/L. Las figuras muestran la emisión de fluorescencia en el eje x (en el rango de 300 a 500 nm) para las longitudes de onda de excitación indicadas en el eje Y (de 250 a 350 nm). Los colores rojos se corresponden con las intensidades más altas y los azules con las más bajas.	123
Figura 4.1-8 EEM medidas a lo largo del tratamiento foto-Fenton para la mezcla de compuestos fenólicos. Las figuras muestran la emisión de fluorescencia en el eje x (en el rango de 300 a 500 nm) para las longitudes de onda de excitación indicadas en el eje Y (de 250 a 350 nm). Los colores rojos se corresponden con las intensidades más altas y los azules con las más bajas.	124

Figura 4.2-1 Eliminación de seis compuestos fenólicos mediante tratamiento con ozono : concentración inicial de cada contaminante = 3.5 mg/L; Dosis de ozono = 0.2 g/h y pH = 7. Se representa la concentración relativa de cada compuesto frente al tiempo de tratamiento: ácido gálico(◆); ácido protocateuico (■); ácido vanílico(▲); ácido sinápico (+); ácido siríngico (×) y 2,4-dinitrofenol (●)	128
Figura 4.2-2 Eliminación de seis compuestos fenólicos mediante tratamiento combinando ozono con luz UVA/VIS (b): concentración inicial de cada contaminante = 3.5 mg/L; Dosis de ozono = 0.2 g/h y pH = 7. Se representa la concentración relativa de cada compuesto frente al tiempo de tratamiento: ácido gálico(◆); ácido protocateuico (■); ácido vanílico(▲); ácido sinápico (+); ácido siríngico (×) y 2,4-dinitrofenol (●).....	128
Figura 4.2-3 Diagramas de Pareto obtenidos para la variable respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidos para el tratamiento mediante ozono (derecha) y mediante l combinación de ozono y luz (izquierda) para la degradación de una mezcla de seis compuestos fenólicos.....	130
Figura 4.2-4 Graficas de contorno para la respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidas de la degradación de seis compuesto fenólicos mediante Ozono. Valor de pH = 5 (izquierda) y 10 (derecha).....	131
Figura 4.2-5 Graficas de contorno para la respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidas de la degradación de seis compuesto fenólicos mediante Ozono. Valor de [C] = 3.5 mg/L.....	132
Figura 4.2-6 Graficas de contorno para la respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidas de la degradación de seis compuesto fenólicos mediante Ozono. Valor de DO_3 = 0.3 g/h (izquierda) y 0.8 (derecha).	133
Figura 4.2-7 Graficas de contorno para la respuesta $t_{80\%}$ (min) obtenidas de la degradación de seis compuesto fenólicos mediante la combinación de Ozono y luz UVA/VIS. Valor de [C] = 3.5 mg/L (arriba izquierda), pH= 7.5 (arriba derecha) y DO_3 = 0.6 g/h (abajo).	134
Figura 4.2-8 Graficas de contorno para la respuesta de $t_{80\%}$ (min) obtenido mediante la combinación O_3 /UVA-VIS menos $t_{80\%}$ (min) obtenido mediante el tratamiento con ozono de la degradación de seis compuesto. Valor de [C] = 3.5 mg/L.	136

Figura 4.2-9 Fotólisis de una mezcla de 6 compuestos fenólicos con una concentración inicial de 3.5 mg/L de cada uno de ellos a tres valores diferentes de pH: 3 (arriba), 7.5 (centro) y 9 (abajo). Se representa la concentración relativa de cada uno de los contaminantes frente al tiempo de tratamiento: ácido gálico(◆); ácido protocateuico (■); ácido vanílico(▲); ácido sinápico (+); ácido siríngico (×) y 2,4-dinitrofenol (●).....	137
Figura 4.2-10 EEMs medidas a lo largo del tratamiento mediante ozono de una mezcla de 8 compuesto fenólicos. Las figuras muestran la emisión de fluorescencia en el X (en el rango de 300 a 500 nm) para las longitudes de onda de excitación indicada en el eje Y (de 250 a 350 nm). Los colores rojos corresponden a intensidades más altas y los azules a más bajas.....	140
Figura 4.2-11 EEMs medidas a lo largo del tratamiento mediante la combinación de ozono con luz UV de una mezcla de 8 compuesto fenólicos. Las figuras muestran la emisión de fluorescencia en el X (en el rango de 300 a 500 nm) para las longitudes de onda de excitación indicada en el eje Y (de 250 a 350 nm). Los colores rojos corresponden a intensidades más altas y los azules a más bajas. ...	141
Figura 4.2-12 Evolución de los 4 componentes obtenidos mediante PARAFAC a lo largo del tratamiento mediante ozono (arriba) y mediante la combinación de ozono con Luz/UVA-Vis (abajo). C1 (●), C2(■), C3 (▲) y C4 (◆).....	142
Figura 4.3-1 EEMs de fluorescencia de STH (20 mg/L) a diferentes pH	146
Figura 4.3-2 EEM de fluorescencia de los componentes obtenidos mediante PARAFAC a cada uno de los pH estudiados.....	148
Figura 4.3-3 evolución de la intensidad de fluorescencia relativa de los tres componentes obtenidos mediante PARAFAC con la adición de Fe(III) a pH 3, 5 y 7. Las líneas en el caso de C1 y C2 muestra el ajuste de la ecuación de Ryan-Weber	150
Figura 4.3-4 cambios de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los componentes obtenidos mediante PARAFAC con el tiempo de irradiación para STH con Fe(III) a pH 3, 5 y 7 en ausencia (derecha) y presencia (izquierda) de H ₂ O ₂ . [STH] ₀ = 20 mg/L, [Fe(III)] ₀ = 5 mg/L y [H ₂ O ₂] ₀ = 2.2 mmol.....	154

Figura 4.4-1 EEMs de diferentes sustancias húmicas o tipo húmicas: a) retentato obtenido de la filtración del digestato por la membrana de 150 kg/mol, b) retentato obtenido de la filtración del digestato por la membrana de 50 kg/mol, c) Sustancias tipo húmicas obtenidas a partir de residuos sólidos urbanos, d) ácidos húmicos comerciales de sigma aldrich, e) ácido húmico de turba Pahokee, y f) ácido húmico de leonardita.....	158
Figura 4.4-2 Cromatogramas de exclusión por tamaños de las A-STH (línea sólida) y un ácido húmico comercial.....	160
Figura 4.4-3 Fotodegradación de cafeína (5 mg/L) en simulador solar a pH=5, [Fe ²⁺]=5 mg/L y concentración estequiométrica de H ₂ O ₂ en ausencia de STH (◆), en presencia de 10mg/L de CVT-230 (▲); 10 mg/L de A-STH (■); y 10 mg/L de A-STH dializadas (●)	161
Figura 4.4-4 Fotodegradación de cafeína (5 mg/L) en simulador solar a pH=5, [Fe ²⁺]=5 mg/L y concentración estequiométrica de H ₂ O ₂ en presencia de diferentes concentraciones de A-STH: 10 mg/L (■); 30 mg/L() y 60 mg/L(x)	162
Figura 4.4-5 Espectro EPR medido a temperatura ambiente para la Intensidad de la señal del aducto TMP-oxígeno singlete después de irradiar durante 15 min en solar box en presencia de concentraciones crecientes de A-STH: a) 50 mg/L; b) 100 mg/L; c) 500 mg/L; d) 2000 mg/L; e) 6000 g/L; y f) 10000 mg/L.....	163
Figura 4.4-6 Espectro EPR medido a temperatura ambiente después de irradiar en solar box durante 3 minutos DMPO (17 mM) a pH=5 bajo las siguientes condiciones experimentales: a) H ₂ O ₂ (2 mg/L)+ Fe ²⁺ (2 mg/L); b) A-STH (200 mg/L); c) A-STH (200 mg/L) + H ₂ O ₂ (2 mg/L)+ Fe ²⁺ (2 mg/L); d) A-STH (20 mg/L) + H ₂ O ₂ (2 mg/L)+ Fe ²⁺ (2 mg/L)	164
Figura 4.5-1 Flujo de trabajo de la aplicación EEMlab	166
Figura 4.5-2 Distribución de los residuos para una muestra mal modelada (arriba a la izquierda) y una muestra modelada más adecuadamente (arriba derecha). Gráficas de leverage mostrando longitudes de onda de emisión cercanas a 315 (abajo izquierda) y de excitación entre 250 y 270 nm (abajo derecha) con gran influencia (cerca de 315 nm) sobre el modelo con respecto al resto de longitudes de onda.	170

Figura 4.5-3 espectros de excitación (línea a puntos) y emisión (línea sólida) para los cuatro componentes obtenidos mediante PARAFAC del set de datos de EEMlab.	171
Figura 4.5-4 validación del modelo de 4 componentes obtenido mediante PARAFAC con dos mitades del conjunto de datos creadas aleatoriamente.	171
Figura 4.5-5 EEMs de los componentes obtenidos mediante PARAFAC para el conjunto de datos de EEMlab.....	172
Figura 4.5-6 EEMs de los compuestos puros a 1mg/L empleados en la creación del conjunto de datos de EEMlab.....	172
Figura 4.5-7 Derecha: peso de los componentes 1 (arriba) y dos (abajo) obtenidos mediante PARAFAC para el set de datos de EEMlab. Izquierda: concentración del ácido sinápico (arriba) y ácido siríngico (abajo) en cada una de las muestras que componen el set de datos de EEMlab	173

INDICE DE ABREVIATURAS

A-STH: Sustancias Tipo Húmicas extraídas a partir de Alperujo

CI: Carbono Inorgánico

CIT: Carbono Inorgánico Total

COD: Carbono Orgánico Disuelto

COT: Carbono Orgánico Total

CPC: Captadores Parabólicos Compuestos

CT: Carbono Total

DBO: Demanda Biológica de Oxígeno

DLS: Dynamic light Scattering (dispersión de luz dinámica)

DQO: Demanda química de oxígeno

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

EEM: Excitation Emission Matrix (matriz de excitación emisión)

FTIR: Fourier-Transformation Infrared spectroscopy (espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier)

NMR: Nuclear Magnetic Resonance (resonancia magnética nuclear)

PARAFAC: PARallel Analysis FACTor (análisis de factores paralelos)

POA: Proceso de Oxidación Avanzada

SBO-CVT-230: Soluble BioOrganic substances (Sustancias bio-orgánicas solubles extraídas a partir de residuos sólidos orgánicos)

SEC: Size-Exclusion Chromatography

STH: Sustancias Tipo Húmicas

STS: Sólidos Totales en Suspensión

ST: Sólidos Totales

SV: Sólidos Volátiles

TGA: TermoGravimetry Analisisys (análisis de termogravimetría)

UHPLC: Ultra High Perfonrmance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de ultra alta resolución)

ZVI: Zero Valent Iron (hierro cero valente)