



UNIVERSIDADE DA CORUÑA - FACULTADE DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E ENXEÑERÍA QUÍMICA I

---

# **SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON PROPIEDADES ADSORBENTES MEDIANTE MÉTODOS DE QUÍMICA SOSTENIBLE**

---

SYNTHESIS OF NANOPARTICLES WITH SORPTION PROPERTIES BY GREEN CHEMISTRY METHODS

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS CON PROPIEDADES ADSORBENTES MEDIANTE MÉTODOS DE QUÍMICA  
SUSTENTABLE

MEMORIA DE TRABAJO DE FIN DE GRADO

JUNIO 2015

Autora: Paula Casal Beiroa

Tutor/es: - Roberto Herrero Rodríguez

- José Luis Barriada Pereira





ROBERTO HERRERO RODRÍGUEZ e JOSÉ LUIS BARRIADA PEREIRA,  
Profesores Titulares do Departamento de Química Física e Enxeñería Química I da  
Universidade da Coruña

CERTIFICAN

que o presente Traballo de Fin de Grao titulado “*Síntesis de nanopartículas con propiedades adsorbentes mediante métodos de química sostenible*” foi realizado por Paula Casal Beiroa no Departamento de Química Física e Enxeñería Química I, e, como titores do mesmo, autorizan a súa presentación a fin de que poida ser xulgada polo tribunal correspondente.

E para que así conste, expídese a presente na Coruña, 19 de xuño do 2015.

Fdo. Roberto Herrero Rodríguez

Fdo. José Luis Barriada Pereira



## **Agradecimientos:**

*A mis tutores, Roberto Herrero y José L. Barriada por su supervisión y orientación durante la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado, y por ofrecerme su ayuda y asesoramiento cuando fueron necesarios.*

*Al grupo de investigación de Físicoquímica de Augas Naturais en general por la buena acogida, y a la doctoranda María Martínez Cabanas en particular por su atención, ayuda y sugerencias.*

*A todos aquellos que, compañeros de Grado o no, fueron de ayuda y apoyo en el transcurso de esta carrera.*

*A mis amistades, por su interés y los ánimos que me han dado siempre.*

*Y a mi madre.*

**Gracias.**



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS:

<b>ABS</b>	Absorbancia	<b>Trolox</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenciazolin-6-sulfónico)	<b>ZVI</b>	Hierro cero-valente
<b>COD</b>	Chemical Oxygen Demand		
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo		
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxígeno		
<b>EC<sub>x</sub></b>	Concentración eficiente		
<b>EtOH</b>	Etanol		
<b>FCR</b>	Reactivo de Folin- Ciocalteu		
<b>IP</b>	Porcentaje de Inhibición		
<b>KHP</b>	Biftalato de potasio		
<b>MeOH</b>	Metanol		
<b>NPs</b>	Nanopartículas		
<b>nZVI</b>	Nanopartículas de hierro cero (nanoscale zero-valent iron particles)		
<b>q</b>	Cantidad de adsorbato adsorbida en el equilibrio por g de adsorbente		
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox		
<b>TEM</b>	Microscopía de Transmisión Electrónica ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )		



## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción y antecedentes</b> .....	5
2.1. Nanotecnología y nanopartículas .....	5
2.2. Síntesis de nanopartículas metálicas .....	5
2.2.1. Métodos convencionales de síntesis de nanopartículas metálicas .....	5
2.2.2. Métodos de síntesis alternativos y respetuosos con el medio ambiente ....	6
2.2.3. Compuestos polifenólicos .....	6
2.3. Nanopartículas de hierro .....	9
2.3.1. Propiedades de las nanopartículas de hierro en la remediación de contaminantes .....	9
2.3.2. Inmovilización de nanopartículas .....	11
Ácido algínico	
Quitosano	
2.4. Cromo: fuentes de contaminación .....	13
2.4.1. Cromo hexavalente como contaminante .....	14
<b>3. Objetivos</b> .....	15
<b>4. Cronograma</b> .....	16
<b>5. Parte experimental</b> .....	17
5.1. Método de elaboración de los extractos vegetales y síntesis de nanopartículas .....	17
5.1.1. Elaboración de extractos: materiales escogidos .....	17
5.1.2. Síntesis de nanopartículas .....	17
5.2. Caracterización de los extractos vegetales .....	17
5.2.1. Medida del potencial redox .....	17
5.2.2. Medida de la capacidad antioxidante .....	17
5.2.2.1. Determinación de polifenoles totales .....	18
5.2.2.2. Ensayo de decoloración de DPPH' .....	18
5.2.2.3. Medida de la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox .....	21
5.2.3. Determinación de la DQO (Demanda Química de Oxígeno) .....	22
5.3. Métodos de inmovilización de nanopartículas .....	23

5.3.1. Perlas de alginato.....	23
5.3.2. Perlas de quitosano.....	24
5.4. Técnicas analíticas empleadas para la determinación de cromo.....	25
5.4.1. Determinación de Cr(VI) por colorimetría.....	25
5.4.2. Determinación de Cr total por medidas de absorción atómica.....	26
<b>6. Resultados y discusión.....</b>	<b>27</b>
6.1. Caracterización de los extractos vegetales.....	27
6.1.1. Potencial redox.....	27
6.1.2. Evaluación de la capacidad antioxidante.....	28
6.1.3. Demanda Química de Oxígeno.....	30
6.1.4. Resumen de todos los parámetros de caracterización de las propiedades antioxidantes de los extractos y discusión.....	31
6.2. Caracterización de las nanopartículas de Fe sintetizadas.....	32
6.3. Pruebas de adsorción y eliminación.....	35
6.3.1. Adsorción de Cr por mezcla directa con nanopartículas en suspensión...35	
6.3.2. Eliminación de Cr mediante nanopartículas inmovilizadas.....	36
6.3.2.1. Eliminación con perlas de ácido algínico.....	36
6.3.2.1.1. Estudio cinético.....	36
6.3.2.1.2. Influencia del pH.....	37
6.3.2.1.3. Estudio de la dosis.....	38
6.3.2.2. Eliminación con perlas de quitosano.....	39
6.3.2.2.1. Estudio de la dosis.....	39
6.3.2.2.2. Estudio cinético.....	40
6.3.2.2.3. Influencia del pH.....	40
6.3.3. Propiedades de adsorción de las nanopartículas sintetizadas.....	42
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>43</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>47</b>

## 1. Resumen

La nanotecnología es un campo que está creciendo en estos últimos años debido a que las nanopartículas de algunos materiales ven incrementadas u optimizadas sus propiedades o aplicaciones en esa escala de tamaño. Al mismo tiempo, la problemática ambiental mundial actual hace cada vez más necesario el desarrollo de procesos de química sostenible y la obtención de nuevos materiales mediante métodos de síntesis verde.

En este trabajo se han sintetizado nanopartículas metálicas de hierro mediante un método respetuoso con el medioambiente, una alternativa frente a los procesos convencionales basada en la capacidad antioxidante de extractos vegetales naturales que reducen metales en disolución.

Los extractos se preparan con biomasa procedente de especies vegetales autóctonas gallegas, y su caracterización se realiza evaluando su capacidad antioxidante mediante diversos métodos y determinando otros parámetros, como el potencial redox y la DQO (*Demanda Química de Oxígeno*). La estimación del tamaño de las nanopartículas sintetizadas con dichos extractos se lleva a cabo mediante imágenes de TEM (*Transmission Electron Microscopy*).

Una vez escogido el extracto considerado apropiado, se realiza un estudio de la capacidad de eliminación de cromo hexavalente de las correspondientes nanopartículas de hierro sintetizadas en función del pH, realizando su inmovilización en varios soportes.

**Palabras clave:** *extractos vegetales, capacidad antioxidante, nanopartículas, hierro, adsorción.*

## **Abstract**

Nanotechnology is a field rising these last years due to the fact that properties or applications of nanoparticles of some materials are increased or optimized in this size scale. At the same time, current global environmental problems required the development of sustainable chemical processes and new materials obtained by green synthesis methods.

In this essay, metallic nanoparticles of iron have been synthesised by an environmental friendly method, an alternative to conventional processes based in the antioxidant capacity of vegetal extracts to reduce metals in solution.

Extracts were prepared with biomass from galician native vegetal especies and their characterisation was made evaluating their antioxidant capacity using various methods, and determining other parameters such as redox potential and COD (*Chemistry Oxigen Demand*). Estimated size of synthesised nanoparticles with each of these extracts was performed by TEM (*Transmission Electron Microscopy*) images.

Once the appropriate extract is selected, a study of de removal of hexavalent chromium at differents values of pH was made with corresponding synthesised iron nanoparticles, making their immobilization in various supports.

**Key words:** *vegetal extracts, antioxidant capacity, nanoparticles, iron, adsorption.*

## Resumo

A nanotecnoloxía é un campo que está crescendo nestes últimos anos debido a que as nanopartículas dalgúns materiais ven incrementadas ou optimizadas as súas propiedades ou aplicacións nesa escala de tamaño. Ao mesmo tempo, a problemática ambiental mundial actual fai cada vez máis necesario o desenvolvemento de procesos de química sostible e a obtención de novos materiais mediante métodos de síntesis verde.

Neste traballo sintetizáronse nanopartículas metálicas de ferro mediante un método respetuoso co medioambiente, unha alternativa aos procesos convencionais baseada na capacidade antioxidante de extractos vexetais naturais que reducen metais en disolución.

Os extractos prepáranse con biomasa procedente de especies vexetais autóctonas galegas, e a súa caracterización realizase evaluando a súa capacidade antioxidante mediante diversos métodos e determinando outros parámetros como o potencial redox e a DQO (*Demanda Química de Osíxeno*). A estimación do tamaño das nanopartículas sintetizadas cos extractos lévase a cabo mediante imaxes de TEM (*Transmission Electron Microscopy*).

Unha vez escollido o extracto considerado apropiado, realízase un estudio da capacidade de eliminación de cromo hexavalente das correspondentes nanopartículas de ferro sintetizadas en función do pH, realizando a súa inmovilización en varios soportes.

**Palabras clave:** *extractos vexetais, capacidade antioxidante, nanopartículas, ferro, adsorción.*



## 2. Introducción y antecedentes

### 2.1. Nanotecnología y nanopartículas

La nanotecnología es el estudio, síntesis, desarrollo y aplicación de sistemas o estructuras a escala nanométrica. La síntesis de nanomateriales es un campo que está de actualidad, y que cada vez va despertando más interés, ya que paulatinamente se va descubriendo que en esa escala de tamaño una amplia variedad de materiales no solo mejoran algunas de sus propiedades sino que pueden llegar a adquirir características innovadoras y presentar nuevas aplicaciones.

Recibe el nombre de nanopartícula aquella partícula cuyas dimensiones (o al menos una de ellas) están comprendidas en el rango de 100 nm o menos.

Este Trabajo de Fin de Grado está centrado en la síntesis verde de nanopartículas metálicas de hierro, en la caracterización de las propiedades antioxidantes de los extractos naturales empleados en la síntesis y en el estudio de las propiedades adsorbentes o eficiencia de actuación en la remediación de contaminantes de las nanopartículas sintetizadas.

### 2.2. Síntesis de nanopartículas metálicas

La síntesis de nanopartículas metálicas mediante los métodos convencionales emplea reactivos agresivos y nocivos para el medio ambiente o se realiza mediante procesos que requieren equipos de coste elevado. Es por ello de especial interés el desarrollo de métodos de síntesis sostenible, que reduzcan a un mismo tiempo costes e impacto ambiental.

#### 2.2.1. Métodos convencionales de síntesis de nanopartículas metálicas

Los métodos de síntesis de nanopartículas metálicas pueden ser de dos tipos: *bottom-up* (de escala atómica a nanométrica), o *top-down* (de mayor a menor tamaño).

Los métodos *bottom-up* se basan en la reducción de metales o átomos metálicos mediante un proceso químico. El método convencional más empleado para la síntesis de nanopartículas metálicas es la reacción de una sal o complejo del metal en disolución con un fuerte reductor como el borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) en presencia de algún agente estabilizante o dispersante (polímero, coloide, surfactante o agente complejante) para evitar la agregación y formación del metal por aglomeración. Este proceso presenta varias desventajas, como la alta toxicidad del borohidruro o la generación de gases inflamables de hidrógeno como subproducto.

Los métodos *top-down* comprenden procesos físicos, químicos o fisicoquímicos, entre los cuales los más destacables en la síntesis de NPs de hierro son los siguientes:

- Descomposición de un precursor organometálico del metal con valencia cero en disolventes orgánicos. La utilización de un precursor organometálico favorece en cierto grado la dispersión, pero sigue siendo necesario un agente estabilizante adicional que evite la aglomeración de las nanopartículas formadas. En el caso de la síntesis de nanopartículas de hierro se emplea el pentacarbonilo de hierro<sup>[1]</sup> como precursor. Las nanopartículas de hierro se

obtienen por descomposición térmica (termólisis) de este compuesto, liberando gases de carbono al medio.

- Bombardeo iónico o desbastado iónico<sup>[2]</sup> consiste en el desgaste y afinamiento de la estructura del metal provocado por un haz iónico, mediante el cual se pueden generar finas láminas o películas de metal de grosor nanométrico. Este método de síntesis requiere equipos muy costosos.

#### 2.2.2. Métodos de síntesis alternativos y respetuosos con el medio ambiente

En los últimos años, la biosíntesis de nanopartículas metálicas se ha estudiado como una alternativa de síntesis frente a los procesos convencionales.<sup>[3,4]</sup> Esta alternativa no sólo constituye un método sostenible y respetuoso con el medio ambiente sino que también es más económico con respecto a los procesos químicos y físicos mencionados anteriormente.

En algunos de los procesos de biosíntesis se emplean materiales inocuos para el medio ambiente como son las hojas o la corteza de árboles y plantas.<sup>[5]</sup> Los extractos obtenidos a partir de esta biomasa contienen antioxidantes, entre los cuales los más importantes son los *compuestos polifenólicos*, y en menor medida azúcares reductores, bases nitrogenadas y aminoácidos.<sup>[6]</sup> Las nanopartículas se forman por contacto directo extracto-disolución del metal, produciéndose la reducción de los cationes metálicos en disolución, actuando el extracto con capacidad antioxidante como un “sustituto” del NaBH<sub>4</sub> que se emplea en el método de reducción convencional bottom-up.

Esta alternativa de síntesis presenta varias ventajas con respecto a los métodos convencionales. Entre las más destacables cabe mencionar que este proceso presenta niveles de toxicidad mucho menores, no emplea reactivos agresivos ni genera subproductos nocivos para el medioambiente y constituye una alternativa de bajo coste. Por otro lado, la matriz de los extractos actúa en ocasiones como estabilizante<sup>[6,7]</sup> que disminuye la agregación de las partículas metálicas formadas sin necesidad de añadir algún otro agente dispersante. Otra ventaja a destacar es la posible valorización de biomasa que pueda ser considerada material de desecho.

Estudios recientes<sup>[3-7]</sup> evalúan la viabilidad de este procedimiento a la hora de sintetizar nanopartículas de varios metales con diferentes extractos. En este trabajo se han caracterizado extractos de diferentes especies autóctonas gallegas (roble, castaño, pino y tojo), así como de las nanopartículas de hierro sintetizadas con los mismos, siguiendo este procedimiento alternativo.

#### 2.2.3. Compuestos polifenólicos

Pertenecen al grupo de los polifenoles o compuestos polifenólicos los compuestos cuya estructura posee al menos un anillo aromático sustituido con uno o más grupos hidroxilo, y se encuentran principalmente en la naturaleza en biomasa como frutas, vegetales, semillas y productos derivados.<sup>[8]</sup>

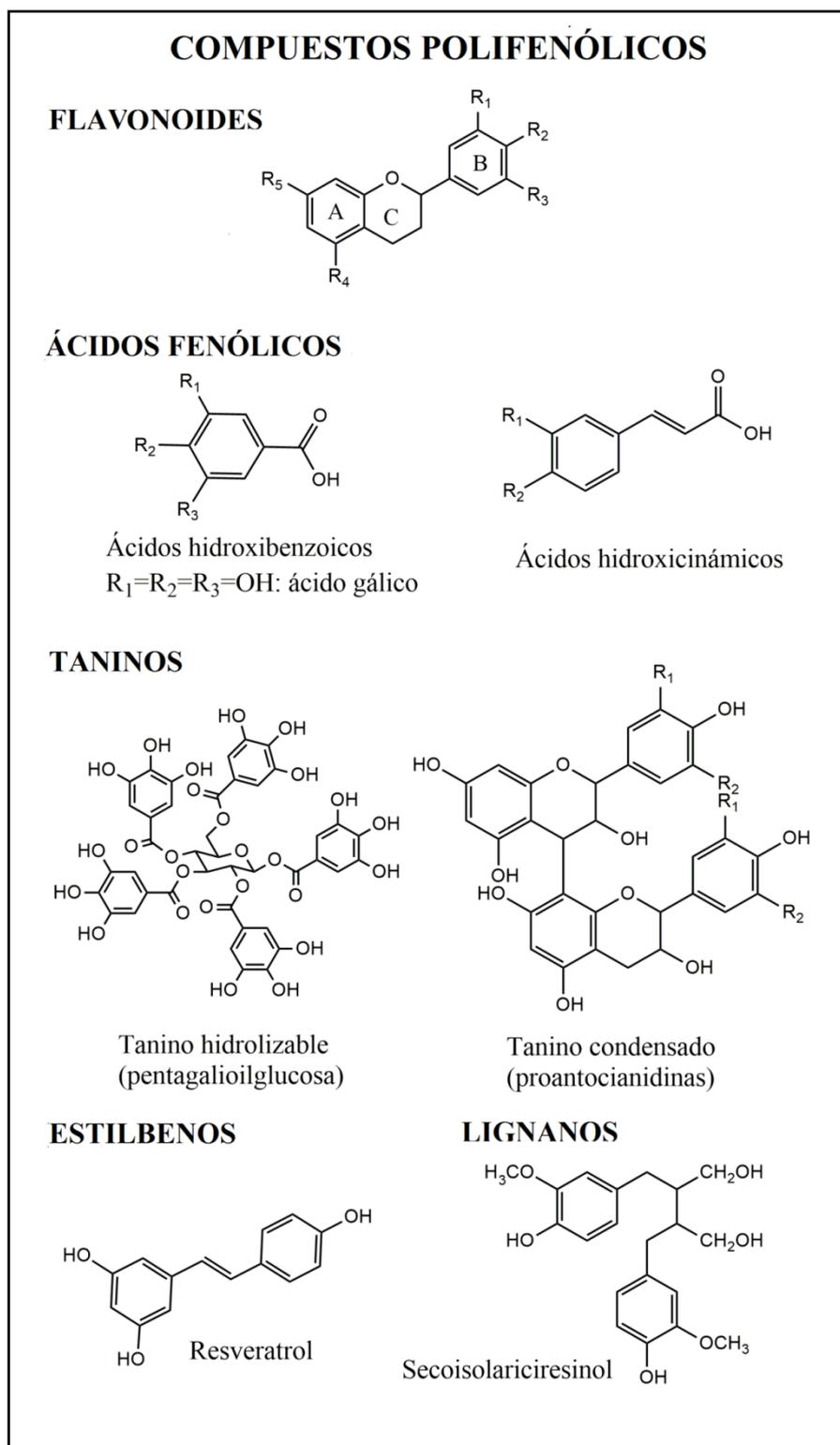


Figura 1: Estructuras de algunos de los compuestos polifenólicos más importantes.

Desde la estructura más simple hasta largas cadenas de anillos aromáticos, los polifenoles constituyen un amplio grupo de fitoquímicos con diversas propiedades y funciones implicadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Algunos de estos compuestos aportan pigmentación y otros son antioxidantes que intervienen en la protección de los tejidos, ya sea frente a la radiación UV como a determinados patógenos o al envejecimiento celular. <sup>[8-10]</sup>

Existen muchos tipos de compuestos polifenólicos, pero los más importantes se dividen en los siguientes grupos: <sup>[10,11]</sup>

- *Flavonoides*: son compuestos de bajo peso molecular, constituidos por dos ciclos aromáticos (designados A y B en la figura 1) enlazados entre sí por un puente de carbono, normalmente en la forma de anillo heterocíclico (C). Los diferentes tipos de flavonoides se dan según los patrones de sustitución del anillo puente, mientras que las sustituciones en el resto de anillos determinan cada compuesto concreto. Se muestran ejemplos de flavonoides en la figura 2.

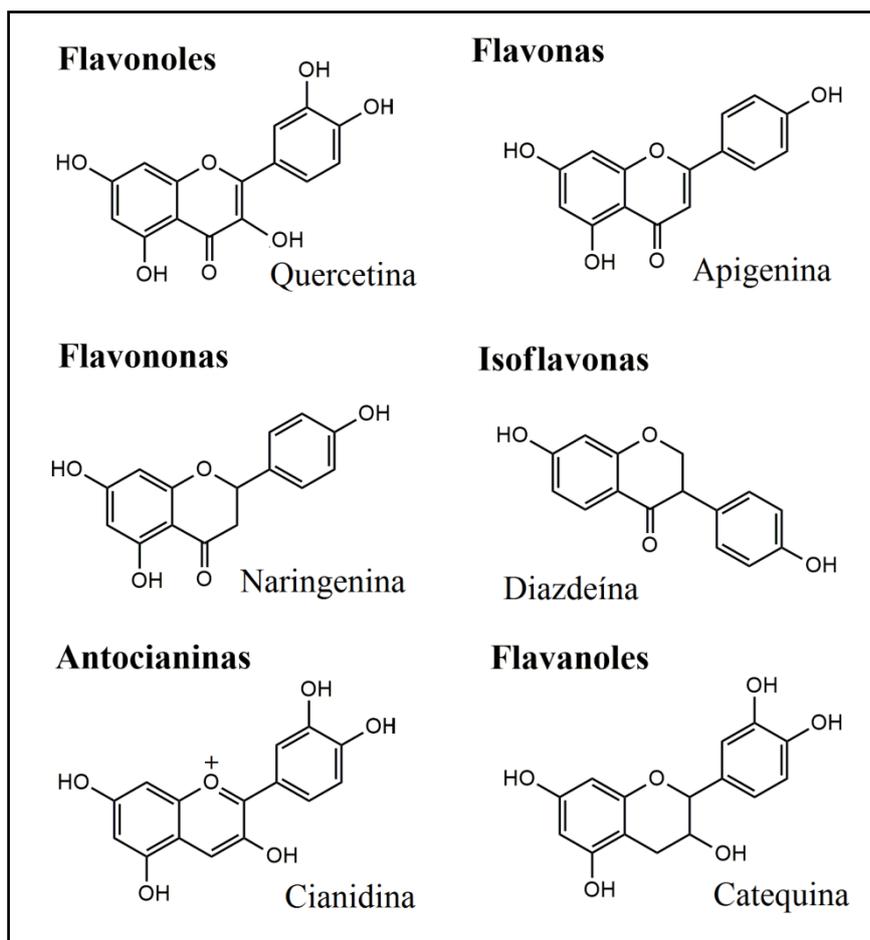


Figura 2: Estructuras de diversos tipos de flavonoides.

Los flavonoides son compuestos con alta capacidad antioxidante y bajos potenciales redox, <sup>[12]</sup> que actúan como donadores de protones produciéndose su oxidación, inhibiendo así otros procesos oxidativos. Los bajos potenciales redox de estos antioxidantes hacen termodinámicamente favorable la reducción de la gran mayoría de radicales libres ( $\cdot\text{O}_2$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}\cdot$ ) y algunos metales.

- *Ácidos fenólicos*: comprenden un tercio de los polifenoles incluidos en la dieta y están presentes como ácidos libres o enlazados. Presentan dos tipos de estructuras que permiten discriminarlos en 2 subgrupos: ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. Los *ácidos hidroxibenzoicos* son compuestos con un anillo aromático sustituido por un grupo carboxilo, e

hidroxilos como sustituyentes en las diferentes posiciones libres. Los *ácidos hidroxicinámicos* son derivados del ácido cinámico, y presentan la cadena de 3 carbonos correspondiente a la estructura de este precursor. Se muestran las estructuras típicas en la figura 1.

- *Taninos*: son polifenoles de alto peso molecular, los cuales se pueden subdividir en dos grupos: condensados e hidrolizables. Los *taninos condensados* están constituidos por polimerización de flavonoides y los *taninos hidrolizables* son derivados del ácido gálico, también antioxidante.
- *Estilbenos y lignanos*: los estilbenos presentan estructuras de varios anillos fenólicos enlazados mediante una cadena de carbono con un doble enlace, por lo que pueden presentarse en forma E o Z, mientras que los lignanos son compuestos de estructura similar al lignano, dos anillos fenólicos enlazados mediante una cadena de enlaces simples. Tanto estilbenos como lignanos se presentan en una proporción muy baja con respecto a los compuestos polifenólicos antes mencionados.

Todos estos compuestos tienen en común la presencia de hidroxilos dadores de protones, los cuales actúan como agentes reductores.

La clave del proceso de biosíntesis de nanopartículas mencionado anteriormente parece ser la riqueza en polifenoles de los extractos, <sup>[5]</sup> ya que son los componentes presentes que aportan la mayor parte de su capacidad antioxidante o reductora. Se puede considerar por tanto que las nanopartículas se forman como consecuencia de la reacción redox que se produce entre los cationes metálicos con el alto contenido en compuestos polifenólicos de los extractos y en menor medida con otros posibles componentes orgánicos reductores.

### 2.3. Nanopartículas de hierro

#### 2.3.1. Propiedades de las nanopartículas de hierro en la remediación de contaminantes

El hierro y sus óxidos son materiales empleados desde los años 90' en el tratamiento de aguas debido a su capacidad de eliminación de diversos contaminantes como metales pesados, colorantes y compuestos halogenados y sulfurados. <sup>[13-19]</sup> Es por ello de especial interés, ya dentro de un contexto donde la nanotecnología está a la orden del día, el desarrollo de métodos de síntesis verde de nanoestructuras de hierro cuya alta superficie específica permita incrementar la eficiencia de eliminación de estos contaminantes, reduciendo a un tiempo los costes y el impacto ambiental.

Una de las vías más importantes de eliminación de estos contaminantes es la *adsorción*.

La adsorción constituye un proceso de eliminación de una sustancia (adsorbato) presente en una fase líquida o gaseosa, por adhesión a la superficie de una fase sólida (adsorbente o sustrato). Esta adhesión puede ser producto del establecimiento de interacciones débiles de Van der Waals (fisorción) o de la formación de enlaces químicos (quimisorción) entre adsorbato y adsorbente.

La adsorción no debe confundirse con la absorción, en la cual se produce la asimilación de la sustancia en el interior de la fase absorbente, produciéndose una disolución uniforme. En la adsorción el adsorbato se fija únicamente en la superficie del adsorbente o sustrato, estableciéndose un equilibrio adsorción-desorción:



Se denomina  $q$  a la cantidad de adsorbato que permanece adsorbido en el equilibrio en una determinada cantidad de adsorbente, expresada generalmente en mg/g. La  $q$  es mayor cuanto mayor sea la superficie del sustrato y mayor la concentración de adsorbato mientras no se produzca la saturación del adsorbente.

El empleo de material nanoparticulado en la remediación de contaminantes mediante adsorción es de especial interés dado que el tamaño reducido del material implica un gran aumento de la superficie específica y, por tanto, una eficacia de adsorción mucho mayor.

La eficiencia de otro tipo de procesos de desintoxicación implicados en la remediación de contaminantes, como puede ser la transformación de iones de alta toxicidad por *reducción*, también se ve incrementada con el aumento de la superficie de contacto.

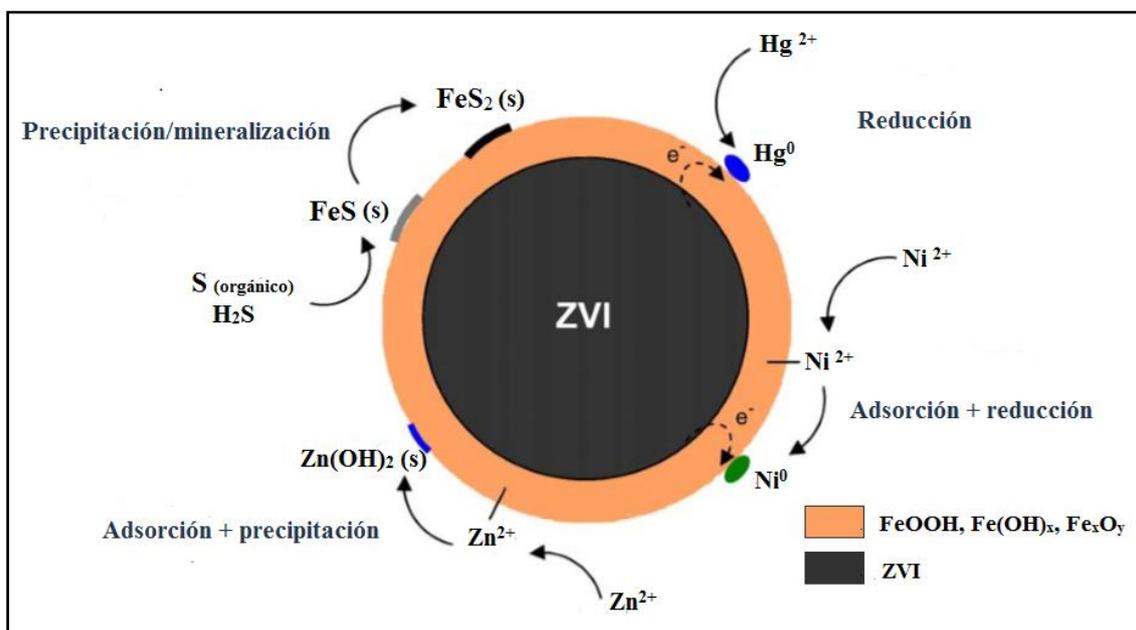
La reducción se produce predominantemente con la utilización de hierro cero-valente (ZVI) al ser un material con alto poder reductor, presentando el hierro un potencial redox de  $E^{\circ}_{\text{Fe(II)/Fe}^0} = -0.440 \text{ V}$ .<sup>[20]</sup> Este material es capaz de reducir la mayor parte de metales de transición, siendo el Mn y el Zn las excepciones. La eliminación por reducción con Fe(II) no está tan favorecida termodinámicamente, y solo ocurre ante metales de potencial redox  $E^{\circ} > +0.771 \text{ V}$ .

Otro mecanismo de eliminación es la *precipitación*, provocada por la transformación de los contaminantes en la superficie del material y conversión a otras especies de baja solubilidad o insolubles. En algunos casos se produce la *mineralización* o la transformación de una fracción orgánica en un compuesto inorgánico o mineral.<sup>[16,19]</sup>

El mecanismo o combinación de mecanismos implicados en la eliminación de contaminantes depende de las características y naturaleza del contaminante en concreto. En la figura 3 se muestra la estructura *core-shell*<sup>[19]</sup> que adoptan las nanopartículas de hierro cero y en la que se basan los mecanismos de eliminación. El *core* o núcleo está constituido por hierro cero y el *shell* o capa externa está compuesto por distintos óxidos o hidróxidos productos de la oxidación del hierro cero. La capa externa provee a la estructura de posiciones de adsorción por complejación o quimisorción, mientras que el núcleo aporta el poder reductor<sup>[21]</sup> implicado en la transformación de iones por reducción o en la deshalogenación de compuestos orgánicos.<sup>[16]</sup>

En el caso de los óxidos o hidróxidos de hierro, el mecanismo mayoritario es el de adsorción. Los cationes metálicos se adsorben por sustitución metálica o por complejación o interacción del adsorbato con los grupos hidroxilo presentes en la superficie del material en disolución. La adsorción de los grupos aniónicos se produce generalmente por sustitución de los grupos hidroxilo y coordinación de estos grupos aniónicos con el metal. En medio ácido, los aniones se fijan mediante interacciones

electrostáticas sobre la superficie de  $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$  cargada positivamente, presentando la adsorción un pH óptimo dependiente del pKa del ácido conjugado de cada compuesto. [22]



**Figura 3:** Modelo de core-shell. Mecanismos de eliminación de diversos contaminantes mediante hierro cero-valente propuestos por Yan, W. et al. (2010). [19]

En estos procesos de remediación de contaminantes, los compuestos de hierro son considerados un buen material a emplear debido a su no toxicidad, fácil obtención y abundancia. De todas formas, a la hora del tratamiento de ecosistemas acuáticos o suelos hay que tener en cuenta que el uso de hierro cero-valente puede tener efectos adversos [23,24] dada su alta reactividad. Esta especie retira oxígeno del medio al producirse su oxidación, y esto puede perjudicar el desarrollo de la flora y fauna del ecosistema. Por este motivo hay que considerar la inmovilización de las nanopartículas en soportes como técnica que nos permita la fácil retirada del material antes de la liberación de los efluentes acuosos al medio.

### 2.3.2. Inmovilización de nanopartículas.

El objetivo de la inmovilización es facilitar la posterior eliminación del material tras la remediación del contaminante. Existen distintos soportes que pueden ser usados en la inmovilización, entre los cuales se han probado los descritos a continuación.

#### Ácido algínico

El ácido algínico es un compuesto que se presenta de manera natural en las algas pardas, materia prima de la cual se obtiene por extracción. Es un polisacárido lineal de alto peso molecular constituido por dos unidades monoméricas, el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G). [25] Las estructuras de los monómeros se muestran en la figura 4.

La forma que adopta la macromolécula depende de su composición, dependiendo de la proporción y agrupación de los monómeros en bloques de secuencias MM o MG unidos por enlaces glucosídicos  $\beta(1-4)$  y bloques GG o GM unidos por enlaces

glucosídicos  $\alpha(1-4)$ . Los bloques de ácido manurónico originan zonas casi planas, mientras que las de ácido gulurónico presentan una estructura en zig-zag, como se muestra en la figura 5.

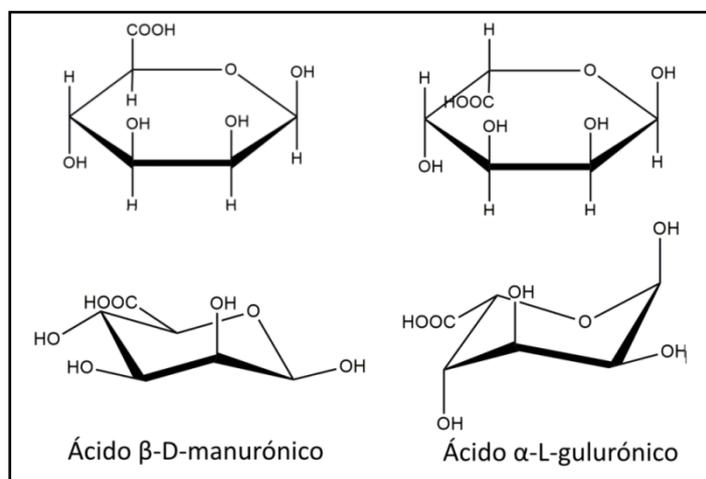


Figura 4: Estructuras de los monómeros: ácidos manurónico y gulurónico.

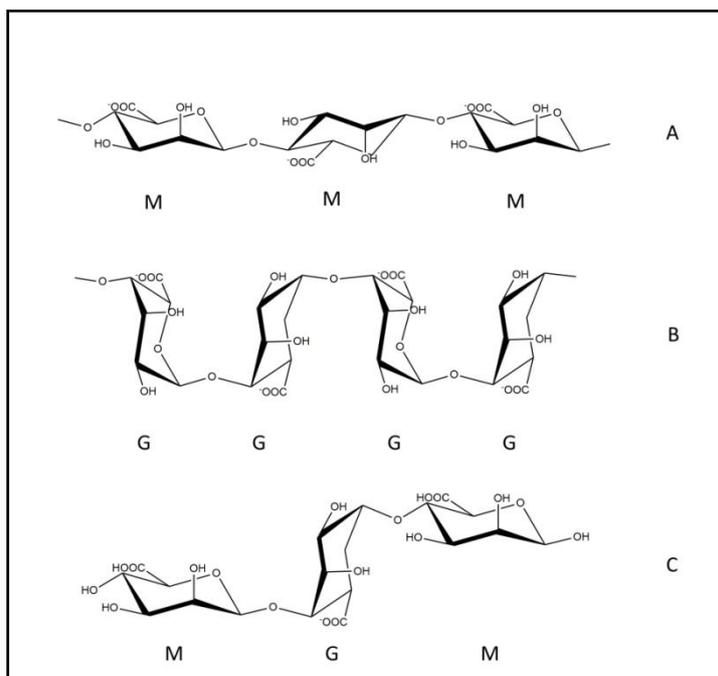


Figura 5: Diferentes bloques presentes en la estructura del alginato;  
A: bloque MM, B: bloque GG; C: bloque MGM.

La importancia de los alginatos viene dada por su capacidad para formar disoluciones viscosas o geles en disolución acuosa. Son por ello utilizados para la inmovilización, debido a la gelificación que se produce en contacto con diversos cationes divalentes, creando una estructura compacta denominada “egg-box”<sup>[26]</sup> o “caja de huevos” mostrada en la figura 6. Entre ellos el más empleado es el calcio debido a que sus sales son económicas, de fácil disponibilidad y no tóxicas.

La formación de la estructura de caja de huevos se produce mediante la coordinación de los cationes de calcio con los grupos carboxilo<sup>[27]</sup> en las cadenas o bloques GG. Esta estructura es más rígida cuantos más bloques GG presente el alginato.

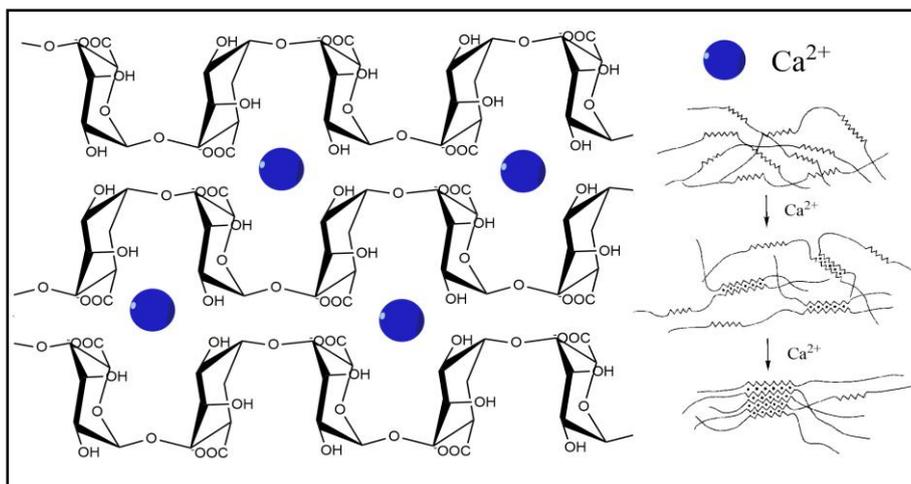


Figura 6: Modelo de la "caja de huevos", estructura que adquieren las cadenas GG de alginato en presencia del catión  $\text{Ca}^{2+}$ .

Uno de los soportes considerados para la inmovilización de las nanopartículas (NPs) es este polímero, formando geles en contacto con una disolución de sal de calcio.

### Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal compuesto por cadenas de  $\beta$ -(1-4)-D-glucosamina. Se obtiene por desacetilación de la quitina (acetilglucosamina), uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza presente en el exoesqueleto de los crustáceos y artrópodos.<sup>[28]</sup> La estructura del quitosano se muestra en la figura 7.

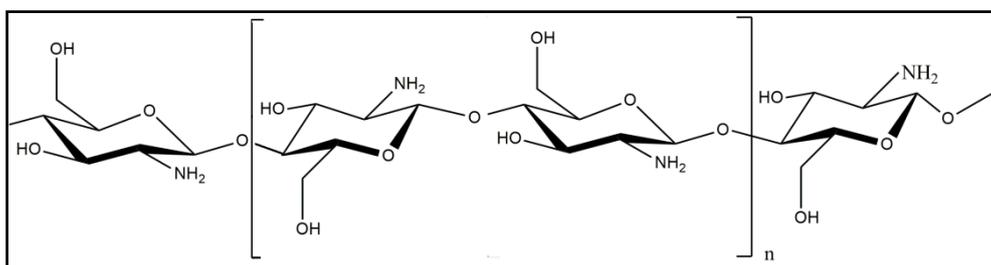


Figura 7: Estructura del quitosano.

Este polímero es soluble en medio ácido, produciéndose la gelificación instantánea al tener contacto la disolución ácida con un medio fuertemente básico. Los geles formados son consistentes y permeables.

El quitosano es el segundo soporte empleado a la hora de la inmovilización de las NPs en forma de perlas.

#### 2.4. Cromo: fuentes de contaminación

El cromo existe en la naturaleza en una gran variedad de estados de oxidación, de los cuales los más estables y de importancia medioambiental son el Cr(III) y el Cr(VI), presentes en varias formas de manera natural en suelos (0-250 mg/Kg), agua dulce ( $2.60 \cdot 10^{-5}$ - $5.20 \cdot 10^{-3}$  ppm) y agua salada ( $5.20 \cdot 10^{-6}$ - $8.32 \cdot 10^{-4}$  ppm).<sup>[29]</sup> Sin embargo, en zonas contaminadas los niveles de cromo pueden llegar a ser muy superiores a los encontrados naturalmente (entre 5-10000 ppm).<sup>[30]</sup>

El aumento de la concentración de cromo en el medio es de origen antropogénico, como consecuencia del desarrollo industrial.<sup>[31]</sup> El cromo y sus componentes son compuestos útiles en la industria dada su resistencia a agentes corrosivos. Es ampliamente utilizado en la fabricación de revestimientos que inhiben la corrosión de objetos metálicos y generan resistencia al choque térmico, en el curtido de cuero y piel, en la industria textil como colorantes o en la preservación de madera o papel, entre otros. La causa de la contaminación por este compuesto es la descarga de efluentes acuosos de las industrias químicas, textiles y metalúrgicas, y su magnitud depende del tipo de proceso que implique el uso de compuestos de cromo.

#### 2.4.1. Cromo hexavalente como contaminante

Entre las especies estables de cromo antes mencionadas, el cromo hexavalente es el que presenta mayor toxicidad y riesgos para la salud, dada su mayor solubilidad con respecto al cromo trivalente y mayor capacidad de ser asimilado por células y sistemas biológicos.<sup>[29]</sup> El efecto tóxico de esta especie se debe en gran parte a su poder oxidante y a la formación de radicales libres producto de su reducción a Cr(III) en el seno celular, motivo por el cual es cancerígena para los seres humanos y organismos vivos expuestos. La inhalación prolongada ocasiona problemas respiratorios tales como asma, bronquitis y neumonía. En contacto con la piel induce alergias, dermatitis y otros daños en la dermis.<sup>[31]</sup>

En los últimos años se ha estado investigando la obtención de nuevos materiales con propiedades adsorbentes para la remediación de diversos contaminantes metálicos como el cromo hexavalente. Entre ellos destacan materiales de origen natural, obtenidos a partir de biomasa como las algas pardas (*Sargasumm muticum*)<sup>[32]</sup> o el helecho.<sup>[33]</sup> Estos materiales presentan buenos porcentajes de eliminación de Cr(VI) a pH bajos, en los que tanto la reducción como la adsorción del cromo está favorecida a un pH óptimo.

Existen también antecedentes de la remediación de cromo Cr(VI) con compuestos de hierro, ya sea hierro cero-valente u óxidos o hidróxidos del metal.

El cromo tiene un potencial redox  $E^0_{Cr(VI)/Cr(III)} = +1.333 \text{ V}$ , por lo que la reducción es termodinámicamente favorable en presencia de Fe(II).<sup>[34]</sup> En la superficie de compuestos de este metal (óxidos e hidróxidos) también se produce la adsorción del contaminante.<sup>[22]</sup>

Estudios realizados con nZVI<sup>[35]</sup> comprueban mediante rayos X que se realiza la fijación química del cromo en su superficie, previa reducción del mismo.

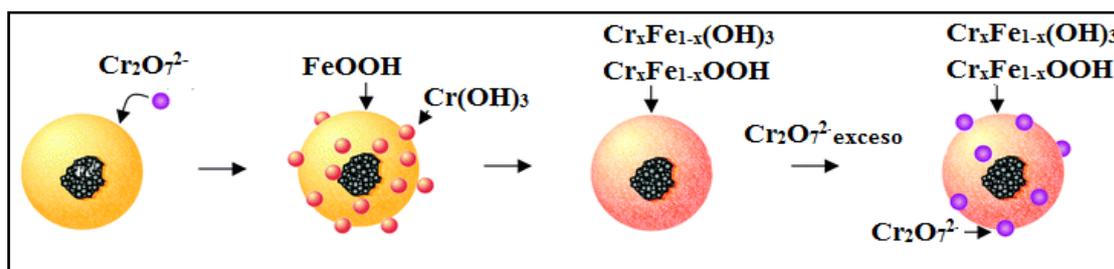


Figura 8: Mecanismo de eliminación de Cr(VI) por reducción/adsorción propuesto por X. Li et al. (2008).<sup>[37]</sup>

### 3. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo general la obtención mediante métodos de química sostenible de nanopartículas metálicas con propiedades adsorbentes que puedan ser empleadas como material en la remediación de contaminantes en efluentes acuosos.

Los objetivos concretos son:

- La obtención de extractos naturales a partir de especies vegetales autóctonas gallegas y caracterización de sus propiedades antioxidantes o reductoras.
- La síntesis de nanopartículas metálicas de hierro basada en el poder reductor o capacidad antioxidante de los extractos vegetales naturales obtenidos.
- La inmovilización en geles de las NPs para facilitar la manipulación del material y su posterior separación del efluente acuoso.
- La evaluación de la capacidad de eliminación de contaminantes que presentan las NPs sintetizadas y de sus propiedades adsorbentes en función del pH, mediante el contacto de este material con disoluciones de una especie tóxica como es el cromo hexavalente a pH ajustado.

#### 4. Cronograma

Las tareas llevadas a cabo durante la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado se desarrollaron durante los meses de diciembre de 2014 a junio de 2015, siguiendo la siguiente distribución temporal por semanas:

**Tabla 1:** Distribución temporal de las actividades realizadas.

	Diciembre			Febrero				Marzo				Abril			Mayo				Junio	
	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Revisión bibliográfica	■	■	■	■						■	■			■	■	■	■	■	■	■
Obtención de extractos		■	■	■	■							■								
Caracterización de extractos				■	■	■	■	■												
Síntesis y caracterización de NPs								■	■	■	■									
Inmovilización NPs												■	■	■						
Pruebas de eliminación de cromo												■	■	■	■	■				
Redacción														■	■	■	■	■	■	■
Horas invertidas	12	16	12	20	20	20	20	12	12	20	20	25	25	30	30	30	20	20	20	10
Total horas invertidas	394 h																			

## 5. Parte experimental

### 5.1. Método de elaboración de los extractos vegetales y síntesis de nanopartículas.

#### 5.1.1. Elaboración de extractos: materiales escogidos

La elaboración de extractos se llevó a cabo para cada especie mediante un proceso de extracción sólido-líquido, en las mismas condiciones de temperatura, tiempo de contacto y proporción biomasa-disolvente.

Se empleó biomasa procedente de especies autóctonas gallegas: hojas de roble, castaño, pino y ramas de tojo. Toda la biomasa fue previamente desecada, triturada y tamizada para conseguir un diámetro de partícula de entre 0.5-1 mm.

Como disolvente se empleó en un primer momento agua, la cual tiene una elevada capacidad de extracción de polifenoles<sup>[11]</sup> y no presenta toxicidad alguna. Seguidamente se realizó otra segunda tanda de extractos sustituyendo el agua por una mezcla 1:1 agua/etanol (EtOH 96% v/v, Panreac), con el objeto de que los extractos en esta mezcla presenten para algunas especies mayor capacidad antioxidante.<sup>[5]</sup>

Se obtienen los extractos por contacto de 3 g de biomasa con 300 ml de disolvente, calentando a reflujo y dejando ebullición por un tiempo de 40 min, tras el cual se obtiene el extracto líquido por filtración a vacío. Los extractos se almacenan a 4°C.

#### 5.1.2. Síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas de hierro se llevó a cabo haciendo mezclas 1:1 en volumen de los extractos obtenidos con una disolución 0.1 M de Fe (III) preparada a partir del nitrato nonahidratado ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  98% , Panreac). La síntesis se realizó goteando la disolución de hierro sobre cada extracto con sonicación.

### 5.2. Caracterización de los extractos vegetales

Dada la complejidad de la matriz orgánica de los extractos, se hace difícil la determinación de sus componentes. La caracterización de los extractos de roble, castaño, pino y tojo se realizó determinando parámetros como el potencial redox, la capacidad antioxidante y la DQO.

#### 5.2.1. Medida del potencial redox

La medida del potencial redox se realizó sobre el extracto recién sintetizado, una vez alcanzada la temperatura ambiente. Para hacer la medida se utilizó un electrodo de Pt conectado a un potenciómetro de pH/mV *HANNA HI 84244*.

#### 5.2.2. Medida de la capacidad antioxidante

De entre todos los parámetros, el que se puede considerar más relacionado con el proceso de síntesis de NPs es el de la capacidad antioxidante. Se evaluó esta capacidad antioxidante por varios métodos, descritos a continuación.

### 5.2.2.1. Determinación de polifenoles totales

La medida de polifenoles totales se realizó por medidas espectrofotométricas mediante ensayos de Folin-Ciocalteu,<sup>[36]</sup> método que ofrece buenos resultados en el intervalo de 5-100 mg/L. El reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) está constituido por una mezcla de fosfotungstato y fosfomolibdato que reacciona con los compuestos fenólicos y polifenólicos aportando una coloración azulada cuyo máximo de absorbancia se encuentra en  $\lambda_{\text{máx}}=765\text{nm}$ .

#### Procedimiento

Los reactivos empleados son una dilución 1:1 de FCR (Folin-Ciocalteu's Reagent, Panreac), una disolución 10% p/v carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  99.5%, Panreac), diferentes diluciones de los extractos y agua desionizada. Se mezclaron en tubos de ensayo de 10 ml con tapón los reactivos en las siguientes proporciones: 0.5 ml de la dilución de muestra, 3.75 ml de agua desionizada y 0.25 ml de la dilución de FCR. Se homogenizó la mezcla agitando con un vórtex y tras 20-30s se añadieron 0.5 ml de la disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Es necesario esperar 1h para que se produzca la reacción por completo antes de realizar las medidas espectrofotométricas a  $\lambda_{\text{máx}}=765\text{nm}$ .

Siguiendo el mismo procedimiento se hizo la recta de calibrado en el rango de concentraciones de 0-100 mg/L de ácido gálico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ , Sigma). Los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos se expresan, por tanto, en equivalentes de este compuesto.

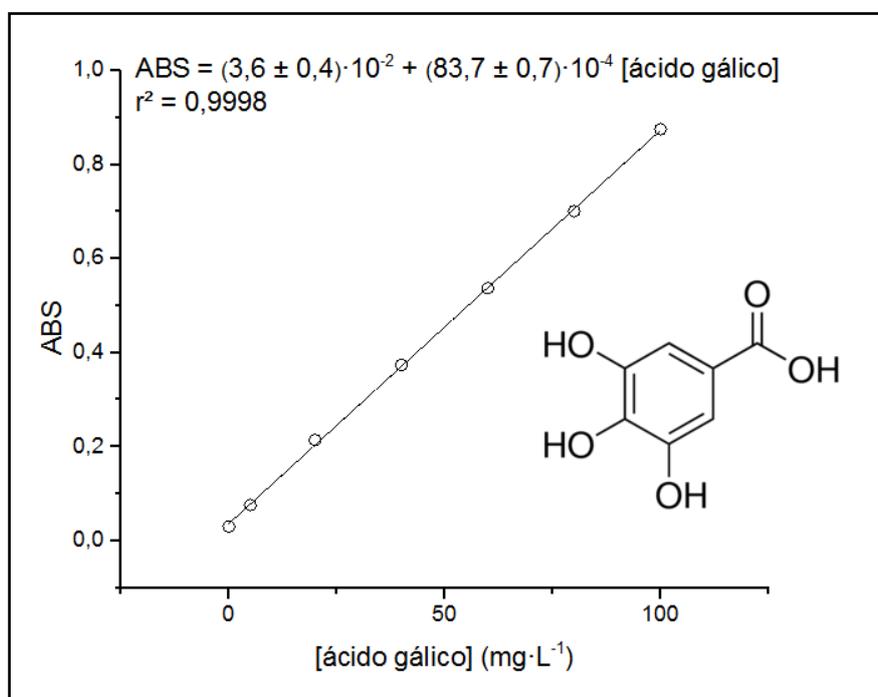


Figura 9: Recta de calibrado para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de Folin-Ciocalteu.

### 5.2.2.2. Ensayo de decoloración de DPPH<sup>•</sup>

El DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es uno de los radicales nitrogenados que presentan cierta estabilidad y pueden ser empleados para medir la capacidad

antioxidante por su alta reactividad y capacidad aceptora de protones. <sup>[37]</sup> Este radical libre en disolución adquiere un intenso color púrpura ( $\lambda_{\text{máx}} = 515\text{nm}$ ) y reacciona con dadores de protones dando lugar a la correspondiente hidrazina, la cual no presenta color.

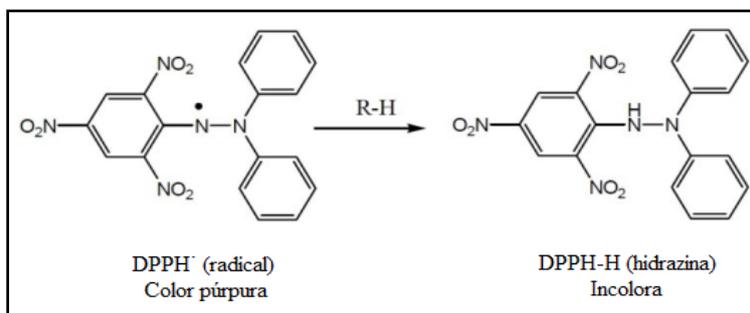


Figura 10: Estructura del radical DPPH<sup>•</sup> y su correspondiente hidrazina.

La capacidad antioxidante se mide en función de la diferencia de absorbancia y se puede expresar de dos formas:

- *Porcentaje de Inhibición (IP)*, o porcentaje de DPPH<sup>•</sup> que no ha reaccionado ante una cantidad fijada de antioxidante. Es una medida relativa.
- La *Concentración Eficiente, EC<sub>50</sub>*, definido como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir la cantidad inicial de DPPH<sup>•</sup> al 50%.

### Procedimiento

Se realizó un calibrado de DPPH<sup>•</sup> (DPPH<sup>•</sup>, Sigma Aldrich) entre las concentraciones de 0.02-0.1 mM preparando las disoluciones por dilución de una disolución más concentrada (disolución Stock 2 mM) del radical en metanol (MeOH, Panreac), la cual se conserva a -20°C en botella ámbar para minimizar su degradación.

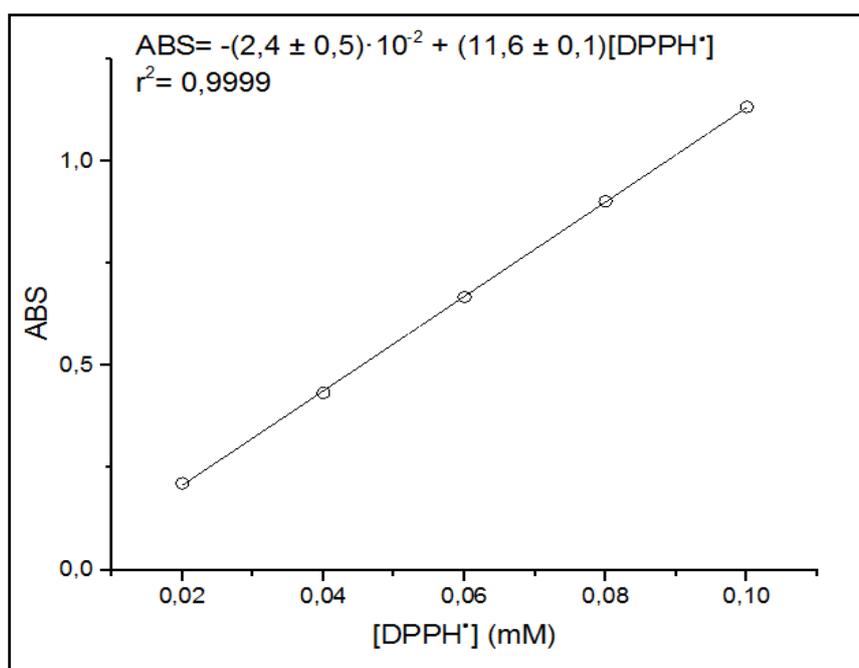


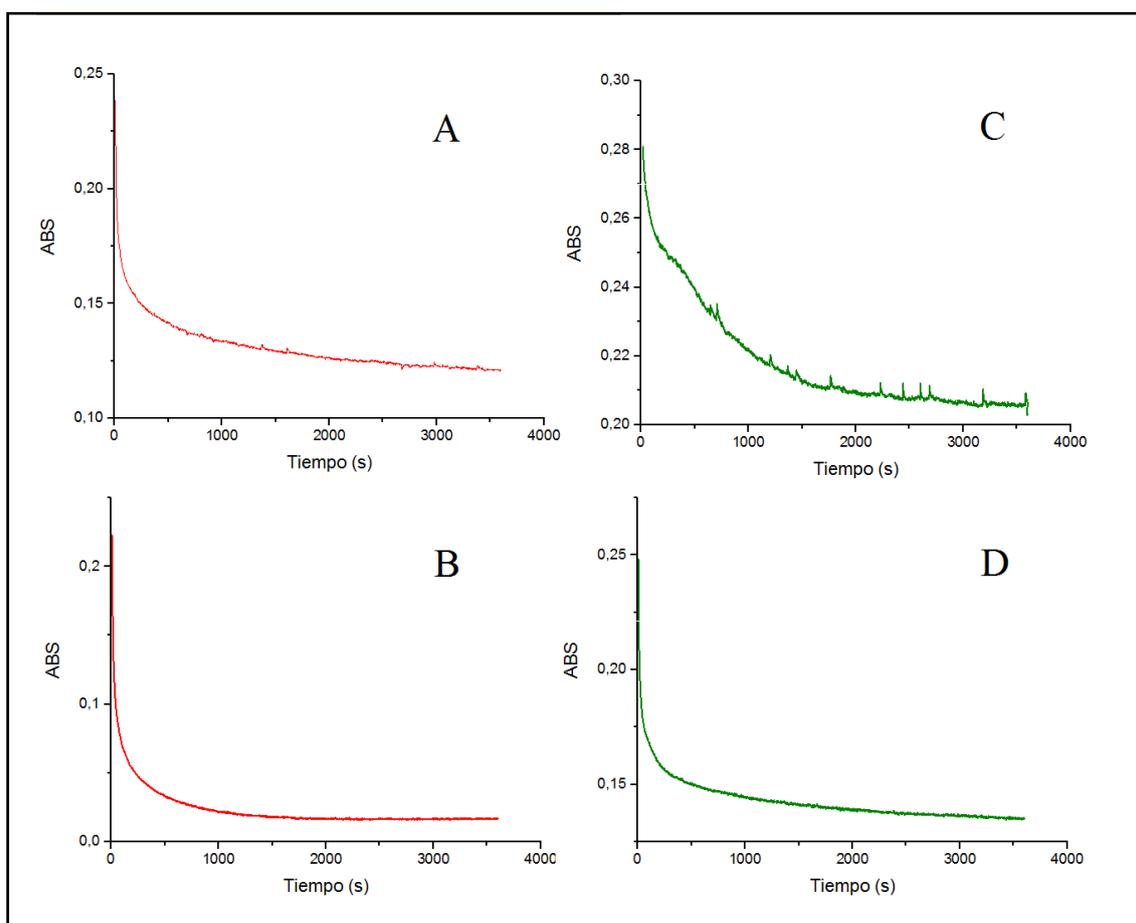
Figura 11: Recta de calibrado para la determinación de la concentración de DPPH<sup>•</sup>.

Para determinar tanto el IP como el  $EC_{50}$  se partió de una de las concentraciones medias del calibrado (0.06 mM) y se mezclaron en tubos de ensayo con tapón 4 ml de esta disolución con 100  $\mu$ L de diferentes diluciones de cada extracto por duplicado realizando el blanco con 100  $\mu$ L de MeOH. La medida de las absorbancias de los puntos de calibrado, blanco y muestras se llevaron a cabo en un espectrofotómetro *Zuzi 4211/20*. Dado que el radical es fotodegradable, los tubos de ensayo se recubrieron externamente con papel de aluminio antes de su uso y se mantuvieron tapados durante el tiempo de reacción.

### Estudio cinético

Se realizó de manera previa un estudio cinético para determinar el tiempo que tarda el  $DPPH^{\bullet}$  en reaccionar con los compuestos antioxidantes de los extractos. Para ello se hicieron las cinéticas para los extractos de mayor y menor concentración de polifenoles en vista de los resultados del ensayo de Folin-Ciocalteu (roble y tojo, respectivamente).

En una cubeta de vidrio se vertió 1 ml de la disolución del radical de concentración 0.06 mM a la cual se añadieron diferentes alícuotas de cada uno de los extractos tras lo cual se realizó la lectura de absorbancias con respecto al tiempo. De cada cinética se realiza una segunda réplica. En vista de los resultados obtenidos representados en la figura 12, se estableció el tiempo de reacción en 40 min.



**Figura 12 :** Estudio cinético para la decoloración de  $DPPH^{\bullet}$ ; A y B: 15 $\mu$ L y 30 $\mu$ L de extracto de roble respectivamente en 1 mL de  $DPPH$  0.06mM; C y D: 300 $\mu$ L y 500 $\mu$ L de extracto de tojo respectivamente en 1 mL de  $DPPH$  0.06mM.

## 5.2.2.3. Medida de la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox

El TEAC se basa en medir la capacidad antioxidante de una sustancia en equivalentes de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). El Trolox es un compuesto antioxidante hidrosoluble análogo del alfa-tocoferol (vitamina E).

El procedimiento experimental empleado es realmente una variante del TEAC convencional. <sup>[38]</sup> En el ensayo TEAC convencional las medidas son función de la decoloración de  $ABTS^{•+}$ , radical de color verde azulado, producto de la pérdida de un electrón de uno de los nitrógenos de su precursor, el ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenciazolin-6-sulfónico)). En este caso concreto se ha adaptado el método para el uso del  $DPPH^{•}$  como radical, al ser el reactivo del que se disponía.

El procedimiento empleado es análogo al método del  $DPPH^{•}$  anteriormente descrito, las medidas de la capacidad antioxidante vienen dadas en función de la cantidad de radical que reacciona, la cual se determina por diferencia de la absorbancia a  $\lambda=515\text{nm}$ , medida en el espectrofotómetro *Zuzi 4211/20*.

Se partió de una concentración de  $DPPH^{•}$  inicial de 0.06 mM que se mezcló con una dilución apropiada de cada extracto conservando las mismas proporciones que en el ensayo con  $DPPH^{•}$  ya descrito, 4 ml de la disolución del radical para 100  $\mu\text{L}$  de muestra.

Se midió la diferencia de absorbancia entre un blanco y cada una de las muestras. Siguiendo el mismo procedimiento, se realizan medidas del  $DPPH^{•}$  con diferentes concentraciones de Trolox (Trolox 97%, Sigma Aldrich) en el intervalo de 0-1.6 mM, y se construye un calibrado.

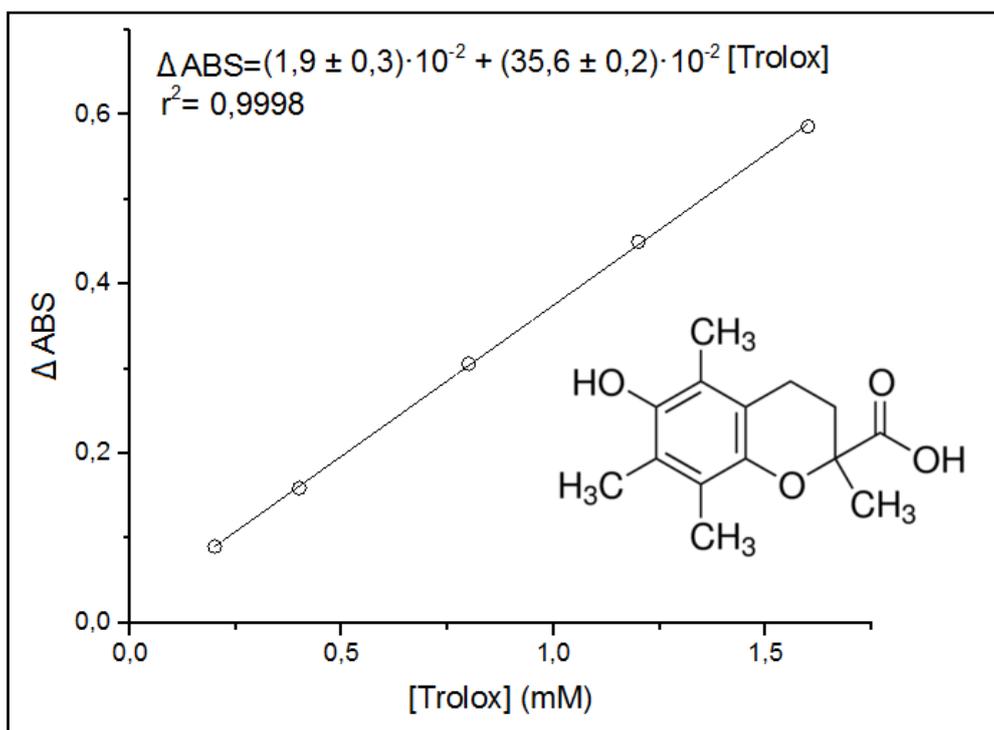


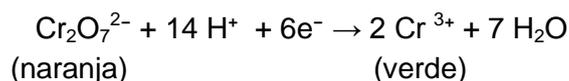
Figura 13: Calibrado de decoloración de  $DPPH^{•}$  a diferentes concentraciones de Trolox añadidas.

### 5.2.3. Determinación de la DQO (Demanda Química de Oxígeno)

La demanda química de oxígeno (DQO) es la medida de la materia orgánica presente en una matriz en función de la cantidad de oxígeno (en mg O<sub>2</sub>/L) que la oxida, o lo que es lo mismo, el oxígeno que demanda la totalidad de esa materia orgánica.

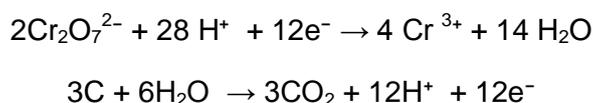
#### Fundamento

El parámetro de la DQO se puede determinar como la cantidad de oxígeno químicamente equivalente a la cantidad de dicromato (Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>) que se consume en un proceso de oxidación-reducción con la matriz.



El ion dicromato es de color naranja, mientras que el Cr (III) es de color verdoso. Si ocurre la reacción redox, se consume el dicromato y se genera cromo trivalente, produciéndose el consecuente cambio de coloración. El método de determinación de la DQO se basa en este cambio de color, al producirse la reducción del dicromato en presencia de carbono orgánico, y se lleva a cabo mediante medidas espectrofotométricas.

El proceso redox que se produce en presencia de carbono orgánico de manera general es el siguiente:



#### Reactivos empleados y procedimiento

Para realizar la determinación de la DQO se empleó el kit Nanocolor 0-29 01.14 DQO 1500. En este kit están incluidos 1 tubo de disolución neutra y 20 tubos de test de DQO, los cuales contienen el reactivo de determinación de DQO ya preparado. El contenido de cada tubo es una mezcla de ácido sulfúrico, dicromato potásico y sulfato de mercurio dada en unas proporciones adecuadas para la adición directa de 2ml de muestra de concentración estimada en el rango de 100-1500 mg/L DQO. Los tubos de muestra y un blanco se calentaron a 150°C durante 2h en un digestor *ECO 25 Thermoreactor VELP Scientífica* para una oxidación completa, tras lo cual se dejan atemperar antes de realizar las medidas de absorbancia a  $\lambda=600\text{nm}$ , longitud de onda del máximo de absorbancia del espectro para el Cr (III).

Al no tener conocimiento de la cantidad inicial de dicromato exacta, se realiza un calibrado con biftalato potásico (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>, Panreac) previamente secado en estufa. El biftalato potásico (KHP) es el patrón primario utilizado en el calibrado del método, al ser una sustancia químicamente muy estable con una DQO teórica igual 1.176 mgO<sub>2</sub>/L por cada mg/L de KHP.

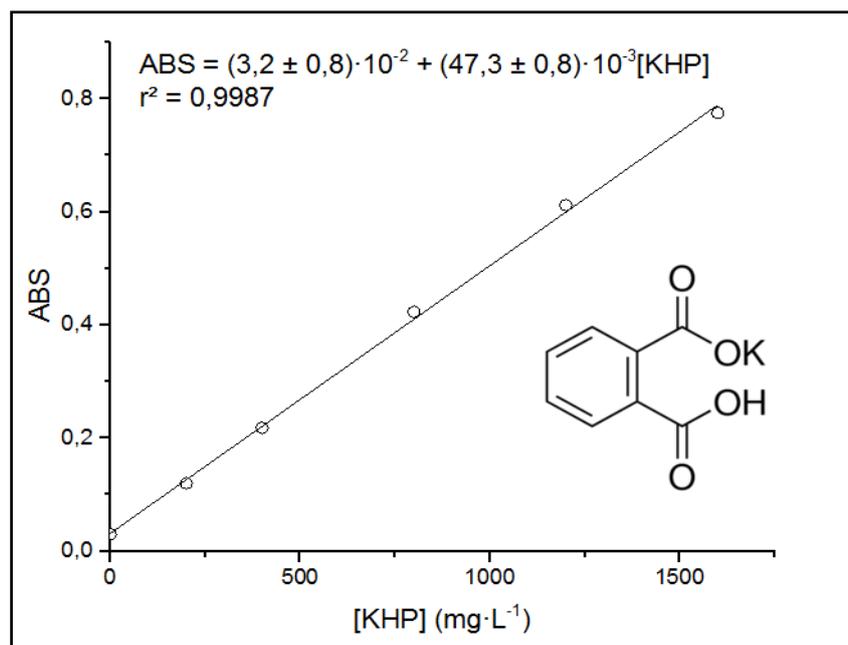


Figura 14: Recta de calibrado para la determinación de la DQO en equivalentes de KHP.

### 5.3. Métodos de inmovilización de nanopartículas

Se realizó la inmovilización de las nanopartículas en dos tipos de soportes.

#### 5.3.1. Perlas de alginato

Se disolvieron 0.5 g de ácido algínico (Sigma) por cada 25 ml de disolución a inmovilizar con agitación y ultrasonidos. Se realizó este procedimiento tanto para la disolución de nanopartículas, como para realizar un blanco con agua desionizada, para luego realizar la inmovilización en forma de perlas goteando la disolución en cloruro de calcio 50 mM (CaCl<sub>2</sub>, Merck).

La mezcla de las NPs con el ácido algínico comienza a coagular antes de gotear sobre el Ca<sup>2+</sup>, probablemente debido a que la presencia de cationes de hierro libres puede contribuir a la formación de la estructura de “caja de huevos”. Por este motivo se realizó la inmovilización disolviendo el ácido algínico en agua y goteando esta disolución sobre la disolución de nanopartículas. Se formaron perlas de color marrón grisáceo (ver figura 15).



Figura 15: Perlas de alginato con nanopartículas de hierro (marrón grisáceo) y perlas de sólo alginato (traslúcidas).

El goteo se realizó o bien por gravedad desde una jeringuilla de vidrio, o mediante una bomba peristáltica.

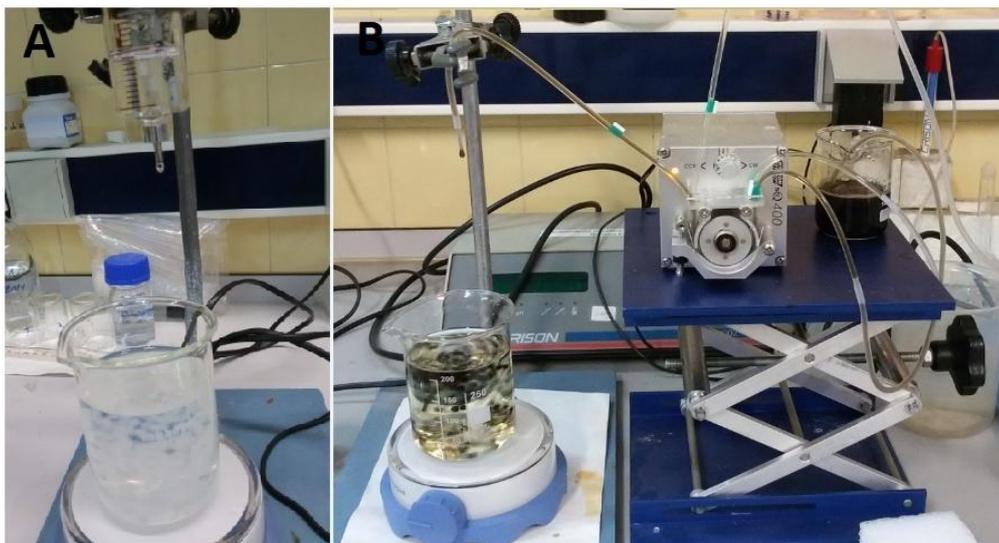


Figura 16: Métodos de goteo: A: goteo mediante jeringa; B: goteo mediante bomba peristáltica.

Las perlas formadas se dejaron curar en la disolución con agitación hasta el día siguiente y se neutralizaron realizando lavados sucesivos con agua desionizada.

### 5.3.2. Perlas de quitosano

Al contrario que en el caso de las perlas de alginato, con quitosano se realizó la disolución del polímero en la propia disolución de nanopartículas, una vez acidificada ésta. Se disolvieron 0.6 g de quitosano (Sigma) en 50 ml de la disolución de nanopartículas a la cual se añadió de previamente 1 ml de ácido acético glacial (Panreac) con el objetivo de aportar la acidez necesaria para que se produzca la disolución. La disolución viscosa resultante se goteó sobre hidróxido sódico (NaOH 98%, Panreac) de concentración 2 M con agitación y se formaron al instante esferas color marrón que oscurecieron con el tiempo (figura 17). Se dejaron curar en agitación hasta el día siguiente y se neutralizaron realizando lavados sucesivos con agua desionizada. Se siguió el mismo procedimiento para realizar un blanco con agua. Las perlas obtenidas con agua son blanquecinas.



Figura 17: Perlas de quitosano con nanopartículas de hierro (marrón oscuro) y perlas de sólo quitosano (blanco).

## 5.4. Técnicas analíticas empleadas para la determinación de cromo

### 5.4.1. Determinación de Cr(VI) por colorimetría

El cromo hexavalente se determina empleando un método colorimétrico<sup>[39]</sup> que se basa en la formación de un complejo de cromo con la 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, cuya estructura se muestra en la figura 18. Este complejo de color rojo violáceo presenta un máximo de absorción a 540 nm.

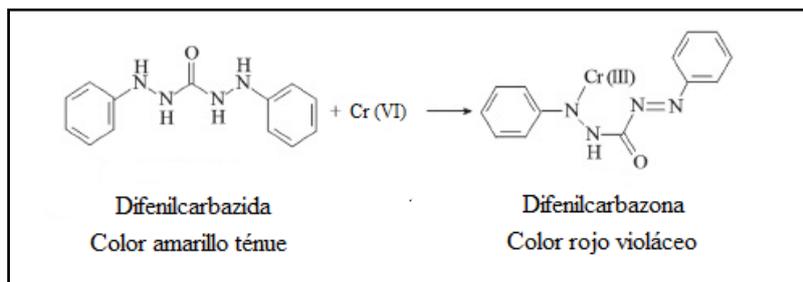


Figura 18: Estructura de la difenilcarbazida y el complejo formado con cromo.

Este método de determinación es específico al Cr(VI)<sup>[40]</sup>, ya que con el Cr(III) la reacción con la difenilcarbazida no se produce. Sin embargo, algunos metales como el hierro o el vanadio pueden formar otro tipo de complejos coloreados y su presencia en la muestra puede ocasionar interferencias.<sup>[39]</sup>

Las medidas se efectuaron en el espectrofotómetro *Zuzi 4211/20*. El calibrado se realizó en el rango de 0-1 mg/L (figura 21) a partir de una disolución stock de 50 ppm de dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$  99.5%, Panreac).



Figura 19: Patrones de calibrado para la determinación de Cr(VI) por colorimetría.

En vista de que el hierro puede interferir en este método formando un complejo amarillo pálido con la difenilcarbazida, se realizó un estudio de esta interferencia en el rango de concentraciones de cromo en el que se trabajó, comparando medidas de absorbancia de una disolución de una concentración determinada de Cr(VI) (0.4 ppm), y la misma concentración de cromo con concentraciones crecientes de Fe(II). Se comprueba que la interferencia es apreciable a concentraciones de hierro mayores a 0.6 ppm, y es observable al ojo humano en la coloración, que se vuelve más rosada, como se muestra en la figura 20.



Figura 20: Cambio de coloración en presencia de Fe(II) 0.8 ppm.

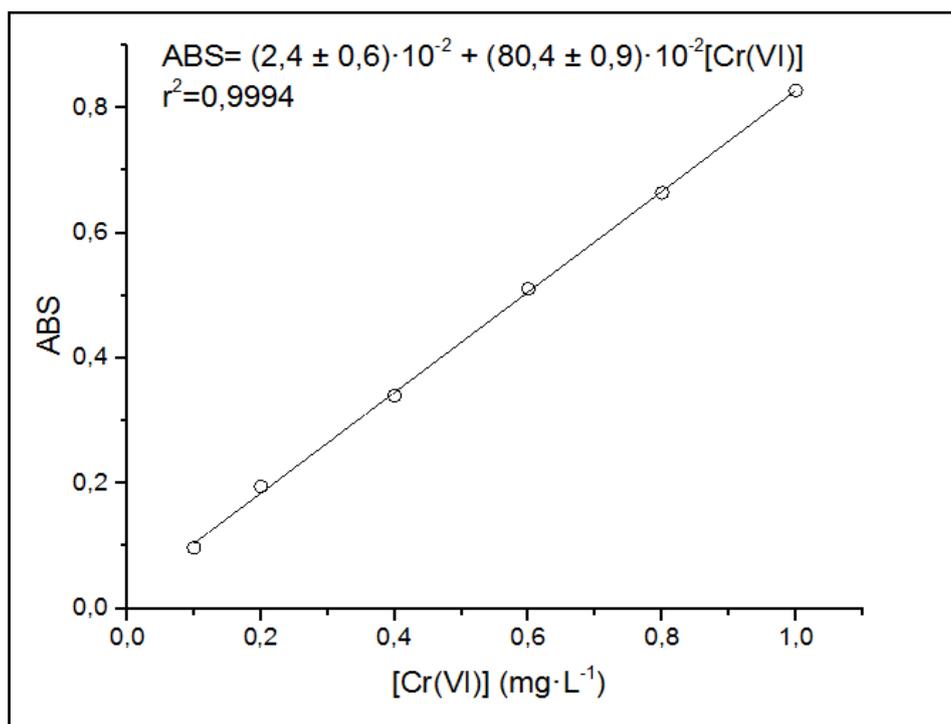


Figura 21: Recta de calibrado para la determinación de Cr (VI) por colorimetría.

#### 5.4.2. Determinación de Cr total por medidas de absorción atómica

La determinación del Cr total se llevó a cabo mediante medidas de absorción atómica en un equipo atomizador de llama *SpectraAA 55B VARIAN* con una lámpara de cátodo hueco de cromo. Se empleó un flujo de gas de aire/acetileno.<sup>[39]</sup> El calibrado se realiza en el rango 0-12 mg/L (figura 22).

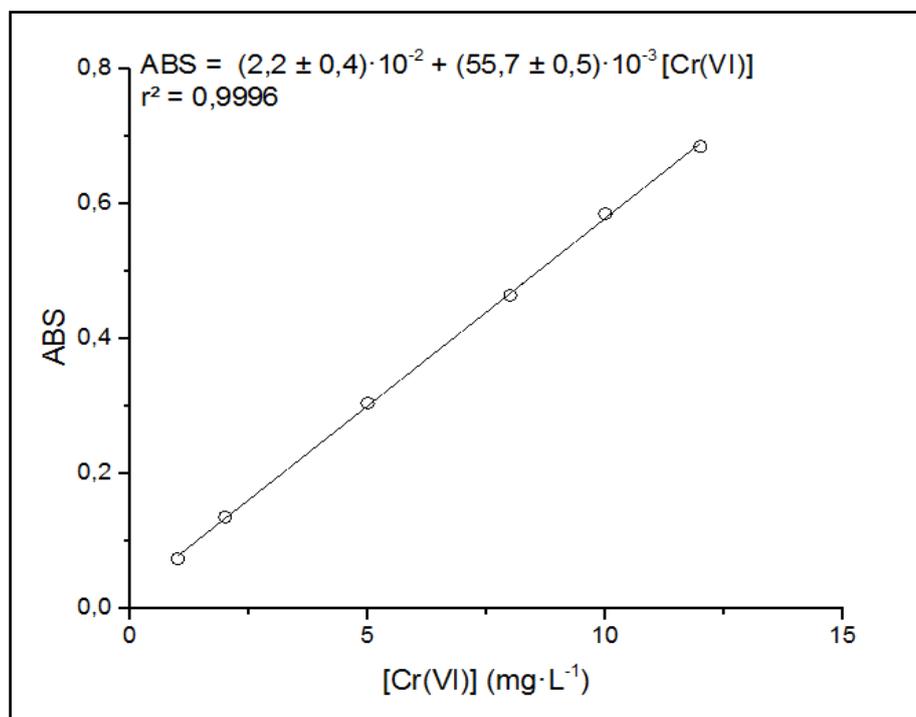


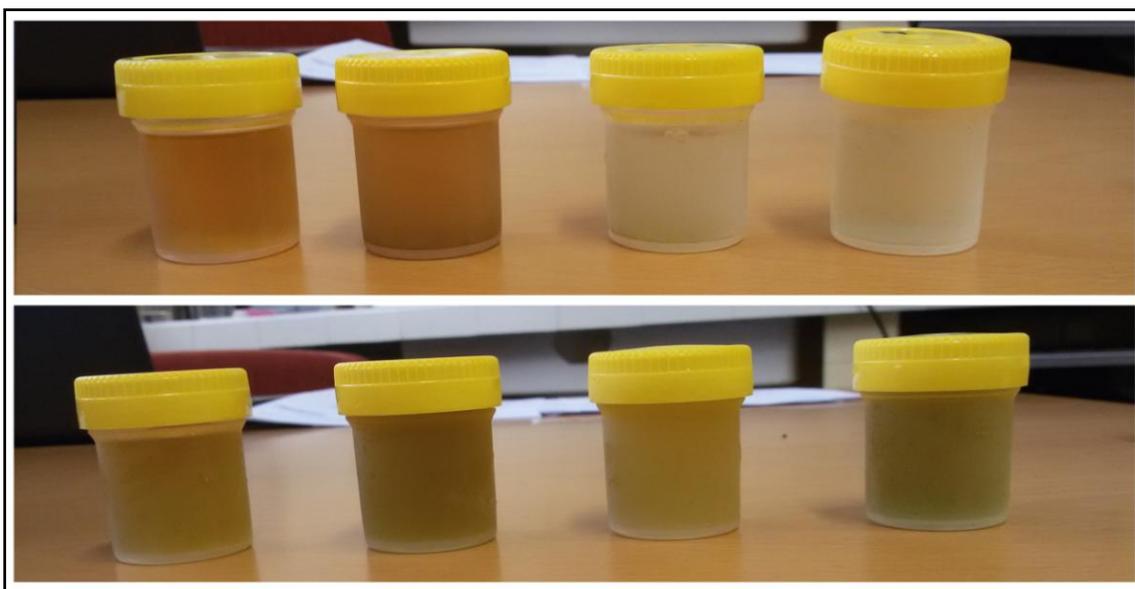
Figura 22: Recta de calibrado para la determinación de Cr total por medidas de absorción atómica.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Caracterización de los extractos vegetales

La caracterización de los extractos vegetales se realizó mediante la determinación del potencial redox, la capacidad antioxidante y la DQO, tanto para los extractos en agua, como en la mezcla 1:1 agua/EtOH.

En vista de la coloración de los extractos mostrados en la figura 23, se puede intuir que en el caso de las extracciones con agua/EtOH se produce una mayor extracción de componentes orgánicos coloreados.



**Figura 23:** Muestras de los extractos vegetales en agua (arriba) y en agua/EtOH (abajo) de roble, castaño, pino y tojo (izq. a dcha.).

Para realizar una comparación que permita evaluar si el empleo de la mezcla de agua/EtOH mejora el proceso de extracción para el objetivo concreto, se realiza la comparación de los extractos una vez efectuada la caracterización, con los resultados obtenidos.

#### 6.1.1. Potencial redox

El primer parámetro medido ha sido el potencial redox, lo que nos permite determinar si el proceso de reducción de hierro va a ser o no espontáneo.

**Tabla 2:** Potenciales de reducción estándar de hierro. <sup>[20]</sup>

Semireacción de reducción	Potencial de reducción vs. Ag/AgCl* (mV)
$\text{Fe}^{3+} + 1\text{e}^- \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$	+548.7
$\text{Fe}^{3+} + 3\text{e}^- \rightleftharpoons \text{Fe}^0$	- 259.3
$\text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{Fe}^0$	- 662.3

\*  $E^0_{\text{Ag/AgCl}} = + 222.3 \text{ mV}$  <sup>[20]</sup>

**Tabla 3:** Valores de los potenciales redox de los extractos.

Potencial redox vs. Ag/AgCl (mV)				
	Roble	Castaño	Pino	Tojo
<b>E. Agua</b>	159.4	179.8	220.2	189.6
<b>E. Agua/EtOH</b>	90.4	96.4	153.1	110.0

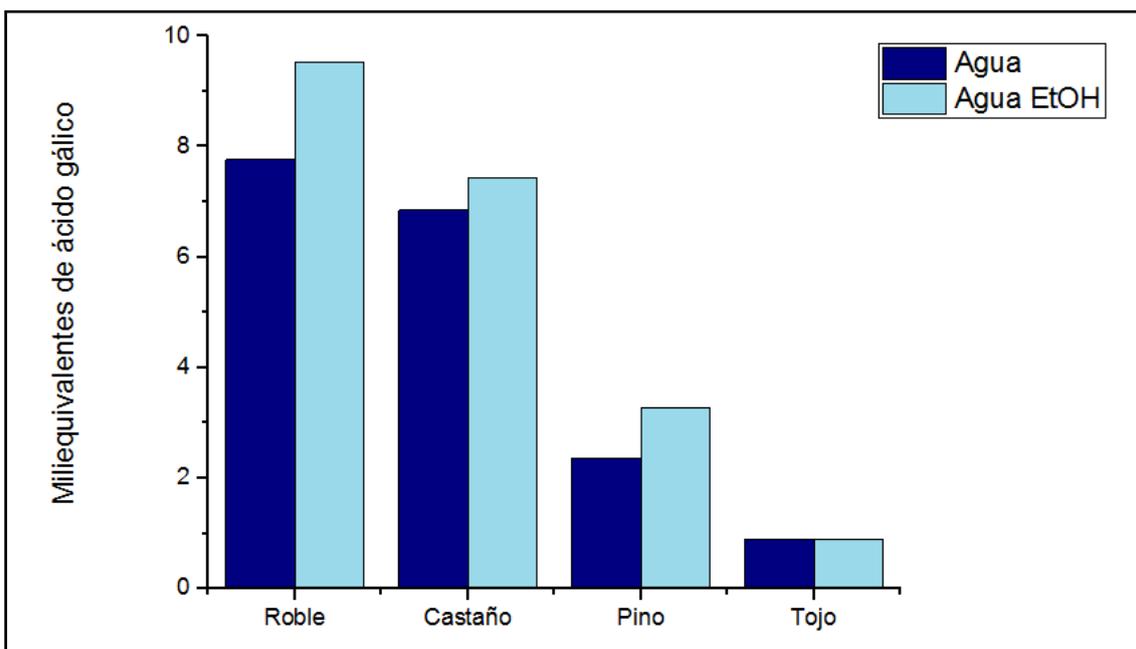
En vista de los potenciales redox de los extractos reflejados en la tabla 3, y teniendo en cuenta los valores del potencial de reducción del Fe (III) y Fe (II) a Fe<sup>0</sup> (tabla 2), se puede concluir que las nanopartículas sintetizadas mediante estos extractos no presentan hierro en el estado de oxidación cero, puesto a que ninguno de los extractos tiene un valor de potencial que pueda hacer este proceso de reducción favorable. De esta forma se llega a la conclusión de que las nanopartículas están formadas por diferentes óxidos o hidróxidos de hierro en diversos estados de oxidación.

Los valores de potencial redox de los extractos en agua/EtOH son menores que los correspondientes en agua para todas las especies vegetales. Esto indica que con estos extractos son más favorables los procesos de reducción, y se puede sospechar que en este disolvente los extractos presentan una mayor capacidad antioxidante.

#### 6.1.2. Evaluación de la capacidad antioxidante

##### Contenido en compuestos polifenólicos de los extractos

Mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu no sólo se miden compuestos polifenólicos sino cualquier compuesto orgánico que presente anillos aromáticos hidroxilados y otros compuestos antioxidantes como azúcares reductores y proteínas. Constituye por ello una medida de la capacidad antioxidante total en presencia de estos compuestos, y no exclusivamente de polifenoles. En la figura 24 se muestran los valores obtenidos para la capacidad antioxidante de los extractos en miliequivalentes de ácido gálico.



**Figura 24:** Capacidad antioxidante en miliequivalentes de ácido gálico de los extractos en agua y en la mezcla 1:1 agua/EtOH.

Como se puede observar en la figura 24, las extracciones con la mezcla de agua/EtOH presentan mayor capacidad antioxidante que los extractos en agua. Esto es debido a una extracción mayor de compuestos orgánicos reductores. Esta diferencia es mayor en el caso de roble que en cualquiera de las biomásas empleadas. El aumento de la capacidad antioxidante para los extractos de castaño y pino es pequeña pero apreciable, mientras que para el tojo esta diferencia es mínima.

### Capacidad antioxidante de los extractos en equivalentes de Trolox

La capacidad antioxidante se evaluó siguiendo un segundo método basado en la decoloración de DPPH<sup>•</sup>, expresando los resultados en miliequivalentes de Trolox.

La capacidad antioxidante medida por este segundo método (figura 25) sigue la misma tendencia que la medida por el ensayo de Folin-Ciocalteu. Se sigue observando una mayor extracción de compuestos reductores en el caso del extracto de roble con la mezcla de agua/EtOH. En el resto de extractos se observa una variación de la capacidad antioxidante pequeña o incluso mínima, como es el caso del tojo.

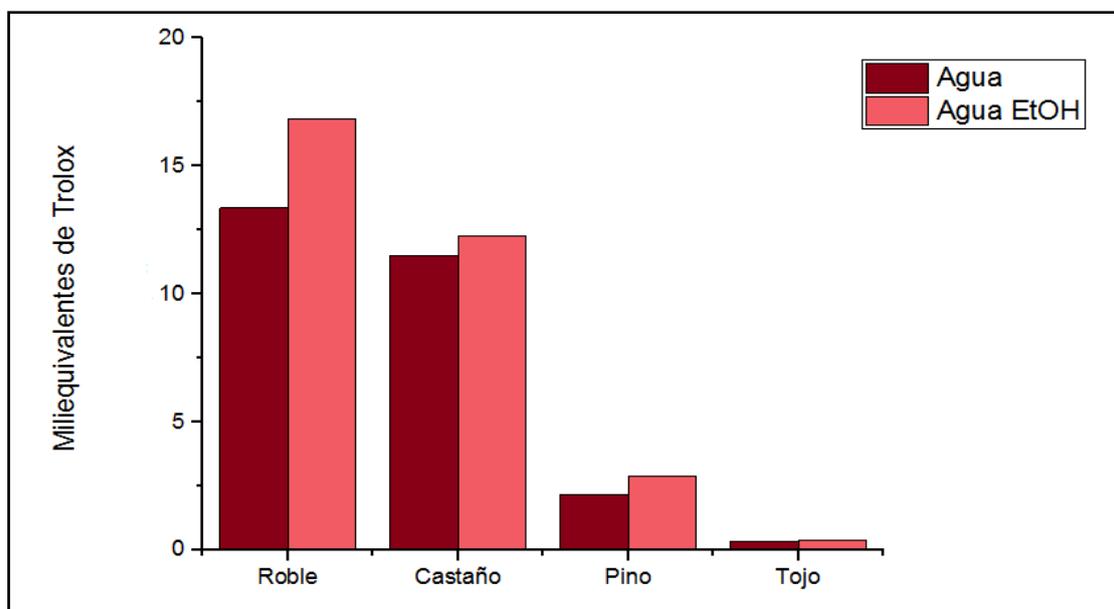


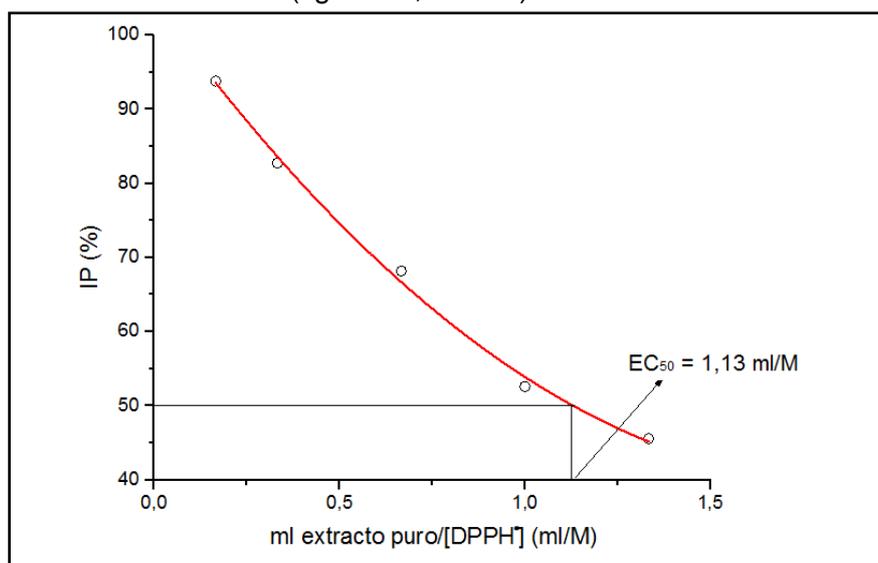
Figura 25: Capacidad antioxidante en miliequivalentes de Trolox de los extractos en agua y en la mezcla 1:1 agua/EtOH.

Se puede concluir que, dado que el principal interés es el desarrollo de un método sostenible que emplee reactivos no tóxicos en la medida de lo posible, los extractos en agua presentan valores suficientemente buenos como para considerar el uso de este disolvente completamente inocuo frente a la mezcla con etanol, con la cual no se aprecia una gran variación de la capacidad antioxidante.

### Determinación del EC<sub>50</sub>

Debido a la disparidad de valores de la capacidad antioxidante de los extractos puros de las diferentes especies vegetales, el IP no es un dato mediante el cual se pueda realizar una comparación, ya que para cada extracto la dilución requerida es diferente. Para realizar una comparación de la capacidad antioxidante de los extractos se determinó el EC<sub>50</sub> de manera gráfica, realizando una representación de los IP de

diferentes diluciones frente al volumen de extracto puro añadido partido de la concentración inicial de DPPH\* (figura 26, tabla 4).



**Figura 26:** Representación gráfica para la determinación del  $EC_{50}$  para el extracto de roble en agua.

**Tabla 4:** Valores de  $EC_{50}$  para los extractos.

	$EC_{50}$ (ml/M)		
	Roble	Castaño	Pino
<b>E. Agua</b>	1.13	1.23	6.87
<b>E. Agua/EtOH</b>	0.83	1.22	4.18

Medidas de  $EC_{50}$  menores se corresponden con los extractos de mayor capacidad antioxidante. En el caso de tojo tras la adición del extracto puro a la disolución de radical siguiendo el procedimiento se alcanzan porcentajes de inhibición del 75% y 72% para los extractos en agua y en agua/EtOH respectivamente. No se ha podido determinar el  $EC_{50}$  para estos extractos de tojo debido a la cantidad insuficiente de antioxidantes de dichos extractos, la cual no permite obtener datos mediante los cuales se pueda hacer la extrapolación al 50% de inhibición.

### 6.1.3. Demanda Química de Oxígeno

La DQO se ha determinado únicamente para los extractos en agua (tabla 5), ya que para los extractos en agua/EtOH las diluciones requeridas para entrar en el rango de medida son muy elevadas, al ser el EtOH por sí solo un compuesto orgánico y estar en una gran proporción. La gran dilución requerida dificulta la determinación por diferencia de la DQO debida únicamente a la materia orgánica extraída, al ser la proporción de EtOH mucho mayor.

**Tabla 5:** Valores de la Demanda Química de Oxígeno de los extractos.

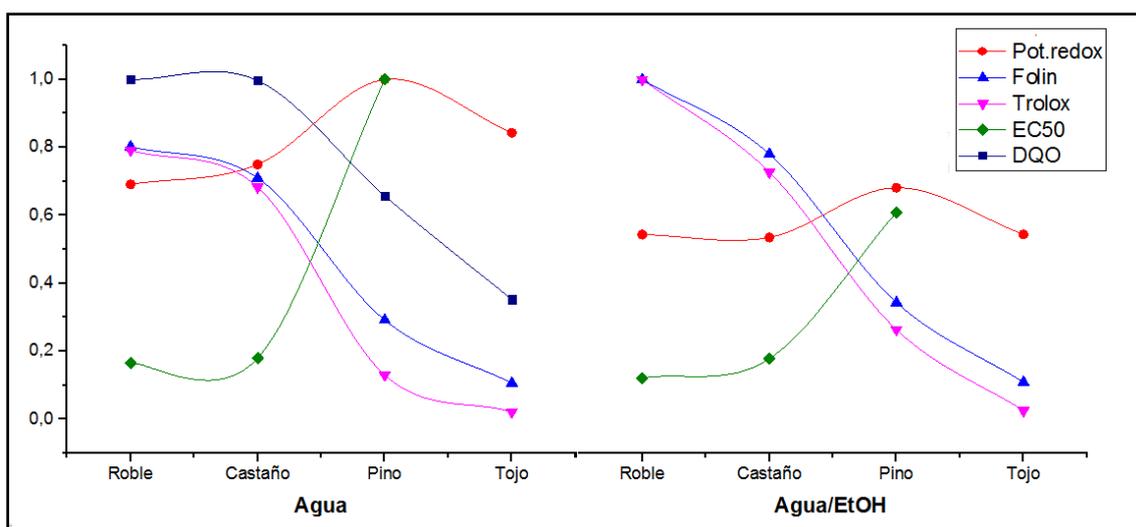
	DQO (mg $O_2$ /L)			
	Roble	Castaño	Pino	Tojo
<b>E. Agua</b>	3678.9	3666.5	2418.3	1295.0

### 6.1.4. Resumen de todos los parámetros de caracterización de las propiedades antioxidantes de los extractos y discusión

**Tabla 6:** Valores de todos los parámetros medidos para todos los extractos.

Extractos	Pot. Redox (mV)	Folin (meq.ác gálico)	Trolox (meq.Trolox)	EC <sub>50</sub> (ml/M)	DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	
Agua	Robe	159.4	7.77	13.4	1.13	3678.9
	Castaño	179.8	6.85	11.5	1.23	3666.5
	Pino	220.2	2.35	2.2	6.87	2418.3
	Tojo	189.6	0.89	0.3	-	1295.0
Agua/EtOH 1:1	Roble	90.4	9.51	16.8	0.83	-
	Castaño	96.4	7.43	12.3	1.22	-
	Pino	153.1	3.26	2.9	4.18	-
	Tojo	110.0	0.90	0.4	-	-

Para realizar la comparación de los resultados, se normalizaron los valores de cada parámetro para englobarlos en una misma escala entre 0 y 1 y se representaron en un mismo gráfico.



**Figura 27:** Representación de los valores normalizados del pH, potencial redox y capacidad antioxidante para todos los extractos.

La figura 27 muestra que la capacidad antioxidante medida por dos de los métodos empleados sigue una misma tendencia, siguiendo en ambos casos y para ambos disolventes una ordenación del tipo Roble > Castaño > Pino > Tojo.

En vista de los resultados obtenidos, las especies vegetales consideradas aptas para el objetivo en concreto son el roble y el castaño, al ser sus extractos los de mayor capacidad antioxidante. Para estos extractos el potencial redox sigue una tendencia inversa con respecto a la capacidad antioxidante por lo que se podría pensar que solo realizando la medida del potencial se puede estimar cuales de los extractos contienen más antioxidantes. Como se puede ver en la tabla 6, todos los extractos en agua/EtOH presentan potenciales redox menores que los de roble y castaño en agua y sin embargo algunos de ellos funcionan peor como reductores, al ser su capacidad antioxidante menor. Convendría realizar un estudio más amplio con mayor variedad de

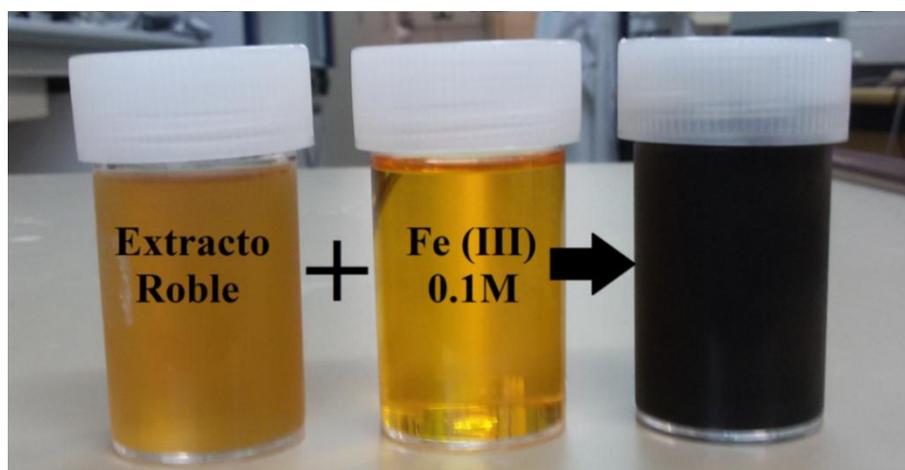
especies vegetales para evaluar si estos valores de potencial redox son debidos al efecto del medio y para comprobar la tendencia de esta medida con la capacidad antioxidante.

En el gráfico también se observa que la capacidad antioxidante sigue la misma tendencia que la DQO y que la materia orgánica total extraída es menor en los extractos de menor poder reductor, por lo que se puede establecer una relación entre la capacidad antioxidante con la eficiencia total de extracción para cada especie.

En cuanto a los valores del  $EC_{50}$ , para ambos disolventes empleados la tendencia es inversa a la capacidad antioxidante, lo cual se corresponde con la definición de este parámetro, ya que a mayor capacidad antioxidante menor cantidad o volumen de extracto es necesario para reducir una determinada concentración del radical empleado, y viceversa.

## 6.2. Caracterización de las nanopartículas de Fe sintetizadas.

Durante la síntesis, a simple vista se observó la turbidez que se producía nada más mezclar la primera gota de disolución de Fe(III) con cada extracto. Al finalizar, se podía apreciar un cambio de coloración con respecto a la disolución de hierro y extractos iniciales (figura 28). Como muestra la figura 29, los extractos se oscurecen en mayor o menor grado con la adición de Fe(III) 0.1 M según su capacidad antioxidante, siendo los extractos de roble y castaño los que aparentemente reducen más hierro y producen una mayor concentración de NPs.



**Figura 28:** Coloración del extracto de roble, de la disolución de hierro y de la disolución producto de la reacción entre ambas.



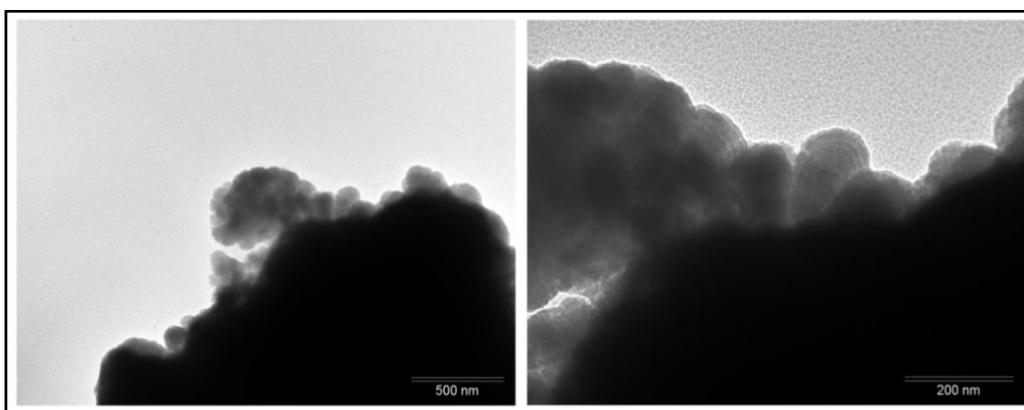
**Figura 29:** Disoluciones de nanopartículas obtenidas con los extractos vegetales de tojo, pino, castaño y roble (izq. a dcha.) en agua (tapón blanco) y en la mezcla agua/ETOH (tapón rojo).

Dados los potenciales redox de los extractos empleados, y como ya se ha comentado anteriormente, las nanopartículas están constituidas por una mezcla de óxidos e hidróxidos de hierro.

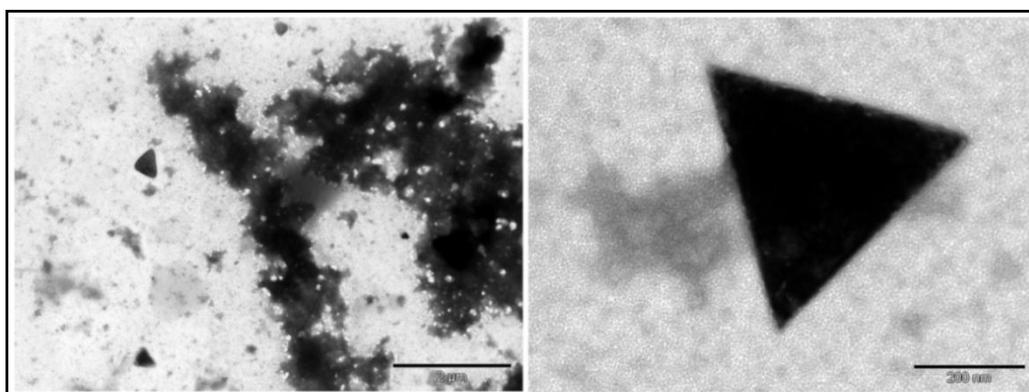
La estimación del tamaño de las nanopartículas se realiza mediante imágenes de TEM (*Transmission Electron Microscopy*). Esta estimación no se ha podido llevar a cabo para las nanopartículas sintetizadas con los extractos de tojo o pino en agua, dado que la baja concentración de partículas formadas dificultó la obtención de buenas imágenes que permitieran diferenciar la muestra de posibles componentes orgánicos.

En las figuras 30-34 se muestran las imágenes de las partículas sintetizadas con algunos de los extractos. La mayor parte se asemejan a nanopartículas esféricas aglomeradas o estructuras ramificadas, por lo que se puede concluir que la matriz de los extractos empleados no funciona por sí sola como un agente dispersante suficientemente eficaz, y se comprueba la tendencia general de las NPs de Fe a aglomerarse. Para la obtención de las nanopartículas dispersas convendría el empleo de un agente estabilizante adicional, como puede ser el citrato. <sup>[6]</sup>

De entre las partículas sintetizadas llaman la atención las formaciones geométricas triangulares sintetizadas con el extracto de castaño en agua/EtOH (figura 31). Mediante las imágenes en 2D no se puede determinar que estas partículas triangulares sean nanopartículas, ya que las dimensiones observables sí superan los 100 nm, pero no se tiene la evidencia de que estas partículas sean planas o de que la tercera dimensión esté o no en el rango de 100 nm.



**Figura 30:** Fotografías de TEM de las partículas sintetizadas con extracto de pino en agua/EtOH 1:1.



**Figura 31:** Fotografías de TEM de las partículas sintetizadas con extracto de castaño en agua/EtOH 1:1.

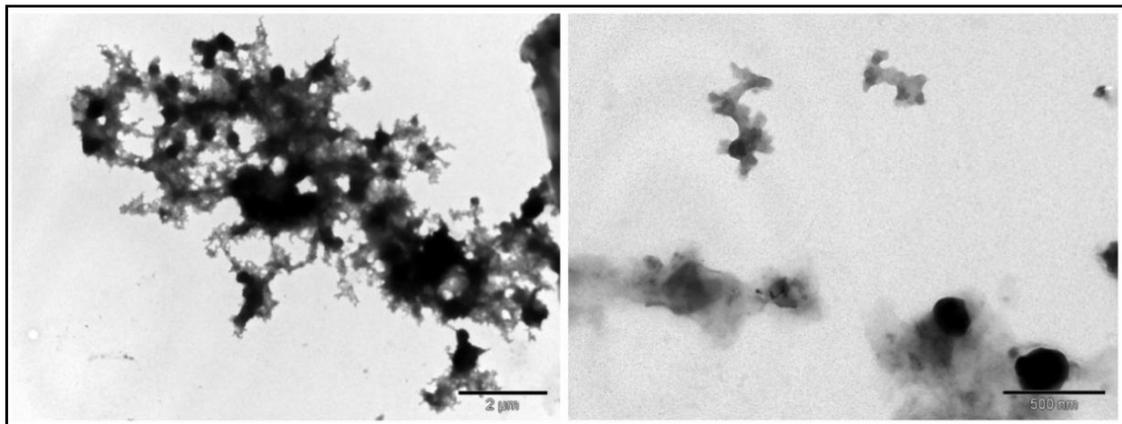


Figura 32: Fotografías de TEM de las partículas sintetizadas con extracto de roble en agua/EtOH 1:1.

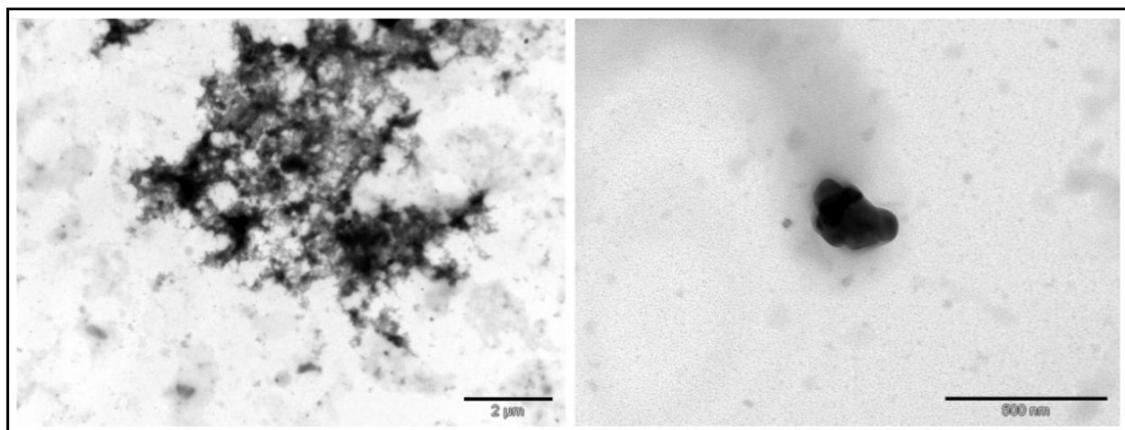


Figura 33: Fotografías de TEM de las partículas sintetizadas con extracto de castaño en agua.

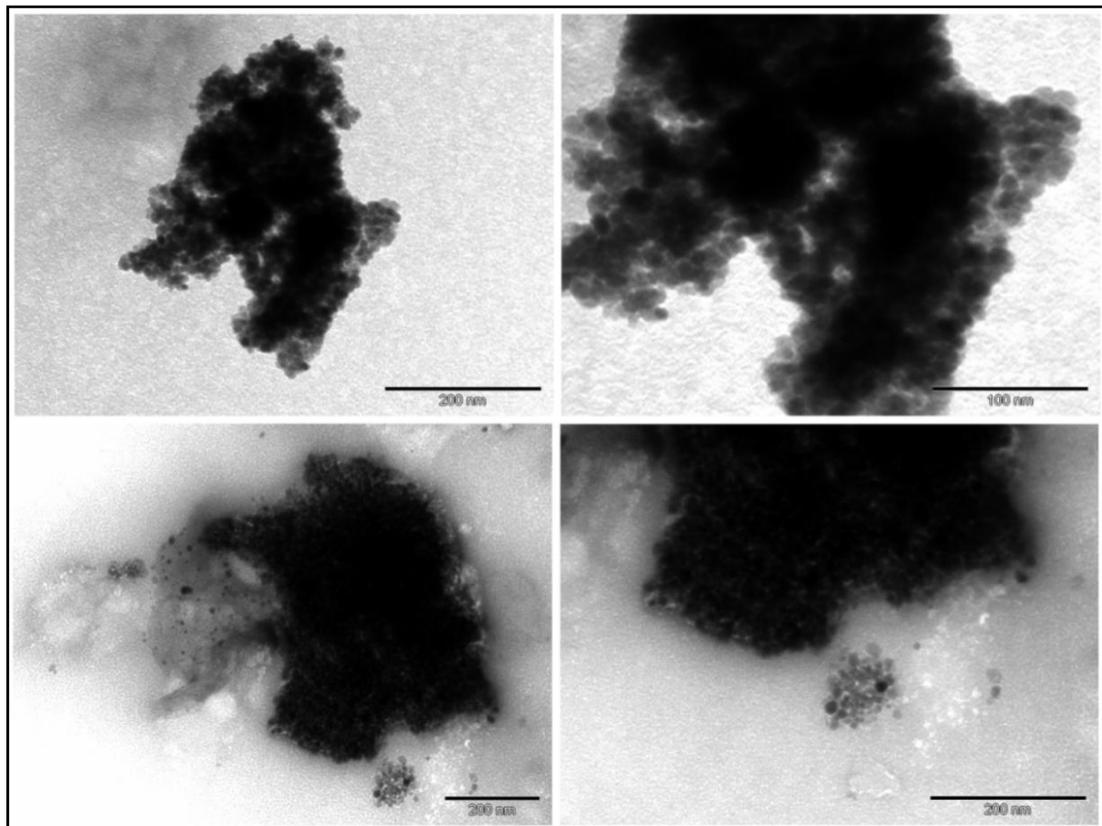


Figura 34: Fotografías de TEM de las partículas sintetizadas con extracto de roble en agua.

En vista de los resultados obtenidos tanto de la capacidad antioxidante como del tamaño y forma de nanopartículas, se escogieron aquellas nanopartículas sintetizadas con el extracto de roble en agua para realizar las pruebas de eliminación de cromo. Esta disolución presenta una mayor proporción de partículas esféricas de en torno a 20 nm de diámetro, aunque aglomeradas.

### 6.3. Pruebas de adsorción y eliminación

Uno de los mecanismos principales de eliminación de cromo es la adsorción en la superficie de las nanopartículas de hierro. Las pruebas de adsorción se llevaron a cabo midiendo el cromo total y determinando el porcentaje de cromo adsorbido. A su vez se realizaron las medidas de Cr(VI) para establecer el porcentaje total de cromo hexavalente eliminado en cada caso por posibles procesos de adsorción/reducción.

#### 6.3.1. Adsorción de Cr por mezcla directa con nanopartículas en suspensión

En primer lugar se realizó una prueba por mezcla directa con el volumen de disolución de nanopartículas correspondiente a 0.1 g de hierro estimados, con el objetivo de comprobar si se produce la eliminación por adsorción. La mezcla estuvo en agitación 24h tras las cuales se realizó la medida del cromo total por absorción atómica, tras el centrifugado de la muestra. Las medidas se repiten pasada una semana en reposo. Los resultados se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7:** Porcentaje de eliminación de cromo total por mezcla directa con la disolución de nanopartículas.

	g Fe	V Cr 50 ppm(ml)	V final (ml)	[Cr] <sub>i</sub> ppm	[Cr] <sub>f</sub> ppm	%Cr elim.
Pasadas 24h						
Réplica 1	0.1	40	76	50	23.46	46.93
Réplica 2	0.1	40	76	50	23.06	47.88
Pasada una semana						
Réplica 1	0.1	40	76	50	10.75	78.50
Réplica 2	0.1	40	76	50	13.37	73.25

La principal desventaja de la remediación por mezcla directa es la difícil separación de las nanopartículas, ya que por centrifugado solo se consigue separar una fracción del material. Las determinaciones del Cr(VI) no se pueden realizar debido a la interferencia que se produce en presencia de hierro.

Al cabo de una semana en reposo, se produce la aglomeración de las nanopartículas y se consigue separar una fracción mayor. Sigue habiendo en disolución la cantidad suficiente de hierro como para ocasionar interferencias en la medida de Cr(VI), de forma que solo se puede realizar la determinación del porcentaje de cromo total eliminado.

La variación del porcentaje de eliminación al separar una mayor cantidad hierro se puede deber a una cinética lenta, o a que el cromo adherido a la superficie de las nanopartículas no separadas también es atomizado en el equipo, y es por eso que al

decantar de nuevo otra fracción de nanopartículas el porcentaje de eliminación resulta mayor. La presencia de las nanopartículas de hierro también podría estar causando interferencias en el equipo de absorción atómica.

Se comprueba que mediante este procedimiento se produce la eliminación de cromo con buenos porcentajes, pero tiene un gran inconveniente. La principal limitación de este proceso de eliminación es la posterior separación de las nanopartículas en suspensión. Ante esta problemática, se procedió a la inmovilización de las nanopartículas en perlas, para facilitar su separación.

### 6.3.2. Eliminación de Cr mediante nanopartículas inmovilizadas

#### 6.3.2.1. Eliminación con perlas de ácido algínico

##### 6.3.2.1.1. Estudio cinético

El estudio cinético se realizó mediante medidas de Cr(VI) para establecer el tiempo que tarda el sistema en llegar al equilibrio. Se operó al pH natural de la disolución de cromo (pH 4 aprox.) poniendo en contacto 100 ml de una disolución de dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$  99.5%, Panreac) de 50 ppm con 2.5 g de las perlas de alginato y hierro con agitación. La variación de la concentración frente al tiempo se representa en la figura 35.

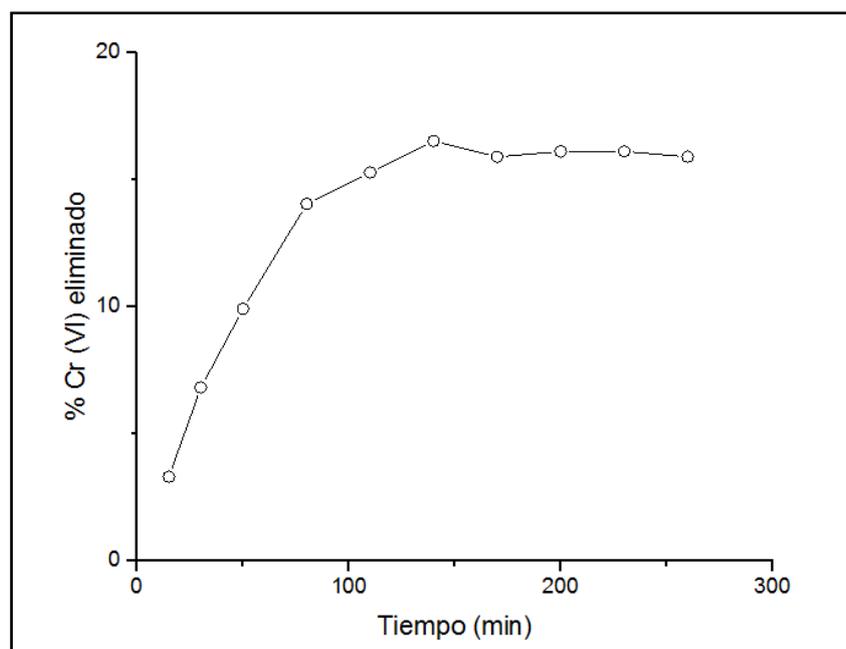


Figura 35: Estudio cinético para los procesos de adsorción/reducción de Cr(VI) con perlas de alginato + Fe.

La cinética se realizó por determinación espectrofotométrica de las concentraciones de Cr(VI), para establecer que se llega al equilibrio tanto de adsorción como de reducción.

El tiempo que tarda el sistema en llegar al equilibrio en las condiciones de trabajo es de 3h. Al trabajar a diferentes pH y para poder asegurar que se alcanza en todos casos la situación de equilibrio, se establece para todos los ensayos un mismo tiempo de contacto disolución-adsorbente de 24h.

## 6.3.2.1.2. Influencia del pH

Se realizó un estudio de la influencia del pH en el proceso de eliminación poniendo en contacto y con agitación 40 ml de una disolución de Cr(VI) de 50 ppm con 1 g aproximado de adsorbente durante 24h en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón. El pH se ajusta con la adición de HNO<sub>3</sub> al 10% y NaOH 0.1 M, según sea necesario.

Tras realizar un blanco con las perlas de alginato sin nanopartículas, se comprobó que tanto las partículas de hierro como el soporte empleado adsorben contaminante.

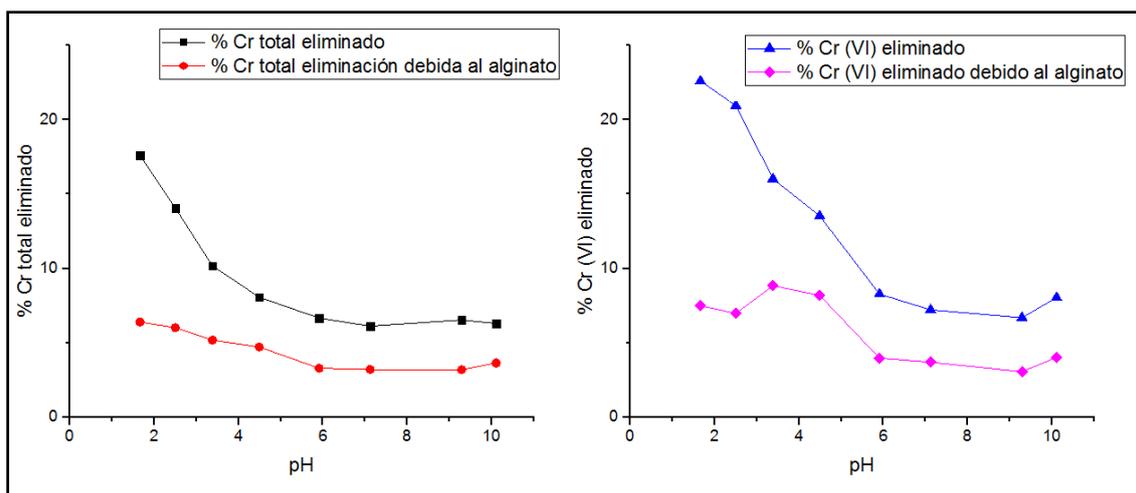


Figura 36: Influencia del pH en la eliminación de Cr(VI) 50 ppm por absorción con perlas de alginato + Fe.

Estudios de eliminación de cromo por el alga *Sargasumm muticum*<sup>[41]</sup> establecen mediante métodos potenciométricos una relación directamente proporcional de la adsorción de Cr(III) con la cantidad de grupos carboxilos presentes en la superficie del alga. Se puede concluir que los grupos carboxilos del alginato coordinan iones de cromo también en este caso, previa reducción del Cr(VI) a Cr(III). A pH muy bajos la alta concentración de protones podría provocar la desorción del Cr(III), compitiendo por las posiciones aniónicas libres.

La adsorción es más eficaz a pH bajos. Esto se puede explicar mediante dos posibles mecanismos de adsorción. Por un lado, a altas concentraciones de protones la superficie del adsorbente adquiere carga positiva y se establecen fuerzas atractivas con los iones dicromato, produciéndose la adsorción de estos aniones por interacciones electrostáticas. Por otro lado, a estos valores de pH también se ve favorecida la posible reducción a Cr(III) una vez entran en contacto los iones dicromato con el hierro, produciéndose la quimisorción del Cr(III) en la superficie de los óxidos de hierro por sustitución metálica.<sup>[35,42]</sup>

La figura 37 muestra la concentración de cada especie en disolución tras el tratamiento con perlas de alginato + Fe. Las concentraciones de Cr(VI) y Cr total son similares en todo el rango de pH por lo que no hay evidencia de que la reducción a Cr(III) se produzca, pero tampoco de lo contrario, pudiendo ser el Cr(III) fuertemente adsorbido tras la reducción. Los valores de Cr(III) se obtuvieron por diferencia de Cr total y Cr(VI), y pudieron ser debidos a errores experimentales en ambas técnicas analíticas empleadas.

A partir de los ensayos realizados y de los datos obtenidos no se puede determinar con seguridad el mecanismo o mecanismos implicados en la adsorción de este contaminante.

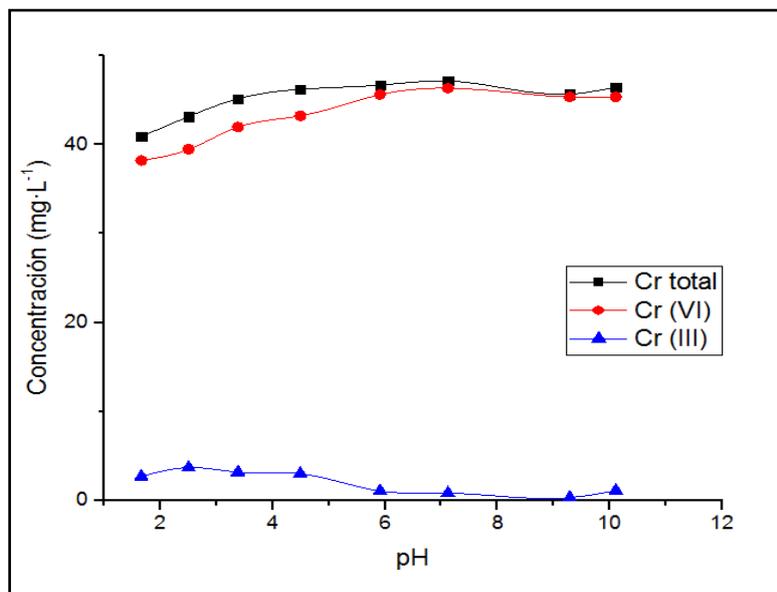


Figura 37: Concentración de las diferentes especies de cromo en disolución tras el tratamiento con perlas de alginato + Fe.

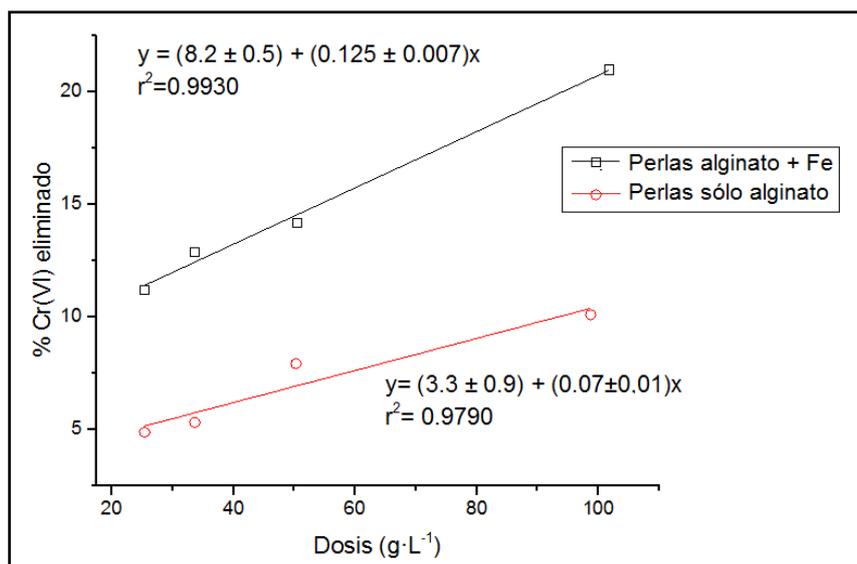
La utilización del alginato como soporte presenta como principal ventaja la estabilidad de las perlas formadas en todo el rango de pH, pero tiene por otro lado varios inconvenientes. Con el método de inmovilización empleado no es posible estimar la cantidad o proporción de hierro que contiene el adsorbente, ya que no se realiza la disolución del polímero en las NPs, sino que éstas se fijan en la superficie de las perlas de manera no cuantificable al establecerse el contacto. Es por este motivo que no se pueden evaluar de forma independiente las propiedades adsorbentes de las NPs, sino que se determinan para el conjunto del adsorbente alginato + NPs. Por otro lado, los porcentajes de eliminación son bajos al no contener las perlas demasiado Fe.

#### 6.3.2.1.3. Estudio de la dosis

Los resultados muestran unos porcentajes de eliminación de cromo bajos con este procedimiento, por lo que se realizó un estudio de la dosis por si se pudiera mejorar la eficacia de eliminación con perlas de alginato.

El estudio de la dosis se realizó variando la proporción de una disolución de dicromato de misma concentración (50 ppm) con respecto a la masa de adsorbente añadido, y representando el porcentaje de eliminación con respecto a la dosis correspondiente.

Según muestra la figura 38, el aumento de la dosis implica un aumento de la eliminación debida al hierro con respecto a la debida al alginato, como se puede deducir en vista de las pendientes de ambas regresiones. Con la dosis más alta con la que es factible operar se consigue casi duplicar el porcentaje de eliminación con respecto a la dosis utilizada inicialmente a ese mismo pH. Aun así no se consigue un porcentaje de eliminación demasiado alto con este método.

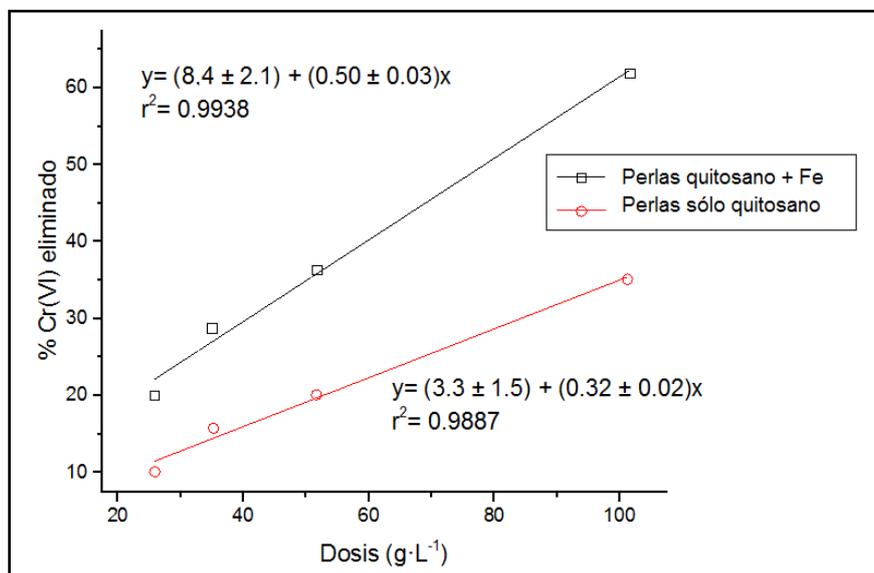


**Figura 38:** Estudio del porcentaje de eliminación de Cr(VI) con respecto a la dosis de perlas de alginato + Fe a pH 4.3.

### 6.3.2.2. Eliminación con perlas de quitosano

En vista de una eficacia discreta de eliminación utilizando alginato como soporte, se realizaron en primer lugar pruebas de la dosis con las perlas de quitosano, para determinar una dosis óptima de trabajo de manera previa.

#### 6.3.2.2.1. Estudio de la dosis



**Figura 39:** Estudio del porcentaje de eliminación de Cr(VI) con respecto a la dosis de perlas de quitosano + Fe a pH 4.5.

A misma dosis de adsorbente, las perlas de quitosano presentan porcentajes de eliminación mayores que en el caso de las perlas de alginato. Se observa que, como ocurría con el anterior soporte, un aumento de la dosis implica el aumento de la adsorción debida al hierro con respecto al blanco, diferencia más acusada en este caso al contener las perlas una cantidad de hierro mucho mayor.

En vista de los resultados obtenidos, se escoge la dosis de  $52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  como dosis a emplear en el estudio de la influencia del pH. El motivo de no escoger la más alta es que en ese caso el volumen de disolución apenas alcanza para cubrir las perlas y con agitación el contacto disolución-perlas no es uniforme.

### 6.3.2.2.2. Estudio cinético

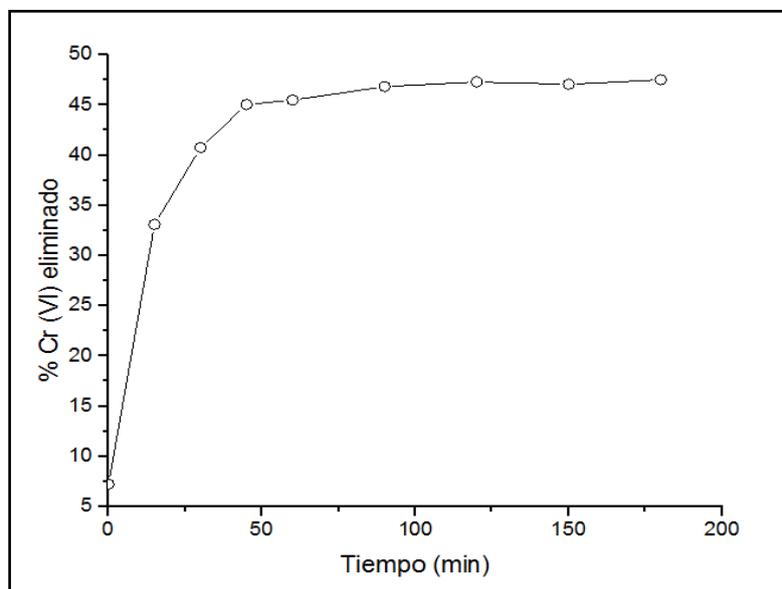


Figura 40: Estudio cinético para los procesos de adsorción/reducción de Cr(VI) con perlas de quitosano + Fe a pH 4.5.

El estudio cinético se llevó a cabo manteniendo la dosis escogida, esto es, 5 g de adsorbente en 100 ml de dicromato potásico 50 ppm. El equilibrio se alcanza pasadas 1.5 h.

### 6.3.2.2.3. Influencia del pH

El estudio de la influencia del pH se realizó por un procedimiento análogo al de las pruebas con perlas de alginato. Se pusieron en contacto 20 ml de la disolución de dicromato 50 ppm de pH ajustado con un 1 g aproximado del adsorbente con agitación durante 24h, tras lo cual se realizaron las medidas.

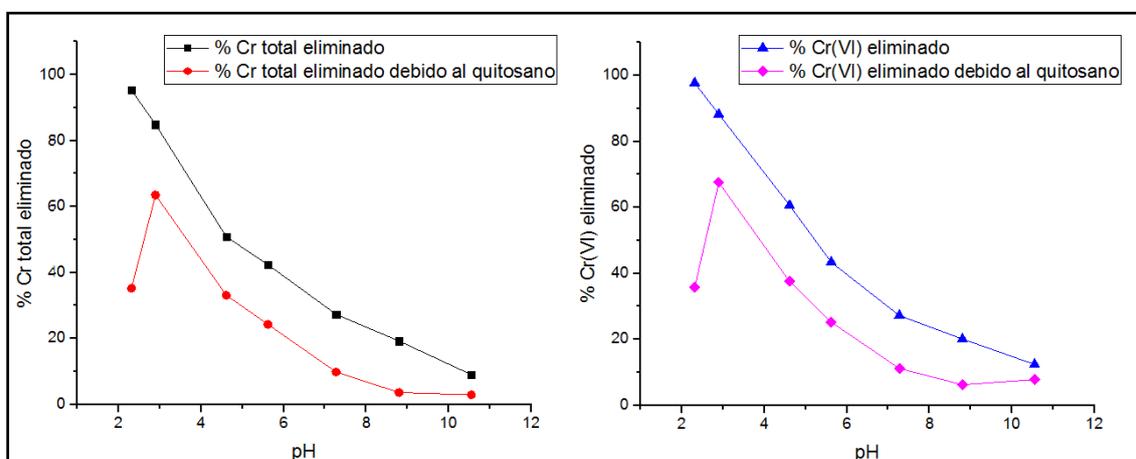


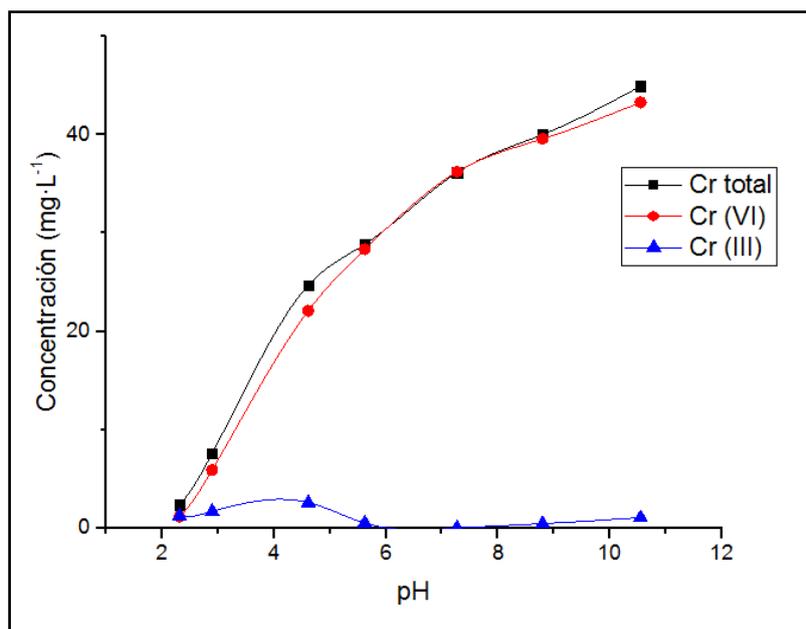
Figura 41: Influencia del pH en la eliminación de Cr(VI) 50 ppm con perlas de quitosano + Fe.

La figura 41 muestra unos porcentajes de eliminación de cromo total bastante mayores que con las perlas de alginato, al tener las perlas de quitosano una mayor proporción de hierro, el cual ya se ha comprobado que funciona como adsorbente.

El quitosano también tiene propiedades de adsorción,<sup>[43]</sup> debido a los grupos amino que presenta su estructura. Estos grupos son básicos, y su protonación a pH ácidos hace que la superficie de la estructura de este polímero adquiera carga positiva y adsorba aniones por interacciones electrostáticas. Esto hace que la adsorción de los iones dicromato se vea favorecida a pH ácidos sobre este soporte.

Las pruebas con perlas de quitosano presentan buenos porcentajes de eliminación de Cr(VI) a pH ácido, siendo la eficacia de eliminación mayor cuanto menor es el pH. A pH 2.3 se alcanza un porcentaje de eliminación del 96%, pH al que se produce la pérdida de consistencia de las perlas, aunque no su total disolución. Este es el motivo por el cual la adsorción en las perlas de sólo quitosano es menor, por su disolución parcial. No se han podido realizar pruebas a pH más ácidos debido a que a esos valores de pH se produce la redisolución completa del quitosano y por tanto se deshacen las perlas. Esta redisolución a pH muy ácido es la principal limitación del empleo del quitosano como soporte.

De igual forma que con las perlas de alginato, se determina la concentración de cada especie de cromo para evaluar si se produce la eliminación por reducción (figura 42).



**Figura 42:** Concentración de las diferentes especies de cromo en disolución tras el tratamiento con perlas de alginato + Fe

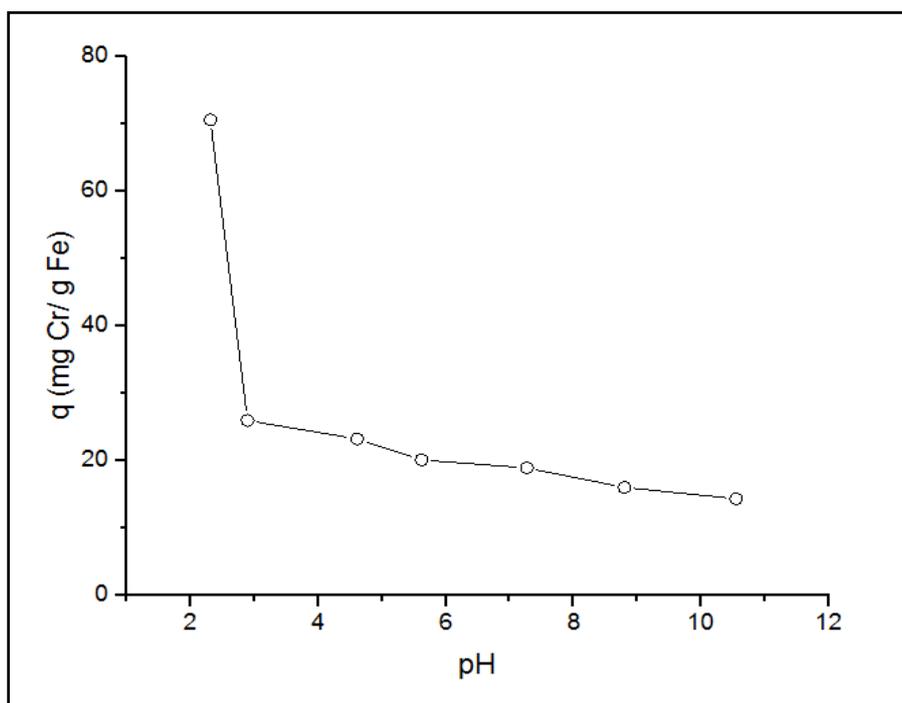
De nuevo las concentraciones de Cr(III) determinadas por diferencia son demasiado pequeñas como para asegurar que la reducción se produzca o estas diferencias sean producidas por un error experimental, por lo que no se puede determinar cuál de los mecanismos de adsorción propuestos es el mayoritario con los ensayos realizados.

La principal desventaja general del empleo de las NPs en suspensión inmovilizadas es que la baja proporción de nanopartículas con respecto al volumen total implica que las inmovilizaciones tengan poca cantidad de NPs de hierro en su composición con

respecto al resto de componentes. Los resultados se podrían mejorar de lograr el aislamiento o concentración de las nanopartículas sintetizadas.

### 6.3.3. Propiedades de adsorción de las nanopartículas sintetizadas

A diferencia de las perlas de alginato, con las de quitosano sí se puede establecer una relación estimada de la cantidad de hierro que hay en cada gramo de adsorbente, sabiendo la cantidad de hierro en la disolución previa y el peso total de las perlas. Esta relación se estableció en 0.01 g Fe por cada gramo de perlas, y permite la estimación de la cantidad de cromo eliminada debido al hierro por separado, tras realizar la corrección con el blanco (adsorción de las perlas de sólo quitosano a mismos valores de pH). Los resultados se muestran en la figura 43.



**Figura 43:** Influencia del pH en la eliminación de Cr(VI) 50 ppm con perlas de quitosano + Fe: adsorción debida al hierro.

Se comprueba que la adsorción sobre las nanopartículas es dependiente del pH, siendo la adsorción menor según aumenta el pH. No se pudieron obtener datos a menor valor de pH debido a las limitaciones que presenta el soporte empleado (quitosano).

Se concluye que la adsorción de cromo en las NPs hierro se ve favorecida a pH ácidos. Esto puede ser debido a que a estos pH la reducción a Cr(III) está muy favorecida en contacto con los óxidos de hierro y se produce la quimisorción del cromo por sustitución metálica de este catión.<sup>[42]</sup> Otro posible mecanismo es la adsorción de aniones en la superficie del material por interacciones electrostáticas tras la formación de grupos  $\text{Fe}(\text{OH}_2)^+$  en la superficie de las NPs a pH ácido sin que ocurra reducción.<sup>[22]</sup> La eliminación de cromo por adsorción puede ocurrir por cualquiera de los dos mecanismos propuestos o por una combinación de ambos.<sup>[35]</sup>

## 7. Conclusiones

Después de la evaluación de los resultados experimentales obtenidos se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- La biosíntesis de nanopartículas de hierro con extractos de especies autóctonas gallegas funciona como alternativa de obtención de NPs frente a los procesos convencionales, de manera más eficaz con los extractos de castaño y roble, de mayor capacidad antioxidante.
- La matriz de estos extractos no impide la tendencia de las NPs del hierro a aglomerarse en ningún caso. Para obtener las NPs más dispersas es necesaria la adición de algún otro agente estabilizante.
- Los resultados para los parámetros de caracterización de los extractos indican que en general aquellas extracciones con agua/EtOH presentan menores potenciales redox y mayor capacidad antioxidante. La diferencia de estos parámetros entre estos extractos y los acuosos no es muy acusada, por lo que se considera la utilización de agua como disolvente, por su nula toxicidad.
- Las NPs sintetizadas tienen propiedades adsorbentes, obteniéndose buenos resultados en la remediación de Cr(VI) con el soporte que incluye la totalidad de estas NPs (quitosano).
- La eliminación de Cr(VI) se produce mayoritariamente por adsorción, siendo este proceso más eficaz a pH bajos.
- La principal limitación que presenta esta alternativa de síntesis de NPs es la baja concentración de las mismas que se obtiene en volúmenes grandes de disolución, y la dificultad para separarlas. Esto provoca que tras la posterior inmovilización las perlas obtenidas tengan una proporción de hierro muy baja. Los resultados podrían mejorarse si se lograra la concentración o aislamiento de estas NPs.

## Conclusions

The following conclusions can be reached after the evaluation of the experimental results:

- The biosynthesis of iron nanoparticles with native galician species extracts works as an alternative for obtaining NPs following conventional processes, and it is more effective with extracts from chestnut tree and oak leaves, which have greater antioxidant capacity.
- However, the extract matrix does not prevent the trend of iron NPs to agglomerate in any case. For more dispersed NPs obtainig, the addition of other capping agent is required.
- The results for the characterization parameters of the extracts indicate that in general those extractions in water/EtOH have lower redox potential and greater antioxidant capacity. The difference in these parameters between extracts in water or water/EtOH is not very pronouced, and that is why the use of water as solvent is favoured for its no toxicity.
- The synthesized NPs have sorption properties, with good results in the removal of Cr (VI) in the support including all of these NPs (chitosan).
- Removal of Cr (VI) is mostly produced by adsorption, and it is more effective at low pH.
- The main limitation of this alternative synthesis of NPs is the low particle concentration obtained in large volumes of solution, and the difficulty to separate them. This causes that after the subsequent inmovilization, the beads obtained have a very low proportion of iron. The results could be improved if the concentration or isolation of these NPs is achieved.

## Conclusións

Despois da avaliación dos resultados experimentais pódese chegar ás seguintes conclusións:

- A biosíntesis de nanopartículas de ferro con extractos de especies autóctonas galegas funciona como alternativa de obtención de NPs fronte aos procesos convencionais, de maneira máis eficaz cos extractos de castaño e carballo, de maior capacidade antioxidante.
- A matriz destes extractos non impide a tendencia das NPs de ferro a aglomerarse en ningún caso. Para obter as NPs máis dispersas é necesaria a adición dalgún outro axente estabilizante.
- Os resultados para os parámetros de caracterización dos extractos indican que en xeneral aquelas extraccións con auga/EtOH presentan menores potenciais redox e maior capacidade antioxidante. A diferenza destes parámetros entre estes extractos e os acuosos non é moi acusada, polo que se considera a utilización de auga como disolvente, pola súa nula toxicidade.
- As NPs sintetizadas teñen propiedades adsorbentes, obténdose bos resultados na remediación de Cr(VI) co soporte que inclúe a totalidade destas NPs (quitosano).
- A eliminación de Cr(VI) prodúcese maioritariamente por adsorción, sendo este proceso máis eficaz a pH baixos.
- A principal limitación que presenta esta alternativa de síntesis de NPs é a baixa concentración das mesmas que se obtén en volumes grandes de disolución, e a dificultade para separalas. Isto provoca que trala posterior inmovilización, as perlas obtidas teñan una proporción de ferro moi baixa. Os resultados poderían mellorarse se se lograra a concentración ou aillamento destas NPs.



## 8. Bibliografía

- [1] Karlsson, M.N.A.; Deppert, K.; Wacaster, B.A.; Size-controlled nanoparticles by thermal cracking of ironpentacarbonyl. *Appl. Phys.* **2005**, *80*, 1579–1583.
- [2] Kuhn, LT.; Bojesen, A.; Timbermann, L.; Structural and magnetic properties of core-shell iron-iron oxide nanoparticles. *J. Phys. Condens Matter* **2002**, *14*, 13551-674.
- [3] Kharissova, O.V.; Rasika Dias, H.V.; Kharisov, B.I.; Olvera Pérez, B.; Jiménez Pérez, J.M. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 4, 240-248.
- [4] Hebbalalu, D.; Lalley, J.; Nadagouda, M.N.; Varma, R.S. Greener Techniques for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers, and Microwaves. *Sustainable Chem. Eng.* **2013**, *1*, 7, 703–712.
- [5] Machado, S.; Pinto, S. L.; Grosso, J. P.; Nouws, H. P. A.; Albergaria, J. T.; Delerue-Matos, C. Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. *Sci. Total Environ.* **2013**, 445-446, 1-8.
- [6] Makarov, Valentin V.; Makarova, Svetlana S.; Love, Andrew J. Biosynthesis of Stable Iron Oxide Nanoparticles in Aqueous Extracts of *Hordeum vulgare* and *Rumex acetosa* Plants. *Langmuir* **2014**, *30*, 20, 5982–5988.
- [7] Nadagouda, M.N.; Castle, A.L.; Murdock, R.C.; Hussain, M.S.; Varma, R.S. *In vitro* biocompatibility of nanoscale zerovalent iron particles (NZVI) synthesized using tea polyphenols. *Green Chem.* **2010**, *12*, 114-122.
- [8] Naczka, M.; Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1523-1542.
- [9] Popa, V.I.; Dumitru, M.; Volf, I.; Anghel, N. Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Ind. Crops Prod.* **2008**, *27*, 144-149.
- [10] Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1821-1835.
- [11] D'Archivio, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **2007**, *43*, 4, 348-361.
- [12] Han, Rui-Min; Zhang, Jian-Ping; Skibsted, Leif H. Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants. *Molecules* **2012**, *17*, 2140-2160.
- [13] Benjamin, M.M; Sletten, R.S.; Bailey, R.P.; Bennet, T. Sorption and filtration using iron-oxide coated sand. *War. Res.* **1996**, *30*, 11, 2609-2620.

- [14] Ponder, S.M.; Darab, J.G.; Mallouk, T.E. Remediation of Cr(VI) and Pb(II) Aqueous Solutions Using Supported, Nanoscale Zero-valent Iron. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 2564-2569.
- [15] Hsu, Jia-Chin; Lin, Chin-Jung; Liao, Chih-Hsiang; Chen, Shyi-Tien. Removal of As (V) and As (III) by reclaimed iron-oxide coated sands. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *153*, 817-826.
- [16] Wang, Chuan-Bao; Zhang, Wei-Xian. Synthesizing Nanoscale Iron Particles for Rapid and Complete Dechlorination of TCE and PCBs. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 7, 19, 2154-2156.
- [17] Cao, J.; Wei, L.; Huang, Q.; Wang, L. Reducing degradation of azo dye by zero-valent iron in aqueous solution. *Chemosphere* **1999**, *38*, 3, 565-571.
- [18] Fan, F.; Guo, Y.; Wang, J.; Fan, M. Rapid decolorization of azo dye methyl orange in aqueous solution by nanoscale zerovalent iron particles. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *166*, 904-910.
- [19] Yan, W.; Herzing, A.A.; Kiely, C.J.; Zang, W. Nanoscale zero-valent iron (nZVI): Aspects of the core-shell structure and reactions with inorganic species in water. *J. Contam. Hydrol.* **2010**, *118*, 96-104.
- [20] Bard, A.J.; Parsons, R.; Jordan, J. Standard potentials in aqueous solution. Marcel Dekker, Inc.: New York 1985.
- [21] Li, X.; Daniel W. Elliott, D.W.; Zhang, W. Zero-Valent Iron Nanoparticles for Abatement of Environmental Pollutants: Materials and Engineering Aspects. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2006**, *31* (4), 111-122.
- [22] Cornell, R. M. Adsorption of ions and Molecules. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses; WILEY-VCH: Weinheim, 2003, 253-295.
- [23] Chen, P.; Su, C.; Tseng, C.; Tan, S.; Cheng, C. Toxicity assessments of nanoscale zerovalent iron and its oxidation products in medaka (*Oryzias latipes*) fish. *Mar. Pollut. Bull.* **2011**, *63*, 339-346.
- [24] El-Temsah, Y.S.; Joner, E.J. Ecotoxicological effects on earthworms of fresh and aged nano-sized zero-valent iron (nZVI) in soil. *Chemosphere* **2012**, *89*, 76-82.
- [25] Ertesvig, H.; Valla, S. Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 85-91.
- [26] Grant, G.T.; Morris, E.R.; Rees, D.A.; Smith, P.J.; Thom, D. Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model. *Febs. Lett.* **1973**, *32* (1), 195-198.
- [27] Gregor, J. E.; Fenton, E.; Brokenshire, G.; Van Den Brink, P.; Sullivan, B. Interactions of Calcium and Aluminium Ions with Alginate. *Wat. Res.* **1996**, *30* (6), 1319-1324.

- [28] Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 603–632.
- [29] Kotas, J.; Z. Stasicka, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* **2007**, *107*, 263-283.
- [30] López García, M. Estudio fisicoquímico del proceso de reducción-adsorción de Cr(VI) en medio acuoso sobre biomateriales de bajo coste. Tesis Doctoral, Universidad de A Coruña, 2013.
- [31] Bielicka, A.; Bojanowska, I.; Wisniewski, A. Two Faces of Chromium - Pollutant and Bioelement. *Pol. J. Environ. Stud.* **2005**, *14* (1), 5-10.
- [32] García, M.; Lodeiro, P.; Herrero, R.; Sastre de Vicente, M.E. Cr(VI) removal from synthetic and real wasterwaters: The use of the invasive biomass *Sargassum muticum* in batch and column experiments. *J. Ind. Eng. Chem.* **2012**, *18*, 1370-1376.
- [33] López García, M.; Lodeiro, P.; Barriada, J.L.; Herrero, R.; Sastre de Vicente, M.E. Reduction of Cr(VI) level in solution using bracken fern biomass: Batch and column studies. *Chem. Eng. J.* **2010**, *165*, 517-523.
- [34] Pettine, M.; D'Ottone, L.; Campanella, L.; Millero, F.J.; Passino, R. The reduction of chromium (VI) by iron (II) in aqueous solutions. *Geochimi. Cosmochim. Acta* **1998**, *62*, 9, 1509–1519.
- [35] Li, X.; Cao, J.; Zhang, W. Stoichiometry of Cr(VI) Immobilization Using Nanoscale Zerovalent Iron (nZVI): A Study with High-Resolution X-Ray Photoelectron Spectroscopy (HR-XPS) *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47* (7), 2131-2139.
- [36] Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B. D. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4113–4117.
- [37] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol.* **1995**, *28* (1), 25–30.
- [38] Pisoschi, A.M.; Negulescu, G.P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem. Anal. Biochem.* **2011**, 1:106.
- [39] Clesceri, L. S.; Greenberg, A.E.; Eaton, A.D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association: Washington, 2012.
- [40] Pflaum, R.T.; Howick, L.C. The Chromium-Diphenylcarbazide Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (19), 4862–4866.
- [41] Lodeiro, P.; Fuentes, A.; Herrero, R.; Sastre de Vicente, M.E. Cr<sup>III</sup> binding by surface polymers in natural biomass: the role of carboxylic groups. *Environ. Chem.* **2008**, *5*, 355-365.

[42] White, A.F.; Peterson, M.L. Reduction of aqueous transition metal species on the surfaces of Fe(II) -containing oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1996**, 60, 20, 3799-3814.

[43] Gerente, C. V.; Lee, K. C.; Le Cloirec, P.; McKay, G. Application of Chitosan for the Removal of Metals From Wastewaters by Adsorption—Mechanisms and Models Review, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2007**, 37:1, 41-127