

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Tesis Doctoral



**CATALIZADORES ENZIMÁTICOS Y BIOMIMÉTICOS
SOPORTADOS PARA LA ELIMINACIÓN DE COLORANTES
MODELO DE SOLUCIONES ACUOSAS**

Autora: Ing. Agostina Córdoba

Directora: Dra. María Lujan Ferreira

Junio de 2015

**CATALIZADORES ENZIMÁTICOS Y BIOMIMÉTICOS
SOPORTADOS PARA LA ELIMINACIÓN DE COLORANTES
MODELO DE SOLUCIONES ACUOSAS**

por

Ing. Química Agustina Córdoba

Dra. María Lujan Ferreira

Directora

Comisión Asesora de Tesis:

Dra. María Lujan Ferreira

Dra. Ivana Magario

Dra. Noelia Pía Alasino

Tribunal Examinador de Tesis:

Dra. María Lujan Ferreira

Dra. Ivana Magario

Dra. Noelia Pía Alasino

Esta Tesis fue enviada a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba para cumplimentar los requerimientos de obtener el grado académico de Doctora en Ciencias de la Ingeniería.

Córdoba, Argentina

Junio, 2015

AGRADECIMIENTOS

*“Con gente como ésa, me comprometo para lo que sea
por el resto de mi vida, ya que por tenerlos junto a mí,
me doy por bien retribuido.”*

Mario Benedetti

Intentar listar a quienes influyeron en el desarrollo de esta tesis, entendiéndola como pieza fundamental de mis últimos cinco años, es sin duda el desafío más importante que incluyen estas páginas.

En primer lugar quiero agradecer a Lujan, por haber tenido la voluntad de trabajar a la distancia brindando siempre sus conocimientos, y contagiando su gran energía y capacidad de trabajo. Por haber pensado generosamente en mi futuro laboral, siempre respetando mis decisiones.

A Ivana, le debo todo lo que aprendí del trabajo científico, más todo lo que no fui capaz de incorporar. Es difícil expresar con palabras su aporte en mi formación y la admiración que supo cultivar en mí en base a su voluntad, su inteligencia, su capacidad de síntesis, su forma de ver el vaso siempre medio lleno, su compañía y su paciencia para apoyarme en los momentos más difíciles de esta etapa, así como su alegría para los momentos más felices. Gracias por ser una amiga más que una directora.

Quiero agradecer al departamento de Química Industrial y Aplicada de la facultad por brindarme la posibilidad de trabajar en la planta piloto de Ingeniería Química. También agradezco a las autoridades del ICTA por permitirme la utilización de sus instalaciones.

Al profesor Vicente Gianna, por haber tenido una respuesta a todas las preguntas, desde el día que lo conocí, hace ya 12 años, hasta hoy.

A mis queridxs compañerxs y amigxs IDTQes les debo la alegría cotidiana, les debo la experiencia hermosa de permiternos repensar el orden normal de las cosas y de intentar cambiarlo, por el solo hecho de creernos capaces de lograr un mejor lugar. Les agradezco dejarme ser parte del sueño del IDTQ y adueñármelo. Les agradezco el aprendizaje enorme de los momentos de calma que devienen en huracanes de reinenciones. Por los momentos de fuerza, por la paciencia, por el respeto. Por permitirme decir que tengo el placer de

trabajar en el mejor grupo del mundo, sin miedo a equivocarme (incluso sin conocer ningún otro). Agradezco y admiro la fuerza y la contención de Raquel. Las eternas charlas de la sede 1, con Juan, José, Noelia, Ivana y Analía. El optimismo de Martín. La sabiduría de Nico. Las grandilocuentes historias de Juani. El compromiso de Alfonsina. La compañía de Alexis en la planta piloto, y todos sus renegares. Las escapadas a Marconi, con Laura, Nico, Juan, Juani, José y Alexis. Los fantásticos almuerzos que siempre tiñen de alegría nuestros días.

Quiero especialmente agradecerle a mi compañero de días, noches y sueños, Franco, por el amor al mundo y a mí, por la poca paciencia, por la fuerza, por la familia que nos inventamos juntos todos los días, por el amor al Manu de nuestro corazón.

A mi familia-compañera, Caro, Sofi, Chacho, Negra y Franco, por la paciencia gigante y por bancar los trapos siempre.

Quiero agradecer a mis padres, su presencia y apoyo en todos los momentos de mi vida, y a mis hermanos, por hacer de mi mundo un lugar más feliz.

A Manuel,

por responder todas las preguntas de mi mundo

con una sonrisa

“¿Cuáles son las condiciones sociales que deben cumplirse para que se instaure un juego social en el cual la idea verdadera esté dotada de fuerza porque los que allí participan tienen interés en la verdad en lugar de tener, como en otros juegos, la verdad de sus intereses?”

Pierre Bourdieu – “El campo científico” (1976)

ÍNDICE

RESUMEN	17
ABSTRACT.....	18
RESUMO.....	19
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	21
1.1. Compuestos fenólicos	23
1.1.1 Colorantes Industriales.....	24
1.2. Industria textil.....	26
1.2.1 Efluentes textiles	28
1.3. Métodos de tratamiento de efluentes	30
1.3.1 Tratamiento Físicos	31
1.3.2. Tratamientos Químicos	31
1.3.3 Tratamiento Biológicos.....	32
1.3.4 Tratamientos enzimáticos	34
1.4. Peroxidasas	37
1.4.1 Peroxidasa de Rábano Picante.....	39
1.4.2 Mecanismo catalítico de HRP.....	42
1.4.3 Aplicación en sistemas de tratamiento de efluentes	46
1.5. Metaloporfirinas	47
1.5.1 Hematin	48
1.5.2 Mecanismo catalítico de metaloporfirinas	51
1.6. Inmovilización de catalizadores	55
1.7. Motivación y objetivos.....	57
PARTE I: SISTEMAS HOMOGÉNEOS.....	61
CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DE PEROXIDASA DEL RÁBANO PICANTE Y SU BIOMIMÉTICO MEDIANTE UNA REACCIÓN TEST SELECCIONADA	63
2.1. Introducción.....	65
2.2. Metodología.....	68

2.2.1. Ensayos cinéticos.....	68
2.2.2. Determinación del coeficiente de absorptividad de la quinonaimina producto ...	70
2.2.3. Determinación experimental de las constantes de velocidad	70
2.3. Resultados	71
2.3.1. Perfiles de absorbancia.....	71
2.3.2. Efecto de la concentración de oxidante en la actividad catalítica	72
2.3.3. Efecto de la concentración de catalizador en la actividad catalítica.....	74
2.3.4. Formación de quinonaimina.....	74
2.3.5. Formación de radicales fenoxi.....	76
2.3.6. Estimación de constantes cinéticas.....	78
2.4. Conclusiones	79
2.5. Resultados publicados	80
CAPÍTULO 3: LOS COLORANTES: CARACTERIZACIÓN INICIAL	82
3.1. Introducción.....	84
3.2. Metodología.....	87
3.2.1. Mediciones espectrales.....	87
3.2.2. Reacciones de oxidación	87
3.3. Resultados.....	89
3.3.1. Comportamiento en solución de Naranja II y Rojo de Alizarina S	89
3.3.2. Reacciones de oxidación en sistemas catalizados por HRP	97
3.4. Conclusiones	102
3.5. Resultados publicados	103
CAPÍTULO 4: DECOLORACIÓN DE ROJO DE ALIZARINA S.....	104
4.1. Introducción.....	106
4.2. Metodología.....	108
4.2.1. Diseño de Experimentos y análisis estadístico.....	108
4.2.2. Reacciones de decoloración de RAS.....	113
4.2.3. Determinación de perfiles temporales de Oxígeno Disuelto, RAS y H ₂ O ₂	114

4.3. Resultados y Discusión	114
4.3.1. Análisis de Interferentes	114
4.3.2. Reacciones de decoloración de RAS.....	116
4.3.3. Optimización de las condiciones de reacción	124
4.3.4. Análisis UV-Visible de las reacciones de decoloración	125
4.3.5. Perfiles de reacción en condiciones seleccionadas	129
4.3.6. Modelado molecular.....	131
4.4. Conclusiones	140
4.5. Resultados publicados	141
CAPÍTULO 5: DECOLORACIÓN DE NARANJA II	144
5.1. Introducción.....	146
5.2. Metodología.....	149
5.2.1. Diseño experimental y análisis estadístico	149
5.2.2. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno	150
5.2.3. Caracterización por FTIR de los productos de reacción	150
5.3. Resultados y Discusión	151
5.3.1. Análisis de interferentes	151
5.3.2. Reacciones de decoloración de Naranja II.....	152
5.3.3. Optimización de las condiciones de reacción y validación de los modelos.....	165
5.3.4. Demanda Química de Oxígeno de soluciones tratadas.....	166
5.3.5. Análisis de productos de reacción.....	167
5.4. Conclusiones	177
5.5. Resultados publicados	178
PARTE II: INMOVILIZACIÓN DE CATALIZADORES	180
CAPÍTULO 6: INMOVILIZACIÓN DE HEMATIN COMO BIOMIMÉTICO DE PEROXIDASA	182
6.1. Introducción.....	184
6.2. Técnicas de caracterización y equipamiento	190
6.3. Inmovilización en hojuelas de quitosano modificado	190

6.3.1. Metodología.....	191
6.3.2. Resultados.....	196
6.3.3. Conclusiones.....	216
6.4. Inmovilización de hematin en bolillas de vidrio no porosas.....	218
6.4.1. Metodología.....	218
6.4.2. Resultados.....	220
6.4.3. Conclusiones.....	223
6.5. Resultados publicados.....	223
PARTE III: ESTUDIOS CINÉTICOS.....	226
CAPÍTULO 7: ESTUDIO CINÉTICO Y MODELADO DE SISTEMAS HOMOGÉNEOS HEMATIN/H ₂ O ₂	228
7.1. Introducción.....	230
7.2. Metodología.....	232
7.2.1. Etapa experimental.....	233
7.2.2. Modelado.....	235
7.3. Resultados y discusión.....	238
7.3.1. Perfiles de consumo de H ₂ O ₂	238
7.3.2. Producción de O ₂	242
7.3.3. Análisis UV-Visible: reacciones HRP/H ₂ O ₂ y hematin/H ₂ O ₂	245
7.3.4. Modelo Pseudo-catalítico: Parametrización.....	249
7.3.5. Modelo Catalítico: Parametrización.....	250
7.4. Conclusiones.....	259
7.5. Resultados publicados.....	260
CAPÍTULO 8: ESTUDIO CINÉTICO Y MODELADO DE REACCIONES DE DECOLORACIÓN DE NARANJA II ...	261
8.1. Introducción.....	263
8.2. Metodología.....	265
8.2.1. Etapa experimental.....	265
8.2.2. Modelado y parametrización.....	268
8.3. Resultados y discusión.....	269

8.3.1. Cinéticas de decoloración de NaII en sistemas homogéneos	269
8.3.2. Modelado Cinético: Parametrización de sistemas homogéneos	273
8.3.3. Sistemas heterogéneos de decoloración de Naranja II.....	281
8.4. Conclusiones	286
8.5. Resultados publicados	288
CAPÍTULO 9: ESTUDIO CINÉTICO Y MODELADO DE REACCIONES DE DECOLORACIÓN DE ROJO DE ALIZARINA S.....	289
9.1. Introducción.....	291
9.2. Metodología.....	292
9.2.1. Etapa experimental.....	292
9.2.2. Modelado y parametrización.....	294
9.3. Resultados y discusión.....	295
9.3.1. Cinéticas de decoloración de RAS en sistemas homogéneos	295
9.3.2. Avance de reacción: Análisis de espectros UV-Visibles	300
9.3.3. Modelado Cinético: Parametrización de sistemas homogéneos	306
9.3.4. Sistemas heterogéneos de decoloración de Rojo de Alizarina S.....	313
9.4. Conclusiones	317
9.5. Resultados publicados	319
CAPÍTULO 10: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	321
10.1. Conclusiones generales.....	323
10.2. Perspectivas futuras.....	328
BIBLIOGRAFÍA	331
ANEXO A: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES TAMPÓN	355
ANEXO B: MODELADO MOLECULAR EMPLEANDO MM2 Y PM6.....	359
ANEXO C: DETERMINACIÓN DE GRUPOS AMINO SUPERFICIALES.....	367

RESUMEN

Se aborda el estudio de un sistema de eliminación de colorantes fenólicos catalizado por hematin como biomimético de HRP. Se presentan estudios de actividad, optimización de las condiciones operativas de reacción, análisis de los productos de decoloración y producción de oxígeno. Estos permitieron confirmar: la acción degradativa de hematin; la inactivación provocada por H_2O_2 ; y la generación de oxígeno. Para lograr catalizadores heterogéneos activos, se optimizó el proceso de inmovilización de hematin sobre quitosano. Un estudio cinético teórico-experimental permitió establecer una analogía entre el mecanismo del biomimético y el de HRP, con producción de radicales fenólicos y radicales $O_2^{\cdot-}$.

ABSTRACT

A system for removing phenolic dyes, catalyzed by hematin as HRP biomimetic is studied. Analysis of activity, degradation products, oxygen generation and optimization of reaction conditions are presented. Hematin degradation mechanism, inactivation by H_2O_2 , and oxygen generation were evidenced. In order to obtain active heterogeneous catalysts, the immobilization process of hematin over chitosan, was optimized. A theoretical-experimental kinetic studied permitted established an analogy between biomimetic and HRP mechanism, producing phenolic and $O_2^{\cdot-}$ radicals.

RESUMO

Aborda-se o estudo de um sistema de eliminação de corantes fenólicos catalisado por hematina como biomimético de HRP. Apresentam-se estudos de atividade, otimização das condições operacionais de reação, análise dos produtos de descoloramento e produção de oxigênio. Estes permitiram confirmar: a ação degradante da hematina, a desativação provocada pelo H_2O_2 e a geração de oxigênio. Para conseguir produzir catalisadores heterogêneos ativos se otimizou o processo de imobilização de hematina em quitosana. Um estudo cinético teórico-experimental permitiu estabelecer uma analogia entre o mecanismo do biomimético e o do HRP com produção de radicais fenólicos e radicais $O_2^{\cdot-}$.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Compuestos fenólicos

Dentro de la categoría de compuestos fenólicos se encuentran aquellos compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo hidroxilo (HO-) enlazado directamente a un anillo aromático. Cuando las estructuras se componen por más de un HO- fenólico se denominan polifenoles. Los compuestos fenólicos son, en su mayoría, de origen natural. Se reportan como metabolitos secundarios cumpliendo importantes tareas en los procesos biológicos de distintos vegetales y animales, así como en la regulación de ciclos de nutrientes del suelo (Gianfreda, Iamarino, Scelza, & Rao, 2006).

Las propiedades físico-químicas de los compuestos fenólicos dependen de su naturaleza aromática y de los hidroxilos presentes en las moléculas, así como de la interacción entre estos últimos. La formación de enlaces puente hidrógeno *inter* e *intra*-moleculares es importante en estos compuestos. Los enlaces *intra*-moleculares reducen la reactividad del grupo hidroxilo, su solubilidad en solventes polares y su capacidad de formar ésteres y éteres. Los *inter*-moleculares, por su parte, aumentan los puntos de fusión y la solubilidad (en solventes polares). Por otro lado, los anillos aromáticos confieren características particulares a los grupos alcoholes. Los fenoles presentan una acidez mayor a la de los alcoholes alifáticos debido a la estabilización de los aniones por formación de estructuras mesoméricas. La acidez de los compuestos fenólicos depende, a su vez, de la naturaleza de los sustituyentes del anillo aromático y de la posición que estos ocupan en las moléculas (Wilfred Vermerris, 2006).

Un aspecto importante de la química de los compuestos fenólicos está relacionado a su oxidación. Las oxidaciones de estos compuestos pueden producirse por abstracción de un átomo de hidrógeno y consecuente formación de un radical libre. Las estructuras aromáticas de los fenoles confieren estabilidad a los radicales formados mediante la deslocalización del electrón desapareado. Este tipo de estructuras aromáticas son susceptibles a procesos de auto-oxidación por exposición a factores como la luz y el O₂ con etapas diferenciadas de reacción de iniciación, propagación y terminación de radicales libres. Hay dos vías de terminación posibles para los radicales libres formados durante estos procesos de oxidación: (1) reacciones de recombinación con formación de estructuras condensadas (Wilfred Vermerris, 2006); u (2) oxidación hasta su completa mineralización a CO₂ y H₂O (Liotta, Gruttadauria, Di Carlo, Perrini, & Librando, 2009). Existen distintos factores que pueden influir en la oxidación de los fenoles como lo son por ejemplo, la naturaleza y la posición de los sustituyentes en los anillos aromáticos. La presencia de sustituyentes dadores de electrones (como -CH₃) acelera las velocidades de oxidación,

mientras que sustituyentes aceptores de electrones disminuyen las velocidades de oxidación de estos compuestos (Gianfreda et al., 2006).

El fenol y sus derivados sustituidos constituyen una importante rama de compuestos contaminantes. Es posible detectarlos en efluentes de industrias textiles, papeleras y curtiembres, entre otras; o en el suelo y el aire como residuos de actividades agrícolas. El fenol, como compuesto modelo, ampliamente estudiado y posee efectos relevantes sobre la salud (Canada, 1999). La sobreexposición al mismo provoca comas, convulsiones, cianosis y muerte. Afecta el funcionamiento del hígado, los riñones, los pulmones y el sistema vascular (Busca, Berardinelli, Resini, & Arrighi, 2008). Además, los compuestos fenólicos poseen distintos grados de actividad estrogénica, la cual causa un desbalance hormonal que puede resultar en cáncer de mama en las mujeres (Wilfred Vermerris, 2006).

1.1.1 Colorantes Industriales

Dentro de los compuestos fenólicos los colorantes industriales representan un gran grupo. Desde su descubrimiento en 1856, los colorantes industriales son ampliamente utilizados. El teñido de fibras textiles es una de sus principales aplicaciones, además de ser empleados en las industrias del cuero, del papel, de la pintura y en la fabricación de tintas para impresión, entre otras. El uso de los colorantes sintéticos se encuentra fuertemente ligado al crecimiento de la industria textil. La producción mundial de estos compuestos fue de 1×10^6 ton solo en 1990 (Hunger, 2003). Las industrias textiles, químicas y farmacéuticas, entre otras, producen grandes cantidades de efluentes coloreados. La liberación de estos efluentes representa un enorme problema ambiental, no solo por la coloración de los mismos, sino porque, además, disminuyen los niveles de oxígeno de los ríos y lagos, confieren alta toxicidad y carácter mutagénico al agua (Weisburger, 2002).

Tabla 1.1. Características de los colorantes clasificados según su modo de aplicación (Clark, 2011; Hunger, 2003; Waring & Hallas, 1990).

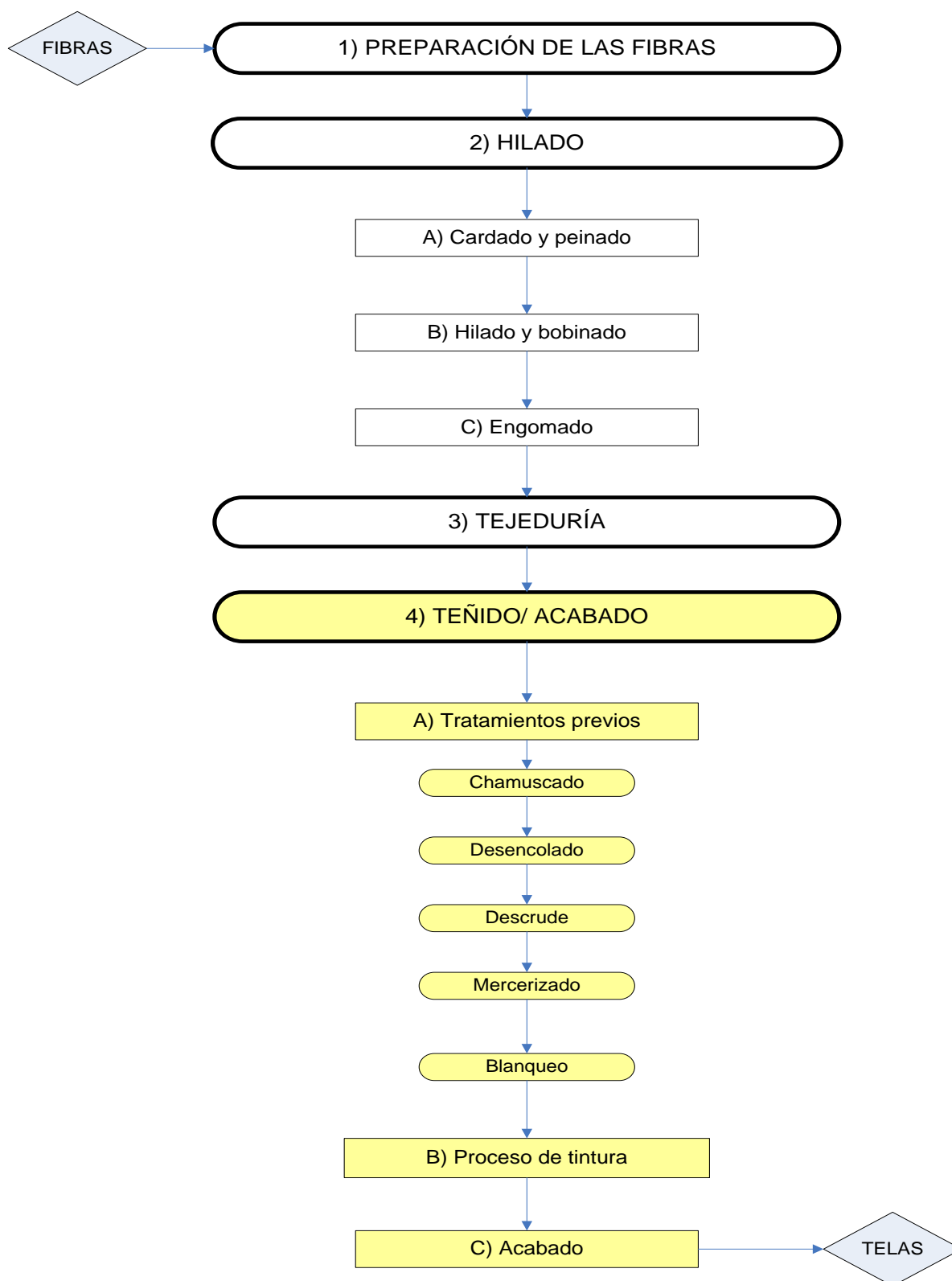
Tipo	Fibras en que se utiliza	Interacción con la fibra	Estructura química	Auxiliares	Pérdidas con el efluente (%)	Comportamiento ante el enjuague
Ácidos/ Básicos	lana, seda	Fuerzas iónicas	Los ácidos son sales de sodio de grupos sulfónicos y los básicos son sales de amonio cuaternario. Generalmente azoicos	La tela se trata previamente con ácidos o bases según corresponda	Ácidos: 5 – 20 Básicos: 0 – 5	Interacción reversible: poco estable ante el lavado
Directos	algodón, rayón	Enlaces puente hidrógeno	Colorantes azoicos con varios grupos azo.	Electrolitos para disminuir la solubilidad del colorante y favorecer interacción con la fibra.	5 – 30	Interacción débil: se pueden eliminar en el lavado
Dispersos	Poliéster	Dipolo – dipolo, Van der Waals, puente de hidrógeno	Antraquinona con grupos amino e hidroxilo.	Agentes dispersantes	0 – 10	Interacción débil: se pueden eliminar en el lavado
Mordientes	lana, seda	Formación de un complejo	Antraquinonas principalmente y en menor proporción azoicos con grupos hidroxilo.	Sales metálicas para formar quelatos (óxidos de cromo y aluminio)	2 – 10	Interacción fuerte: durabilidad ante el lavado
Tina	algodón, rayón	Dipolo – dipolo, Van der Waals, puente de hidrógeno	Antraquinonas.	Reductor: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, Oxidante: H_2O_2 , pH alcalino	5 – 20	Insolubles en agua: soportan lavados
Reactivos	algodón, rayón lana, seda, poliamida poliéster	Covalente	Azoicos, antraquinonas, ftalocianinas	pH alcalino, sales	10 - 50	Enlace fuerte: confiere solidez al lavado

Existen dos formas de clasificar los colorantes industriales: según su estructura química o según sus formas de aplicación. La clasificación basada en la estructura es la más apropiada, otorga información acerca de las propiedades de una serie de colorantes. No obstante, la clasificación según usos o formas de aplicación es la más usada por el Colour Index (Colourist, 1971). En la Tabla 1.1 se presenta la clasificación según sus usos, junto a las fibras textiles sobre la cual se aplican, y la estructura química a la que pertenecen. La nomenclatura estandarizada de los colorantes se encuentra establecida en el Colour Index y se constituye por: el modo de aplicación, el color y una secuencia de números; por ejemplo, C.I. *Acid Yellow 3* o C.I. *Basic Blue 41*. Además se asigna a cada colorante un código de 5 números (Hunger, 2003).

Las estructuras moleculares de los colorantes se caracterizan por poseer un grupo de átomos llamado cromóforo, que les confiere la capacidad de generar color (dos Santos et al., 2007). Debido a los colores que son capaces de generar y a que las fibras en las que se emplean son las dos de mayor importancia (algodón y poliéster), las familias de colorantes más utilizadas son azoicos y antraquinónicos.

1.2. Industria textil

La principal industria productora de efluentes coloreados es la textil. La cadena productiva incluye las etapas de preparación de las fibras, hilado, tejeduría y teñido. Estas etapas pueden estar integradas en una misma planta industrial o en ocasiones, pueden emplazarse en distintas instalaciones fabriles. En nuestro país las actividades de hilado y tejeduría se localizan cerca de la región de obtención de la fibra en el Noreste Argentino, mientras que el teñido se ubica cerca de las industrias de indumentaria en los grandes centros urbanos.



Esquema 1.1. Esquema de operaciones de una industria textil. En amarillo se marcan las etapas que generan efluentes coloreados.

Las etapas que forman parte de la industria textil y aquellas que producen efluentes coloreados se detallan en el Esquema 1.1.

1.2.1 Efluentes textiles

La composición de los efluentes industriales es dependiente de la actividad y las características particulares de la industria que los genera. No obstante, existen una serie de parámetros que permiten una rápida caracterización de los mismos, como lo son: sólidos en suspensión, pH, temperatura, Oxígeno disuelto, Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), entre otros. Los valores de pH, temperatura y Oxígeno disuelto presentan una gran importancia por su efecto sobre los ecosistemas acuáticos en los cuales se disponen finalmente los efluentes industriales. La modificación del pH de los cauces de agua naturales altera las características microbiológicas de las mismas, mientras que el aumento de la temperatura disminuye la cantidad de oxígeno disuelto. El ensayo de DQO otorga información de la cantidad de materia orgánica e inorgánica susceptible ser oxidada por acción de un oxidante fuerte, y se mide en mg/l de oxígeno equivalentes. Por su parte, la DBO indica la cantidad de materia orgánica susceptible de ser degradada por acción microbiana aerobia, medida en mg/l de oxígeno consumido. Los valores de DQO incluyen a la DBO, pero otorgan información adicional correspondiente a la presencia de compuestos no biodegradables presentes en los efluentes líquidos (Ramalho, 1990).

Las características de los efluentes generados en las industrias textiles se presentan en la Tabla 1.2, junto a una descripción de las etapas productivas de las cuales se liberan (C. P. de I. S. y C. del A. (CEPIS), 1994; C. P. de I. S. y C. del ambiente (CEPIS), 1997). Los parámetros como la DBO, DQO, el pH y la coloración de los efluentes textiles son muy variables, en función de cada tecnología en particular (dos Santos, Cervantes, & van Lier, 2007).

De las distintas etapas que generan efluentes, la etapa de teñido es la que mayormente contribuye al volumen de descarga líquida de una industria textil, representando alrededor del 65% del efluente global (Bandala, 2002).

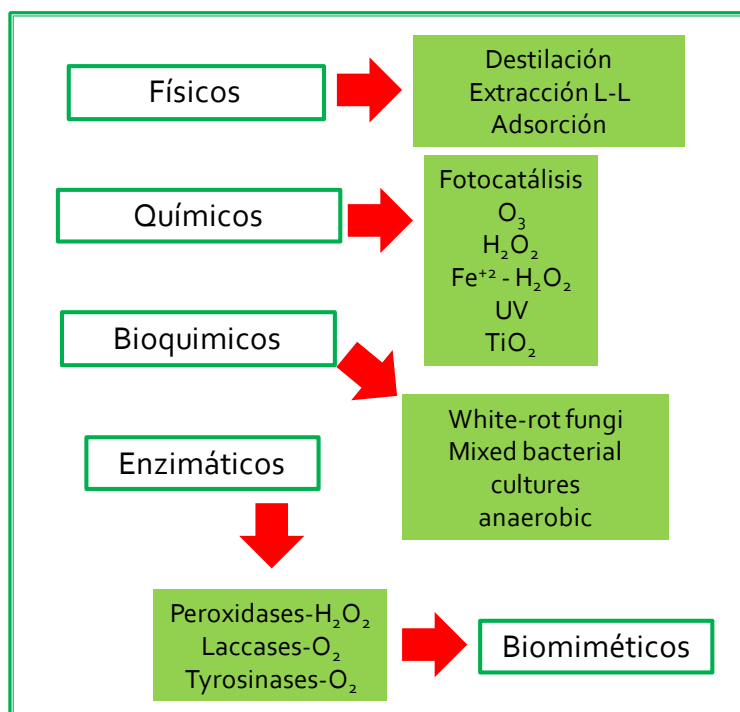
Tabla 1.2. Etapas productivas de la industria textil en las cuales se liberan efluentes, y las características de los mismos.

Etapas	Descripción	Efluente
Chamuscado o quemado	El tejido se expone a una llama de gas para quemar fibras protuberantes que puedan ocasionar un teñido no uniforme.	Agua de lavado final con algunos sólidos sedimentables. De bajo impacto ambiental.
Desencolado	Se remueve el agente de encolado para mejorar la afinidad de las fibras a los tintes y sustancias auxiliares. El proceso puede ser un lavado en caliente para encolados solubles y degradación ácida o enzimática para insolubles.	Aporta el 50% del valor de la DBO del efluente global, debido a los agentes de encolado (almidón, alcohol polivinílico, carboximetilcelulosa) y enzimas utilizadas (desencolado enzimático).
Descrude	Sirve para eliminar los aceites (naturales y de procesado), ceras, pectinas y otras impurezas remanentes en los tejidos. Para lograrlo se utiliza disoluciones de NaOH con tensioactivos en caliente.	Contribuye en gran medida a la DBO (pero en menos de un 50%) Y al pH.
Mercerizado	Tratamiento específico de la fibra de algodón. Permite incrementar la resistencia a roturas, lustre y la afinidad de los colorantes. Se utilizan baños con muy altas concentraciones (20 a 30%) de NaOH	pH elevado del orden de 11 a 14, debido al NaOH remanente no recuperado.
Blanqueo	Se remueve el color indeseado de algunas fibras. Para tal fin se trata el material textil con H ₂ O ₂ , hipoclorito de sodio NaClO o clorito de sodio NaClO ₂ y tensioactivos.	Agentes blanqueadores y tensioactivos remanentes. AOX (halógenos orgánicos absorbibles) si se utiliza NaClO o NaClO ₂ debido a la presencia de cierto porcentaje de cloro.
Teñido	La materia textil entra en contacto con una disolución o dispersión de colorante, absorbiéndolo y reteniéndolo en mayor o menor	Alta carga DBO y DQO debido a colorantes y auxiliares de teñido. pH alcalino y temperaturas cercanas a 30° C. Elevada

	medida.	coloración.
Acabado	Incluye una serie de operaciones químicas y mecánicas a las que se someten los tejidos para darles especificaciones finales deseadas.	Alta DQO debido a tensioactivos catiónicos y resinas acrílicas

1.3. Métodos de tratamiento de efluentes

El desarrollo de sistemas de tratamiento de efluentes resulta ser de gran y creciente interés; considerando el peligro que significa la liberación de contaminantes al ambiente. Existen en la actualidad distintas tecnologías aplicadas al tratamiento de efluentes que difieren en la naturaleza del tratamiento empleado, una clasificación de este tipo se presenta en el Esquema 1.2. Las principales técnicas disponibles para la decoloración de efluentes de la industria textil, se pueden agrupar en tres grandes grupos: tratamientos físicos, químicos y biológicos.



Esquema 1.2. Distintas tecnologías aplicadas al tratamiento de efluentes, clasificadas según su naturaleza.

1.3.1 Tratamiento Físicos

Los tratamientos físicos se basan en la transferencia de los contaminantes de una fase a otra. Los mismos son de naturaleza no destructiva. Los métodos de filtración y adsorción son los más aplicados. Dentro de los adsorbentes más empleados, el carbón activado es uno de los más comunes, sin embargo presenta algunos inconvenientes que incluyen sus altos costos de obtención y una inactivación de aproximadamente el 10% en cada regeneración térmica (dos Santos et al., 2007). Se han reportados buenos rendimientos de la adsorción con carbón activado, no obstante estos dependen de la naturaleza de los contaminantes y requieren el agregado de grandes cantidades de adsorbente (Robinson, McMullan, Marchant, & Nigam, 2001). Con objeto de disminuir estos inconvenientes, distintos materiales, como zeolitas, resinas poliméricas, cenizas, bentonitas, entre otros, han sido estudiados como adsorbentes (dos Santos et al., 2007). Las zeolitas presentaron bajas capacidades de adsorción, no obstante el empleo de resinas de intercambio iónico presentó buenos rendimientos. Sin embargo, estas últimas no son aptas para todo tipo de colorantes, y la eficiencia del tratamiento dependerá, por lo tanto, del tipo de resina utilizada y de la afinidad de la misma con los colorantes estudiados (dos Santos et al., 2007).

Los métodos que emplean membranas incluyen a la ultrafiltración, la nanofiltración y la ósmosis inversa. Su utilización en tratamientos de efluentes textiles, permite tratar efluentes de la etapa de teñido, además de los efluentes de las etapas de mercerizado y blanqueo. Sin embargo, estas tecnologías requieren de altos costos de inversión y mantenimiento. Además producen concentrados de contaminantes que deben ser posteriormente tratados (Husain, Husain, & Kulshrestha, 2009).

1.3.2. Tratamientos Químicos

Tratamientos de coagulación–floculación (los cuales son procesos de naturaleza físico–química) son empleados comúnmente en procesos de tratamientos de efluentes. Existen reportes de altas eficacias de eliminación de colorantes dispersos y sulfurados. Sin embargo, los colorantes de tipo reactivo, directos, ácidos y de tina forman agregados de baja calidad que presentan una mala deposición (dos Santos et al., 2007). Sumado a esto, los procesos suelen ser caros por el uso de reactivos de alto costo.

Los tratamientos químicos implican la transformación de los contaminantes por acción de un agente oxidante, que comúnmente es O_3 , H_2O_2 y MnO_4^{-2} . Dentro de los tratamientos

químicos, merecen especial consideración los procesos de oxidación avanzada (en inglés: Advanced Oxidation Processes AOPs). Los mismos se caracterizan por oxidar los compuestos recalcitrantes y de gran toxicidad logrando importantes disminuciones de la DQO (dos Santos et al., 2007). Se conocen como AOPs a procesos de oxidación que implican la generación de radicales hidroxilo (OH^\bullet) capaces de interactuar con los compuestos orgánicos del medio. En estos procesos se emplean catalizadores de Fe, Mn y TiO_2 en presencia o ausencia de fuentes de radiación para generar los radicales hidroxilos a partir de ozono o peróxido de hidrógeno (Busca et al., 2008). Los reactivos, así como las fuentes de radiación son costosos y su máximo potencial de decoloración es alcanzado cuando se los acopla a otros tratamientos, como adsorción o tratamientos biológicos, a fin de conseguir la máxima economía del agente oxidante (Rodríguez Fernández- Alba A., Rosal García, Dorado Valiño, Villar Fernández, & Sanz García, 2001).

El método Fenton es uno de los AOPs más estudiados y consiste en la generación del radical hidroxilo por medio de la reacción entre el ión ferroso (Fe^{+2}) y H_2O_2 . Los inconvenientes de esta técnica son variados, siendo el más importante la sensibilidad que presenta al pH del medio, con un intervalo óptimo de aplicación entre 3 y 6, lo que implica la necesidad de corregir los valores de pH de los efluentes proveniente de la etapa de tintura (pH entre 9 y 11) (Babuponnusami & Muthukumar, 2014; dos Santos et al., 2007). Por otro lado, los productos de la reacción de oxidación, como los son los ácidos orgánicos, eliminan al Fe^{+2} del ciclo catalítico debido a su capacidad para formar complejos. Se suman a estos inconvenientes, la necesidad de eliminar el catalizador de los efluentes tratados (Rodríguez Fernández- Alba A. et al., 2001). Asimismo, diferentes técnicas de inmovilización del Fe^{+2} han sido exitosas en la disminución de estos problemas de aplicación (Babuponnusami & Muthukumar, 2014). Además, el empleo de luz ultravioleta y visible, así como la sonicación permitieron aumentar las eficiencias de estos tratamientos, a expensas de aumentar los costos de operación (Bagal & Gogate, 2014; Rahim Pouran, Abdul Aziz, & Wan Daud, 2015). El empleo de luz para aumentar la producción de radicales inorgánicos durante los procesos Fenton, constituye una de las áreas más estudiadas.

1.3.3 Tratamiento Biológicos

Los procesos de naturaleza biológica incluyen tratamientos con bacterias u hongos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Enzimas mono y di-oxigenasas presentes en diferentes bacterias son capaces de catalizar la escisión de estructuras aromáticas por incorporación de O_2 (Saratale, Saratale, Chang, & Govindwar, 2011). Este tipo de enzimas requieren de cofactores dadores de electrones, como NADH y NADPH. Sin embargo,

colorantes con grupos azo, o sustituyentes que contengan nitrógeno o grupos sulfónicos resultan recalcitrantes para este tipo de tratamientos debido a su resistencia a las oxigenasas (Claus, Faber, & König, 2002), por lo que estos tratamientos no consiguen eliminar el color en la mayoría de los casos (Jafari, 2012; Méndez-Paz, Omil, & Lema, 2005). Una solución a este problema se obtiene combinando tratamientos anaeróbicos con tratamientos aeróbicos. Existen, por otro lado, reportes en la literatura de la eliminación de colorantes azoicos mediante especies de *Pseudomonas* que contienen enzimas aeróbicas azo reductasas (Zimmermann, Gasser, Kulla, & Leisinger, 1984; ZIMMERMANN, 1982).

Los tratamientos anaeróbicos, por su parte, producen la ruptura de las estructuras de los colorantes por reducción. El mecanismo de reducción de azocolorantes da lugar a la generación de aminas aromáticas no coloreadas, pero de elevada toxicidad y mutagenicidad. Debido a estas consideraciones, en la eliminación de colorantes azoicos resulta conveniente el uso secuencial de procesos anaerobios y aerobios. De esta manera, los productos tóxicos generados mediante un tratamiento anaerobio, pueden ser oxidados posteriormente en un proceso aerobio convencional (F. P. Van Der Zee et al., 2003).

En condiciones aeróbicas, las principales enzimas relacionadas a la degradación oxidativa de contaminantes son: peroxidasas y fenoloxidasas (lacasas y tirosinasas). Las enzimas peroxidasas catalizan la oxidación de estructuras aromáticas en presencia de H_2O_2 . Por su parte, las lacasas y tirosinasas catalizan la oxidación de fenoles y demás compuestos aromáticos, en presencia de O_2 .

Los hongos poseen la capacidad de liberar exoenzimas, lo cual los hace muy atractivos para su aplicación en sistemas de tratamiento de efluentes. Dentro de este tipo de tratamientos, especial atención se merecen los hongos de la pudrición blanca (en inglés: white rot fungi-WRF) (Figura 1.1), los cuales producen un poderoso sistema de enzimas oxidativas conocido como sistema enzimático lignolítico (en inglés: *Lignin-Degrading Enzyme System*-LDS), que les confiere la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes orgánicos (Gianfreda et al., 2006; Wesenberg, Kyriakides, & Agathos, 2003). Este sistema enzimático se compone por lacasa, Lignina Peroxidasa y Peroxidasa de Manganeso. Es posible encontrar en la bibliografía numerosos estudios de decoloración mediante tratamiento con WRF (Dhillon, Kaur, & Brar, 2012; Hailei et al., 2009; Khelifi, Ayed, Bouallagui, Touhami, & Hamdi, 2009; Selvam, Swaminathan, & Chae, 2003; Senthilkumar, Perumalsamy, & Janardhana Prabhu, 2014; Wesenberg et al., 2003).

Los tratamientos biológicos, en general, requieren del ajuste de las condiciones del efluente a tratar: pH, temperatura y nutrientes esenciales para el desarrollo de la biomasa (Forss &

Welander, 2011). Requieren elevados tiempos de tratamiento y en ocasiones se necesitan grandes superficies para llevar a cabo este tipo de degradación. Además, la expresión de las enzimas encargadas de la eliminación de contaminantes no es constante en el tiempo, sino que depende de la fase de desarrollo de los microorganismos y de los posibles inhibidores que pueda contener el efluente a tratar (Husain et al., 2009). Los procesos aeróbicos, por su parte, implican un aumento de los costos de operación en la necesidad de aireación. Cabe destacar también que este tipo de tratamientos generan problemas de disposición final de los lodos producidos.



Figura 1.1. Hongos de la pudrición blanca. Izquierda: *Phanerochaete Chrysosporium*. Derecha: *Trametes Versicolor*.

1.3.4 Tratamientos enzimáticos

El afán por aumentar las eficiencias alcanzadas mediante los tratamientos biológicos da lugar a la purificación y estudio de sistemas enzimáticos de plantas, bacterias u hongos y sus potenciales aplicaciones en la degradación de contaminantes coloreados. Las enzimas, además de ser potentes catalizadores, son capaces de eliminar compuestos recalcitrantes, en condiciones más extremas de pH, temperatura y concentración que los sistemas biológicos de los cuales son aisladas (Durán & Esposito, 2000).

Varias enzimas pertenecientes a la clase de las oxidoreductasas (EC 1), están siendo estudiadas para remover compuestos fenólicos de efluentes industriales (Hunger, 2003). Estas enzimas catalizan reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno, oxígeno o electrones entre moléculas (Chaplin & Bucke, 1990). La Figura 1.2 muestra estructuras tridimensionales de tres enzimas oxidativas ampliamente estudiadas. Lacasas y tirosinasas presentan Cu en sus sitios activos, mientras que las peroxidases presentan Fe.

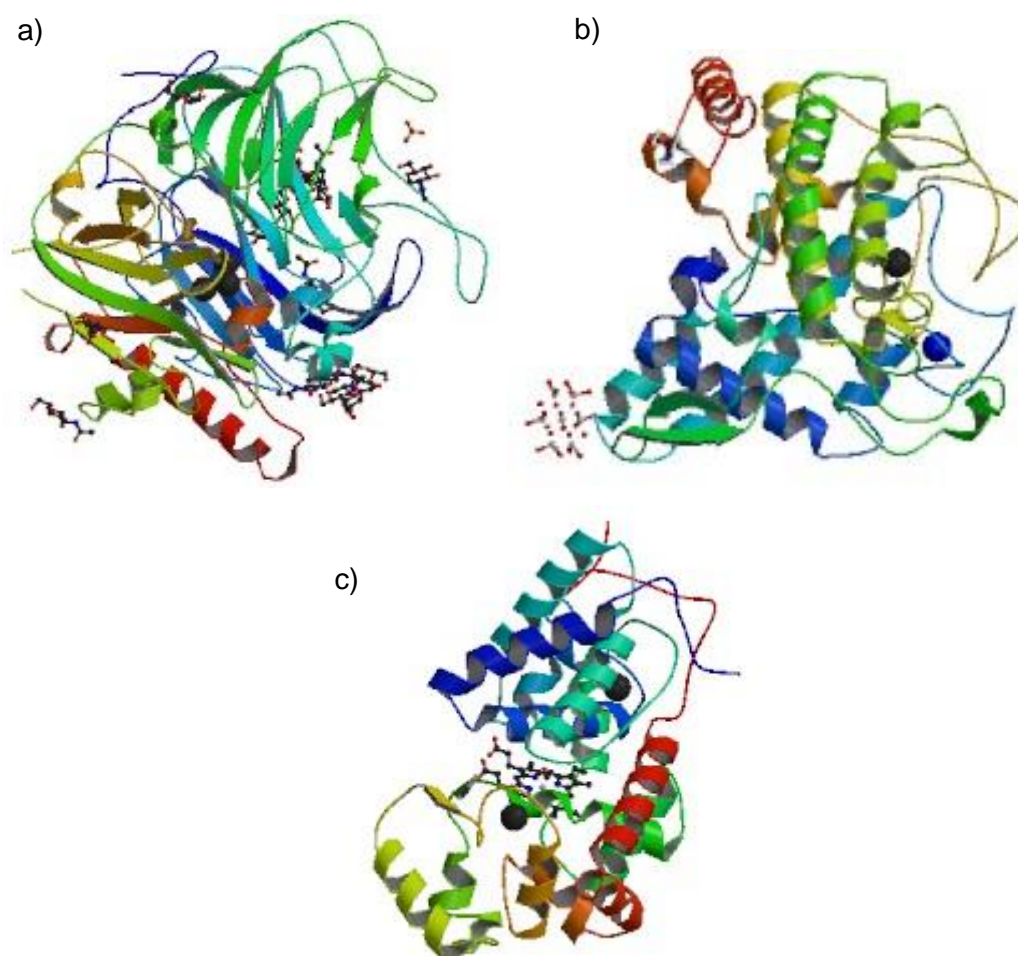


Figura 1.2. Estructuras tridimensionales de: a) Lacasa de *Botrytis aclada* (Osipov E, 2014). b) Tirosinasa de hongo (abPPO4) (Mauracher SG, 2014). c) Peroxidasa de rabano picante (HRP) (Carlsson GH, 2005).

Las lacasas catalizan reacciones de acoplamiento oxidativo y formación de productos poliméricos, a partir de la formación de radicales fenólicos (ver Figura 1.3). Son enzimas multi-cúpricas en las cuales los átomos de cobre presentes en la enzima se clasifican como Cu tipo 1, 2 y 3, y juegan un importante rol en la actividad catalítica. Estas enzimas son capaces de reducir O_2 a H_2O , oxidando a sustratos fenólicos, y aminas aromáticas o alifáticas (Kudanga, Nyanhongo, Guebitz, & Burton, 2011). El cobre tipo 1 se ubica en el sitio en donde se produce la oxidación e interviene en la captura y transferencia de electrones, mientras que los de tipo 2 y 3 participan en la reducción de O_2 (Kudanga et al.,

2011; Monteagudo, Durán, & López-Almodóvar, 2008). La posibilidad de formar productos de acoplamiento que puedan separarse físicamente del medio de reacción y la gran variedad de sustratos susceptibles a ser oxidados por estas enzimas favorecieron el estudio de sus potenciales aplicaciones industriales (Kudanga et al., 2011). Existen numerosos reportes de la aplicación de lacasas en el tratamiento de efluentes provenientes de la industria textil (Bollag & Myers, 1992; Chivukula & Renganathan, 1995; Hublik & Schinner, 2000; Kudanga et al., 2011; Russo & Giardina, 2008; R. Xu, Zhou, Li, & Zhang, 2013).

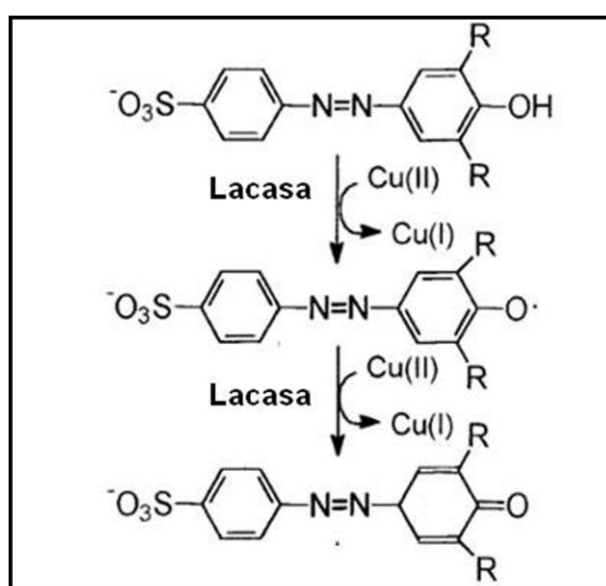


Figura 1.3. Reacción de oxidación de azocolorantes catalizada por Lacasa (Córdoba, Magario, & Ferreira, 2014)(Chivukula & Renganathan, 1995).

Las tirosinasas se conocen como polifenol oxidasas o catecolasas. Catalizan reacciones de *o*-hidroxilación de monofenoles con O₂. Los *o*-bifenoles producidos, luego de una posterior deshidrogenación forman *o*-quinonas, las cuales polimerizan por vías no enzimáticas (Figura 1.4). Estas enzimas se inhiben en presencia de CO (Durán & Esposito, 2000; Gianfreda et al., 2006). Distintos autores presentaron estudios de tirosinasas inmovilizadas en distintos soportes para su aplicación en reacciones de formación de quinonas (Sun, Payne, & Moas, 1992; Sun & Payne, 1996; Wada, Ichikawa, & Tatsumi, 1993). Estos reportes mencionan la posible inactivación de la enzima por interacción con los productos quinónicos (Durán & Esposito, 2000).

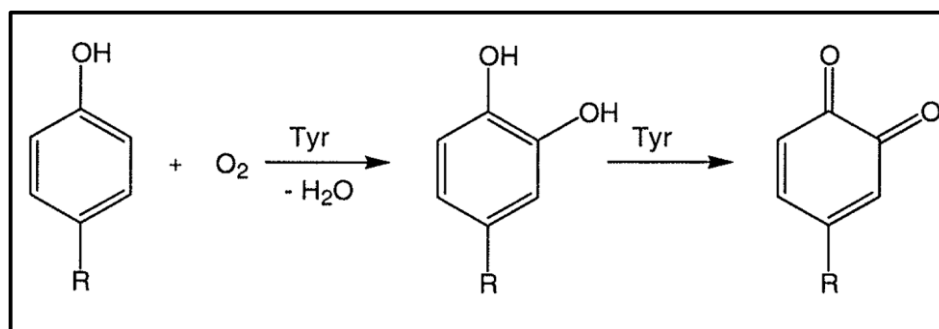


Figura 1.4. Reacciones de hidroxilación de catecol y posterior deshidrogenación, catalizada por tiosinasa.

1.4. Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1) son enzimas que oxidan compuestos fenólicos y aminas aromáticas, empleando H₂O₂ como agente oxidante. El fundamento de la catálisis de estas enzimas, así como el de las lacasas, se basa en facilitar la abstracción de H de los grupos –OH o –NH con la consecuente formación de radicales libres orgánicos. Estos radicales pueden así combinarse por un proceso conocido como polimerización oxidativa, lo que facilita la posterior eliminación de los contaminantes (Gianfreda et al., 2006). Se pueden clasificar, según las características de su sitio activo, en: hemo peroxidasas, peroxidasas de vanadio y peroxidasas no metálicas (Husain et al., 2009). Las hemo peroxidasas poseen ferri-protoporfirina IX como grupo prostético (Figura 1.5). De las seis posiciones de coordinación del Fe, cuatro se encuentran ocupadas por los cuatro átomos de nitrógeno del anillo pirrólico. La quinta posición, conocida como sitio proximal, se ocupa por un grupo imidazol perteneciente a un residuo de histidina; mientras que la sexta posición, el sitio distal, permanece vacante en el estado nativo de estas enzimas y se corresponde con el sitio en donde ocurre la reacción (H B Dunford, 1999). Estas enzimas pueden ser de origen vegetal, tales como la peroxidasa de soja (SBP) y la peroxidasa de rábano picante (HRP); y de origen fúngico como cloroperoxidasa (CPO), lignina peroxidasa (LiP) y Manganese peroxidasa (MnP) –que presenta Mn^{III} en lugar de Fe^{III} en su sitio activo–. Los mecanismos de acción, condiciones óptimas de operación y posibles aplicaciones, han sido ampliamente estudiadas (Bódalo, Gómez, Gómez, Bastida, & Máximo, 2006; Durán & Esposito, 2000; Hamid & Khalil ur, 2009). Existen en la literatura vastos estudios de degradación de

compuestos fenólicos, entre ellos colorantes, empleando este tipo de enzimas solubles e inmovilizadas en soportes sólidos (Husain et al., 2009).

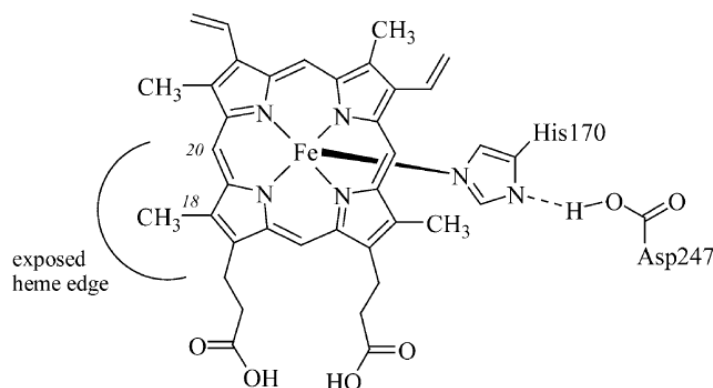


Figura 1.5. Estructura de la ferri-protoporfirina IX, grupo prostético de HRP (Veitch, 2004).

MnP es una enzima sintetizada por hongos de la pudrición blanca, la cual depende de la presencia de Mn^{+2} , el cual induce su producción y actividad. Estudios de degradación de compuestos fenólicos permitieron obtener buenos resultados de actividad catalítica de la enzima aislada (Durán & Esposito, 2000; Husain et al., 2009). La polimerización de guaiacol, *o*-cresol y 2,6-dimetoxifenol, entre otros sustratos fenólicos y aminas aromáticas catalizada por esta enzima dió lugar a la obtención de polímeros cuya masa molecular varió entre 1000 y 1500 (Iwahara & Honda, 2000). Estas polimerizaciones fueron llevadas a cabo en presencia de elevados volúmenes de cosolventes (Husain et al., 2009). Soluciones de diferentes colorantes azóicos como Congo Red, Naranja G y Naranja IV fueron decoloradas exitosamente por MnP (Cheng et al., 2007).

Otra de las enzimas constituyentes de los sistemas lignolíticos, producidos por WRF es LiP. La misma es una hemoproteína glicosilada que posee un elevado potencial redox, lo cual le otorga la capacidad de oxidar una gran cantidad de compuestos mediante mecanismos de formación de radicales libres no específicos (Pointing, 2001). Estas enzimas lignolíticas poseen la capacidad de transformar compuestos recalcitrantes en sustancias susceptibles a ser mineralizadas (transformadas en CO_2 y H_2O) (Husain et al., 2009).

Estudios de decoloraciones del azocolorante Reactive brilliant Red K-2BP catalizados por MnP, LiP y una mezcla de ambas permitieron comprobar que la actividad enzimática es altamente dependiente de la estrategia de alimentación de H_2O_2 empleada, debido al grave problema de inactivación por peróxido que sufren las peroxidasas (Yu, Wen, & Qian,

2005). Los resultados obtenidos por estos autores demuestran que la decoloración fue sensible al pH del medio, siendo óptima a valores de pH cercanos a 3.

Las peroxidasas de plantas más utilizadas son HRP y SBP. Ambas son capaces de eliminar fenoles con rendimientos similares en condiciones suaves de temperatura y pH (Bódalo et al., 2006). Ambas enzimas sufren inactivación por H_2O_2 . Además, pueden ser inactivadas por ataque de los radicales libres formados durante el ciclo catalítico, o por adsorción a los productos poliméricos (Husain et al., 2009; Wagner & Nicell, 2002). Estudios comparativos concluyeron en que SBP es menos activa que HRP, pero menos sensible a la inactivación por productos (Bódalo et al., 2006). Sumado a esto, SBP presenta actividad en un rango de pH mayor al de HRP, y un canal de acceso al sitio activo de mayor tamaño lo que le permite aceptar mayor variabilidad de sustratos que HRP (Kamal & Behere, 2008; Ryan, Carolan, & Ó'Fágáin, 2006). Estas características, sumadas a los menores costos de obtención de SBP, la convierten en una alternativa atractiva para su implementación en sistemas de tratamiento de efluentes (Ryan et al., 2006).

1.4.1 Peroxidasa de Rábano Picante

La peroxidasa de rábano picante o *HorseRadish Peroxidase* (HRP) (*Armoracia rusticana*) en particular la isoenzima C ó HRP-C, ha sido objeto de estudio exhaustivo. La posibilidad de la producción de la enzima recombinante, la elucidación de la estructura tridimensional por rayos X y la descripción de los intermediarios en el ciclo catalítico de la enzima permitieron importantes avances en la comprensión de la relación estructura-función de esta enzima. HRP tiene capacidades probadas de eliminación de compuestos fenólicos de soluciones acuosas (Husain et al., 2009; Pirillo, Einschlag, Ferreira, & Rueda, 2010a; Pirillo, García Einschlag, Rueda, & Ferreira, 2010a; Reihmann & Ritter, 2006; Ryan et al., 2006; Saidman, Rueda, & Ferreira, 2006; Wagner & Nicell, 2002; Q. Xu, Mao, Liu, Zhu, & Sheng, 2006).

La estructura polipeptídica de HRP se compone por 308 aminoácidos y dos tipos de centros metálicos: Fe(III) protoporfirina IX (grupo hemo) y dos átomos de calcio. El grupo hemo se une a la proteína por un enlace coordinado en la quinta posición del Fe con el residuo His170 de la enzima. El segundo sitio axial de coordinación (sexta posición) se encuentra desocupado en el estado basal de la enzima, disponible para formar un enlace con H_2O_2 durante el ciclo catalítico. Los átomos de calcio se encuentran enlazados a la enzima mediante una red de enlaces puente hidrógeno y la pérdida de los mismos se traduce en la pérdida de actividad y estabilidad térmica de la enzima. La estructura secundaria de la

enzima se compone principalmente de α -hélices y pequeñas porciones de láminas β (ver Figura 1.2.c) (Veitch, 2004).

La Figura 1.6 presenta el espectro UV-Visible de HRP en solución acuosa de buffer fosfato pH 7, 0.1 M. Se observan en el espectro el pico característico de absorción de las proteínas a 280 nm, y la banda soret de HRP a 403 nm, con un hombro a 380 nm característico de Fe(III) pentacoordinado. La relación de la absorbancia a 403 nm sobre 280 nm se conoce como reinheitszahl (RZ) o purity number y debe hallarse entre 3.0 y 3.4 en el caso de preparaciones de HRP de elevada pureza (H B Dunford, 1999). Del espectro de la Figura 1.5, RZ toma el valor de 7, lo cual puede deberse a la formación de agregados de proteínas en un medio de buffer, así como también la adsorción de iones pertenecientes al buffer empleado (M L Foresti & Ferreira, 2005).

La polimerización de fenoles y aminas aromáticas catalizada por HRP ha sido ampliamente estudiada. Las aplicaciones estudiadas de peroxidasas en descomposición de fenoles incluyen la detoxificación de suelos y de soluciones acuosas. Klibanov y colaboradores emplearon por primera vez HRP en la eliminación de fenol de soluciones acuosas, con peróxido de hidrógeno como oxidante obteniendo resultados exitosos (Klibanov & Morris, 1981; Klibanov, Tu, & Scott, 1983). No obstante, HRP mostró signos de inactivación durante la reacción.

Diferentes estudios presentan evidencia de distintos mecanismos de inactivación de HRP: (1) coordinación improductiva de H_2O_2 (Baynton, Bewtra, Biswas, & Taylor, 1994; H B Dunford, 1999; Hiner et al., 2001); (2) interacción de la enzima con intermediarios radicalarios de reacción (Q. Huang, Tang, & Weber Jr, 2005; J A Nicell & Wright, 1997; Wagner & Nicell, 2002); y (3) adsorción de los productos oligoméricos de reacción sobre el sitio catalítico y bloqueo (Husain et al., 2009; J A Nicell, Saadi, & Buchanan, 1995; Wagner & Nicell, 2002).

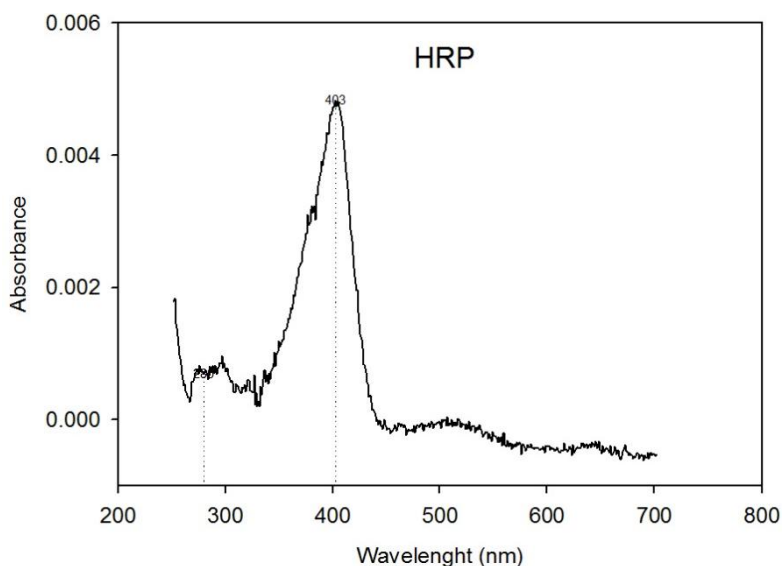


Figura 1.6. Espectro UV-Visible de HRP en solución buffer fosfato pH 7, 0.1 M.

El efecto de la naturaleza de los sustratos sobre las características de los oligómeros/polímeros obtenidos por precipitación ha sido objeto de análisis de diferentes estudios (Jian, Taylor, Huixian, Biswas, & Bewtra, 1994; Kobayashi & Higashimura, 2003).

Un gran número de trabajos de investigación se han propuesto como objetivo el mejoramiento, la optimización y el aumento de la actividad enzimática de HRP en la eliminación de fenol y derivados fenólicos (Bódalo et al., 2006; Curvetto et al., 2006a; Hamid & Khalil ur, 2009; Q. Huang et al., 2005; Nazari, Esmaceli, Mahmoudi, Rahimi, & Moosavi-Movahedi, 2007; Saidman et al., 2006). El agregado de aditivos, como polietilenglicol, quitosano o cationes metálicos, como níquel (Ni^{+2}) demostraron ser efectivos en la disminución de la inactivación (Hamid & Khalil ur, 2009; Q. Huang et al., 2005; Nazari et al., 2007). Los aditivos poliméricos se adhieren a los productos condensados de reacción favoreciendo su precipitación. Wu y colaboradores demostraron que la adición de polietilenglicol al medio de reacción promueve su interacción con los productos poliméricos de reacción protegiendo de esta manera a la enzima (Wu, Taylor, Biswas, & Bewtra, 1997). Por otro lado, valores de pH ligeramente ácidos del medio de reacción producen la neutralización de los polifenoles –cuyos valores de pKa son menores al de los fenoles de partida–, disminuyendo su solubilidad (Bódalo et al., 2006; Wagner & Nicell, 2002).

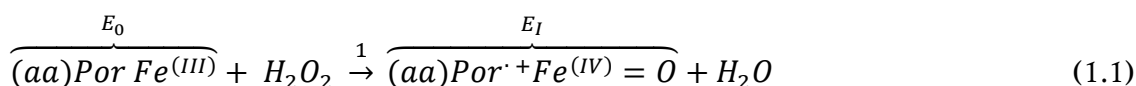
La capacidad de HRP de eliminar compuestos fenólicos permitió el estudio de la aplicación de este sistema a compuestos de mayor complejidad, como lo son los colorantes industriales. Existen en nuestro grupo de investigación antecedentes de decoloración de soluciones de Alizarina, Negro de Eriocromo R y Fluoresceína mediante el empleo de HRP y H_2O_2 (Pirillo,

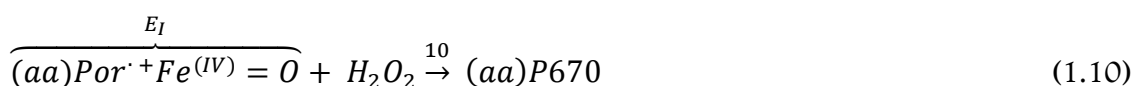
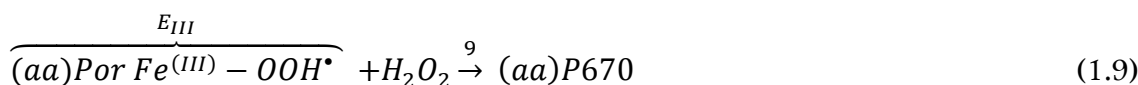
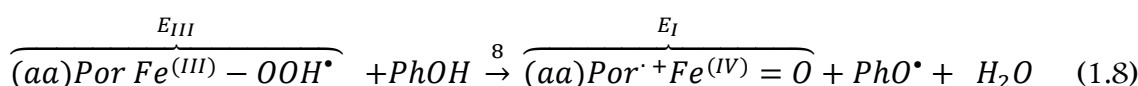
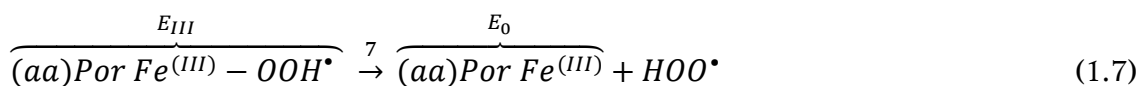
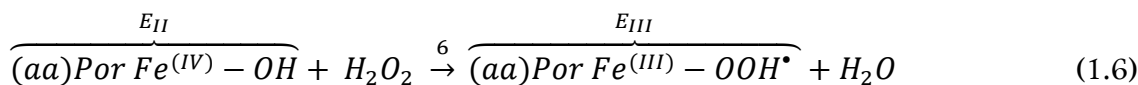
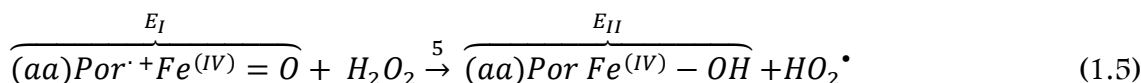
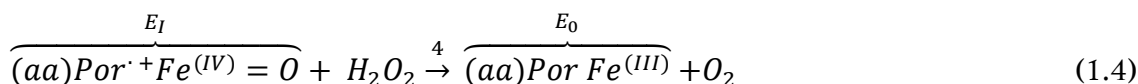
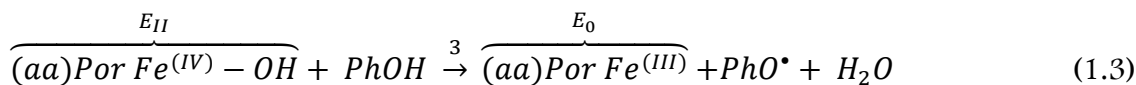
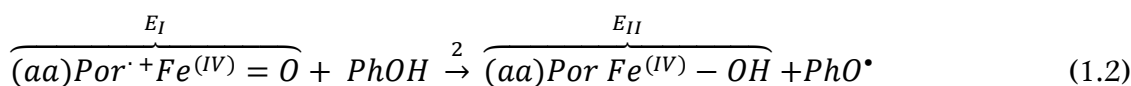
Einschlag, et al., 2010a; Pirillo, García Einschlag, et al., 2010a; Pirillo, Rueda, & Ferreira, 2012). HRP demostró su capacidad de degradar los tres colorantes estudiados a compuestos de menor peso molecular, para lo cual los radicales orgánicos productos de la oxidación catalítica inician reacciones de degradación, en lugar de las reacciones de acoplamiento que tienen lugar para los radicales fenoxilos (Pirillo, Einschlag, et al., 2010a; Pirillo, García Einschlag, et al., 2010a).

El estudio de los productos de reacción que permanecen en solución es importante cuando se persigue degradar contaminantes mediante su descomposición química. La medida de la toxicidad de las soluciones luego del tratamiento propuesto constituye un indicador clave de la efectividad de los procesos de bioremediación de efluentes. Wagner y colaboradores estudiaron la toxicidad de soluciones fenólicas luego del tratamiento con HRP (Wagner & Nicell, 2002). Los resultados reportados indican que la toxicidad de las soluciones tratadas disminuye abruptamente con un agregado extra de H_2O_2 al medio de reacción, así como también con el agregado de quitosano como aditivo. Existen también reportes de la toxicidad remanente de soluciones tratadas con HRP/ H_2O_2 , de los colorantes Remazol Turquoise Blue G y Lanaset Blue 2R empleando organismos como bioindicadores. En este estudio se evaluó la toxicidad sobre *Daphnia magna* (crustáceo cuyo tamaño va de de 1 a 3 mm, ampliamente utilizado en técnicas de bioensayos) de las soluciones de colorantes sin tratar y tratadas, demostrando una clara disminución de la misma (Wagner & Nicell, 2002). No obstante, similares estudios empleando *Artemia salina* (crustáceo branquiópodo) no presentaron disminución en los valores medidos de toxicidad (Ulson de Souza, Forgiarini, & Ulson de Souza, 2007).

1.4.2 Mecanismo catalítico de HRP

El mecanismo catalítico de HRP fue estudiado en profundidad, incluyendo los intermediarios participantes y la función de los aminoácidos claves en las reacciones que tienen lugar durante la oxidación de compuestos fenólicos. El conjunto completo de reacciones catalizadas por HRP en presencia de H_2O_2 y sustrato orgánico reductor se presentan a continuación. Además, el Esquema 1.3 presenta las reacciones principales del ciclo catalítico de HRP y los cambios en el sitio activo que implican la conformación de un nuevo intermediario, mientras que el Esquema 1.4 incluye todas las reacciones que pueden tener lugar durante la oxidación.





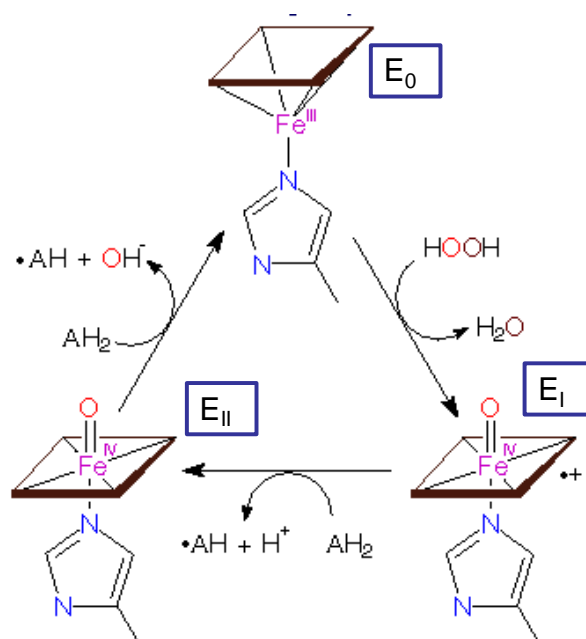
En una primera reacción (reacción 1.1) el peróxido de hidrógeno oxida el estado nativo de la enzima (E_0) en Compuesto I (catión radical π) por escisión heterolítica del enlace O–O de H_2O_2 (Reihmann & Ritter, 2006). El compuesto I ($(aa)Por^{\cdot+} Fe^{(IV)}=O$) de HRP es capaz de oxidar a una molécula de sustrato reductor, que puede ser el compuesto fenólico (PhOH) o sus productos semi-oxidados, en una reacción redox de transferencia de un único electrón mediante la que se genera un radical orgánico (PhO^{\cdot}) y el Compuesto II ($(aa)Por^{\cdot+} Fe^{(IV)}-OH$) de HRP (reacción 1.2). Finalmente, el Compuesto II reacciona con otra molécula de sustrato reductor para retornar a su estado nativo con formación de un segundo radical orgánico (reacción 1.3).

En HRP nativa, el hierro se encuentra en su estado de oxidación +3, penta-coordinado al grupo hemo de la enzima. La estructura proteica de la enzima juega un rol clave en el mecanismo de oxidación. La presencia de una histidina protonada (His170) favorece la unión del peróxido de hidrógeno al $Fe^{(III)}$ de la enzima nativa. Uno de los átomos de

oxígeno de H_2O_2 forma un enlace dativo con el Fe(III) de HRP, formando un intermediario altamente inestable conocido como Compuesto 0 (complejo Fe(III)-hidroperóxido) (Reihmann & Ritter, 2006). Esta activación del grupo hemo es promovida por la ayuda de un aminoácido nucleofílico de la enzima (His42), que actúa como aceptor de un H^+ de H_2O_2 . Posteriormente, uno de los átomos de oxígeno del peróxido, se desprende como una molécula de agua y la enzima forma el Compuesto I. La ruptura heterolítica que se produce en este paso es asistida por otro aminoácido de la enzima (Arg38) que facilita un protón para permitir la liberación de la molécula de H_2O . El Compuesto I contiene Fe(IV) coordinado al catión radical π (Everse, 1997; Reihmann & Ritter, 2006). El sitio activo de HRP es altamente hidrofóbico y la formación del radical fenoxi se produce por sustracción de hidrógeno por parte del catión radical π , en la cual participa también el residuo His42 de HRP. Esta ruptura homolítica del enlace H-O del sustrato fenólico, con la necesaria protonación del Compuesto I provoca la formación del Compuesto II. El Compuesto II es una especie oxoperferril- (Fe(IV)) (Reihmann & Ritter, 2006). Ambas especies catalíticas (Compuestos I y II) son altamente oxidantes, con potenciales redox cercanos a +1 V (Veitch, 2004).

Además del ciclo catalítico mencionado, se han postulado distintas reacciones laterales que pueden ocurrir por interacción improductiva con H_2O_2 que intentan explicar la observada inactivación de HRP por peróxido.

El Compuesto I puede reaccionar con H_2O_2 , el cual puede actuar como sustrato reductor (reacción 1.4), en una reacción que conduce a la formación de HRP en su estado nativo con la liberación de O_2 . Esta vía de reacción se conoce como modo catalítico de HRP, e implica una reducción del Compuesto I por transferencia de dos electrones desde H_2O_2 . Existen en la bibliografía reportes de la existencia de esta vía de reacción en ausencia de sustratos orgánicos reductores (Hernández-Ruiz, Arnao, Hiner, García-Cánovas, & Acosta, 2001; Hiner et al., 2001).



Esquema 1.3. Reacciones principales del ciclo catalítico de HRP. AH₂ representa el sustrato fenólico.

Por otro lado, la reacción de reducción de Compuesto I con H₂O₂ puede ocurrir como una reducción con transferencia de un electrón para dar lugar a la formación de Compuesto II (reacción 1.5). Posteriormente, el Compuesto II puede reaccionar con H₂O₂ con la consecuente formación del Compuesto III ((aa)Por Fe(III)-O₂^{•-}) (reacción 1.6), el cual es altamente estable y puede regenerar el estado nativo (reacción 1.7) o el Compuesto I (reacción 1.8) a muy bajas velocidades (Hiner et al., 2001). Las reacciones 1.5 y 1.7 implican la generación de radicales superóxido (OO^{•-}), el cual puede provocar la liberación de O₂ por medio de la reacción: $2 \text{O}_2^{\bullet-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (Hiner et al., 2001). Este set de reacciones con H₂O₂, alternativas a la vía catalítica se conoce como vía *pseudo*-catalítica y es reconocida como la vía posible de generación de O₂ de las monoperoxidasas, como es el caso de HRP (Vlasits et al., 2010). No obstante, a pesar de haber sido detectada la formación de estas especies radicalarias, resultados de simulación computacional reportados por Hiner y colaboradores indican que la principal vía de consumo de H₂O₂ en ausencia de sustratos reductores es la vía catalítica de reacción (Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001). A su vez, el exceso de H₂O₂ puede provocar la inactivación irreversible de la enzima a partir del Compuesto III (reacción 1.9) o del Compuesto I (reacción 1.10), por formación de verde-hemoproteína (P670) (Adediran, 1996; H B Dunford, 1999; Hernández-Ruiz et al., 2001; Reihmann & Ritter, 2006).

& Nicell, 2002) constituyen los mayores obstáculos para su empleo en efluentes. Por otra parte, la actividad enzimática es óptima a valores ácidos y neutros de pH (Hamid & Khalilur, 2009). Esta limitada estabilidad que presenta HRP en las condiciones normales de los tratamientos de remediación, implican la necesidad de emplear grandes cantidades de enzima fresca, lo que se traduce en un notable aumento de los costos de operación (Husain et al., 2009).

Existen diversos trabajos publicados sobre la utilización de las peroxidases de los hongos de la pudrición blanca como alternativas de menor costo a HRP (Husain et al., 2009; Mohorčič, Teodorovič, Golob, & Friedrich, 2006; Pointing, 2001), como así también de biomiméticos (Ambrosio, Rueda, & Ferreira, 2009; Kadokawa, Kokubo, & Tagaya, 2002; Nagiev et al., 2000; Singh et al., 2001; Yao et al., 2014). En el campo de los biomiméticos, los derivados de las porfirinas de hierro y de complejos férricos o ferrosos con ligandos derivados de anilina se reportan como eficientes en el tratamiento de efluentes acuosos contaminados con fenol y derivados (Crestini, Pastorini, & Tagliatesta, 2004; Emmert Iii Thomas, J., Hon, B., Gengenbach, A. J., 2008; Hemmert, Renz, & Meunier, 1999).

1.5. Metaloporfirinas

Los complejos porfirínicos de hierro constituyen el grupo prostético de las hemoproteínas. Una gran cantidad de procesos biológicos se encuentran mediados por estos compuestos. Hemoglobina y mioglobina son responsables del transporte de dioxígeno durante la respiración, Citocromo B y C catalizan el transporte de electrones durante la producción de energía celular o la detoxificación de sustancias foráneas, mientras que catalasas y peroxidases catalizan la reducción de H_2O_2 en distintos sistemas. El grupo prostético de todas estas proteínas se compone por estructuras porfirínicas de Fe(II) o Fe(III), conocidas como hemo o hemin respectivamente (*Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*, 1994).

La estructura porfirínica es conocida como protoporfirina IX y se presenta en la Figura 1.7. El hierro posee seis electrones d capaces de formar enlaces coordinados. En las protoporfirinas de Fe, la porfirina se une al metal formando cuatro enlaces de coordinación, mientras que los sitios axiales de coordinación quedan libres (*Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*, 1994). En las proteínas, uno de estos sitios es ocupado por un residuo aminoacídico. En el caso de HRP y catalasa histidina es el ligando axial (Veitch, 2004).

Las metaloporfirinas de origen natural o sintético se convierten en una alternativa económica y versátil a la hora de sustituir biocatalizadores. Su capacidad de oxidar

diferentes sustratos fenólicos ha sido probada (Ghosh et al., 2008; Hodges, Lindsay Smith, & Oakes, 1997; Pirillo, Einschlag, et al., 2010a; Pirillo, García Einschlag, et al., 2010a). La principal aplicación de estos catalizadores es en reacciones de oxidación en síntesis orgánica (W. Nam, Mi Hee, Sun Kyung, & Kim, 2000; Stephenson & Bell, 2007a, 2007b). La susceptibilidad del ligando porfirínico a la oxidación destructiva es uno de los principales problemas asociados a su aplicación.

1.5.1 Hematin

Hematin es una hidroxil-ferri-protoporfirina IX de origen natural (Figura 1.7.) presente en la sangre. Su caracterización estuvo motivada principalmente por el desarrollo de drogas para el tratamiento de la malaria (De Villiers, Kaschula, Egan, & Marques, 2007). Su valor comercial es del orden del 10% del valor de HRP y su performance como catalizador fue probada exitosamente en la oxidación de etilfenol, en presencia de H₂O₂ (Akkara, Wang, Yang, & Gonsalves, 2000). Posteriormente, la efectividad de hematin en la decoloración de soluciones acuosas diluidas de colorantes azoicos como Azul Negro de Eriocromo R, entre otros sustratos fenólicos fue estudiada en distintas oportunidades (Ambrosio et al., 2009; Pirillo, Einschlag, et al., 2010a; Pirillo, García Einschlag, et al., 2010a; Saidman et al., 2006; Singh et al., 2001). Estos precedentes permiten considerar a hematin como una potencial alternativa a HRP, tomando en cuenta principalmente las ventajas asociadas a su menor costo. Sin embargo, la baja solubilidad y capacidad de formar agregados a bajos valores de pH limitan la aplicación de hematin. A los fines de superar estos problemas, se han propuesto diferentes estrategias como la modificación química o la inmovilización (Adams, Adams, Berman, & Baldwin, 1982; Ambrosio et al., 2009; Curvetto et al., 2006a; Moosavi-Movahedi et al., 2008; Saidman et al., 2006).

El estudio del comportamiento en solución de las porfirinas de hierro permite analizar el efecto del pH del medio de reacción sobre la solubilidad de los mismos y su capacidad de formar dímeros, así como la naturaleza de los dímeros formados (De Villiers et al., 2007).

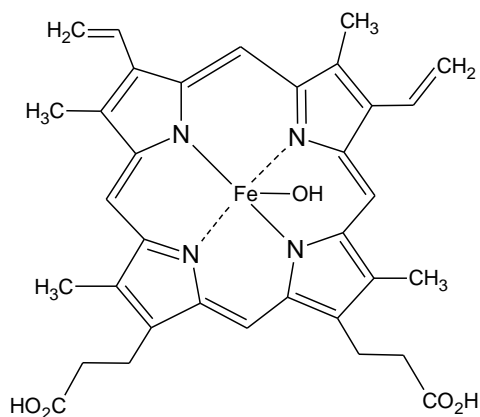


Figura 1.7. Hematin.

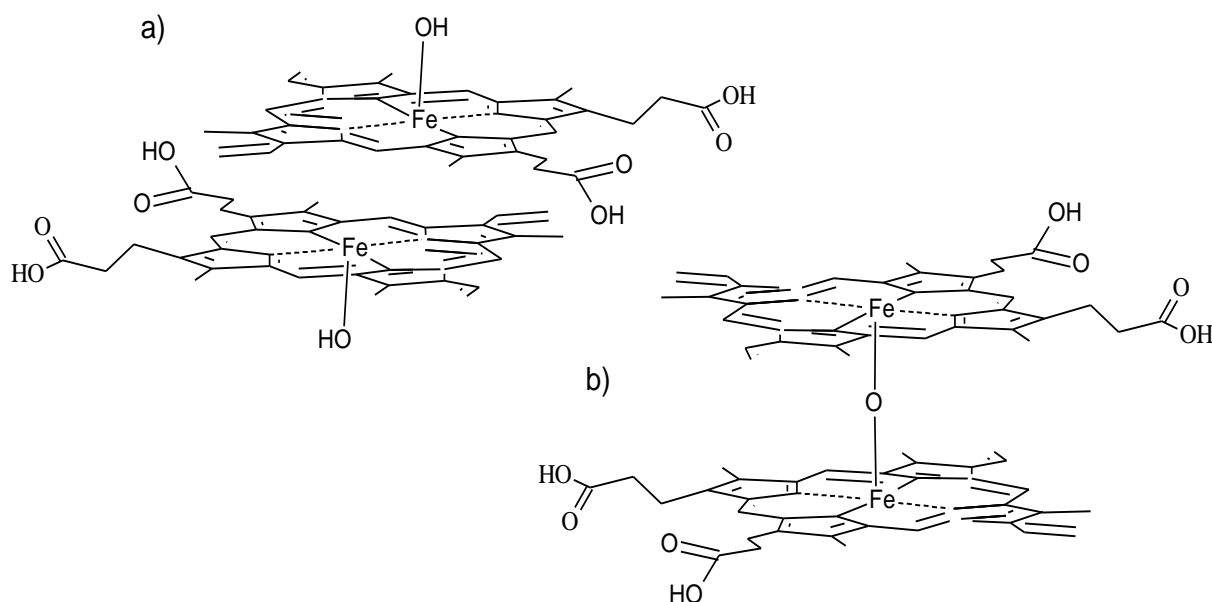


Figura 1.8. Estructuras diméricas que puede formar Hematin. a) Dímeros $\pi-\pi$. b) Dímeros $\mu-\text{oxo}$.

Estos compuestos pueden agregarse, dependiendo de factores como pH, concentración, fuerza iónica y polaridad del solvente (Asher, de Villiers, & Egan, 2009). La Figura 1.8 presenta las estructuras de los dímeros que puede formar hematin en solución. Los dímeros $\pi-\pi$ se observan en soluciones con solventes próticos, ya que la naturaleza de la interacción es de tipo hidrofóbica. Sin embargo, el aumento de concentración de sal del medio, así como el agregado de solventes apróticos, como el DMSO pueden provocar la formación de dímeros $\mu-\text{oxo}$, los cuales se caracterizan por la formación de un enlace

covalente Fe–O–Fe. Estos resultados, obtenidos por Asher y colaboradores, demostraron que hematin en solución acuosa forma espontáneamente dímeros no covalentes π – π , los cuales pueden transformarse mediante una reacción reversible en dímeros μ –oxo por alteración de las condiciones del medio (Asher et al., 2009; De Villiers et al., 2007).

El espectro de hematin en solución acuosa de buffer fosfato pH 7, 0.1 M se presenta en la Figura 1.9. En el espectro se observa la presencia del pico correspondiente a la banda solet, a 394 nm y el hombro a 347 nm. La formación de agregados altera las absorptividades de la banda a 394, mientras que la absorptividad a 347 permanece constante (De Villiers et al., 2007). En el recuadro se observa en una ampliación, la banda de transferencia de carga cercana a 610 nm, la cual es asignable a la formación de dímeros no covalentes π – π (De Villiers et al., 2007). En este tipo de dímeros, los Fe(III) pentacoordinados se enfrentan de manera tal que los ligandos axiales se orienten hacia el exterior (ver Figura 1.8). De acuerdo con los datos obtenidos experimentalmente, el 17% de las moléculas totales de hematin se encuentran como monómeros en las condiciones estudiadas de la Figura 1.8. La formación de dímeros μ –oxo puede determinarse por la presencia de un nuevo pico a 575 nm (Asher et al., 2009).

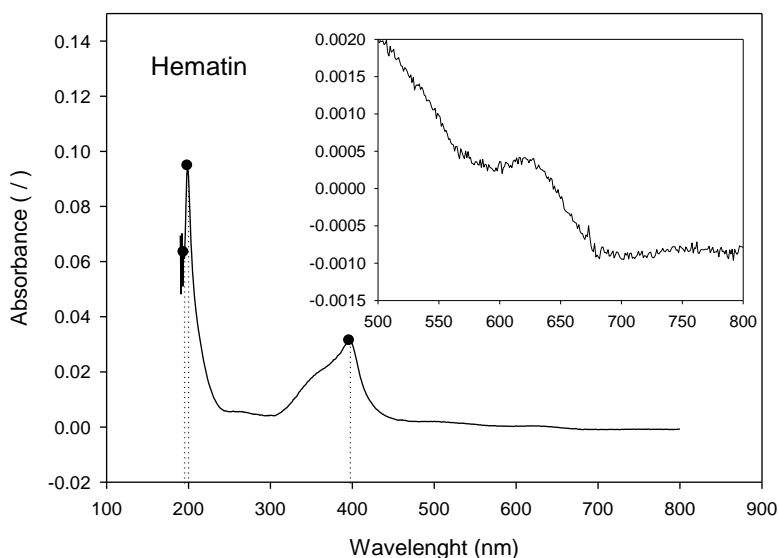


Figura 1.9. Espectro UV–Visible de solución de hematin en buffer pH 7, 0.1M. En el recuadro: ampliación del espectro de hematin en iguales condiciones entre 500 y 800 nm.

1.5.2 Mecanismo catalítico de metaloporfirinas

El accionar de HRP se encuentra bien definido, mientras que el mecanismo oxidativo de las metaloporfirinas es aún una incógnita. Estudios reportan vías de reacción de metaloporfirinas similares al mecanismo enzimático, no obstante se postulan mecanismos con ruptura homolítica del enlace O–O de H₂O₂ (W. Nam, Han, et al., 2000), o mecanismos basados en los sistemas Fenton, con formación de intermediarios Fe⁺² (Stephenson Bell, A.T. , 2005). La mayoría de estos mecanismos involucran la generación de radicales OH•, a diferencia del mecanismo de HRP. Debido a la probada acción cooperativa de residuos aminoacídicos en la coordinación de sustratos y ruptura de enlaces claves en la formación de los intermediarios catalíticos de las peroxidasas, es imaginable que la ausencia de estructura proteica en hematin debe impactar en el mecanismo catalítico.

Acción catalítica tipo Fenton

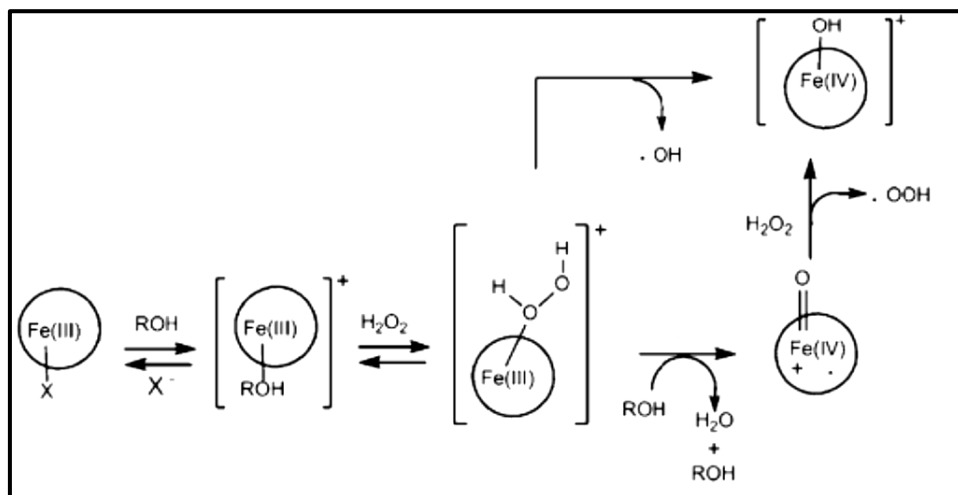
La química del hierro en solución y sus reacciones con H₂O₂ han sido ampliamente estudiadas. Fe(II) y Fe(III) en solución se encuentran hexa- coordinados con ligandos H₂O, OH⁻ o OOH⁻. El sistema conformado por las sales de Fe(II) y H₂O₂ se denomina Fenton. En los sistemas Fenton el Fe⁺² cambia su estado de oxidación entre +2 y +3 y el enlace O– O de H₂O₂ se escinde homolíticamente, con la consecuente generación de radicales hidroxilo (OH•) y peroxilo (OOH•) como especies oxidantes (I Magario, García Einschlag, Rueda, Zygadlo, & Ferreira, 2012). No obstante, existe evidencia espectroscópica de formación de especies iónicas oxo-Fe en presencia de Fe⁺³ (Fenton-like), como FeO⁺², que contiene Fe(IV), análogo al Compuesto I de peroxidasas; y FeO⁺³, que contiene Fe(V) (Bray & Gorin, 1932; H Brian Dunford, 2002). Ghosh y colaboradores estudiaron la cinética de las reacciones de oxidación catalizadas por activadores de H₂O₂ Fe(III)-TAML (complejo sintético de Fe(III) y Ligando Macrocíclico Tetra- Amido). Los resultados que obtuvieron permiten postular un mecanismo de reacción análogo al de las enzimas peroxidasas, con formación de oxo- especies de Fe(IV) y (V), oxidación de sustratos por abstracción de un H y actividad catalasa de formación de dióxigeno en ausencia de sustrato orgánico (Ghosh et al., 2008).

Acción catalítica de metaloporfirinas sintéticas

El estudio del mecanismo de las porfirinas de hierro acarrea una larga discusión respecto a las especies participantes y la formación o no de especies reactivas de oxígeno como lo son los radicales hidroxilos, peroxilos o superóxidos. El peróxido de hidrógeno coordina la sexta posición del Fe en las porfirinas férricas. Traylor y Xu proponen la ruptura heterolítica del enlace peroxídico con formación de catión radical π de Fe(IV) y radicales $\text{HOO}\cdot$ y $\text{HO}\cdot$ altamente reactivos (Traylor & Xu, 1987, 1990). Paralelamente, diferentes estudios presentan resultados que concuerdan con un mecanismo de oxidación de un electrón, con ruptura homolítica del enlace peroxídico y formación de la especie porfirínica de Fe(IV) junto al radical hidroxilo (Almarsson & Bruce, 1995; Bruce, 1991). A su vez, existe también un mecanismo propuesto para metaloporfirinas sintéticas catalizando reacciones de epoxidación que supone la presencia de rupturas homolíticas y heterolíticas simultáneas (Esquema 1.5) (W. Nam, Han, et al., 2000; Stephenson Bell, A.T. , 2005; Stephenson & Bell, 2007a). Los autores postulan que. (1) la naturaleza prótica y aprótica de los solventes, así como su acidez; (2) la naturaleza de los ligandos del complejo porfirínico como donores o aceptores de electrones; o (3) la presencia de halógenos en los ligandos y sustratos son factores que afectan la relación entre las rupturas homolíticas y heterolíticas, así como también los productos de oxidación formados. Un aumento de la densidad electrónica cercano al enlace O-O del complejo Por Fe(III)-OOR favorece la ruptura homolítica del enlace. Esto último implica que una estructura pobre en electrones de la metaloporfirina, del sustituyente del hidropéroxido y del ligando axial, tienden a provocar la escisión heterolítica del enlace O-O (W. Nam, Lim, & Oh, 2000; W. Nam, Han, et al., 2000). Por otro lado, en trabajos llevados a cabo por Stephenson y Bell, la naturaleza aprótica de los solventes favoreció la formación de radicales inorgánicos, lo que provocó un mayor consumo de H_2O_2 y desactivación de las porfirinas analizadas (Stephenson & Bell, 2007b).

Hay estudios con diferentes porfirinas de hierro que demuestran la existencia de especies oxoperferril catión radical π y oxoperferril como los análogos del compuesto I y compuesto II de las peroxidasas, respectivamente (W. Nam, Mi Hee, et al., 2000; Stephenson Bell, A.T. , 2005; Traylor & Xu, 1990). La formación de porfirinas oxo-Fe(IV) por reacción con *ter*butil hidropéroxido en medio acuoso ha sido detectada mediante espectroscopías UV-Visible, NMR y EPR, y de resonancia Raman. Además, se determinó que los ligandos aceptores de electrones en los anillos porfirínicos actúan estabilizando dichas especies. No obstante, empleando metanol como solvente no fue posible detectar la formación de oxoespecies (Bell et al., 1991; Hodges et al., 1997). La participación de oxo-Fe(IV) catión radical π en la hidroxilación de alquenos fue determinada por UV-Visible a -40°C en

mezcla de solventes CH_2Cl_2 y CH_3CN con complejos porfirínicos acil-peroxo-Fe(III) (W. Nam, Lim, et al., 2000).



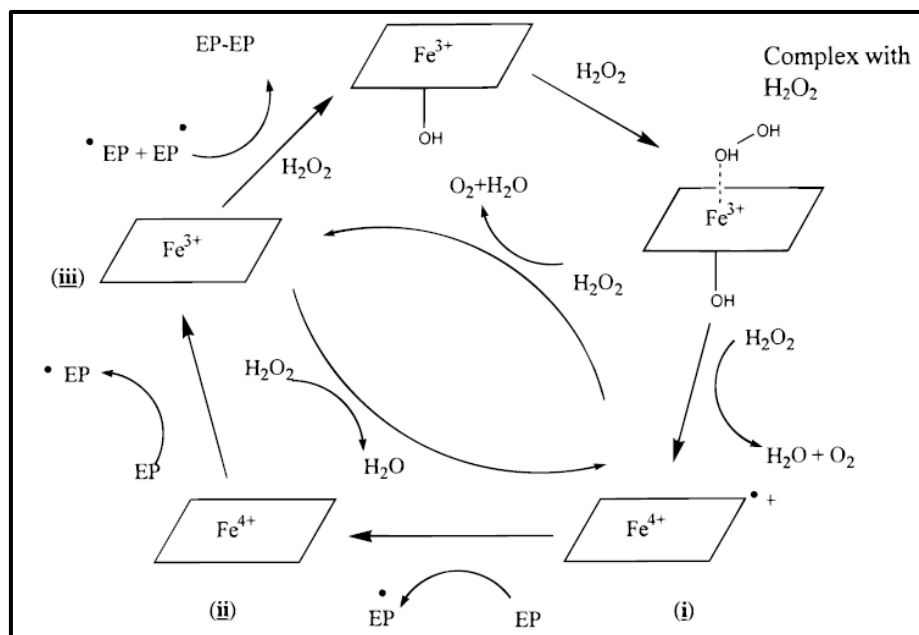
Esquema 1.5. Heterólisis y homólisis de peróxido de hidrógeno catalizada por porfirinas de Fe (III). Esquema publicado por Ned Stephenson y Alexis Bell (Stephenson & Bell, 2007a).

La pérdida de actividad de estos catalizadores debe ser considerada en la discusión respecto de los mecanismos de reacción. Stephenson y Bell sostienen que la producción de radicales inorgánicos debida a la homólisis del enlace O-O aumenta la degradación de las metaloporfirinas. A su vez, la formación de dímeros μ -oxo disminuye la actividad catalítica (Stephenson & Bell, 2007a).

Acción catalítica de hematin

En comparación con las porfirinas de hierro sintéticas meso-sustituidas, hematin contiene un sustituyente pirrol como el que compone el sitio activo de las hemo-enzimas. Solo se diferencia de estas en la coordinación de la quinta posición, ya que en las enzimas esta es ocupada por la estructura proteica. Mediante estudios de espectroscopía Moesbauer, Akkara y sus colaboradores postularon un mecanismo de acción similar al de HRP para hematin en la polimerización de fenoles que se presenta en el Esquema 1.6 (Akkara et al., 2000). Las diferencias propuestas residen en la remoción del grupo -OH coordinado en la quinta posición de hematin durante la formación del intermediario I y un mayor consumo

de sustrato oxidante (H_2O_2) por parte de hematin en contraste con la enzima. Además, los autores proponen también la presencia de una vía de inactivación reversible con formación del Compuesto III (Akkara et al., 2000). Sin embargo, trabajos anteriores realizados con hematin, basados en espectroscopía EPR, postulan la escisión homolítica del enlace peroxídico de peróxidos orgánicos y la presencia de $\text{OOH}\cdot$ y $\text{OH}\cdot$ (Kalyanaraman, Mottley, & Mason, 1983; Rafiquzzaman, Komagoe, & Tamagake, 1995).



Esquema 1.6. Mecanismo de polimerización de etilfenol (EP) propuesto por Joseph Akkara (Akkara et al., 2000). Notar que los intermediarios i y ii son análogos a Cpd I y II de HRP.

Contemplando la discusión existente, a la hora de analizar el mecanismo de decoloración de hematin, su eficacia y los productos del tratamiento, se plantean las siguientes cuestiones a determinar durante el desarrollo de esta tesis:

- (1) ¿El mecanismo de eliminación de los colorantes estudiados es degradativo o polimerizante?
- (2) ¿Qué efecto tiene la estructura del sustrato en el mecanismo de hematin?
- (3) ¿La ruptura del enlace O–O es homolítica o heterolítica en las condiciones a estudiar?

- (4) ¿Son las especies reactivas de oxígeno las responsables de la oxidación de los sustratos orgánicos? O de manera análoga a HRP se forman radicales orgánicos por abstracción de H.
- (5) ¿Cuáles son las reacciones de consumo de H_2O_2 que intervienen en los sistemas de reacción a evaluar?
- (6) ¿Cuáles son las vías de inactivación del catalizador que es necesario inhibir?

1.6. Inmovilización de catalizadores

El empleo en fase soluble de catalizadores en procesos de escala industrial trae aparejado una serie de inconvenientes:

- (1) Inestabilidad química y térmica de los catalizadores homogéneos (especialmente enzimáticos), lo cual puede provocar la pérdida de actividad producto de las condiciones del medio.
- (2) La incorporación del catalizador homogéneo al medio de reacción, lo que implica la necesidad de incluir etapas posteriores de separación, cuando estas sean posible.
- (3) La dificultad de ser reutilizado para lograr una mejor eficiencia económica de los procesos catalíticos.
- (4) La dificultad de diseñar reactores catalíticos de operación continua.

La necesidad de contar con un catalizador heterogéneo para el desarrollo de un sistema catalítico de tratamiento de contaminantes fenólicos requiere, por lo tanto, del estudio de una etapa de inmovilización.

Se conoce como inmovilización al proceso mediante el cual se restringe, completa o parcialmente, el movimiento de enzimas, células, o cualquier otro catalizador homogéneo, por unión de los mismos a un soporte (Ivana Magario, 2009). El alto costo de las enzimas favoreció el desarrollo de distintos métodos de inmovilización, los cuales se presentan en la Figura 1.10.

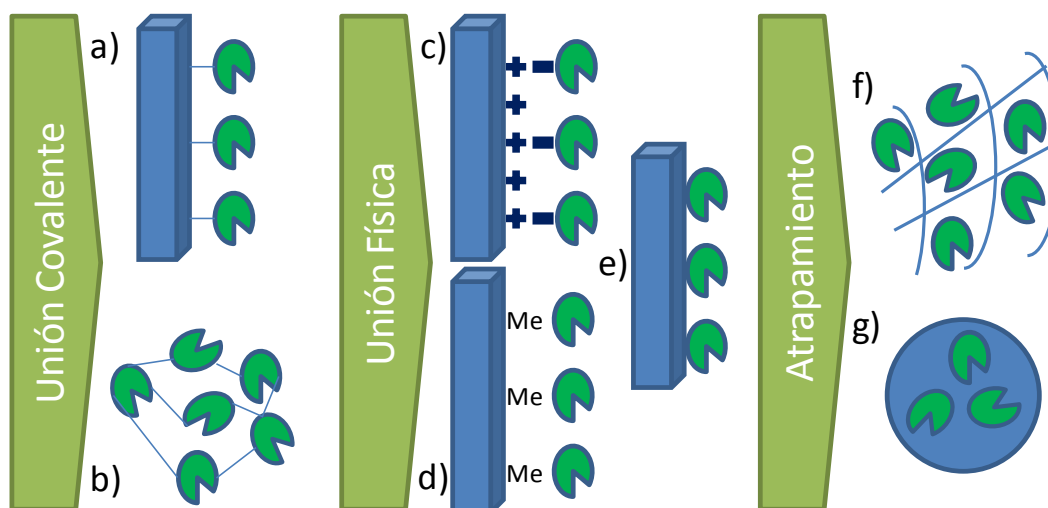


Figura 1.10. Métodos de inmovilización de enzimas. a) Unión covalente, b) Entrecruzamiento, c) Unión Iónica, d) Unión Metálica, e) Adsorción, f) Atrapamiento, g) Encapsulación.

Los métodos de inmovilización pueden clasificarse en función del tipo de unión involucrada al soporte o entre las mismas enzimas. Los métodos que requieren de una interacción covalente presentan como principal ventaja la estabilidad de estos enlaces, por lo que no se producen pérdidas de la fase activa del catalizador en el medio de reacción (leaching). En el método de unión covalente (Figura 1.10, a), un enlace de tipo covalente se forma entre grupos funcionales de la enzima y el soporte activado. Requiere de una etapa previa de activación del soporte, mediante la cual se activa un grupo funcional de interés, susceptible a un posterior ataque nucleofílico de los aminoácidos de la enzima. Los principales aminoácidos participantes en enlaces covalentes son cisteína, lisina, tirosina, treonina, histidina, metionina, triptófano, asparagina, ácido aspártico y glutámico, entre otros (Guauque Torres, 2013). Un método común de activación superficial es la unión con un agente acoplante como glutaraldehído. La unión enzima-soporte puede ser directa, o mediada por un bloque espaciador. La ventaja del empleo de un bloque espaciador se asocia a un mayor grado de movilidad de la enzima, lo que provoca un aumento de su actividad.

Por su parte, el entrecruzamiento (Figura 1.10, b) involucra la unión de las enzimas mediante el empleo de un reactivo acoplante. El glutaraldehído es uno de los más utilizados para este fin. De esta manera se logra la inmovilización de las enzimas sin la presencia de un soporte insoluble, y en su lugar la molécula entrecruzante actúa como soporte. Este método permite mejorar las eficiencias volumétricas de los catalizadores heterogéneos obtenidos (Guauque Torres, 2013).

Los métodos que involucran interacciones físicas incluyen unión iónica (Figura 1.10,c), unión metálica (Figura 1.10,d) y adsorción (Figura 1.10,e). Se diferencian entre ellos en el tipo de interacciones no covalentes con el soporte. La unión iónica implica la unión entre grupos ionizados del soporte y la enzima; en la inmovilización por unión metálica, una sal metálica previamente precipitada sobre el soporte es capaz de unirse con algún grupo nucleofílico de la proteína; y la adsorción implica la participación de fuerzas más débiles como Van der Waals, atracciones hidrofóbicas, y enlaces puente hidrógeno. Son métodos más económicos que los covalentes, pero tienen la desventaja de ser reversibles, en función de las características del medio, lo cual los hace muy inestables (Nisha, Karthick, & Gobi, 2012).

Por último, otra forma de inmovilizar catalizadores homogéneos implica el atrapamiento de los mismos en matrices poliméricas (Figura 1.10, f) o su encapsulación (Figura 1.10, g). Las redes poliméricas empleadas pueden ser de origen natural o sintético. Estas deben ser permeables a los reactivos y productos de las reacciones involucradas y, a su vez, deben retener las enzimas dentro de la red. La principal ventaja de estas técnicas es que no alteran la estructura de las enzimas, sin embargo los catalizadores heterogéneos obtenidos presentan limitaciones de transferencia de masa (Guauque Torres, 2013; Nisha et al., 2012).

El método de inmovilización utilizado, así como el soporte seleccionado en cada caso influyen en el comportamiento del catalizador heterogéneo obtenido. Los soportes pueden reunir diferentes características de porosidad, tamaño de partícula, densidad y forma. Pueden ser matrices orgánicas o inorgánicas, naturales o sintéticas.

Las desventajas asociadas a los procesos de inmovilización pueden ser, por un lado la pérdida de la actividad de la fase activa del catalizador por modificación de su estructura y, por otro lado, la gran heterogeneidad de los catalizadores heterogéneos. La optimización de los procesos de inmovilización, por lo tanto, constituye una etapa vital a la hora de desarrollar sistemas catalíticos eficientes.

1.7. Motivación y objetivos

El presente estudio se enmarca dentro de la catálisis enzimática y biomimética, cuyo objeto son las enzimas y compuestos capaces de mimetizar su actividad, así como la optimización de los procesos que catalizan.

El estudio de una tecnología novedosa capaz de ser aplicada al tratamiento de efluentes conteniendo residuos fenólicos implica considerar diferentes aspectos:

1. Eficacia del proceso de eliminación a través del análisis de parámetros claves de los efluentes como DBO, BQO o TOC; y/o parámetros específicos para el tipo de contaminante como grado de decoloración y/o conversión de la estructura target a eliminar.
2. Análisis de los productos de reacción a fin de confirmar su baja toxicidad.
3. Optimización de la reacción para ser llevada a cabo en condiciones tales que se obtenga la mayor eficacia y eficiencia del tratamiento.
4. Inmovilización del catalizador para posibilitar el re- uso del mismo.
5. Estudio cinético como soporte para la selección apropiada del modelo de reactor y su modo de operación; y la obtención de información del mecanismo de reacción que permita predecir condiciones de mayor eficiencia del sistema.

El objetivo general de esta tesis es el desarrollo de un sistema catalítico de decoloración de soluciones modelo de colorantes textiles por medio de la aplicación de hematin como biomimético de HRP.

Los objetivos particulares incluyen:

1. El análisis cinético de la reacción de co-oxidación de fenol y 4-aminoantipirina catalizada por HRP y hematin, como reacción test de actividad.
2. La determinación de las condiciones óptimas de oxidación de los colorantes propuestos, catalizados por HRP y hematin en solución.
3. La inmovilización de los catalizadores en distintos soportes económicos.
4. La optimización de la etapa de inmovilización del catalizador en un soporte seleccionado.
5. El análisis de los mecanismos de reacción –degradativos o polimerizantes–, así como la determinación de las vías de producción de oxígeno molecular.
6. El estudio de las vías de inactivación de los catalizadores por reacción con H_2O_2 o por interacción con los productos formados durante la reacción.
7. La determinación de la naturaleza de los intermediarios de reacción participantes en el ciclo catalítico de hematin.
8. La determinación de la toxicidad de las soluciones de los colorantes, luego de los tratamientos con HRP y hematin inmovilizado.
9. El estudio teórico-experimental de la cinética de reacción de decoloración catalizada por hematin.

La tesis se divide en tres partes. La Figura 1.11 incluye una representación esquemática de la misma.

La primera parte corresponde al estudio de los catalizadores solubles e incluye los capítulos 2, 3, 4 y 5. En estos capítulos se presentan los resultados correspondientes al estudio cinético de la reacción de co-oxidación de fenol con 4-aminoantipirina (Capítulo 2), el estudio del comportamiento en solución de los colorantes seleccionados sumado a resultados preliminares de decoloración y co-oxidación con HRP (Capítulo 3). Por su parte, los capítulos 4 y 5 presentan resultados de optimización de las condiciones de reacción de decoloración de Naranja II (Capítulo 4) y Rojo de Alizarina S (Capítulo 5), incluyendo un análisis preliminar de los mecanismos de eliminación del color con ambos catalizadores.

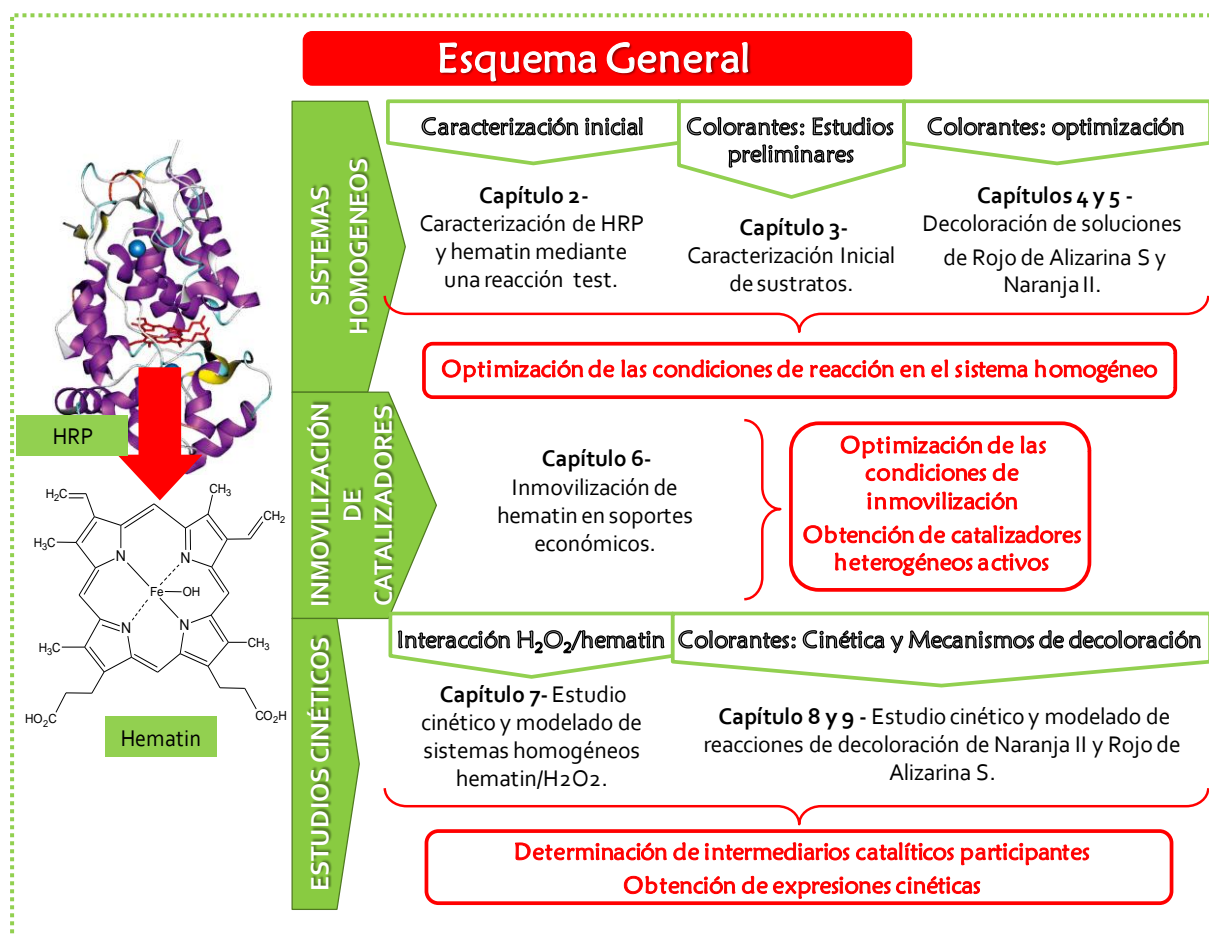


Figura 1.11. División de la tesis.

La segunda parte corresponde al estudio y optimización del proceso de inmovilización de HRP y hematin en diferentes soportes, incluyendo el comportamiento de los catalizadores en usos sucesivos. Esta sección incluye el Capítulo 6.

La tercera parte corresponde al estudio cinético experimental y teórico de las reacciones de oxidación de Naranja II y Rojo de Alizarina S catalizadas por hematin. Se compone por el Capítulo 7, en el cual se presenta el análisis de la interacción de los catalizadores con el sustrato oxidante H_2O_2 , en ausencia de sustrato fenólico; y los Capítulos 8 y 9 que presentan resultados de modelado cinético y parametrización de las reacciones de decoloración en sistemas homogéneos y heterogéneos de Naranja II y Rojo de Alizarina S respectivamente.

Finalmente, en el capítulo 10, se presentan las conclusiones de esta tesis y se sugieren posibles trabajos futuros.

PARTE I

SISTEMAS HOMOGÉNEOS

CAPÍTULO 2

CARACTERIZACIÓN DE PEROXIDASA DEL RÁBANO PICANTE Y SU BIOMIMÉTICO MEDIANTE UNA REACCIÓN TEST SELECCIONADA

- *Se corrobora la **actividad de hematin** en reacciones de oxidación de compuestos fenólicos.*
- *Se observa la **inhibición** de las vías principales de oxidación de fenol para altas relaciones molares $[H_2O_2]:[catalizador]$.*
- *No se observó la formación de **polifenoles** en las condiciones de reacción estudiadas.*

2.1. Introducción

Existen múltiples reacciones test para evaluar la actividad enzimática de peroxidasa o catalítica de biomiméticos y miméticos. La reacción de co-oxidación de fenoles y 4- aminoantipirina (AAP) con H_2O_2 ha sido ampliamente estudiada (Carvalho et al., 2006; Metelitsa et al., 1994; Vojinovic et al., 2004). La detección se basa en la formación de un producto condensado del radical fenoxi con AAP para dar lugar a una quinonaimina de color púrpura (Figura 2.1), cuya concentración es susceptible de ser medida espectrofotométricamente, lo cual posibilita su extendida aplicación (Biava & Signorella, 2010; Mifune et al., 2003; Odo et al., 2009). Esta reacción encuentra su principal aplicación en sistemas de detección rápida y sencilla de H_2O_2 o fenol, y otros compuestos como glucosa, etanol, lactato y colesterol en diferentes inmunoensayos basados en peroxidasas y en el monitoreo de bioprocesos en reactores con inyección de flujo (Mifune et al., 2003; Omuro Lupetti, Rocha, & Fatibello-Filho, 2004; Ribeiro, Segundo, Reis, & Lima, 2009). Fue originalmente testeada en 1943 por Emerson empleando ferricianuro de potasio en medio alcalino como catalizador (Emerson, 1943). En la actualidad, tanto HRP (Metelitsa, Litvinchuk, & Savenkova, 1991; Vojinovic et al., 2004), como complejos metálicos (Omuro Lupetti et al., 2004; Rajendiran & Santhanalakshmi, 2006; Tang, Zhang, Liu, & Han, 2002) y entre ellos metaloporfirinas sintéticas (Mifune et al., 2003; Odo et al., 2009) demostraron ser catalizadores activos para esta reacción.

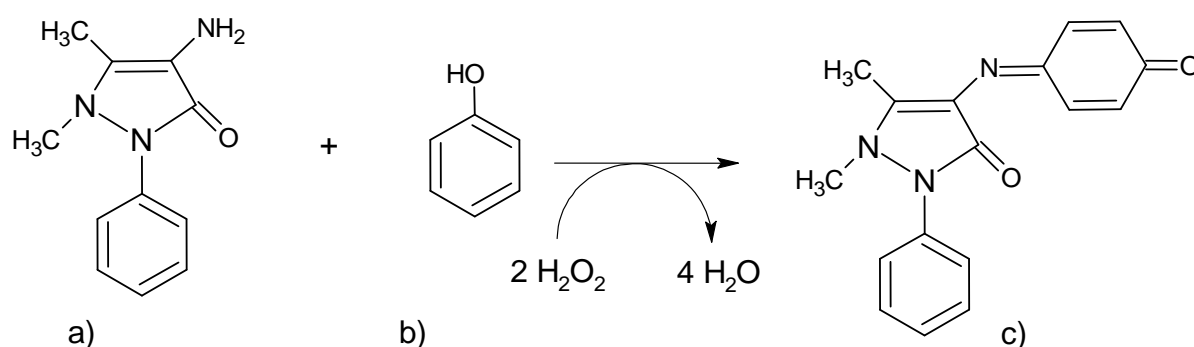
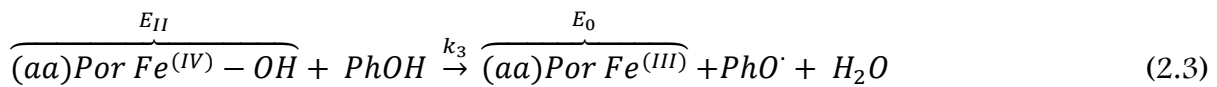
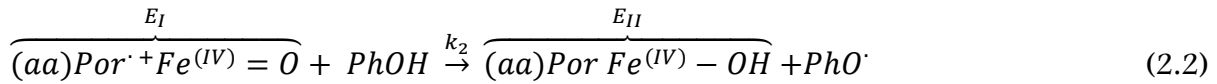
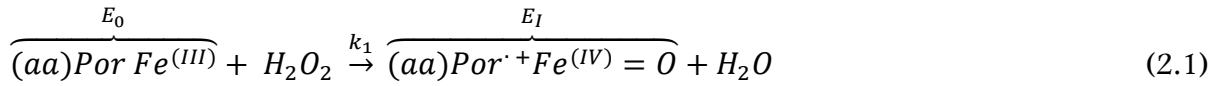


Figura 2.1. Co- oxidación de fenol y AAP. a) 4- aminoantipirina, b) fenol, c) Estructura de la quinonaimina producto de la co- oxidación.

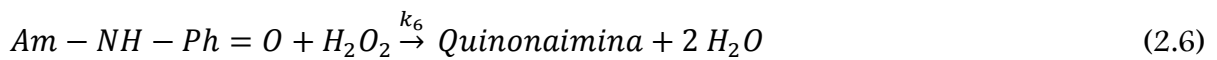
El mecanismo de la reacción de la co-oxidación catalizado por HRP fue propuesto por Nicell (J A Nicell & Wright, 1997) y modificado por Carvalho y colaboradores (Carvalho et al., 2006). Las reacciones catalíticas que componen la secuencia incluyen:



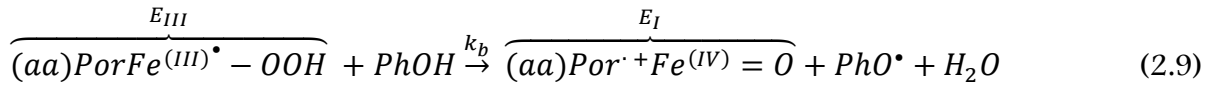
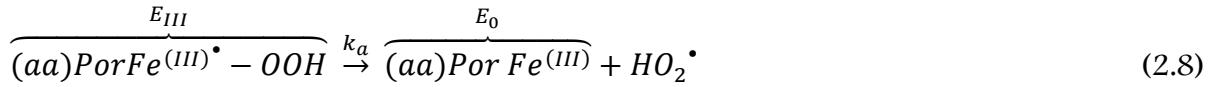
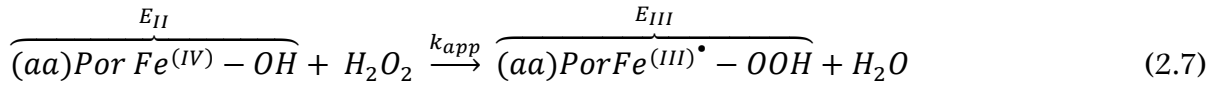
Los radicales fenoxi formados en 2.2. y 2.3 dan lugar a las siguientes reacciones radicalarias de propagación (2.4) y terminación (2.5):



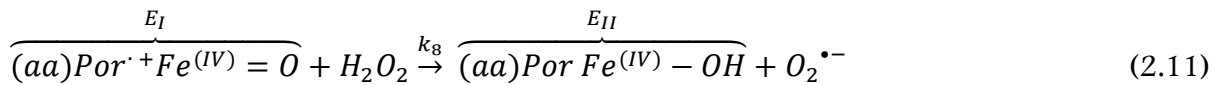
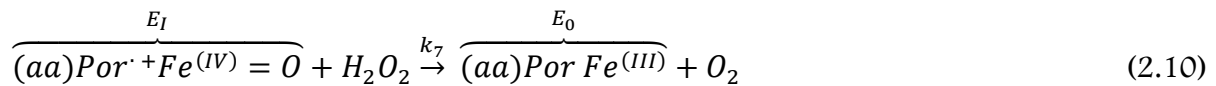
Finalmente, por reacción con H₂O₂ se genera el producto coloreado que es determinado por espectroscopia UV-Visible:



Se considera, además, una vía de inactivación reversible de HRP de tres pasos:



Carvalho planteó, además, la necesidad de incluir en el modelo cinético la reacción de desproporción de H_2O_2 catalizada por HRP, para mejorar la predicción de la formación de la quinonaimina en condiciones de exceso de H_2O_2 (Carvalho et al., 2006).



Por su lado, los intermediarios E_I y E_{II} pueden extraer un protón del grupo amino de la molécula de AAP generando el radical aminil ($AM-NH\bullet$). No obstante, las altas concentraciones de fenol respecto a AAP empleadas permiten descartar estas reacciones además del acoplamiento de radicales aminil como rutas paralelas relevantes para el modelo de predicción de formación de la quinonaimina.

Este capítulo incluye una evaluación y análisis del mecanismo catalítico de hematin en la reacción de oxidación de fenol con presencia de 4- aminoantipirina, lo que permite evaluar la capacidad catalítica de hematin como biomimético de HRP en base a una reacción ampliamente estudiada. Se presentan resultados experimentales de la cinética de oxidación de fenol/AAP a diferentes concentraciones de catalizador y H_2O_2 . Además, en base a los resultados experimentales obtenidos, se estiman los valores de las constantes de velocidad del ciclo catalítico principal para HRP y hematin, considerando en este último caso la formación de intermediarios catalíticos análogos a los de la enzima.

2.2. Metodología

2.2.1. Ensayos cinéticos

Se realizaron dos series de experimentos para cada catalizador, hematin y HRP. En la primera se modificó la concentración inicial de H_2O_2 en cada corrida, mientras que en la segunda se modificó la concentración de catalizador. Las condiciones de cada corrida experimental se detallan en la Tabla 2.1.

La solución madre de HRP se preparó en buffer $KH_2PO_4/NaOH$ pH 7 0.1M a una concentración de 500 mg/l. Hematin se disolvió en NaOH 0.01 M, obteniéndose una solución de 324 mg/l. Previo a su empleo, las soluciones de catalizador se sometieron a 30 (HRP) y 15 (hematin) minutos de agitación. Soluciones de 7.8 mM de AAP y 140 mM de fenol se prepararon en buffer KH_2PO_4 0.1 M, pH 7.

La determinación de las concentraciones de fenol y AAP a utilizar se fijaron en base a los reportes de esta reacción publicados por diferentes autores. Buchanan y Nicell emplearon una relación molar [fenol]:[AAP]=4, mientras que Carvalho aumenta esta relación a 63 (Buchanan & Nicell, 1997; Carvalho et al., 2006; J A Nicell & Wright, 1997). Es importante mencionar que, a los fines de evitar las reacciones de los catalizadores con AAP como sustrato, se emplea un exceso de fenol en el medio de reacción. Metelitz y colaboradores probaron que la concentración de AAP no afecta a las velocidades de formación de la quinonaimina producto para relaciones [fenol]:[AAP] alrededor de 50 (Metelitz et al., 1991).

Las concentraciones de AAP y fenol en todas las corridas experimentales fueron 0.11 mM and 8.35 mM, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en cubetas plásticas a temperatura ambiente, con un volumen final de 3 ml. Las correspondientes alícuotas de soluciones de fenol, AAP, catalizador y buffer pH 7 fueron agregadas en las cubetas hasta alcanzar las concentraciones requeridas (ver Tabla 2.1). Se dió inicio a la reacción mediante la adición de la cantidad correspondiente de solución de H_2O_2 (H_2O_2 30 vol. diluido 1:10 en buffer KH_2PO_4 0.1 M, pH 7). Las cubetas se invirtieron 3 veces, a los fines de lograr la homogeneización de la mezcla y se colocaron en el espectrofotómetro para dar lugar a las mediciones. Cada corrida se realizó por triplicado para determinar la desviación estándar asociada a las velocidades iniciales obtenidas. La formación de color se monitoreó por la determinación de la absorbancia a 510 nm a intervalos de 1 s, durante 300 s de reacción.

Adicionalmente, se analizaron las modificaciones espectrales del sistema fenol/H₂O₂/HRP en presencia y ausencia de AAP, para el cual se emplearon las siguientes condiciones: [fenol]: 8.35 mM, [H₂O₂]: 0.3 mM, [HRP]:0.3 mg/l, [AAP]:0.11 mM. Se recolectaron los espectros de las mezclas de reacción en el rango 300– 800 nm cada 30 s utilizando cubetas de cuarzo (Perkin– Elmer).

Tabla 2.1. Series de experimentos para la co- oxidación de fenol/AAP con HRP y hematin.

HRP			Hematin		
Exp. N°	[H ₂ O ₂] ₀ (mM)	[HRP] (mg/l)	Exp. N°	[H ₂ O ₂] ₀ (mM)	[hematin] (mg/l)
1	0.09	0.30	23	0.09	0.30
2	0.17	0.30	24	0.17	0.30
3	0.26	0.30	25	0.3	0.30
4	0.30	0.30	26	0.87	0.30
5	0.60	0.30	27	1.3	0.30
6	0.86	0.30	28	1.73	0.30
7	1.73	0.30	29	3.46	0.30
8	0.30	0.56	30	6.90	0.30
9	0.30	1.00	31	8.65	0.30
10	0.30	1.39	32	17.3	0.30
11	0.30	1.72	33	34.6	0.30
12	0.30	2.89	34	69.2	0.30
13	0.30	3.44	35	86.5	0.30
14	0.30	6.94	36	17.3	0.50
15	0.30	13.89	37	17.3	1.50
16	0.30	34.44	38	17.3	2.00
17	3.46	0.30	39	17.3	2.50
18	6.91	0.30	40	17.3	3.10
19	8.64	0.30	41	17.3	6.00
20	17.3	0.30	42	17.3	12.1
21	34.6	0.30	43	17.3	18.8
22	69.2	0.30			

2.2.2. Determinación del coeficiente de absortividad de la quinonaimina producto

El coeficiente de absortividad molar de la quinonaimina formada se determinó experimentalmente, mediante las siguientes asunciones: (1) la quinonaimina se genera hasta conversión completa del reactivo limitante (AAP) y; (2) el valor de absorbancia máximo considerado es el correspondiente al punto de cambio de pendiente de los perfiles de absorbancia obtenidos con HRP (ver Figura 2.2). En base a estas consideraciones, se tomaron los valores de absorbancia de los experimentos N° 3 hasta 11 de la tabla 2.1 para determinar el coeficiente de extinción a 510 nm. Se calcularon así las velocidades iniciales de generación de quinonaimina a distintas condiciones de reacción mediante $(d[\text{dye}]/dt)_{t=0}$.

2.2.3. Determinación experimental de las constantes de velocidad

Para realizar la estimación de las constantes cinéticas del modelo se realizó una aproximación al estado pseudo-estacionario para los intermediarios E_0 , E_I y E_{II} propuesto por Dunford (H B Dunford, 1999). Las suposiciones incluyen: (1) que las reacciones catalíticas 2.1, 2.2 y 2.3 son las etapas controlantes de la velocidad; (2) $E_{\text{total}} = E_0 + E_I + E_{II}$; y (3) $k_2 \gg k_3$. De esta manera fue posible obtener una ley de velocidad de tipo potencial que sólo dependa las concentraciones empleadas de catalizador, fenol y H_2O_2 .

$$-r_{\text{Dye},0} = \frac{E_T}{\left(\frac{1}{k_1}\right)\left(\frac{1}{[H_2O_2]_0}\right) + \left(\frac{1}{k_3}\right)\left(\frac{1}{[PhOH]_0}\right)} \quad (2.13)$$

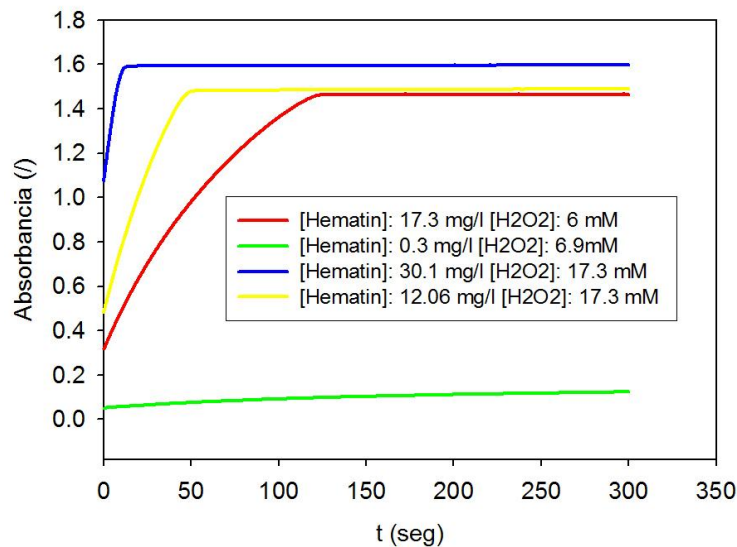
La forma recíproca de esta expresión permite computar de manera sencilla los valores de las constantes k_1 y k_3 mediante una regresión lineal. La pendiente de la recta obtenida corresponde a $(k_1 E_T)^{-1}$ y la ordenada al origen es $(k_3 E_T [PhOH]_0)^{-1}$, según se observa en la ecuación 2.14.

$$-\frac{1}{r_{\text{Dye},0}} = \overbrace{\frac{1}{k_1 E_T}}^{\text{pendiente}} \frac{1}{[H_2O_2]_0} + \overbrace{\frac{1}{k_3 E_T [PhOH]_0}}^{\text{ordenada}} \quad (2.14)$$

2.3. Resultados

2.3.1. Perfiles de absorbancia

La Figura 2.2 muestra algunos de los perfiles obtenidos de Abs₅₁₀ vs. tiempo para los sistemas AAP/fenol/HRP y AAP/fenol/hematin. La formación de producto coloreado fue posible tanto con HRP como con hematin. En los sistemas catalizados por HRP se observa un aumento lineal de la absorbancia hasta un valor máximo de $1,44 \pm 0,02$ (valor promedio observado para los experimentos comprendidos entre el N° 3- 11 de la Tabla 2.1). No obstante, luego de alcanzado este valor, se detecta un comportamiento bifásico, provocado por una marcada disminución de la velocidad de aumento de la absorbancia (cambio de pendiente). Además, el valor de esta segunda pendiente, aumenta con la concentración de H₂O₂ empleada. La formación de productos conjugados del tipo fenoxi- fenoxi podría ser responsable de este incremento de absorbancia (Akkara et al., 2000; S. G. Datta, Dou, Shibley, & Datta, 2012; Reihmann & Ritter, 2006). Este comportamiento no se observó en los sistemas catalizados por hematin.



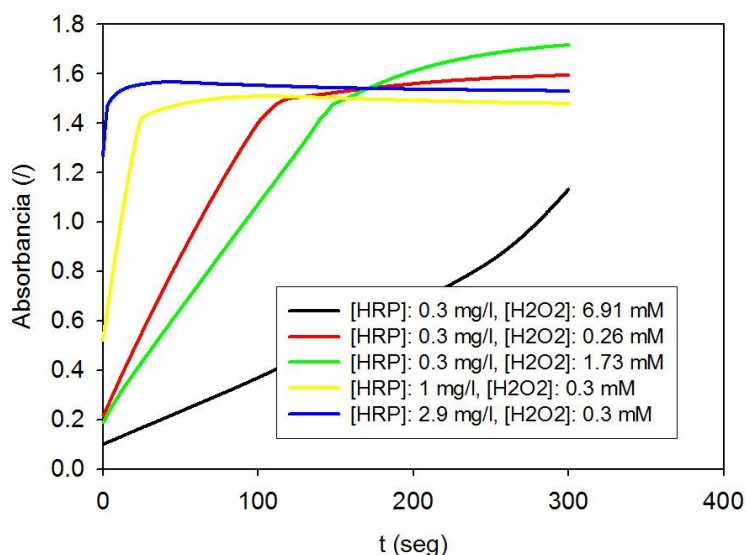


Figura 2.2. Mediciones de absorbancia a 510 nm vs. tiempo obtenidas para distintos experimentos de la tabla 2.1. Cada perfil corresponde al promedio de tres repeticiones.

Por otro lado, a alta relación molar $[H_2O_2]:[HRP]$ se observa un cambio de pendiente en el perfil de color aumentando la velocidad de formación de colorante luego de 300 s en una segunda etapa (en la Figura 2.2 corresponde a $[HRP]: 0.3 \text{ mg/l}$, $[H_2O_2]: 6.91 \text{ mM}$). Una posible causa de este comportamiento bifásico es la participación de vías alternativas de reacción que consumen H_2O_2 tales como la vías catalítica o *pseudo*-catalítica de HRP (Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001; Vlasits et al., 2010), que pueden estar favorecidas en los primeros minutos de reacción frente a la formación de color dada la alta concentración inicial de H_2O_2 .

Los experimentos con alto contenido de HRP (comprendidos entre el N°13– 16 de la tabla 2.1) no permitieron el cálculo de las velocidades iniciales, ya que la reacción se completó casi instantáneamente.

2.3.2. Efecto de la concentración de oxidante en la actividad catalítica

La Figura 2.3–A muestra la variación de las velocidades iniciales de incremento de absorbancia a 510 nm a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Para las reacciones de co-oxidación catalizadas por HRP, la actividad aumenta con la concentración inicial de H_2O_2 hasta el punto máximo de 0,3 mM. Para concentraciones mayores la actividad cae drásticamente (círculo rojo en la Figura 2.3,A). Este valor de concentración óptima de H_2O_2

concuenda con resultados ya reportados para HRP, independientemente de la concentración de enzima utilizada (Curvetto et al., 2006b; J A Nicell & Wright, 1997; Vojinovic et al., 2004). Por otro lado, la formación de quinonaimina catalizada por hematin fue de 10 a 15 veces más lenta que la correspondiente a HRP en la región de baja concentración de H_2O_2 . La mayor actividad se detectó a una concentración inicial de H_2O_2 de 17 mM. Ambos catalizadores mostraron un aumento de la velocidad de reacción con el aumento de concentración de H_2O_2 hasta valores máximos. Esto indica que la etapa de activación del estado nativo de los catalizadores es influyente en la velocidad de reacción. Luego de superados los valores máximos de velocidad, vías paralelas de inactivación por reacción con H_2O_2 aumentan en importancia, reduciendo así las velocidades de formación de colorante.

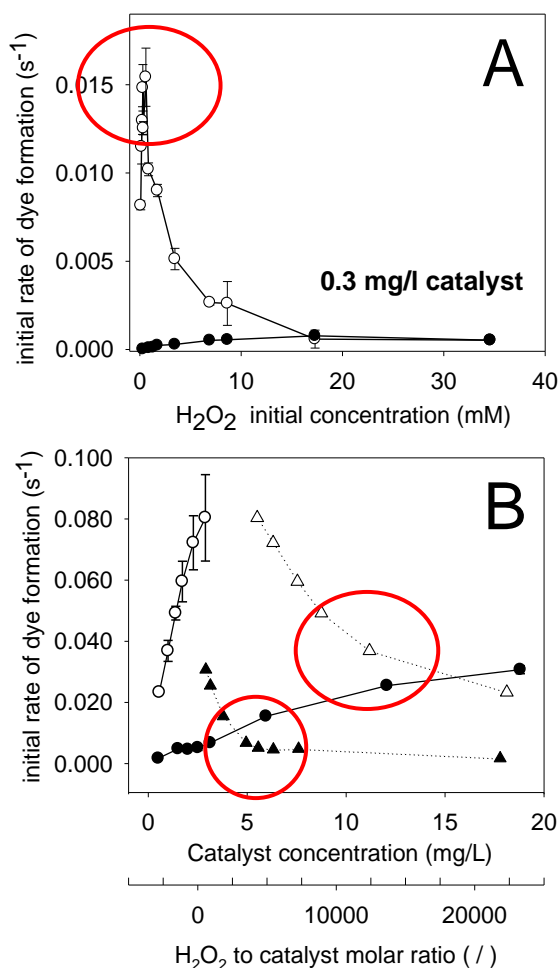


Figura 2.3. Efecto de la concentración inicial de H_2O_2 (A) y la concentración de catalizador (B) en las velocidades iniciales de formación del producto coloreado. Símbolos blancos: reacciones catalizadas por HRP, símbolos negros: reacciones catalizadas por hematin. Los triángulos representan velocidad inicial vs. relación molar $[H_2O_2]:[catalizador]$.

2.3.3. Efecto de la concentración de catalizador en la actividad catalítica

En la Figura 2.3-B se observa la variación de la velocidad inicial de aumento de absorbancia a 510 nm con la concentración de catalizador empleada. La relación lineal observada entre las velocidades de reacción y la concentración del catalizador es consistente con la hipótesis de que las reacciones catalíticas son controlantes de la secuencia. La Figura 2.3-B presenta también los valores de velocidades iniciales frente a la relación molar $[H_2O_2]:[catalizador]$. Las velocidades de reacción disminuyen linealmente con el aumento de relación molar $[H_2O_2]:[catalizador]$ en ambos sistemas catalíticos. Sin embargo, se evidencia un punto de inflexión en la curva, a partir del cual varía la pendiente (círculos rojos en la Figura 2.3,B). Este punto puede indicar un cambio en la distribución del flujo de reacciones que ocurren en el medio, que va desde el ciclo catalítico principal hacia las rutas de inactivación como vías de mayor importancia relativa a altas relaciones molares peróxido a catalizador.

2.3.4. Formación de quinonaimina.

El valor determinado del coeficiente de absorción es $\epsilon = 13.473 \pm 296 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, el cual varía considerablemente entre los coeficientes publicados para la quinonaimina producida durante la reacción de oxidación de fenol/AAP catalizados por HRP. Los mismos van desde $7210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (J A Nicell & Wright, 1997); $7870 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Metelitz et al., 1991) a $11120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Carvalho et al., 2006). Esta hipercromicidad observada en nuestras condiciones de reacción puede ser producto de la formación de complejos de transferencia de carga. Estos complejos involucran la transferencia de un protón desde un donador a un aceptor y presentan bandas de absorción en el rango de 525 a 680 nm (bandas CT). Estas bandas son asignables a la excitación de electrones desde el orbital molecular ocupado de mayor energía (en inglés: *highest occupied molecular orbital, HOMO*) del donador a los orbitales moleculares vacíos de menor energía (en inglés: *lowest unoccupied molecular orbital, LUMO*) del aceptor (Vinod Kumar, 2000). En función del exceso de fenol presente en las condiciones de reacción empleadas, es de esperar la formación de complejos fenol-quinonaimina como el representado en la Figura 2.4.

El avance de reacción provoca cambios en los espectros de los sistemas reactivos que se muestran en la Figura 2.5. El transcurso de la reacción estuvo acompañado de aumentos de las absorbancias a 510 y 318 nm en ambos sistemas catalíticos. La formación del producto

deseado se confirma por estos valores observados de λ_{\max} (Fiamegos, Stalikas, & Pilidis, 2002; Rajendiran & Santhanalakshmi, 2006). La estructura de la quinonaimina producto presenta un enlace N=C conjugado con el enlace C=O del residuo de fenolato (ver Figura 2.1). La banda de absorción a 510 nm se puede asignar a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del enlace C=O, mientras que la banda a 318 nm puede ser producto de una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del sistema conjugado. Para el caso de hematin, el espectro de absorción del colorante se ve afectado por la absorción del catalizador en la región comprendida entre 300–450 nm (línea discontinua).

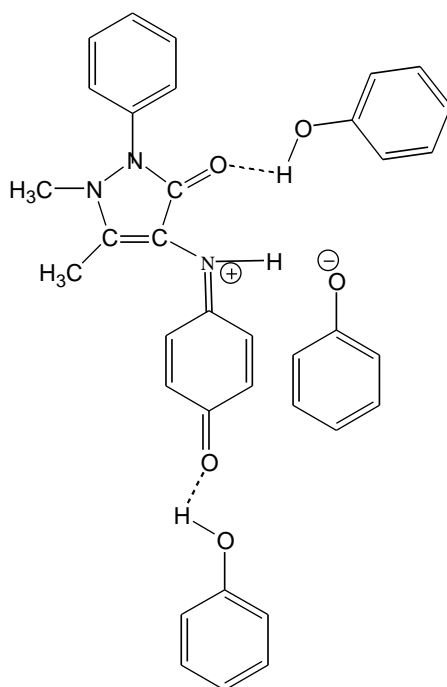


Figura 2.4. Complejo de transferencia de carga Fenol: Colorante.

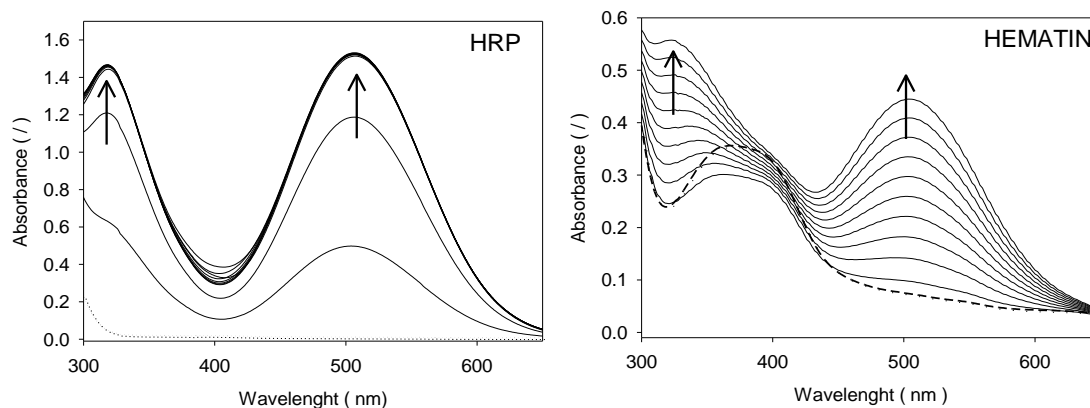


Figura 2.5. Cambios espectrales en el tiempo para sistemas AAP/fenol/H₂O₂ durante los primeros 5 minutos de reacción. Concentraciones iniciales: [AAP] = 0.11 mM; [Fenol] = 8.35 mM; [H₂O₂]_{HRP} = 0.3 mM; [H₂O₂]_{HEMATIN} = 17 mM; [HRP]=0.3 mg/l; [Hematin]=6 mg/l.

2.3.5. Formación de radicales fenoxi

Con el objetivo de comprobar el posible acoplamiento de radicales fenoxi, se monitorearon espectros en el tiempo para el sistema fenol/H₂O₂/HRP en ausencia de AAP. Los resultados muestran un aumento de la absorbancia a 400 nm; seguido por un corrimiento batocrómico de esta banda hacia valores cercanos a 430 nm y el ensanchamiento del pico. Esta evolución espectral se asigna a la acumulación de radicales fenoxi seguida de recombinación con formación de productos polifenólicos como los que se presentan en la Figura 2.7 (Reihmann & Ritter, 2006; Wagner & Nicell, 2002). Además, al final de las mediciones se observó la formación de un precipitado marrón típico de los polifenoles insolubles. Esto implica que en presencia de AAP, es posible que la combinación de radicales fenoxi compita con las moléculas de AAP en las reacciones de transferencia de electrones. Por otro lado, los productos polifenólicos contribuyen al aumento de absorbancia observado en el punto de inflexión de los perfiles de la Figura 2.2. No obstante, la capacidad de absorción de los cromóforos presentes en los polifenoles es mucho menor a la del cromóforo del colorante objetivo.

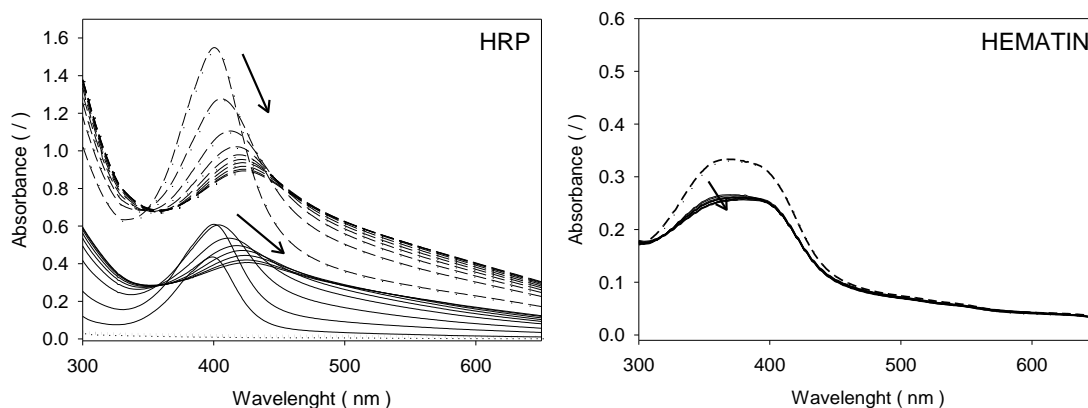


Figura 2.6. Espectros en el tiempo obtenidos para el sistema fenol/ H₂O₂/HRP (izquierda) y fewnol/H₂O₂/hematin (derecha, resultados obtenidos por la Dra. Ivana Magario).

Concentraciones iniciales: [fenol]: 8.35 mM, $[H_2O_2]_{\text{Hematin}}$: 17 mM, [Hematin]: 6 mg/l; HRP línea continua: $[H_2O_2]_{\text{HRP}}$: 0.3 mM, [HRP]: 0.3 mg/l; HRP línea cortada: $[H_2O_2]_{\text{HRP}}$: 3 mM, [HRP]: 3 mg/l.

El acoplamiento de los radicales fenoxi ha sido despreciado en los estudios reportados de la reacción de co-oxidación de fenol y AAP catalizada por HRP (Metelitsa et al., 1994; J A Nicell & Wright, 1997). Sin embargo, a altas concentraciones de H_2O_2 y HRP la velocidad de formación de polifenoles aumenta como puede apreciarse en la Figura 2.6. El acoplamiento de polifenoles con AAP es, asimismo, probable en estas condiciones. Si la formación de los polifenoles es una vía activa durante la formación de color, los valores de absorbancia del punto de cambio de pendiente en la Figura 2.2 deberían variar con la concentración de H_2O_2 , así como también respecto a los valores máximos alcanzados en los sistemas con hematin. Dado que este no es el caso, se puede suponer que la formación de polifenoles resulta importante sólo cuando la conversión de AAP es cercana al 100%, al menos en el rango evaluado de concentraciones de H_2O_2 . Este resultado indicaría además que el valor de la constante de velocidad para el acoplamiento fenoxi-fenoxi es mucho menor que la constante de recombinación fenoxi-AAP.

Experimentos posteriores llevados a cabo por la Dra. Ivana Magario permitieron observar la ausencia de recombinación de radicales fenoxi-fenoxi (ver Figura 2.6, derecha), así como la formación de precipitado marrón, en las reacciones catalizadas por hematin. Akkara y colaboradores, sin embargo, lograron obtener polímeros de etilfenol a menores relaciones molares $[H_2O_2]:[\text{hematin}]$ que las empleadas en la Figura 2.6 (Akkara et al., 2000). Observaron a su vez, un decrecimiento progresivo de la banda solet (ubicada en 394 nm) al inicio de la reacción, asignable a la oxidación de la estructura de la porfirina por acción del H_2O_2 o de radicales inorgánicos formados durante el ciclo catalítico (Cunningham, Danks, Hay, Hamerton, & Gunathilagan, 2001; Stephenson Bell, A.T. , 2005). Este comportamiento, ausente en la Figura 2.6, puede verse enmascarado por la acumulación en el medio de reacción de los radicales fenoxi, cuya absorbancia máxima es también a 400 nm. La mayor relación molar [fenol]:[hematin] empleada en nuestros experimentos sustenta este posible enmascaramiento. Existen en la literatura reportes de formación de radicales peroxilo ($HOO\cdot$) en sistemas de hematin/hidroperóxidos (Kalyanaraman et al., 1983; J. Van Der Zee, Barr, & Mason, 1996). Las altas concentraciones de H_2O_2 empleadas en nuestros experimentos pueden promover vías de descomposición de peróxido con producción de radical peroxilo (Cunningham et al., 2001; W. Nam, Han, et al., 2000; Stephenson Bell, A.T. , 2005; Traylor & Xu, 1990). Estos

radicales se encuentran en equilibrio con los radicales superóxidos ($\text{HOO}\cdot = \text{H}^+ + \text{O}_2\cdot^-$), los cuales se adicionan rápidamente con los radicales fenoxi, provocando la apertura de las estructuras aromáticas (Rappoport, 2009), imposibilitando la formación de polifenoles en las reacciones catalizadas por hematin, en ausencia de AAP.

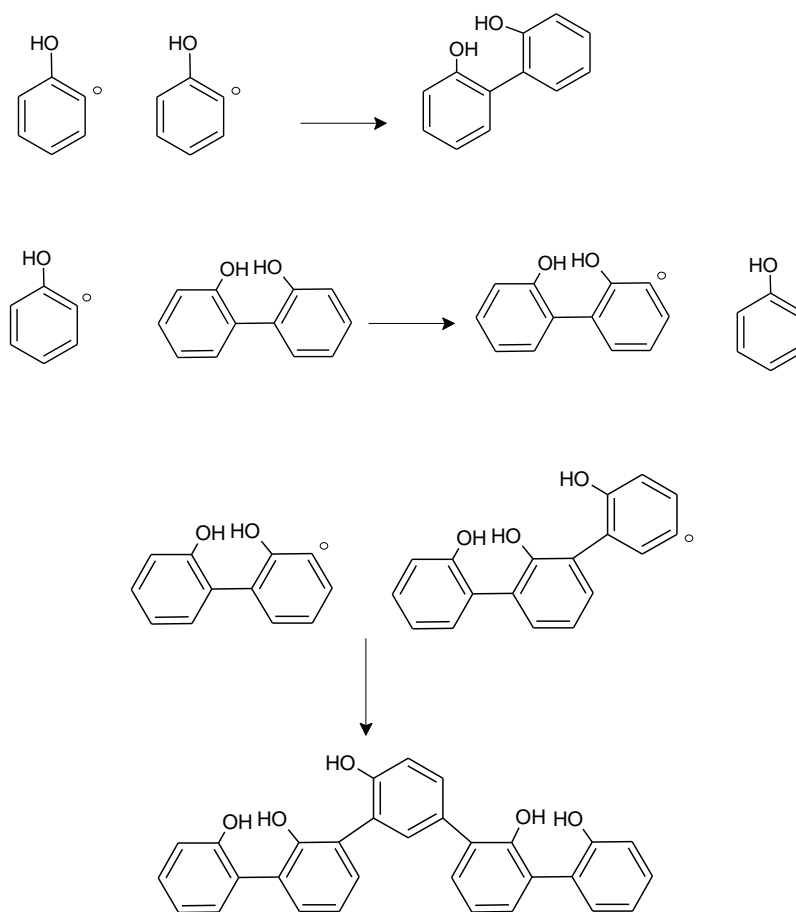


Figura 2.7. Productos conjugados del radical fenoxi.

2.3.6. Estimación de constantes cinéticas

La Figura 2.8 incluye las representaciones gráficas de la ecuación 2.14 para HRP y hematin, así como también los valores de los parámetros de las rectas a las que se ajustaron los datos experimentales. Los valores de las constantes (en $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$) obtenidos para HRP son k_1 : $1.70 \cdot 10^3$, k_3 : $2.4 \cdot 10^1$; mientras que para hematin k_1 : $1.70 \cdot 10^{-2}$ y k_3 : $3.0 \cdot 10^{-2}$. El valor obtenido para las constantes pone en evidencia la mayor actividad de HRP respecto de hematin. Estas estimaciones experimentales se emplearon como valores iniciales para la tarea de

parametrización del modelo de acción descrito, el cual fue desarrollado posteriormente por parte de integrantes del grupo de trabajo. La activación del estado nativo del catalizador es dos órdenes de magnitud mayor respecto de k_3 en el caso de HRP. En base a estos resultados es posible inferir que el intermediario E_1 se encontrará en mayor concentración que el estado nativo de la enzima, es decir que la activación de E_0 no resulta ser un paso limitante de la velocidad para las concentraciones de reactivos estudiadas. En el caso de hematin, la similitud entre los valores de las constantes impide hacer este análisis. No obstante, es necesario obtener datos de todas las constantes de velocidad para poder determinar las concentraciones de los intermediarios catalíticos con el avance de reacción.

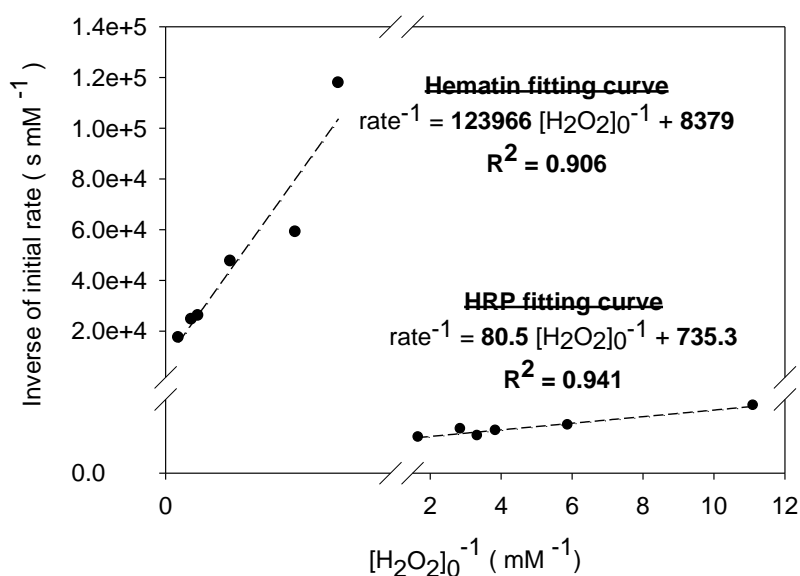


Figura 2.8. Formas recíprocas de velocidad inicial de reacción vs. concentración inicial de peróxido.

2.4. Conclusiones

El estudio de la reacción de co-oxidación de AAP/fenol permitió corroborar la formación del producto condensado con ambos catalizadores, lo que demuestra la actividad de hematin en reacciones de oxidación de compuestos fenólicos. En las condiciones testeadas para ambos catalizadores se observó una hipercromicidad del colorante producto, lo cual

puede asociarse a la formación de complejos de transferencia de carga del tipo fenol:quinonaimina, debido al exceso de fenol presente en el medio de reacción.

El estudio de las velocidades iniciales de formación de quinonaimina en ambos sistemas permite establecer como etapa influyente de la velocidad de reacción, a la etapa de activación con H_2O_2 del estado basal de los catalizadores (E_0). Los valores estimados de las constantes k_1 y k_3 indican que la reacción de activación de E_0 no es limitante en el caso de HRP, en presencia de H_2O_2 .

Por otro lado, el aumento de la relación molar $[H_2O_2]:[catalizador]$ permite observar el efecto inhibitorio de las vías principales de oxidación de fenol a causa de la desactivación – reversible o irreversible – de ambos catalizadores por parte de H_2O_2 . La disminución de la actividad fue mucho más marcada en caso de hematin, hecho que se asigna a la ausencia de la estructura proteica en el biomimético.

Además, del estudio de los sistemas de oxidación de fenol en ausencia de AAP, se corroboró la formación de radicales fenoxi, así como su acoplamiento y la posterior precipitación de polifenoles. Sin embargo, en presencia de AAP, los resultados demuestran que estas reacciones de acoplamiento de radicales fenoxi solo adquieren importancia luego del consumo casi completo de AAP, lo que indica que el valor de la constante cinética de acoplamiento de radicales fenoxi–fenoxi es mucho menor al de la constante de acoplamiento de radicales fenoxi–AAP. Hematin, por su parte, no fue capaz de catalizar la formación de polifenoles en las condiciones de reacción estudiadas, lo que puede asociarse a la presencia de radicales inorgánicos que provoquen la ruptura de las estructuras aromáticas de los radicales fenoxi mediante un mecanismo degradativo.

Finalmente, los valores de las constantes de reacción estimados mediante el estudio cinético experimental pueden ser empleados posteriormente como valores iniciales en estudios de parametrización del modelo de acción descrito.

2.5. Resultados publicados

Los resultados que se presentan en este capítulo se emplearon como base experimental para llevar a cabo estudios de modelado cinético y estimación de parámetros, por parte de integrantes de nuestro grupo de investigación. Fueron publicados en:

- Chemical Engineering Science. “Mechanistic evaluation of hematin action as a horseradish peroxidase biomimetic on the 4-aminoantipyrine/phenol oxidation reaction.” Autores: Córdoba, A., Alasino, N., Asteasuain, M., Magario, I., Ferreira, M.L. 129 (2015), pag: 249–259.

CAPÍTULO 3

LOS COLORANTES: CARACTERIZACIÓN INICIAL

- *Se demuestra la **disminución de las velocidades de reacción**, para ambos catalizadores, con el aumento del volumen molecular de los sustratos fenólicos.*
- *Se epostula la formación de **agregados no covalentes** de las moléculas de los colorantes en solución.*

3.1. Introducción

Los colorantes seleccionados como modelo durante el desarrollo de esta tesis forman parte de dos de las familias de mayor importancia en base a su utilización: azoicos y antraquinónicos.

Los colorantes azoicos constituyen más del 50% de la producción total de colorantes. Se caracterizan por poseer uno o más grupos azo ($-N=N-$). Estos grupos se unen al menos por uno de sus enlaces a un grupo aromático (dos Santos et al., 2007; Willy Herbst, 2003). Son mayormente usados para producir colores amarillos, rojos y naranjas (dos Santos et al., 2007). Una de las principales características del grupo azo es la posibilidad de presentar tautomerismo, como se observa en la Figura 3.1 (círculos rojos). Cada especie tautomérica presenta una coloración diferente y la proporción de cada isómero en la solución depende de la naturaleza del solvente y de los sustituyentes (Willy Herbst, 2003).

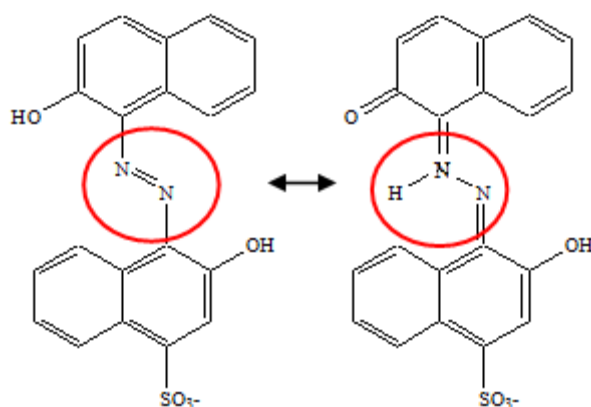


Figura 3.1. Tautomerismo. Formas azo e hidrazona de Azul Negro de Eriocromo.

El colorante azoico seleccionado para ser empleado como compuesto modelo es Naranja II (NaII) o C.I. *Acid Orange 7*, C.I. 15510 (Figura 3.2). Este colorante es altamente estable debido a la fuerte formación de enlaces intramoleculares y el tautomerismo, generado por el sustituyente $-OH$ en la posición *ortho*, el cual inhibe la ionización, la abstracción de hidrógeno y la isomerización *cis-trans* (Bandara & Kiwi, 1999).

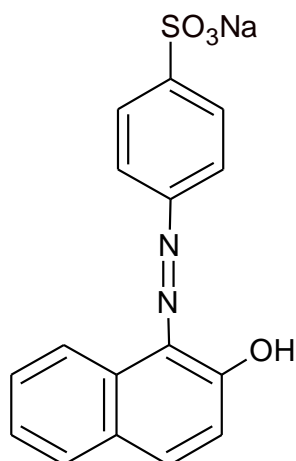


Figura 3.2. Estructura química de Naranja II (C.I. 15510).

Los segundos colorantes más utilizados son de tipo antraquinónico, debido a la buena relación costo–efectividad que otorgan. La estructura característica de esta familia de colorantes es 9,10–antraquinona (ver Figura 3.3), el cual es un compuesto no coloreado. Al incorporar sustituyentes fuertemente dadores de electrones se produce la formación de compuestos coloreados (Willy Herbst, 2003).

Este tipo de colorantes cubren casi todos los colores del espectro visible, pero son usados principalmente para obtener colores violetas, azules y verdes (dos Santos et al., 2007). Otorgan un buen brillo y resistencia a la luz (Willy Herbst, 2003).

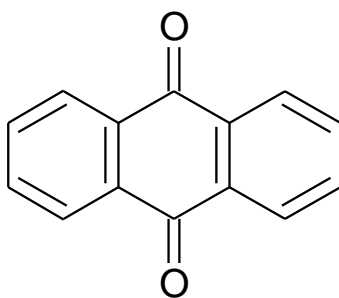


Figura 3.3. 9,10-antraquinona.

Dentro de los distintos colorantes antraquinónicos se decidió estudiar la decoloración de Rojo de Alizarina S (RAS) o C.I. *Mordant Red 3*, C.I. 58005 (Figura 3.4, a). Las soluciones de

este colorante presentan una importante turbidez, que puede asociarse a la capacidad de este compuesto de formar agregados en solución (Vasileva, Godjevargova, Ivanova, & Gabrovska, 2009). La selección de este colorante se asocia a la existencia de estudios previos de decoloración de Rojo de Alizarina, el cual es un colorante cuya estructura se encuentra altamente emparentada a RAS (Figura 3.4, b) (Pirillo et al., 2012). De esta manera es posible analizar los efectos del grupo sulfónico sobre la decoloración catalizada por HRP y hematin.

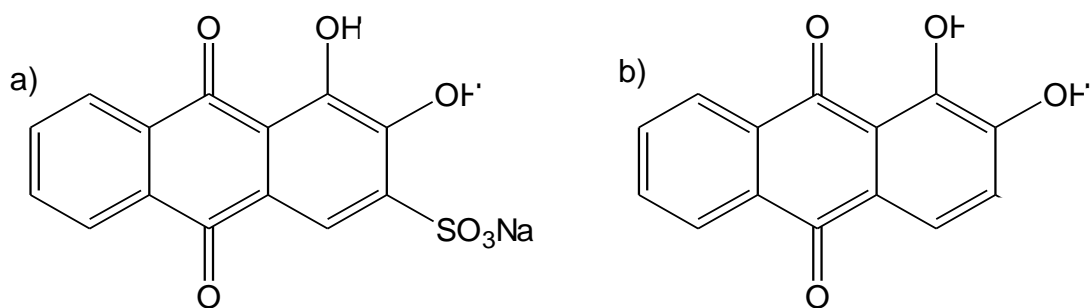


Figura 3.4. a) Estructura Química de Rojo de Alizarina S (C.I. 58005). b) Estructura Química de Rojo de Alizarina (C.I. 58000).

El presente capítulo presenta resultados preliminares de oxidación de Naranja II (NaII) y Rojo de Alizarina S (RAS), acompañados de estudios de comportamiento en solución de dichos sustratos. El objetivo de este capítulo es determinar los rangos de las variables operativas de reacción en los cuales serán posteriormente evaluados y optimizados los sistemas de eliminación de colorantes. Además, se pretende evaluar el tipo de acción oxidativa de la enzima hacia los colorantes, degradativa con formación de estructuras de menor conjugación o condensante con formación de estructuras de mayor conjugación por unión de moléculas de colorante o colorante- aminoantipirina. Los estudios llevados a cabo con NaII y RAS incluyeron: (1) análisis de sus espectros UV/visibles; e impacto del pH del medio solvente (2) estudios del comportamiento oxidativo de los sistemas colorante/ H_2O_2 /HRP; y (3) estudios del comportamiento oxidativo de los sistemas colorante/4- aminoantipirina/ H_2O_2 /HRP.

3.2. Metodología

3.2.1. Mediciones espectrales

Se tomaron los espectros UV-Visibles (entre 200 y 800 nm) para RAS y NaII en soluciones buffer de distintos valores de pH. Para las mediciones en buffer pH 5 se empleó buffer acetato de sodio, para pH 7 se utilizó buffer fosfato, para pH 9 se empleó buffer tris y para pH 10.6 buffer carbonato/bicarbonato. En todos los casos la concentración de buffer fue 0.1 M, mientras que la concentración de colorante utilizada fue 8 mg/l. Las determinaciones se realizaron en cubetas de cuarzo (Perkin-Elmer) a temperatura ambiente, empleando como referencia el buffer correspondiente de disolución.

Para las soluciones de RAS, se calculó el valor de pKa en función de las absorbancias medidas a diferentes valores de pH (Gokhale, 2006).

3.2.2. Reacciones de oxidación

Las condiciones de operación empleadas fueron seleccionadas en base a la reacción de co-oxidación de 4-aminoantipirina (AAP)/fenol estudiada en Capítulo 2. A los fines de determinar la posible formación de productos de co-oxidación de AAP con Naranja II y Rojo de Alizarina S se llevaron a cabo experimentos en presencia AAP análogos a los que se presentan en el capítulo anterior. La tabla 3.1 indica las concentraciones empleadas en cada experimento.

El buffer utilizado fue en todos los casos fue $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7, 0.1M. La soluciones madre de HRP, de colorantes y de AAP se prepararon en el mismo buffer a una concentración de 500 mg/l, 10 mM y 7.8 mM, respectivamente. Previo a su empleo, la solución de catalizador se sometió a 30 minutos de agitación.

Para poder analizar el avance de reacción “*en línea*”, se disminuyó la concentración de sustrato fenólico a valores que otorguen absorbancias por debajo de 1.5, para que las mediciones espectrales sean confiables (Exp. N° 1 a 4). Las reacciones se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo a temperatura ambiente, con un volumen final de 3 ml. Las correspondientes alícuotas de soluciones de colorante (18 μl), catalizador (1.8 μl) y buffer pH 7 (2950 μl) fueron agregadas en las cubetas hasta alcanzar las concentraciones

requeridas. Se dio inicio a la reacción mediante la adición de 33.5 μ l de solución de H₂O₂ (H₂O₂ 30 vol. diluido 1:10 en buffer KH₂PO₄ 0.1 M, pH 7).

Tabla 3.1. Concentración de especies intervinientes en los ensayos de oxidación.

Exp. N°	Tipo de colorante	[Colorante] mM- mg/l	[AAP] (mM)	[H ₂ O ₂] (mM)	[HRP] (mg/l)
Medición en línea					
1	NaII	0.06 – 21.0	–		
2	NaII		0.11		
3	RAS		–	0.3	0.3
4	RAS	0.06 – 20.5	0.11		
Medición por toma de muestras					
5	NaII	8.35 – 2900	–		
6	NaII		0.11		
7	RAS		–	0.3	0.3
8	RAS	8.35 – 2850	0.11		

Por otro lado, las reacciones a altas concentraciones de sustrato fenólico (8.35 mM) se monitorearon “*off line*”, mediante la toma de muestras de reacción a tiempos determinados que luego se analizaron espectrofotométricamente (Exp. N° 5 a 8). Las reacciones se llevaron a cabo en viales de 10 ml con un volumen final de reacción de 3 ml, a temperatura ambiente. Las correspondientes alícuotas de soluciones de colorante (2505 μ l), catalizador (1.8 μ l) y buffer pH 7 (460 μ l) fueron agregadas en las cubetas hasta alcanzar las concentraciones requeridas. Se dio inicio a la reacción mediante la adición de 33.5 μ l de solución de H₂O₂ (H₂O₂ 30 vol. diluido 1:10 en buffer KH₂PO₄ 0.1 M, pH 7). Se tomaron alícuotas de 15 μ l a distintos tiempos de reacción y se llevaron a un volumen de 3 ml con buffer en la cubeta. En todos los casos las cubetas se invirtieron 3 veces, a los fines de lograr la homogeneización de la mezcla. En todas las mediciones se recolectaron los espectros de las mezclas de reacción en el rango de 300 a 800 nm, utilizando cubetas de plástico y empleando buffer fosfato pH 7 0.1 M en la cubeta de referencia.

3.3. Resultados

3.3.1. Comportamiento en solución de Naranja II y Rojo de Alizarina S

Análisis espectral UV/visible en agua bidestilada

Para obtener información útil en ensayos cinéticos a través de mediciones espectrales UV-Visible es necesario determinar cuidadosamente la intensidad y longitud de onda del pico máximo correspondiente al espectro de absorción de cada colorante. La absorción de energía por parte de compuestos orgánicos implica la transferencia de electrones de los orbitales σ , π y n (orbitales enlazantes) desde el estado fundamental a estados de mayor energía. Existen también orbitales antienlazantes σ^* y π^* . Los electrones no implicados en la formación de enlace se encuentran en los orbitales n de O, S, N y halógenos (orbitales de no enlace). La energía relativa implicada en las transiciones electrónicas posibles se presenta en la Figura 3.5.

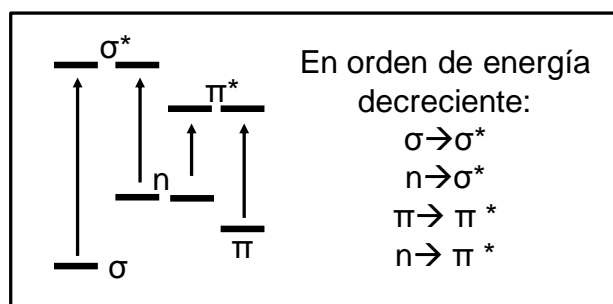


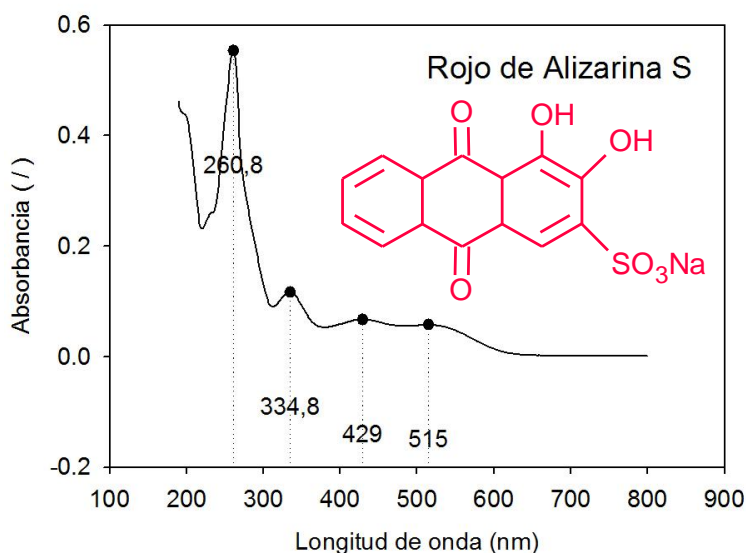
Figura 3.5. Transiciones electrónicas y energías

Entre los parámetros que afectan los espectros de una sustancia se encuentran la fuerza iónica y el pH del medio solvente, la concentración en solución y la presencia de otros iones. Las bandas $n \rightarrow \sigma^*$ sufren el impacto del cambio de solvente. Este tipo de transiciones se producen en compuestos saturados que poseen átomos con pares de electrones no compartidos. Aparecen en la región entre 150 y 250 nm y las absorptividades molares son del orden de 100 a 3000 $M^{-1} cm^{-1}$. Los máximos de absorción asignables a estos estados se desplazan a longitudes de onda más cortas en presencia de disolventes polares.

Las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ son las que se observan principalmente por espectroscopía UV-Visible. Ambas transiciones requieren de un grupo funcional (cromóforo) que suministre orbitales π . Por otro lado, grupos funcionales como $-\text{OH}$ o $-\text{NH}_2$ se conocen como auxocromos y su presencia desplaza los picos de los cromóforos a longitudes de onda más largas y aumenta sus intensidades. Los auxocromos poseen al menos un par de electrones sin compartir, n , que puede interactuar con los electrones π de los cromóforos. Esta interacción posee un efecto estabilizante del estado π^* por disminución de su energía, lo que provoca el desplazamiento batocrómico (al rojo).

El análisis de los espectros de las moléculas de colorante implica considerar los siguientes aspectos:

- (1) la asignación de grupos funcionales a los picos espectrales
- (2) el efecto del pH del medio en las especies isoméricas
- (3) la formación de agregados no coloidales que modifican los espectros observados
- (4) la presencia de macromoléculas en el medio, que puedan aumentar la formación de agregados de los colorantes.



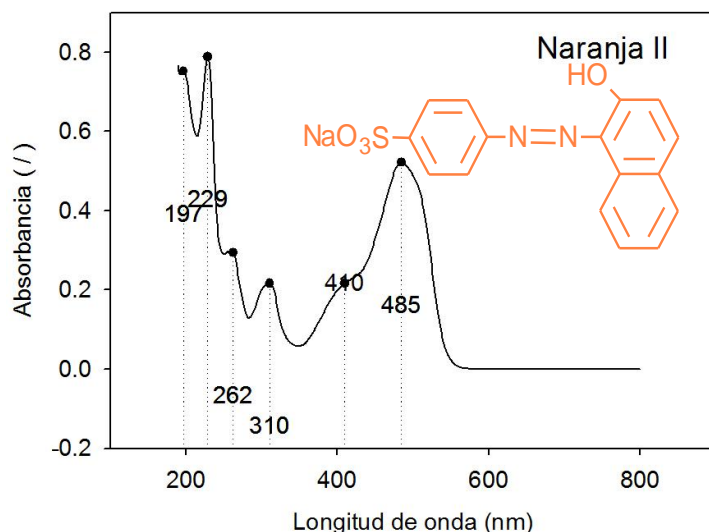


Figura 3.6. Espectros completos de Rojo de Alizarina S y Naranja II en agua destilada.
Concentración de colorante: 8 mg/l.

Los espectros de los colorantes se presentan en la Figura 3.6, en la cual se especifican las posiciones de los picos de absorción. Naranja II por su parte, presenta los picos correspondientes a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los anillos de benceno y naftaleno (229 y 310 nm, respectivamente); además de un pico a 410 nm asignable a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del enlace C-N=N-C y un pico a 484 nm correspondiente a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ de los enlaces -C=O y -N=C . Estas observaciones permiten comprobar la presencia en solución de las formas azoica e hidrazona de Naranja II (Figura 3.7). Además, los valores relativos de absorbancia permiten afirmar que la forma hidrazona se encuentra presente en mucha mayor proporción (J. Chen & Zhu, 2006; Li, Qu, Zhang, & Liu, 2006; Liang et al., 2010; Pasto & Johnson, 1981).

Rojo de Alizarina S presenta un pico a 260.8 nm correspondiente al anillo antracénico. Además, el pico a 334.8 nm es asignable a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del enlace -C=O ; mientras que a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del enlace OH-C=C-OH se les asigna el pico a 429 nm; y el pico observado a 515 nm corresponde a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ del enlace -C=O perteneciente al auxocromo OH-C-C=O (Gao et al., 2008; Pasto & Johnson, 1981; P Zucca, Vinci, Sollai, Rescigno, & Sanjust, 2008).

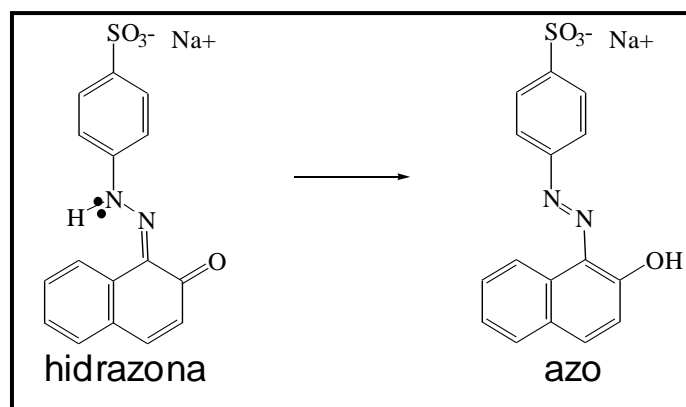


Figura 3.7. Tautomerismo. Formas azo e hidrazóna de Naranja II.

Efecto del pH en la estructura de los colorantes

El conocimiento de los efectos que pueda tener el pH de las soluciones sobre los espectros UV-Visibles es fundamental para los posteriores estudios de optimización de las condiciones de decoloración que se proponen en los capítulos siguientes. El rango de pH seleccionado para llevar a cabo este análisis de efecto es aquel en el cual se ha reportado una máxima actividad de HRP ($5 < \text{pH} < 9$) (H B Dunford, 1999; Klibanov & Morris, 1981; Monier, Ayad, Wei, & Sarhan, 2010). Además, en el caso de RAS se incluye el análisis del espectro a pH 10.6.

El efecto del pH del medio disolvente sobre las estructuras de los colorantes se presenta en la Figura 3.8. La Figura 3.8,a muestra los resultados obtenidos para NaII, el cual no presenta modificaciones de su estructura al variar el pH de las soluciones en un rango de 5 a 9. No obstante, se observa una ligera hipercromicidad a valores más altos de pH.

El valor de pK_a reportado para NaII es de 10.7 (Abbott, Batchelor, Lindsay Smith, & Moore, 2009). La presencia de $-\text{OH}$ en posición orto estabiliza la estructura de NaII debido al fuerte tautomerismo generado (Figura 3.7), el cual dificulta la ionización del grupo alcohol (Abbott et al., 2009; Hou, Li, Liu, Wang, & Wan, 2007). Las estructuras deprotonadas del colorante se muestran en la Figura 3.9.

Rojo de Alizarina S por su parte, presenta importantes alteraciones del espectro asociadas a cambios en su estructura a los distintos valores de pH testeados (Figura 3.8,b) Los círculos en la Figura 3.8 marcan tres puntos isobéuticos, los cuales indican la coexistencia en solución de tres especies en equilibrio ácido-base (ver Figura 3.10). Los valores de pK_a obtenidos para RAS fueron de 6.7 y 11.

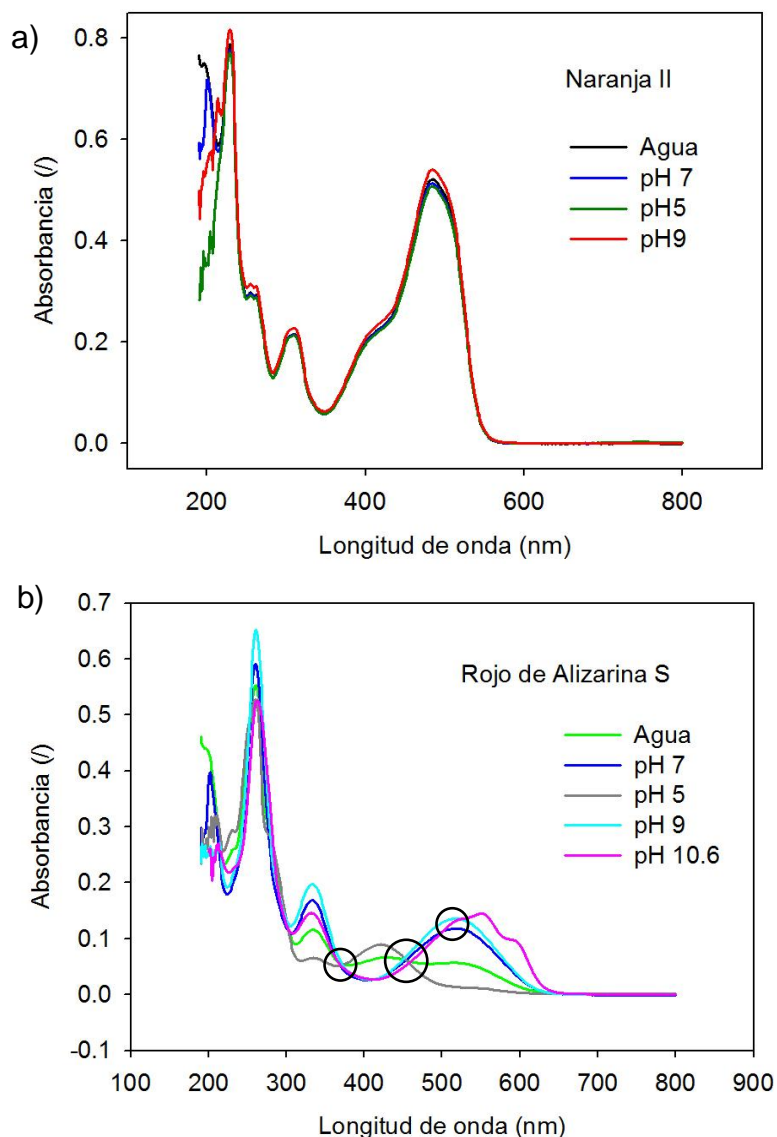


Figura 3.8. Espectros de NaII (a) y RAS (b) a diferente pH del medio.

Se observa el mismo comportamiento de hiper Cromicidad, incluso más acentuado que en el caso de NaII, en los picos a 260.8 nm y 335 nm para todos los valores de pH, mientras que en el pico a 511 nm solo es observable a valores de pH mayores a 7. Este último pico (515 nm, asignado a $\text{OH}^- \text{C}=\text{C}=\text{O}$) desaparece a pH 5, mientras que aumenta la absorbancia a 429 nm ($\text{HO}-\text{C}=\text{C}-\text{OH}$), lo cual es consistente con los híbridos de resonancia que pueden existir en solución según el grado de disociación de RAS (ver Figura 3.11). La solución de RAS a pH 10.6 presenta variaciones en la banda a 511, la cual se traslada a 550 nm. Este

pico puede asignarse a las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ de los enlaces $-C=O$ formados luego de la deprotonación completa del colorante. El hombro a 600 nm se asigna a los grupos carbonilo conjugados presentes a pH 10,6, relacionados con la formación de nuevos enlaces $-C=O$ (ver Figura 3.11). A pH 9, existen cada vez más especies con $-OH$ ionizados (y especies quinoides resonantes), puesto que el primer pK_a de RAS sódico es de 6.7. La especie principal en solución es un dianión. Al presentar un segundo pK_a de 11, la concentración relativa del trianión respecto al dianión a pH 10.6 es 0,4. Es decir que a pH 10,6 una proporción importante de RAS se encuentra como trianión (con los dos $-OH$ ionizados, más el grupo sulfónico como sulfonato). La presencia de un punto isobéptico a 525 nm confirma que hay dos especies que coexisten a pH 10,6 (Nazar, Khan, & Shah, 2010).

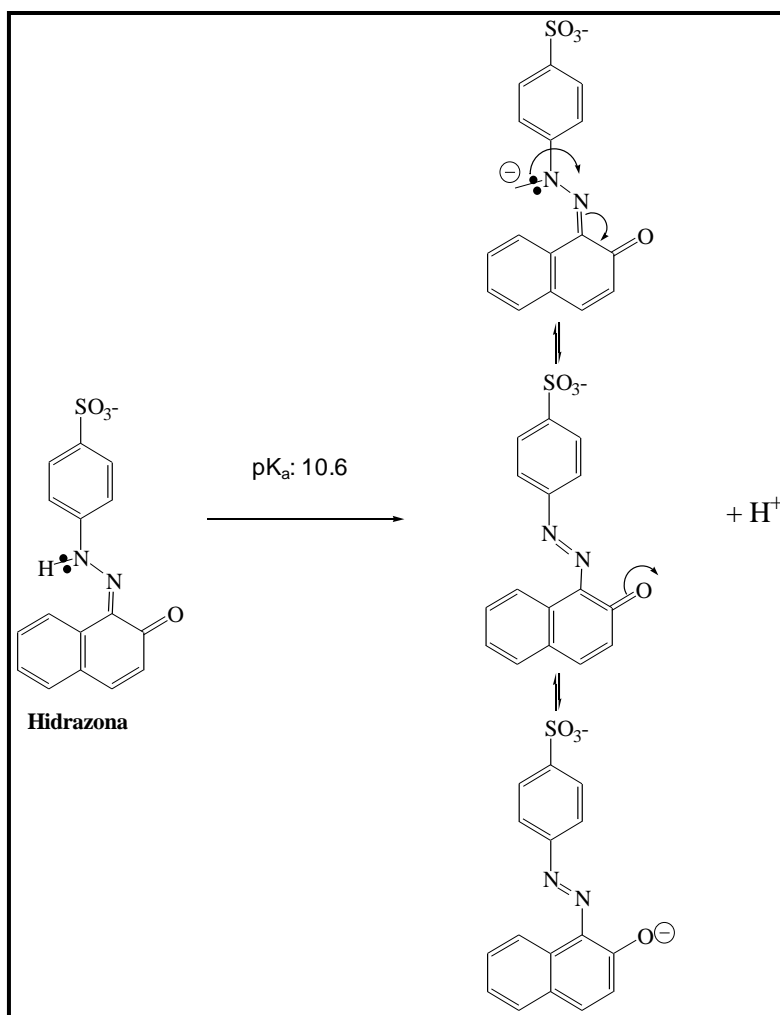


Figura 3.9. Especies deprotonadas de Naranja II presentes en solución a valores de pH cercanos a 10.6.

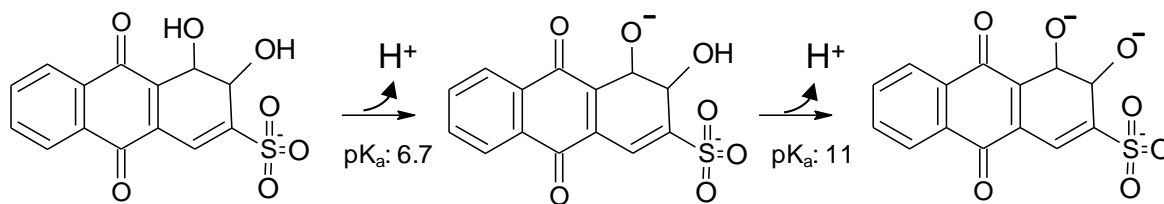


Figura 3.10. Especies deprotonadas de RAS en solución.

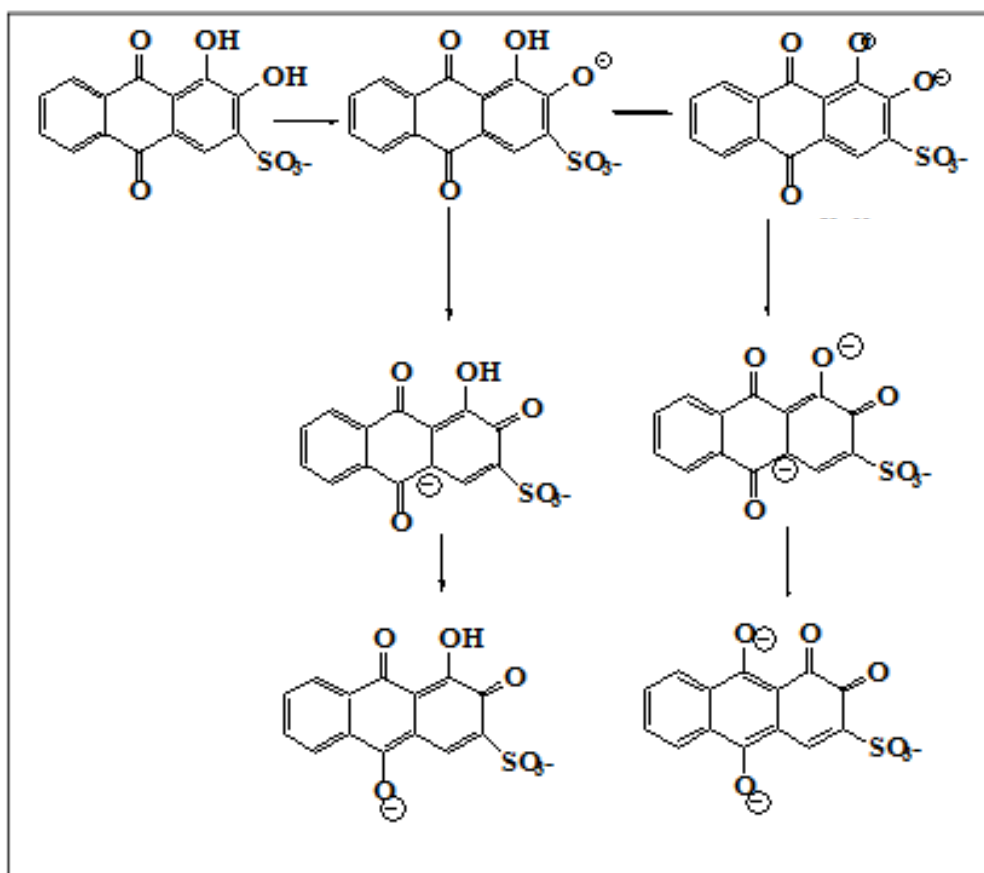


Figura 3.11. Estructuras de resonancia de Rojo de Alizarina S a distintos pHs.

Formación de agregados moleculares

La turbidez observada en las soluciones de RAS puede estar relacionada a la formación de agregados. La hipercromicidad observada en los espectros de ambos colorantes con el aumento del pH del medio disolvente puede asociarse a la presencia de agregados de los colorantes en solución. Esta hipercromicidad es producto de un efecto desagregante del

aumento del pH, ya que la absorptividad de las especies disminuye con la formación de agregados no covalentes (Koleva, Stoyanov, Kolev, Petkov, & Spiteller, 2008; Sautter, Thalacker, Heise, & Wurthner, 2002). Un aumento de la concentración de la forma monomérica del colorante, producto de la disociación de dímeros por aproximación del valor del pH del medio al valor de pK_a se traduce en un aumento de la absorbancia (Bandara & Kiwi, 1999; Reeves, Maggio, & Harkaway, 1979). A su vez, la presencia de macromoléculas en solución, como las enzimas, aumenta la formación de agregados.

La capacidad de RAS de conformar agregados moleculares ha sido reportada con anterioridad (Vasileva et al., 2009), así como el estudio de las estructuras diméricas producto de la formación de enlaces puente hidrógeno (Pilipenko, Safronova, & Trachevsky, 1993). Pirillo y colaboradores observaron agregados de alizarina en solución acuosa a pH neutro (Pirillo, García Einschlag, Rueda, & Ferreira, 2010b).

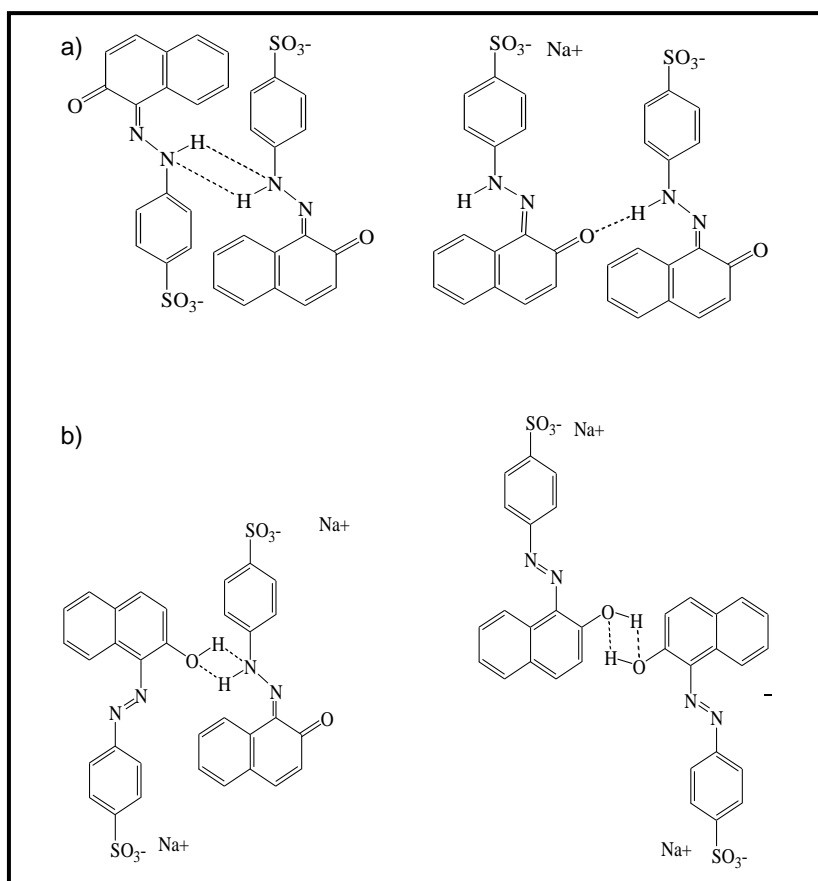


Figura 3.12. Agregados bimoleculares de NaII. a) hidrazona– hidrazona. b) hidrazona– azoica c) azoica– azoica.

Diferentes interacciones intermoleculares no covalentes, como enlaces puente hidrógeno e interacciones electrostáticas estabilizan estos agregados de colorante. Las estructuras diméricas posibles para ambos colorantes se presentan en las Figuras 3.12 y 3.13.

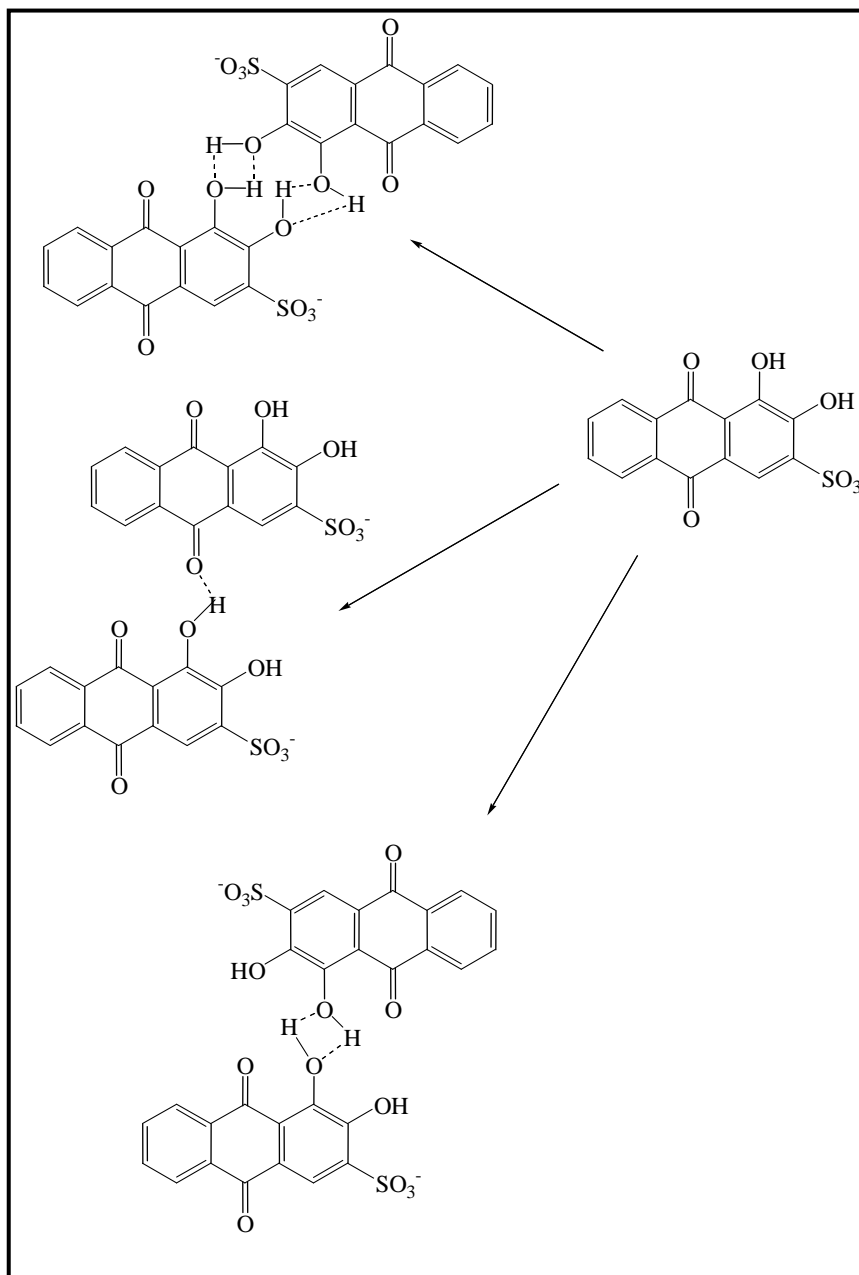


Figura 3.13. Agregados bimoleculares de Rojo de Alizarina S.

3.3.2. Reacciones de oxidación en sistemas catalizados por HRP

Colorantes/ H_2O_2 /HRP

Las variaciones de absorbancia de los picos característicos de cada colorante en presencia de H_2O_2 se muestran en la Figura 3.14. Los espectros presentaron una oscilación de los valores máximos de absorbancia, con un leve aumento de la misma para RAS y una leve disminución en el caso de NaII luego de 1 hora de reacción, sin corrimientos ni modificaciones en la forma del espectro visible. Este comportamiento se observó para concentraciones de los colorantes de 0.06 mM, razón por la cual se analizó el efecto del aumento de las concentraciones a 8.35 mM sin presentar variaciones en los espectros medidos. Asimismo, en el caso de RAS se observó un leve aumento de absorbancia a 300 nm luego de los 60 minutos de reacción, característico de la formación de productos de menor conjugación.

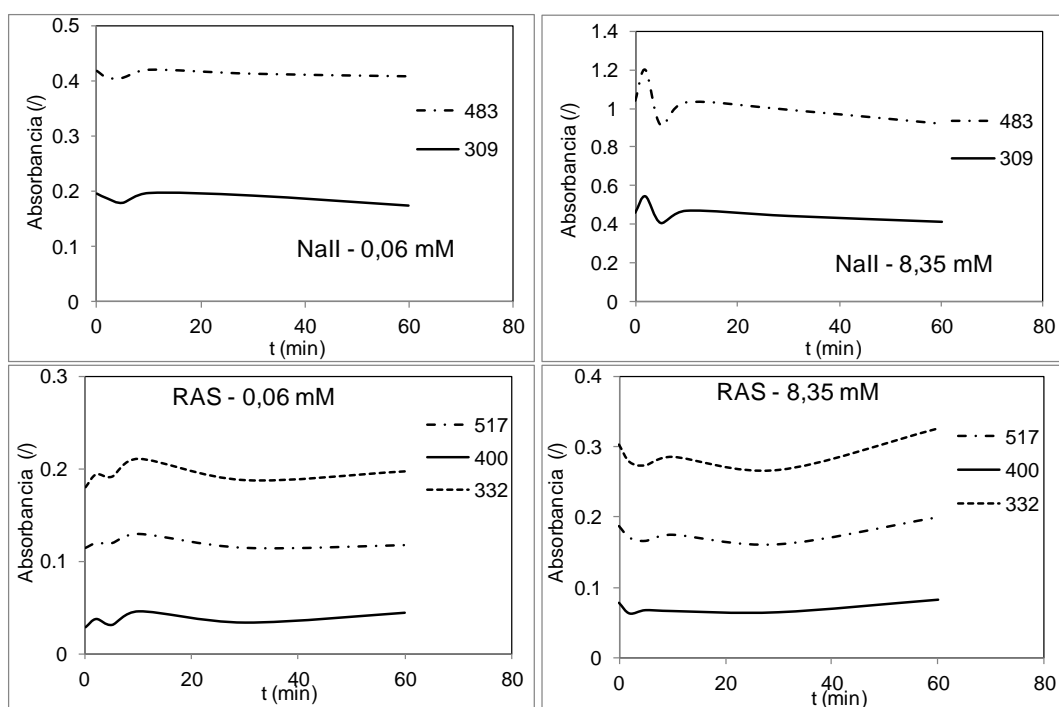


Figura 3.14. Variación de los picos de absorción para cada colorante durante el tratamiento con HRP/ H_2O_2 .

La presencia de agregados de colorantes en el medio de reacción a valores de pH neutro puede ser responsable del comportamiento oscilatorio observado. La disponibilidad de grupos $-OH$ de los sustratos fenólicos, al igual que el volumen de los agregados no les permite transformarse como tales en sustrato de la enzima, a diferencia de las estructuras monoméricas (Pirillo et al., 2010). En este caso, la oscilación de la absorbancia se atribuye a

una disminución por posible acción degradativa de HRP y un consecuente aumento producto de un efecto desagregante, debido a la disminución de concentración de las especies monoméricas. La baja velocidad de reacción así como la baja conversión observada en ambos casos puede deberse a las condiciones seleccionadas, las cuales favorecen la inactivación de los catalizadores por formación de intermediarios no reactivos. Las condiciones de reacción como pH, temperatura, concentración de peróxido de hidrógeno y concentración de catalizador deben ser modificadas para optimizar la eliminación de los colorantes y poder analizar los mecanismos de decoloración.

Colorantes/AAP/H₂O₂/HRP

Los resultados obtenidos en los experimentos de co-oxidación de 4-aminoantipirina con Naranja II y Rojo de Alizarina S se muestran en la Figura 3.15. A su vez, la variación de los picos máximos de absorbancia se presenta en la Figura 3.16. A bajas concentraciones de colorantes, los espectros registrados a tiempos de reacción mayores a 2 h presentan un aumento de la absorbancia a longitudes de onda inferiores a 400 nm, lo que puede asociarse a la formación de productos de menor peso molecular. No obstante, a valores de longitudes de onda menores a 330 nm el espectro puede verse afectado por el espectro de absorción de AAP. Por otra parte, se observa para ambos colorantes una leve disminución de la absorbancia de sus picos característicos (484 nm para NaII y 511 nm para RAS), lo que puede indicar la ruptura de las estructuras de los colorantes por acción catalítica de la enzima, pero con muy bajos rendimientos.

Sin embargo, en el espectro medido para RAS, el avance de reacción produce un aumento de la absorbancia a 318 y 400 nm (Figura 3.16). Este pico de absorbancia a 318 nm, análogo al observado para el sistema fenol/AAP/H₂O₂ catalizado por HRP (ver capítulo 2), se asignó a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del sistema conjugado N=C/C=O presente en la estructura de la quinonaimina producto de la reacción. Sin embargo, no se observa en este caso la formación de un nuevo pico a mayores longitudes de onda producto de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ del mismo sistema conjugado. Es importante aclarar, de todos modos, que este pico puede estar siendo enmascarado por la banda de absorción de RAS a 511 nm. La co-oxidación de RAS con AAP podría, por lo tanto, provocar la formación de la quinonaimina presente en la Figura 3.17, análoga a la obtenida con fenol, a velocidades mucho menores.

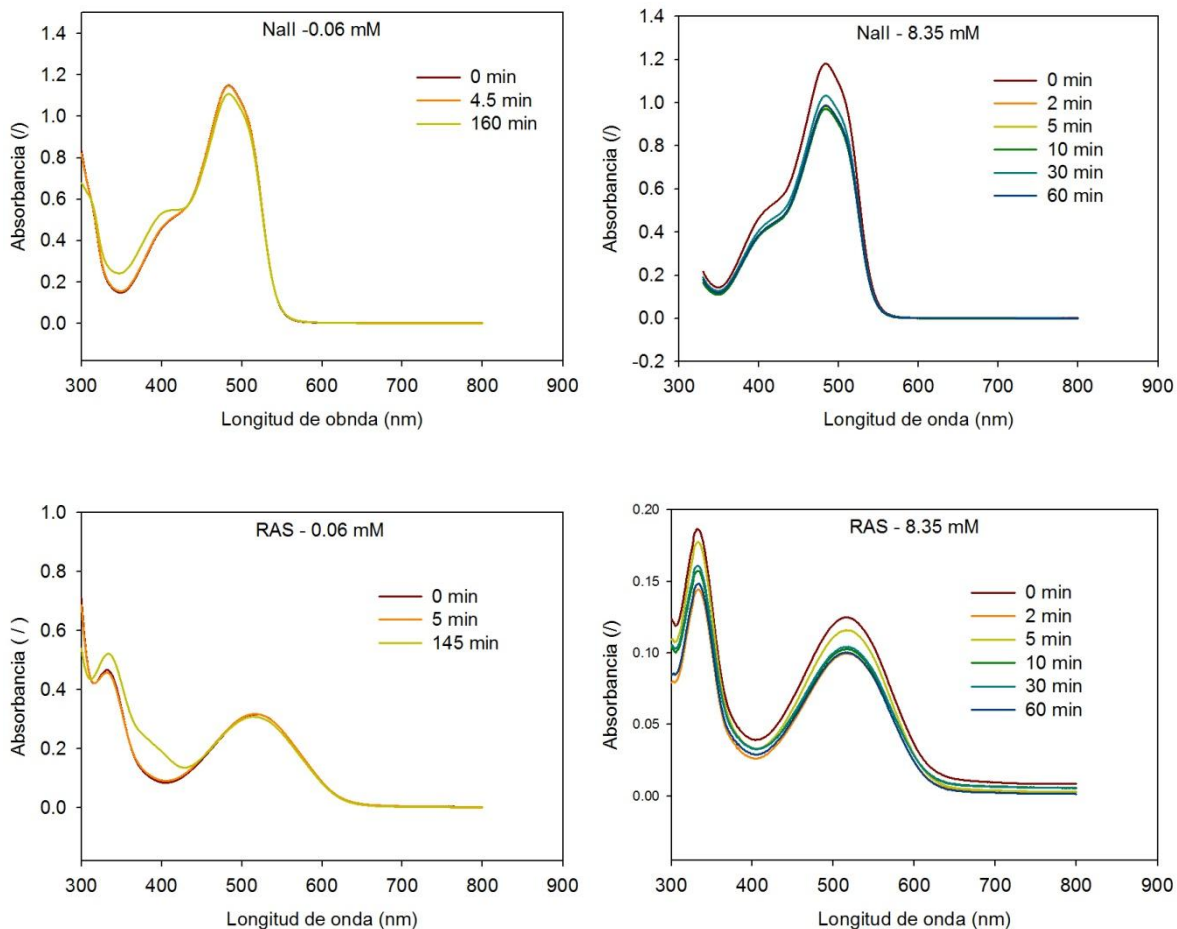


Figura 3.15. Avance de reacción de co-oxidación de AAP con NaII y RAS a altas y bajas concentraciones de colorante.

En los espectros correspondientes a altas concentraciones de colorante se observa una disminución general de los valores de absorbancia. Este comportamiento podría indicar cierta actividad degradativa del catalizador hacia los colorantes. Es evidente que las concentraciones relativas de colorantes frente a AAP son tan altas que no ha sido posible observar en ningún caso la formación de productos de co-oxidación.

Cabe indicar por otro lado que las bajas actividades enzimáticas medidas en estas condiciones en comparación a las observadas con el sustrato fenol (ver capítulo 2) indicarían que los colorantes son estructuras más voluminosas que generan cierto impedimento estérico para el acceso al sitio activo de HRP en contraste con la pequeña molécula de fenol.

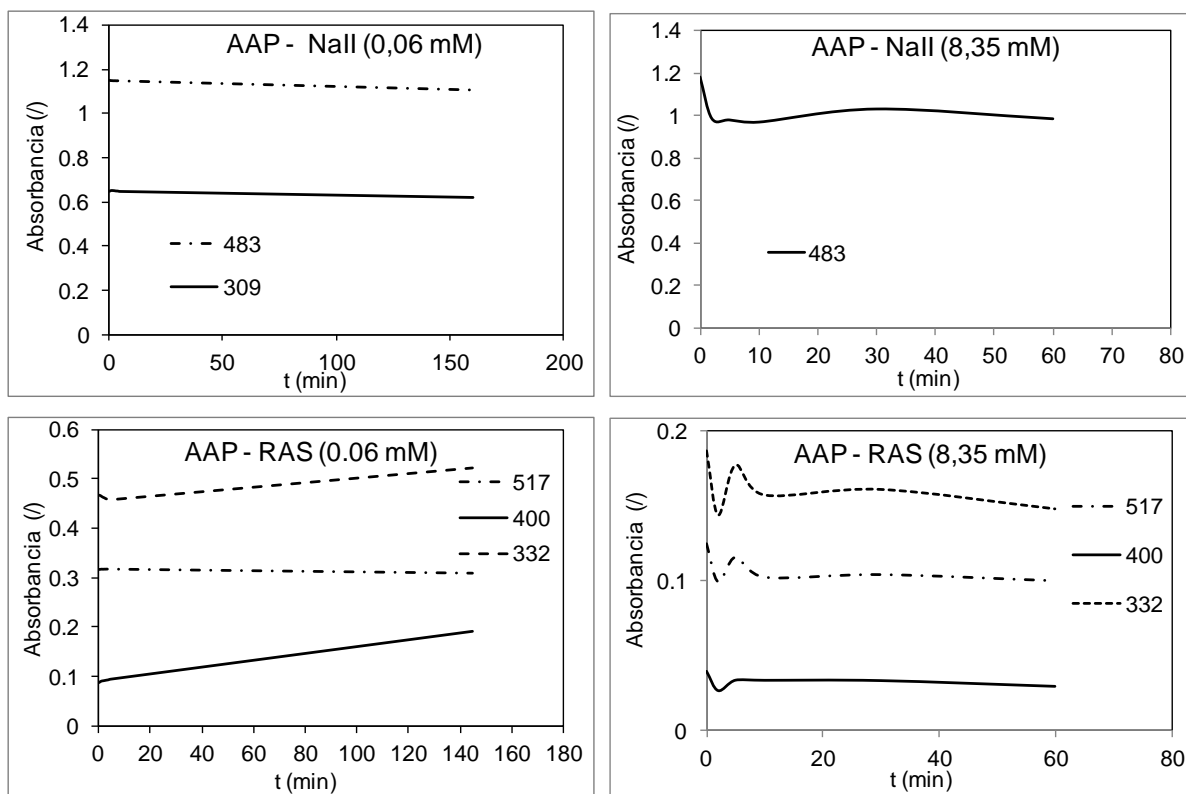


Figura 3.16. Variación de los picos de absorción para cada colorante durante la reacción de co-oxidación con AAP catalizada por HRP/H₂O₂.

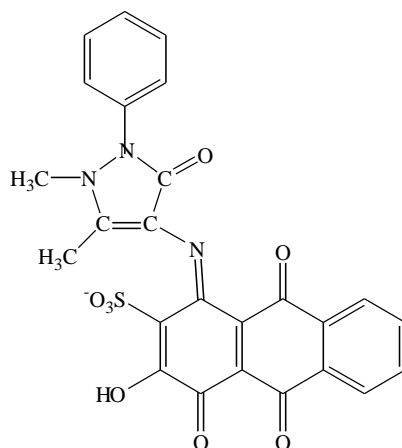


Figura 3.17. Estructura propuesta de la quinonaimina producto de la co-oxidación de AAP con RAS.

3.4. Conclusiones

El estudio del espectro de absorbancia de Naranja II permite corroborar la existencia de las formas azoica e hidrazona del colorante en solución, siendo esta última la de mayor presencia, debido a la estabilización producida por el tautomerismo. Rojo de Alizarina S presenta importantes alteraciones del espectro a distintos valores de pH de la solución, lo que es consistente con los valores obtenidos para las constantes de disociación ácidas de los grupos -OH del colorante. Los valores testeados de pH del medio disolvente no produjeron cambios observables en los espectros de Naranja II en las longitudes de onda de los picos característicos debido al tautomerismo generado que inhibe la disociación ácido-base en esta estructura.

Se presume, además, la formación de agregados no covalentes de NaII y RAS en solución, cuya concentración es dependiente del pH del medio disminuyendo mientras el pH aumenta.

Los estudios de oxidación de NaII y RAS con HRP mostraron bajas velocidades de reacción en las condiciones testeadas. La presencia de un comportamiento oscilatorio en los valores de absorbancia de los picos característicos de cada colorante puede asignarse a la presencia de agregados en el medio de reacción.

Por último, no fue posible confirmar la obtención de los productos de co-oxidación de NaII y RAS con AAP. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de formación de quinonaimina con RAS a bajas concentraciones de colorante.

Al comparar los resultados obtenidos con HRP en la oxidación de fenol (Capítulo 2) vs. colorantes fenólicos puede observarse una notable disminución de las velocidades de reacción con el aumento del volumen molecular de los sustratos. Sumado a esto, lejos de advertir la formación de estructuras de mayor peso molecular (oligómeros), se evidencia una leve formación de productos de degradación con NaII y RAS. Esto último permite suponer que el aumento de complejidad en la estructura de los sustratos fenólicos provoca la degradación de los radicales orgánicos formados en lugar de su acoplamiento.

Las condiciones de reacción, como el pH, la temperatura, la concentración de H_2O_2 y la concentración de catalizador deben ser modificadas posteriormente para optimizar las velocidades de las reacciones de oxidación de Naranja II y Rojo de Alizarina S.

3.5. Resultados publicados

Los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en el IV Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, realizado en Montevideo en el año 2010, en el trabajo titulado: “Eliminación de Rojo de Alizarina S y Naranja II catalizada por peroxidasa de rábano picante”. Autores. Agostina Córdoba, Ivana Magario, María Luján Ferreira.

CAPÍTULO 4

DECOLORACIÓN DE ROJO DE ALIZARINA S

- *Se evidencia la formación de productos de menor peso molecular con ambos catalizadores, lo que permitió postular la existencia de **mecanismos degradativos** de oxidación de Rojo de Alizarina S.*
- *Se observa un **efecto inhibitorio** de la concentración de H_2O_2 .*
- *Se propone la presencia de una vía paralela de reacción por coordinación de H_2O_2 en competencia con el colorante, capaz de **producir O_2** (vía catalática o pseudo-catalática) en los sistemas catalizados por hematin.*
- *Se demuestra la **falta de especificidad** de hematin a los sustratos fenólicos frente a HRP.*

4.1. Introducción

La degradación de Rojo de Alizarina S (RAS) mediante el empleo de procesos fotocatalíticos con óxidos metálicos semiconductores ha sido objeto de estudio en los últimos años en diferentes grupos de investigación. La utilización de óxidos de zinc, titanio y hierro presentaron buenos resultados en la decoloración de RAS (Bellanti, Castrucci, Ruiu, Visco, & Campanella, 2010; Kansal, Lamba, Mehta, & Umar, 2013; Lai, Zhou, Wang, Yang, & Chen, 2013). También existen reportes en la literatura de las mejoras producidas por el dopado con bismuto (Sood, Mehta, Umar, & Kansal, 2014). No obstante, el efluente generado por el empleo de luz ultravioleta resulta perjudicial para la vida acuática (Muhd Julkapli, Bagheri, & Bee Abd Hamid, 2014) además de encarecer el proceso de decoloración. La incorporación de metales nobles como oro y plata mejora las eficiencias de decoloración pero eleva los costos de los catalizadores obtenidos (M. L. de Souza & Corio, 2013; Pal, Deb, & Sircar, 2013).

Resultados de la degradación catalítica de RAS mediada por la metaloporfirina sintética 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphine-Mn(III) como biomimético de lacasa se presentan en el trabajo de Paolo Zucca y colaboradores. El mecanismo propuesto de eliminación de RAS es degradativo y culmina con la obtención de ácido ftálico como producto final (P Zucca et al., 2008). Durante estos estudios los autores descartaron la participación del radical hidroxilo como oxidante en las condiciones evaluadas.

Existen antecedentes de nuestro grupo de investigación de estudios de degradación del colorante antraquinónico Alizarina (ver Figura 4.1,a) en condiciones seleccionadas con HRP y hematin solubles utilizando el enfoque OFAT (un factor a la vez). Los resultados mostraron la capacidad de hematin (25 mg/l) para eliminar el 97% de alizarina en solución acuosa a pH neutro durante 2 h de reacción, para soluciones de colorante de 50 mg/l. A su vez, estudios UV-Visible del medio de reacción permitieron concluir en la formación de productos por acoplamiento/condensación de radicales del colorante (Pirillo, García Einschlag, et al., 2010a). No obstante, estudios de la degradación del colorante Fluoresceína (ver Figura 4.1,b) no otorgaron buenos rendimientos de decoloración y los espectros del medio de reacción presentaron evidencia de formación de estructuras de menor peso molecular (Pirillo, Einschlag, Ferreira, & Rueda, 2010b).

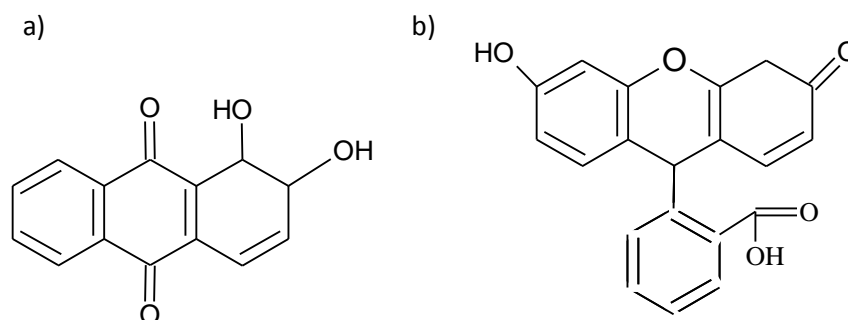


Figura 4.1. Estructura de los colorantes Alizarina (a) y Fluoresceína (b).

En esta tesis se pretende abordar el estudio de la oxidación de RAS catalizada por hematin como biomimético de HRP, analizando las diferencias y similitudes de los mecanismos de ambos catalizadores. El presente capítulo contiene resultados correspondientes a la catálisis homogénea con hematin y HRP. El empleo de herramientas de diseño estadístico de experimentos permite seleccionar la cantidad y condición de una serie de corridas experimentales de forma de optimizar recursos para obtener determinado nivel de conocimiento del sistema bajo estudio.

La interacción de HRP con H_2O_2 y la consecuente formación de E_I , así como las características electrónicas y estéricas de E_I , E_{II} y E_{III} han sido objeto de diferentes estudios teórico-experimentales que emplean métodos de química computacional para analizar los resultados experimentales (*Porphyrin Handbook*, 2000; Shelnutt, 2000; Tatoli, Zazza, Sanna, Palma, & Aschi, 2009; Zazza, Aschi, & Palma, 2006). La química computacional simula estructuras y reacciones químicas numéricamente, basándose total o parcialmente en las leyes de la física. Los métodos computacionales pueden dividirse en dos grandes categorías, aquellos basados en la mecánica molecular y los basados en la mecánica cuántica. La mecánica molecular aplica las leyes clásicas de la física a los núcleos de las moléculas, sin consideraciones electrónicas. Trata a los átomos como esferas rígidas y a los enlaces como resortes. La capacidad de estiramiento, torsión y flexión de los enlaces se describe matemáticamente mediante el empleo de la ley de Hooke. Se incorporan, a su vez, las interacciones de van der Waals, repulsión estérica y atracción/repulsión electrostática entre los átomos no enlazados. La energía potencial total de la molécula se describe a partir de la suma de las energías de las interacciones de estiramiento, flexión y torsión y de la energía de no enlace. Por su parte, los métodos basados en la mecánica cuántica emplean la

ecuación de Schrödinger para describir a las moléculas incluyendo el tratamiento explícito de su estructura electrónica (María Laura Foresti, 2006).

Este capítulo incorpora a la discusión resultados de modelado molecular obtenidos por la Dra. Ferreira, a los fines de soportar las observaciones experimentales. Los cálculos fueron desarrollados con un método de mecánica molecular, MM2 (Molecular Mechanics Allinger program version 2) incluido en Chem 3D Pro 5.0 de Cambridge Soft 1999, y con un método semiempírico que considera la configuración electrónica, PM6 (Parameterized Model 6), incluido en el software MOPAC.

Los objetivos particulares de este capítulo se detallan a continuación:

- Analizar el efecto de variables operativas en la actividad de decoloración de RAS con HRP y con hematin en solución.
- Optimizar las condiciones de los factores analizados para maximizar la eficiencia y la eficacia de ambos catalizadores en la decoloración de RAS.
- Determinar la naturaleza degradativa o polimerizante de la catálisis oxidativa en ambos casos.
- Analizar los perfiles de oxígeno disuelto y la concentración de peróxido de hidrógeno para ambos catalizadores durante el proceso de decoloración a fin de inferir sobre el mecanismo de acción en ambos casos
- Incorporar a la discusión de resultados un estudio de modelado molecular que permitan analizar las interacciones de los intermediarios catalíticos con H_2O_2 y RAS.

4.2. Metodología

4.2.1. Diseño de Experimentos y análisis estadístico

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas, que permiten obtener modelos polinómicos por regresión a los datos experimentales. De esta manera, es posible determinar las condiciones óptimas de operación en sistemas en los cuales la respuesta se ve influenciada por varios factores

(variables independientes). Para establecer la relación entre la respuesta y las variables independientes se emplean datos cuantitativos obtenidos de un diseño óptimo de experimentos. Las técnicas de Diseño Óptimo de Experimentos (DOE) hacen uso de herramientas estadísticas que permiten la selección de un mínimo número de experiencias, distribuidas dentro de la región experimental. Las condiciones (o niveles) de cada variable independiente son modificadas simultáneamente de un experimento a otro, lo que permite evaluar efectos de interacción de variables sobre la respuesta (Gutierrez Pulido, De la Vara Salazar, & Interamericana, 2008; Montgomery, 2001).

Con objeto de evaluar la actividad de ambos catalizadores dentro de una región específica de condiciones de reacción en base a la metodología de superficie de respuesta (RSM), se seleccionó un diseño experimental para determinar los experimentos a realizar.

La relación funcional real entre los factores y las respuestas se desconoce, por lo que se establece una aproximación a la relación entre la variable dependiente (respuesta) $Y=f(X_j)$ y el conjunto de variables independientes (factores) (X_j) mediante un modelo matemático polinomial multivariado, obtenido por estimaciones de mínimos cuadrados a partir de las respuestas obtenidas experimentalmente. Estas últimas se ajustaron al siguiente modelo polinómico de segundo grado:

$$Y = b_0 + \sum b_i \cdot X_i + \sum b_{ii} \cdot X_i^2 + \sum \sum b_{ij} \cdot X_i \cdot X_j \quad (4.1)$$

donde Y es la respuesta prevista, b_0 es el promedio de todas las respuestas experimentales, b_i el principal coeficiente de efecto de la variable X_i , b_{ii} el coeficiente de segundo orden de la variable X_i , y b_{ij} el coeficiente de efecto de interacción entre las variables X_i y X_j ($i \neq j$). Las variables independientes y sus efectos, así como los efectos de curvatura (interacciones) sobre la respuesta estudiada se evaluaron estadísticamente. Un diseño Doehlert (Doehlert, 1970) con cuatro factores se seleccionó con el fin de estimar los parámetros de la ecuación 4.1. La particularidad de este diseño es que presenta una distribución de puntos igualmente espaciados y, en contraste con los diseños conocidos, las matrices Doehlert son más uniformes y eficientes (número de experimentos igual a $k^2 + k + 1$ siendo k el número de factores). Además, permiten determinar en un primer paso los efectos de un grupo de factores y, a través de una expansión de la matriz experimental, extender el análisis a más

variables independientes (Benoit-Marquié, Puech-Costes, Braun, Oliveros, & Maurette, 1997; Ivana Magario, 2009).

El diseño experimental utilizado se realizó en dos etapas. En una primera etapa se evaluaron los efectos de la temperatura, el pH y la concentración de peróxido de hidrógeno para la cual la matriz experimental contenía trece experimentos uniformemente distribuidos representando los vértices de un cubo octaedro (Figura 4.2) (Tabla 4.1, experimentos 1–13). En una segunda etapa se introdujo una cuarta variable independiente, la concentración de catalizador; lo que sumó 8 experimentos al diseño (Tabla 4.1, experimentos 13–21). Para evaluar la reproducibilidad de las experiencias se realizaron cuatro repeticiones en el centro de la región experimental. El orden de los experimentos en cada etapa se realizó en forma aleatoria aunque se agruparon aquellos que compartían el mismo valor de temperatura.

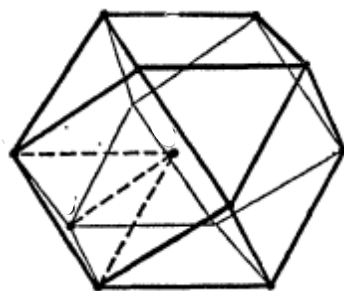


Figura 4.2. Cubo octaedro.

La región experimental fue definida considerando las condiciones de pH y temperatura de efluentes clásicos de la industria textil (Badawy & Ali, 2006; COMMISSION, 2003). Así, el rango de variación de la temperatura se fijó entre 30–50°C, el rango de pH fue de 7–11, la concentración de peróxido de hidrógeno se modificó entre 0,05–5 mM, y la concentración de catalizador entre 0,05–4,95 mg/l. La relación molar H₂O₂/RAS varió desde 0,24 a 24 y la relación másica catalizador/RAS varió entre 6.10⁻⁴ y 6.10⁻². Los niveles de cada factor son los valores de los mismos. En este caso se trabajó con 5 niveles para la temperatura, 7 niveles para la concentración de H₂O₂, 7 niveles para el pH y 3 niveles para la concentración de catalizador. A su vez, el volumen de reacción, la concentración de colorante y la agitación se mantuvieron constantes.

Los valores de las variables fueron normalizados o codificados como: $X_i = (U_i - U_M)/\Delta U$. Donde X_i es la variable codificada en un rango que va desde -1 a +1, U_i el valor de la variable efectiva, U_M el valor central del rango de la variable y ΔU el paso de la variable ($= (U_{i,Max} - U_{i,Min})/2$).

Las respuestas analizadas fueron la Conversión porcentual (Y) y el Rendimiento Catalítico (Z), las cuales se definen en las ecuaciones 4.2 y 4.3

$$Y = \left(\frac{A_0 - A_{60}}{A_0} \right) \cdot 100 \quad (4.2)$$

Donde A_0 es la absorbancia a tiempo cero y A_{60} la absorbancia a los 60 min de reacción, ambas a 511 nm, el pico correspondiente al cromóforo de RAS (ver Figura 3.6, capítulo 3).

$$Z = \frac{Y \cdot [\text{Rojo de Alizarina S}]}{100 \cdot [\text{Catalizador}] \cdot [H_2O_2] \cdot V_t} \quad (4.3)$$

En la ecuación 4.3 $[RAS]$ y $[H_2O_2]$ denotan la concentración molar de RAS y H_2O_2 en mM, V_t el volumen de reacción en litros, y $[Catalizador]$ la concentración de catalizador en g/l. El rendimiento catalítico expresa los milimoles de colorante convertido por gramo de catalizador y por milimol de oxidante.

El análisis estadístico de los resultados se efectuó por medio del software comercial STATGRAPHICS Centurión, versión XV.1 (Virginia, USA). Se analizaron los efectos sobre las respuestas estudiadas y se ajustaron las respuestas mediante modelos de regresión múltiple. Los modelos se evaluaron por medio de los coeficientes de determinación o de regresión (R^2). La significancia estadística de los factores y de sus efectos de interacción se determinó mediante el Test de ANOVA, siendo descartados aquellos factores que no afectaron las variables dependientes analizadas ($p > 0,05$). No obstante, la jerarquía de los modelos se mantuvo (Gutierrez Pulido et al., 2008).

Tabla 4.1: Diseño de Experimentos: Doehlert para cuatro factores.

Exp N°	Temperatura		Concentración de H ₂ O ₂		pH		Concentración de Catalizador	
	Efectivo (°C)	Codificado	Efectivo (mM)	Codificado	Efectivo (-)	Codificado	Efectivo (mg/l)	Codificado
Matriz experimental para el estudio de los factores temperatura, Concentración de H ₂ O ₂ y pH								
1	40	0	2,5	0	9,0	0	2,5	0
2	50	+ 1,0000	2,5	0	9,0	0	2,5	0
3	45	+ 0,5000	4,7	+ 0,8660	9,0	0	2,5	0
4	35	- 0,5000	4,7	+ 0,8660	9,0	0	2,5	0
5	45	+ 0,5000	3,2	+ 0,2887	10,6	+ 0,8165	2,5	0
6	35	- 0,5000	3,2	+ 0,2887	10,6	+ 0,8165	2,5	0
7	40	0	1,1	- 0,5774	10,6	+ 0,8165	2,5	0
8	30	- 1,0000	2,5	0	9,0	0	2,5	0
9	35	- 0,5000	0,4	- 0,8660	9,0	0	2,5	0
10	45	+ 0,5000	0,4	- 0,8660	9,0	0	2,5	0
11	35	- 0,5000	1,8	- 0,2887	7,4	- 0,8165	2,5	0
12	45	+ 0,5000	1,8	- 0,2887	7,4	- 0,8165	2,5	0
13	40	0	4,0	+ 0,5774	7,4	- 0,8165	2,5	0

Experimentos adicionales para el estudio del factor Concentración de catalizador

4	45	+ 0,5000	3,2	+ 0,2887	9,4	+ 0,2041	4,44	+ 0,7906
15	35	- 0,5000	3,2	+ 0,2887	9,4	+ 0,2041	4,44	+ 0,7906
16	40	0	1,1	- 0,5774	9,4	+ 0,2041	4,44	+ 0,7906
17	40	0	2,5	0	10,2	+ 0,6124	4,44	+ 0,7906
18	35	- 0,5000	1,8	- 0,2887	8,6	- 0,2041	0,56	- 0,7906
19	45	+ 0,5000	1,8	- 0,2887	8,6	- 0,2041	0,56	- 0,7906
20	40	0	4,0	+ 0,5774	8,6	- 0,2041	0,56	- 0,7906
21	40	0	2,5	0	7,8	- 0,6124	0,56	- 0,7906

Una herramienta interesante a explorar cuando existen diferentes factores que afectan a más de una respuesta estudiada es la función deseabilidad. La metodología de multicriterio es muy útil para ser empleada en la optimización y es aplicable cuando varias respuestas han sido estudiadas simultáneamente. En nuestro caso, es de interés encontrar un compromiso entre la decoloración porcentual y el rendimiento catalítico. La función deseabilidad es la más utilizada actualmente para este fin (Murphy, Tsui, & Allen, 2005). La escala de la función deseabilidad (d) va desde d=0 a d=1. Las ventajas de esta función han sido reportadas para múltiples y variadas aplicaciones (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escaleira, 2008).

4.2.2. Reacciones de decoloración de RAS

Las reacciones de decoloración se llevaron a cabo en viales de vidrio de 10 ml con agitación magnética, los cuales se sumergieron en un baño térmico, (ver Figura 4.3). La concentración inicial de colorante se mantuvo constante en todos los experimentos en un valor de 75 mg/l. RAS se disolvió en las siguientes soluciones tampón de concentración 0.1 M: (1) pH de 7 a 7.8, buffer fosfato; (2) pH de 8.6 a 9.4, buffer Tris/HCl; y (3) pH mayor a 10, buffer carbonato/bicarbonato. En todos los casos el contraión fue sodio. La solución madre de HRP se preparó disolviendo 4.62 mg en 9240 ml de buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 (500 mg/l). Mientras que la solución madre de hematin (324 mg/l) se preparó disolviendo 8.1 mg en 25 ml de solución de NaOH 0.01 M. La mezcla de reacción estuvo conformada por 5150 μ l de solución de RAS 150 mg/l, el volumen correspondiente de solución madre de HRP o hematin (11.5 a 141 μ l) y la cantidad requerida de solución buffer correspondiente hasta alcanzar un volumen final de 10.3 ml. El volumen total de solución comercial de H₂O₂ (Laboratorios Apotarg S.R.L., Argentina) (1.4 a 5 μ l) se repartió en tres agregados iguales, a tiempo 0, 10 y 20 min de reacción a los fines de disminuir los efectos de inactivación de los catalizadores. Con el primer agregado de peróxido de hidrógeno se dio inicio a la reacción. Se tomaron dos muestras del medio de reacción, de 300 μ l cada una, la primera previo al agregado de H₂O₂ y la segunda a los 60 minutos de reacción.

Todas las muestras fueron inmediatamente diluidas en 2.7 ml de la solución buffer correspondiente a cada experimento y analizadas por espectroscopia UV-Visible. La evaluación de la eficacia del tratamiento se llevó a cabo mediante lecturas de absorbancia a 511 nm no obstante, los espectros se midieron en el rango de 200 a 800 nm.



Figura 4.3. Baño termostatzado con agitación magnética empleado para las reacciones de decoloración de RAS

4.2.3. Determinación de perfiles temporales de Oxígeno Disuelto, RAS y H₂O₂

Las reacciones de decoloración se llevaron a cabo con agitación magnética a 30 °C. Las condiciones experimentales seleccionadas fueron: concentración de catalizador: 4 mg/l; concentración de peróxido de hidrógeno: 2,5 mM, concentración del RAS: 75 mg/l y el pH del medio: 9. 400 µl de solución madre de HRP 500 mg/l se añadió al sistema HRP/RAS y 361,5 µl de solución madre de hematin de 553,2 mg/l se añadió al sistema hematin/RAS. Para dar inicio a la reacción se añadieron 46,6 µl de 30% vol. peróxido de hidrógeno a 49,55 ml del medio de reacción compuesto por solución de RAS 75 mg/l en buffer Tris pH 9 y el volumen del correspondiente catalizador.

La medición de oxígeno fue continua durante 60 minutos de reacción. El monitoreo se llevo a cabo con sensor Pasco pasport Dissolved Oxygen PS-2108 (California, EE.UU.).

Para obtener los perfiles de concentración de peróxido de hidrógeno se tomaron muestras de 1 ml a diferentes tiempos durante el avance de reacción. Las muestras se diluyeron en 8 ml de agua destilada y 1 ml de solución de H₂SO₄ 1 M para detener la reacción. La concentración de H₂O₂ en cada muestra se midió a través de titulación yodométrica (I. M. Kolthoff E. J. Meehan, Stanley Bruckenstein, 1972).

Para los perfiles de concentración de RAS, se llevaron a cabo reacciones de decoloración con: 9,33 µl de peróxido de hidrógeno 30% vol., 9,91 ml de solución de RAS 75 mg/l en buffer tris pH 9 y 80 µl de solución madre de HRP 500 mg/l para el sistema HRP/RAS y 72,3 µl de solución madre de hematin 553,2 mg/l para hematin/RAS. Se tomaron muestras en diferentes momentos después de la adición de peróxido y se tratan como se especifica en la sección 4.2.1. Las conversiones se calcularon según la ecuación (4.2), con los valores de absorbancia a 511 nm y se multiplicaron por la concentración inicial del RAS para obtener valores de concentración final de colorante.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Análisis de Interferentes

Preliminarmente, se analizó, el efecto de los catalizadores y el H₂O₂ (5 y 50 mM para HRP y hematin, respectivamente) en el espectro de absorción de RAS en buffer pH 9. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.4. HRP no provoca ningún efecto en el

espectro de RAS. Sin embargo, la presencia de hematin provoca una hipercromicidad a longitudes de onda comprendidos entre 300 y 430 nm. Por otro lado, la presencia de H_2O_2 afecta el espectro mediante un aumento de absorbancia comprendida entre 200 y 250 nm, debido a la absorción de H_2O_2 . Debido a que ninguna especie de la reacción, aparte de RAS, absorbe a 511 nm; puede confirmarse que una disminución de la absorción en esta longitud de onda es directamente proporcional a la ruptura del grupo cromóforo.

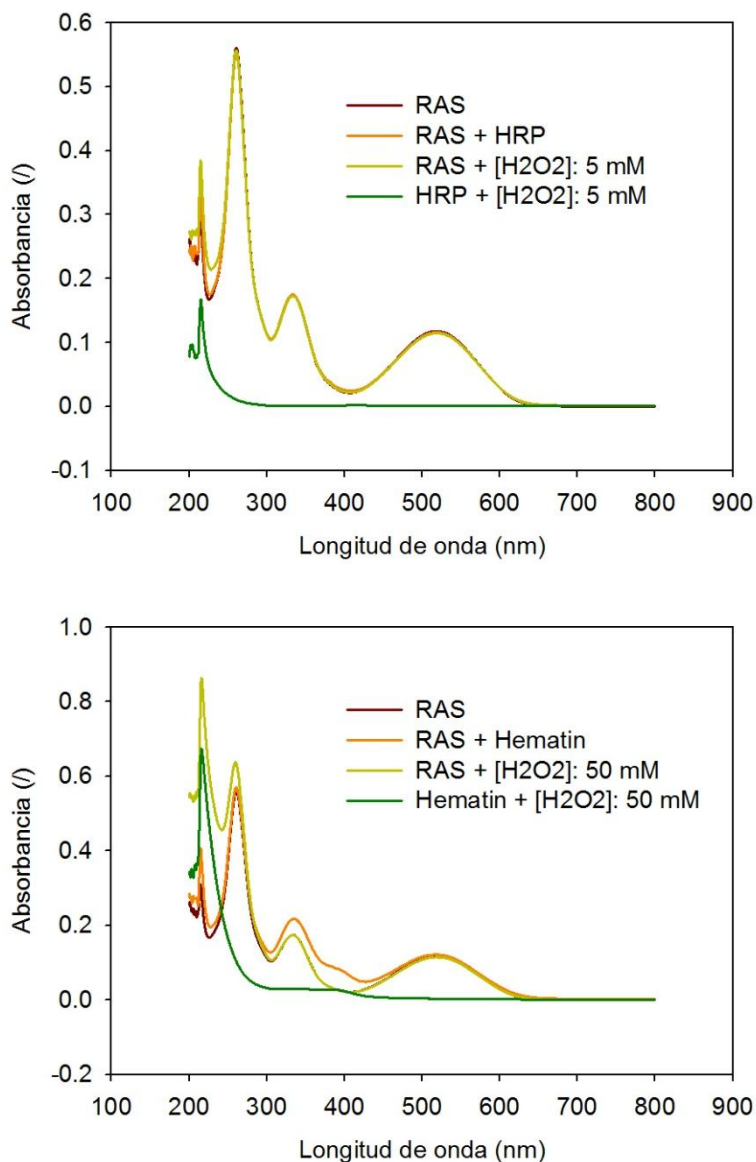


Figura 4.4. Efecto de los catalizadores y peróxido de hidrógeno en el espectro de absorción de la solución de RAS en buffer pH 9. [RAS]: 75 mg/l; [Catalizador]: 10 mg/l; [H₂O₂]: 5 mM para HRP y [H₂O₂]: 50 mM para hematin.

4.3.2. Reacciones de decoloración de RAS

El rango de variabilidad de los factores bajo estudio y el tiempo de corte de reacción deben ser cuidadosamente seleccionados. La Figura 4.5 muestra cinéticas de decoloración para HRP y hematin modificando en ambos casos la concentración de catalizador y de H₂O₂. Con hematin se obtuvieron conversiones cercanas al 80% en los primeros 20 min de reacción, independientemente de la concentración de catalizador y oxidante testeadas en este caso. HRP por su parte, presentó conversiones crecientes con la concentración de catalizador. En base a estos resultados se seleccionó la región experimental de la matriz de experimentos que se detalla en la Tabla 4.1. El tiempo del tratamiento se fijó en una hora para todas las corridas.

La Tabla 4.2 muestra los valores de respuesta del diseño experimental. Para determinar si el peróxido de hidrógeno es capaz de decolorar soluciones RAS mediante reacciones no catalíticas se llevaron a cabo reacciones sin catalizador a pH 9 y 10,6, con una concentración inicial de peróxido de 2,5 mM. Se obtuvieron sólo el 2,3% y el 3,4% de conversiones, respectivamente, evidenciando la naturaleza catalítica de la decoloración en presencia de hematin o HRP.

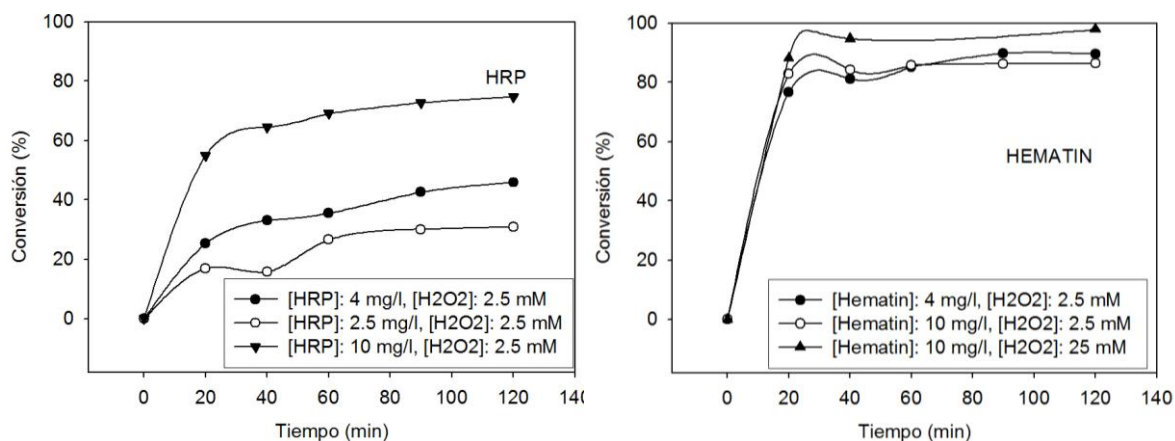


Figura 4.5. Perfiles de conversión de Rojo de Alizarina S. [RAS]: 75 mg/l; pH: 9 y Temp: 40°C.

Tabla 4.2. Resultados obtenidos de conversión y rendimiento catalítico para cada punto del diseño experimental.

Exp. Nº	HRP		Hematin	
	Conversión. (%)	Rendimiento Catalítico (mM _{Colorante} (mM _{H₂O₂} g _{Catalizador}) ⁻¹)	Conversión (%)	Rendimiento Catalítico (mM _{Colorante} (mM _{H₂O₂} g _{Catalizador}) ⁻¹)
1	30.5 (±4.46) ^a	1069 (±156) ^a	77.6(±0.45) ^a	2722 (±15.81) ^a
2	28.0	1361	61.2	2982
3	25.9	907	71.0	2488
4	29.2	800	92.3	2527
5	57.1	12511	73.5	16106
6	21.8	763	86.4	3030
7	27.7	606	66.8	1463
8	40.5	8869	77.2	16916
9	39.5	1083	92.6	2716
10	25.5	2034	88.3	2738
11	16.0	299	72.2	2537
12	22.7	1105	61.8	3010
13	13.8	257	71.8	1339
14	19.5	301	92.3	1423
15	23.2	358	93.6	1444
16	29.8	1335	102.7	4606
17	12.9	254	91.9	1814
18	13.0	2829	23.8	5164
19	27.4	5950	17.7	3851
20	3.0	292	22.2	2171
21	0.0	0	0.0	0.0

^a Valores promedio obtenidos de las repeticiones del punto central.

Hematin como catalizador

Los modelos cuadráticos obtenidos para las conversiones (Y) y los rendimientos catalíticos (Z) por ajuste de las respuestas de la Tabla 4.2 a la ecuación (4.1) son:

$$Y = 76.6_{(\pm 0.87)} + 43.3_{(\pm 1.7)} X_{[Hematin]} + 17.6_{(\pm 1.7)} X_{pH} - 4.1_{(\pm 1.6)} X_T - 18.4_{(\pm 4.2)} X_{[Hematin]}^2 - 40.34_{(\pm 9.0)} X_{[Hem]} X_{pH} \quad (4.4)$$

$$Z = 2080_{(\pm 424)} - 6943_{(\pm 742)} X_{[H_2O_2]} + 873_{(\pm 750)} X_{pH} + 8779_{(\pm 1269)} X_{[H_2O_2]}^2 \quad (4.5)$$

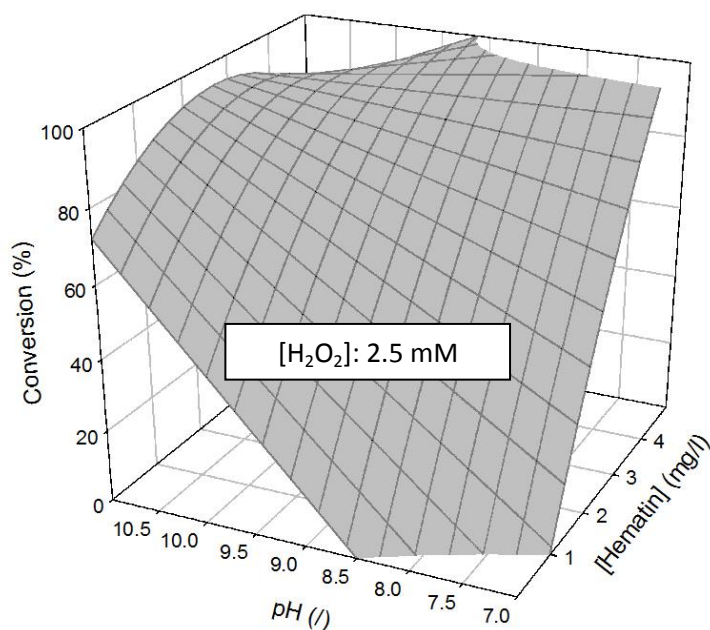
En cada caso, los factores se representan en sus valores codificados. El modelo elegido ofrece la mejor relación entre las respuestas y los factores estadísticamente significativos. Para la conversión, el coeficiente de determinación es $R^2 = 98,69\%$ y $R^2_{\text{ajustado}} = 98,33\%$. Para el rendimiento catalítico, el coeficiente de determinación es $R^2 = 86,43\%$ y $R^2_{\text{ajustado}} = 84,40\%$.

La Figura 4.6 presenta las superficies de respuesta obtenidas para la conversión y el rendimiento catalítico. Es posible observar un efecto positivo del aumento de la concentración de hematin sobre la conversión del RAS, al igual que el aumento del pH desde valores neutros a alcalinos. El rendimiento catalítico Y , por su parte, se ve afectado principalmente por la concentración de H_2O_2 y en menor medida por el aumento de pH. Y disminuye hasta su un valor mínimo a concentraciones medias de H_2O_2 , seguido de un aumento posterior. La disminución de Y con el aumento de la concentración de H_2O_2 es un indicativo de existencia de vías paralelas de reacción y/o de inactivación de hematin que consumen ineficientemente H_2O_2 . No obstante, la recuperación del rendimiento puede asociarse a: (1) la regeneración de especies catalíticas activas de hematin por reacción con H_2O_2 mediante la vías catalítica o *pseudo*-catalítica (ver discusión de mecanismos de reacción en Capítulo 1); o (2) la producción de radicales inorgánicos a altas concentraciones de H_2O_2 , que atacan la estructura de RAS aumentando así los milimoles de RAS convertidos por gramo de catalizador por milimol de oxidante (Granados-Oliveros et al., 2011; Granados-Oliveros, Ortega, Páez-Mozo, Ferronato, & Chovelon, 2010; Granados-Oliveros, Páez-Mozo, Ortega, Ferronato, & Chovelon, 2009). Sin embargo, Zucca y colaboradores han demostrado que la oxidación de RAS en soluciones de pH neutro catalizada por una porfirina de manganeso, con concentraciones de H_2O_2 similares a las empleadas en este estudio, no involucra la formación de radicales $HO\cdot$ (P Zucca et al., 2008).

Las conversiones obtenidas con hematin son máximas a altas concentraciones de catalizador y valores alcalinos de pH, lo cual se asocia con el aumento de monómeros de hematin en solución. La solubilidad de hematin en agua aumenta con el aumento del pH de la solución. Además, De Villiers y colaboradores estudiaron el comportamiento de la metaloporfirina en solución acuosa y demostraron que la constante de dimerización presenta un valor máximo a $pH = 7,5$, luego del cual decrece (De Villiers et al., 2007). El aumento de pH del medio de reacción provoca también la disociación del H_2O_2 (cuyo $pK_a = 11,62$) con el consecuente aumento en la concentración de HOO^- , el cual presenta mayor poder nucleofílico, lo que le confiere mayor reactividad (Rafiquzzaman et al., 1995). Sin embargo, la conversión tiene un máximo a $pH = 10$ y luego disminuye; lo que puede

relacionarse a las especies de RAS presentes en solución a valores mayores de pH. Emmert y colaboradores estudiaron la oxidación de colorantes azoicos catalizada por metaloporfirinas y determinaron que la reacción de oxidación se produce por la abstracción de hidrógeno (Emmert iii Thomas, J., Hon, B., Gengenbach, A. J., 2008). RAS a $\text{pH} < 5,5$ se encuentra presente como monoanión, entre 5 y 11 como dianión y a $\text{pH} > 11$, como un trianión completamente desprotonado (Ghasemi et al., 2006). Esto implica que la ausencia de hidrógeno disponible para reaccionar con el enlace $\text{Fe}=\text{O}$ de hematin activado (especie E_I y E_{II}) no permite la generación de radicales del colorante. En resumen, para obtener una alta conversión de RAS, se requiere un compromiso entre la cantidad de hematin disponible y la reactividad del RAS a valores de pH entre 9,5 y 10.

La temperatura ha presentado un efecto despreciable o nulo sobre la conversión y el rendimiento en el rango considerado.



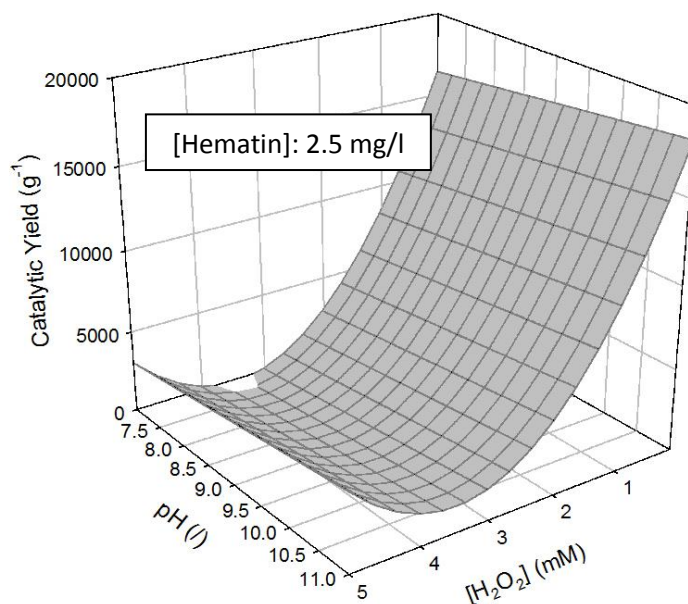


Figura 4.6. Superficies de respuesta para la conversión y el rendimiento catalítico de los sistemas Hematin/RAS. La temperatura se fijó en 40°C.

HRP como catalizador

Los modelos cuadráticos seleccionados para adaptarse a las respuestas estudiadas con HRP como catalizador son:

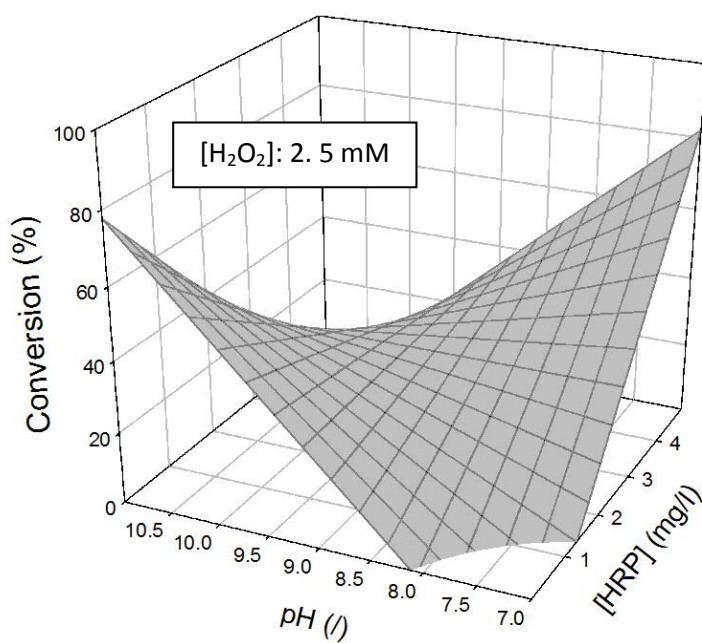
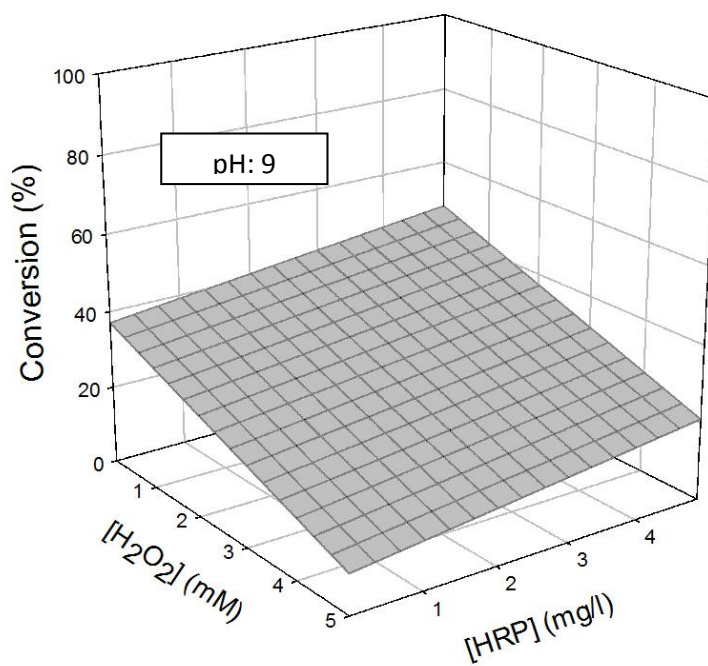
$$Y = 29.2_{(\pm 1.5)} - 13.5_{(\pm 3.1)} X_{[H_2O_2]} + 6.5_{(\pm 3.1)} X_{[HRP]} + 3.8_{(\pm 3.1)} X_T - 51.4_{(\pm 10.1)} X_{[HRP]} X_{pH} - 13.0_{(\pm 7.8)} X_{[H_2O_2]} X_T + 11.9_{(\pm 8.9)} X_{pH} X_T \quad (4.6)$$

$$Z = 725_{(\pm 350)} - 4627_{(\pm 645)} X_{[H_2O_2]} - 1083_{(\pm 638)} X_{[HRP]} + 6153_{(\pm 1107)} X_{[H_2O_2]}^2 + 4398_{(\pm 1863)} X_{[H_2O_2]} X_{[HRP]} \quad (4.7)$$

Estos modelos tienen bajos coeficientes de correlación. Para la conversión $R^2 = 74.04\%$ y $R^2_{ajustado} = 65.84\%$ y para el rendimiento catalítico, $R^2 = 79,48\%$ y $R^2_{ajustado} = 75.58\%$. A diferencia de hematin, los resultados obtenidos para la decoloración de RAS catalizada por HRP (ver Tabla 4.1) permitieron obtener ajustes pobres.

La Figura 4.7 presenta las superficies de respuesta obtenidas para la conversión y el rendimiento catalítico. A diferencia de hematin las conversiones obtenidas son menores y se ven negativamente afectadas por la concentración de H₂O₂. Este efecto puede estar

asociado a la inactivación que sufre HRP por H_2O_2 y por el ataque de radicales orgánicos a los residuos aminoacídicos de la proteína (Baynton et al., 1994; H B Dunford, 1999; Hiner et al., 2001; Q. Huang et al., 2005; Kapeluich et al., 1997; Wagner & Nicell, 2002). La inactivación por H_2O_2 es producida por: (1) una ruta de reacción alternativa de E_{II} (reacciones 1.6 y 1.9, Capítulo 1), o por una vía alternativa de reacción con E_I (reacción 1.10, Capítulo 1), ambas con formación de (aa)P670. La segunda vía de inactivación mencionada implica a los radicales de RAS formados durante el ciclo catalítico. Alizarina tiene una estructura similar a RAS, no obstante, se observaron altas conversiones de Alizarina, incluso a concentraciones de H_2O_2 de 21 mM (Pirillo, García Einschlag, et al., 2010b). La estructura de RAS, a diferencia de Alizarina, presenta un grupo sulfónico cargado negativamente a la par de los grupos $-OH$. Por lo tanto, es más razonable pensar que RAS no es un buen sustrato para HRP debido a su mayor volumen y al efecto del grupo sulfónico, o a la existencia de alguna reacción secundaria diferente.



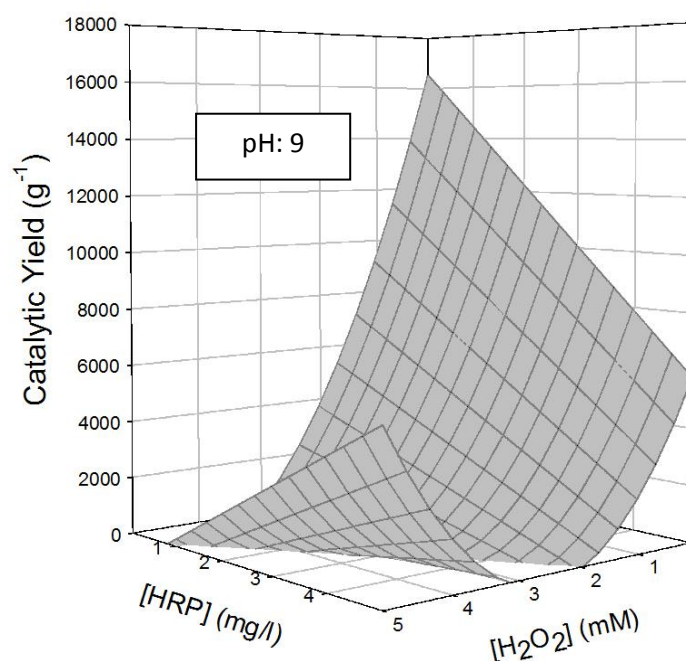


Figura 4.7. Superficies de respuesta para la conversión y el rendimiento catalítico de los sistemas HRP/RAS. La temperatura se fijó en 40°C.

Por su parte, el pH no afecta a las respuestas estudiadas. No obstante, existe una interacción negativa entre el aumento del pH y la concentración de HRP. Este hallazgo es consistente con la actividad catalítica reportada para HRP en presencia de sustratos simples, que se mantiene prácticamente constante en el intervalo de pH de 7 a 9, y cae a valores de pH más altos (H B Dunford, 1999). Además, el aumento de moléculas de RAS deprotonadas a valores de pH cercanos a 11 impide la formación de radicales por abstracción de hidrógeno, como se mencionó para el sistema con hematin.

Al igual que la conversión el rendimiento catalítico disminuyó con el aumento de la concentración de H₂O₂ probablemente debido a la inactivación inducida por H₂O₂ (inactivación suicida, formación de (aa)P670). Por otra parte, el rendimiento presentó un ligero aumento a altas concentraciones de H₂O₂ y HRP (ver Figura 4.7). Comportamiento que puede asociarse a una regeneración de HRP al estado nativo producto de la activación de vías catalíticas o *pseudo*-catalíticas de reacción y a la regeneración desde el Compuesto E_{III} (reacciones 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7, Capítulo 1).

4.3.3. Optimización de las condiciones de reacción

Teniendo en cuenta que las respuestas estudiadas, rendimiento catalítico y conversión, representan la eficiencia y eficacia catalítica respectivamente, se empleó la función deseabilidad para determinar las condiciones que maximizan ambas características. La Figura 4.8 muestra los resultados obtenidos para HRP y hematin.

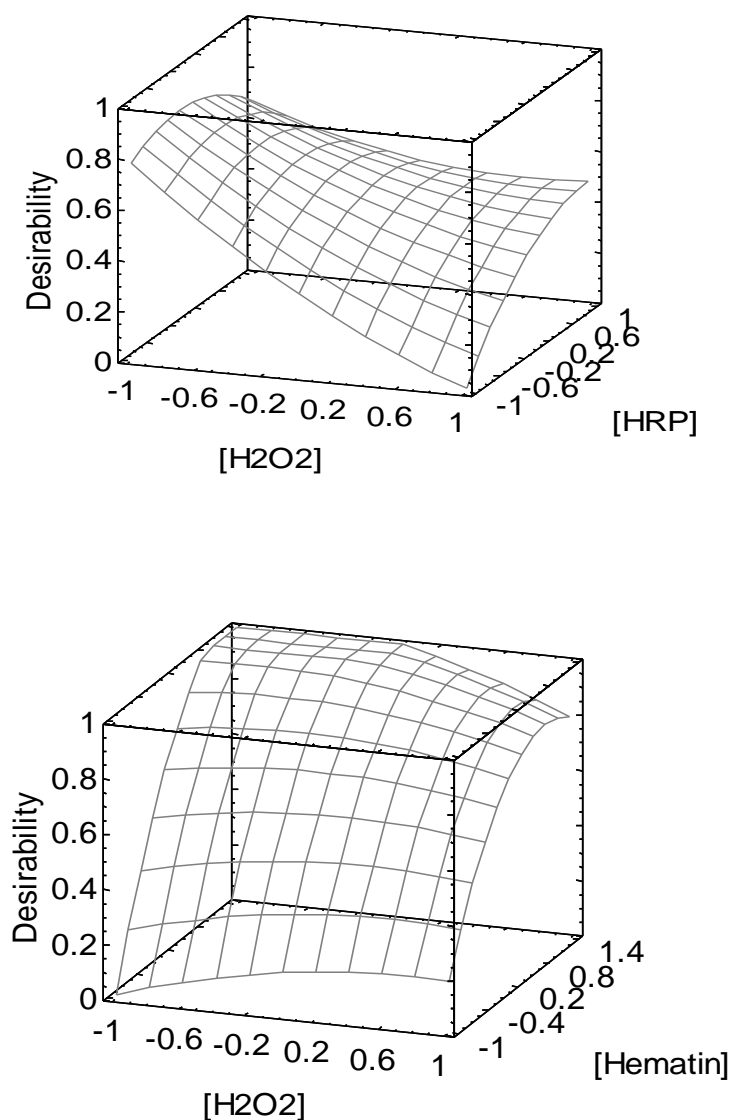


Figura 4.8. Función deseabilidad para HRP y hematin, considerando rendimiento catalítico y conversión de RAS. Los valores de las variables se encuentran codificados.

La sensibilidad de HRP al aumento de la concentración de H_2O_2 impide alcanzar el valor máximo de la función deseabilidad en las condiciones testeadas. El valor óptimo para este sistema se encuentra en el rango más bajo de concentraciones de H_2O_2 y HRP. El aumento de la concentración de HRP no ayuda a maximizar ambas respuestas. Esto implica que la disponibilidad de la enzima al sustrato está siendo afectada. La agregación de enzimas en solución acuosa tamponada es un problema importante que muchas veces no se aborda adecuadamente cuando las enzimas libres se ponen a prueba en sistemas acuosos, y puede ser responsable de la falta de disponibilidad observada (M L Foresti & Ferreira, 2005).

La función deseabilidad observada para HRP se puede explicar como el resultado de cuatro reacciones diferentes que ocurren en paralelo: (1) la generación de radicales inorgánicos/orgánicos a altas concentraciones de HRP; (2) la destrucción del grupo Ferriprotoporfirina IX y/o de la estructura proteica de HRP a alta concentración de H_2O_2 ; (3) la formación de agregados de la enzima a alta concentración de HRP y; (4) el potencial impacto negativo de los dímeros/oligómeros de sustrato en la inhibición de la actividad enzimática (más alta a bajas concentraciones de HRP); considerando que el bloqueo de la enzima ha sido reportado como inhibidor con ciertas estructuras de sustrato (Ziemys & Kulys, 2005). Tres de estas reacciones disminuyen la conversión final de RAS.

El problema de la agregación de proteínas o el bloqueo del sitio activo de la enzima por interacciones no productivas con dímeros de RAS no se observaron en el caso de hematin. Los mejores resultados para el análisis combinado de conversión de RAS y rendimiento catalítico se encontraron a la mayor concentración de hematin y a una concentración media de H_2O_2 en todo el rango estudiado. Sin embargo, a altas concentraciones de H_2O_2 , la degradación parcial del anillo porfirínico debido a una mayor generación de radicales inorgánicos y/u orgánicos se propone como la causa probable de la disminución de la función deseabilidad a valores inferiores a 1. En el caso de hematin, la función deseabilidad puede ser resultado de dos reacciones diferentes que ocurren en paralelo: (1) la generación de radicales inorgánicos/orgánicos a altas concentraciones de hematin; y (2) la formación de especies inactivas de hematin y/o destrucción del grupo hemo a altas concentraciones de H_2O_2 .

4.3.4. Análisis UV-Visible de las reacciones de decoloración

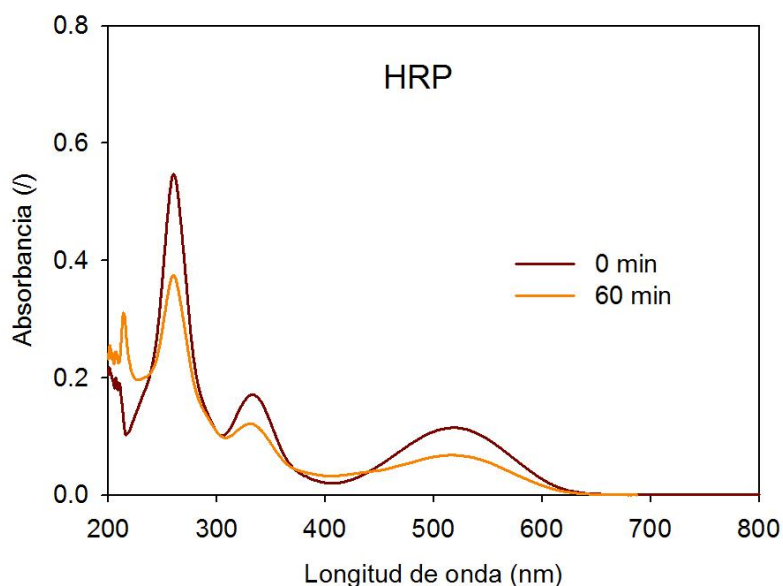
La Figura 4.9 muestra los espectros UV-Visible para soluciones de RAS, antes y después del tratamiento, con HRP y hematin como catalizadores en condiciones seleccionadas. La

decoloración es más eficaz en el sistema hematin/ H_2O_2 . Sin embargo, con ambos catalizadores es evidente la caída de los valores de absorbancia en las longitudes de onda características. En ningún caso se observan corrimientos a mayores longitudes de onda de los picos, asociados a la formación de productos de acoplamiento de radicales. Por el contrario, el aumento de absorbancia entre 200 y 220 nm está relacionado a la formación de compuestos aromáticos de menor peso molecular y alta absorptividad molar.

La Figura 4.10 muestra el grado de decoloración alcanzado durante los experimentos, con HRP y hematin. La diferencia de color observada en el estado inicial de las soluciones se debe a la diferencia de pH de las mismas. En ninguna de las reacciones de oxidación llevadas a cabo se observó generación de material insoluble indicativo de formación de precipitado de productos oligoméricos.

Estas observaciones permiten postular la naturaleza degradante de los mecanismos de oxidación de RAS con HRP y hematin en el rango seleccionado de las condiciones aquí estudiadas.

La presencia de un grupo sulfónico en la estructura del colorante afecta el mecanismo de decoloración debido a su gran volumen y carga neta negativa. La Figura 4.11 muestra los posibles productos de acoplamiento de radicales de Rojo de Alizarina S, los cuales se encuentran altamente desfavorecidos por interferencias electrónicas y estéricas. Estas interferencias no se presentan en el caso de Alizarina, lo cual puede entenderse como la razón por la que no se observan productos de polimerización con RAS.



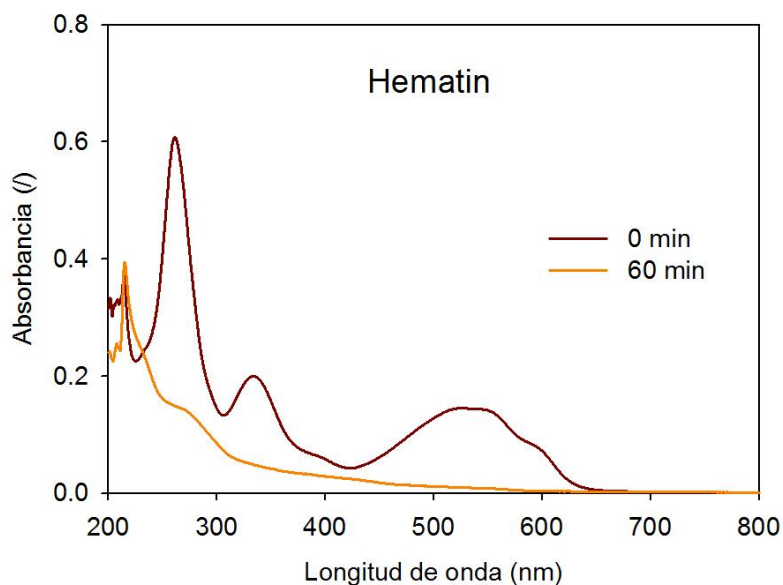


Figura 4.9. Espectros UV-Visible de soluciones de RAS 75 mg/l, al inicio y luego de 60 min de tratamiento. Sistema HRP: [HRP]:2.5 mg/l; [H₂O₂]:0.4 mM; pH:9; T:35 °C. Sistema Hematin: [Hematin]:4.44 mg/l; [H₂O₂]:3.2 mM; pH:9.4; T:45 °C.

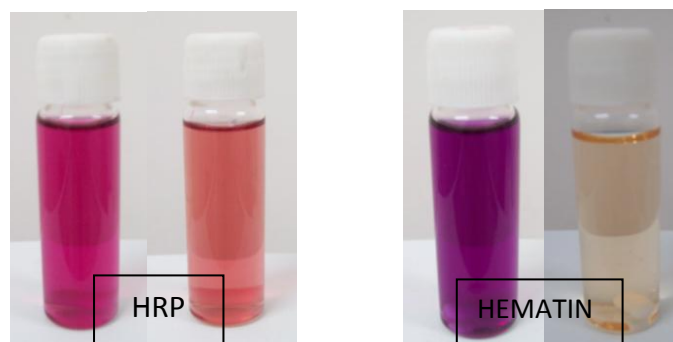


Figura 4.10. Grado de decoloración alcanzado luego de 60 minutos de tratamiento. [RAS]: 75 mg/l. *Izquierda:* [HRP]: 2.5 mg/l, [H₂O₂]: 3.2 mM, pH:10.6, Temp: 35°C. *Derecha:* [Hematin]: 2.5 mg/l, [H₂O₂]: 4.7 mM, pH: 9, Temp: 35°C.

Existen en la literatura propuestas de mecanismo degradativo para RAS, bajo diferentes tratamientos. Zucca y colaboradores han propuesto mecanismos de degradación con formación de diquinonas en decoloraciones de RAS catalizadas por lacassas y 5,10,15,20-tetraquis(4-sulfonatofenil)porfina-Mn(III) (P Zucca et al., 2008). Además, se han propuesto vías degradativas de decoloración de soluciones de RAS tratadas mediante sistemas foto-Fenton, electro-Fenton, procesos electroquímicos o fotocatalíticos (Devi, Rajashekhar, Raju, & Kumar, 2009; Faouzi, Nasr, & Abdellatif, 2007; Gao et al., 2008;

Lachheb et al., 2002; Panizza & Oturan, 2011). Por otro lado, estructuras de colorantes de mayor complejidad como Fluoresceína (Figura 4.1,b), presentaron evidencia de degradación a productos de menor peso molecular en presencia de HRP/H₂O₂ (Pirillo, Einschlag, et al., 2010a).

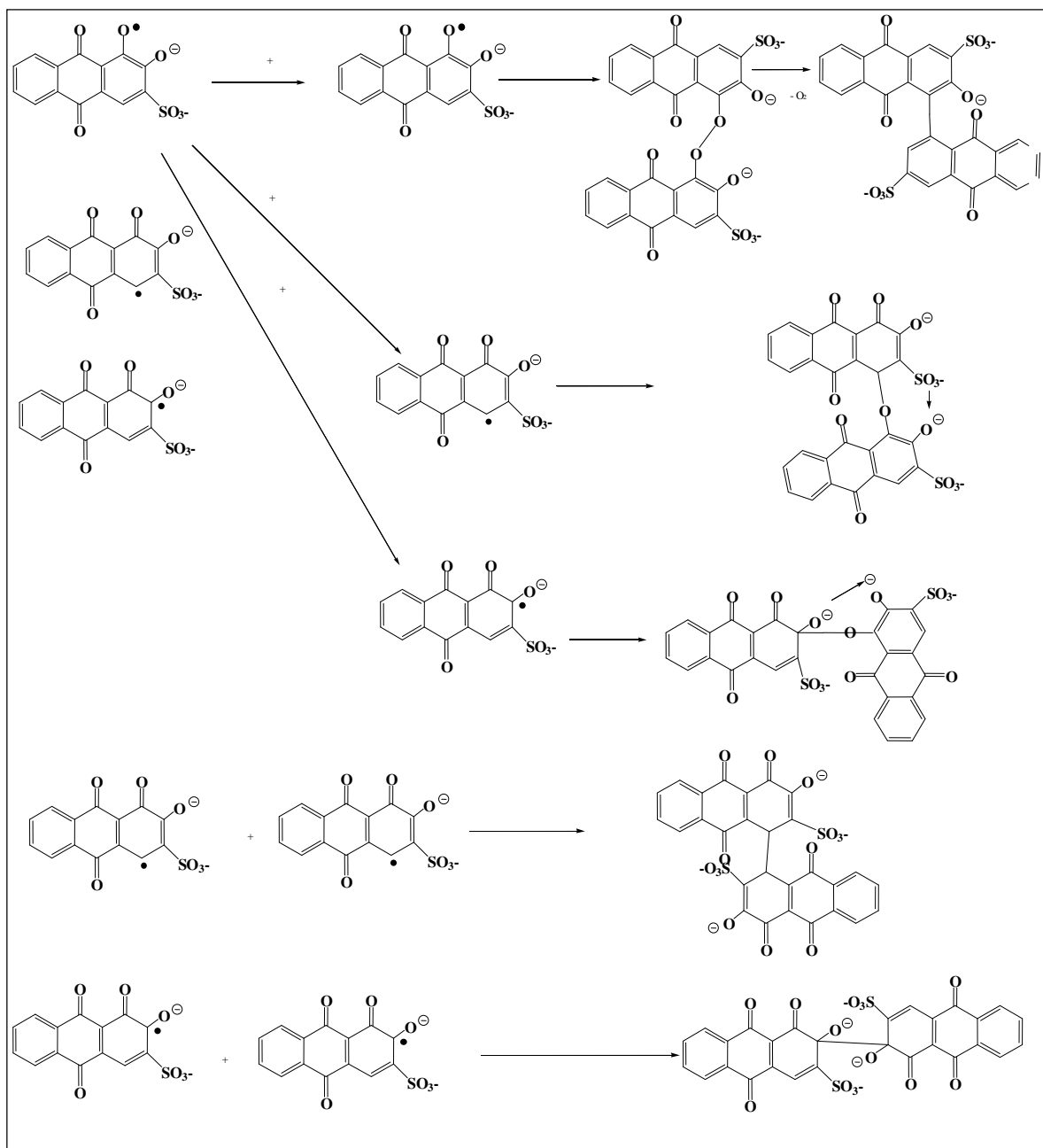


Figura 40.11. Posibles estructuras de acoplamiento de radicales de Rojo de Alizarina S.

4.3.5. Perfiles de reacción en condiciones seleccionadas

La Figura 4.12 muestra los perfiles de oxígeno, peróxido de hidrógeno y concentración de Rojo de Alizarina S con el avance de reacción en condiciones seleccionadas. El estudio de consumo o producción de oxígeno y peróxido de hidrógeno durante la oxidación de RAS puede dar indicios de las diferencias en las rutas de reacción de ambos catalizadores.

La concentración del RAS sólo disminuyó un 40% del valor inicial con HRP como catalizador. Sumado a esto, los consumos de peróxido de hidrógeno y oxígeno disuelto son casi invariables después de los primeros 20 minutos de reacción. Estos resultados indican la ausencia de participación de una vía catalítica o *pseudo*-catalítica de reacción (reacción 1.4, Capítulo 1); en línea con los resultados publicados por Hernandez-Ruiz y sus colaboradores, los cuales aseguran que en presencia de sustrato fenólico no hay participación de la vía catalítica de HRP (Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001).

En el caso del sistema hematin/H₂O₂, los resultados fueron muy prometedores. La concentración de RAS se redujo casi a cero. Disminuyó la concentración de peróxido de hidrógeno y aumentó la concentración de oxígeno disuelto. Esto puede asociarse a la participación de reacciones de producción de oxígeno, como pueden ser las vías catalítica o *pseudo*-catalítica de hematin. De todas maneras existen diferentes vías catalíticas y no catalíticas de producción y consumo de O₂ que pueden tener lugar en estos sistemas (I Magario et al., 2012). Estas reacciones pueden tener un impacto negativo sobre las reacciones de oxidación, debido a que: (1) consumen H₂O₂ disponible; (2) pueden generar radicales altamente reactivos, tales como OH• y HOO•, capaces de atacar no sólo a sustratos y productos intermedios, sino también a los catalizadores.

El aumento del consumo de H₂O₂ y la producción de O₂ al inicio de la reacción difieren de lo observado durante la oxidación de alizarina y otros colorantes, como azul negro de eriocromo y fluoresceína, utilizando hematin como catalizador, a mayores concentraciones de H₂O₂ (21 mM) y a pH 7, llevadas a cabo anteriormente en nuestro grupo de investigación. En esas condiciones, hematin presentó un consumo de oxígeno, frente a una liberación del mismo observada para HRP (Pirillo, Einschlag, et al., 2010b).

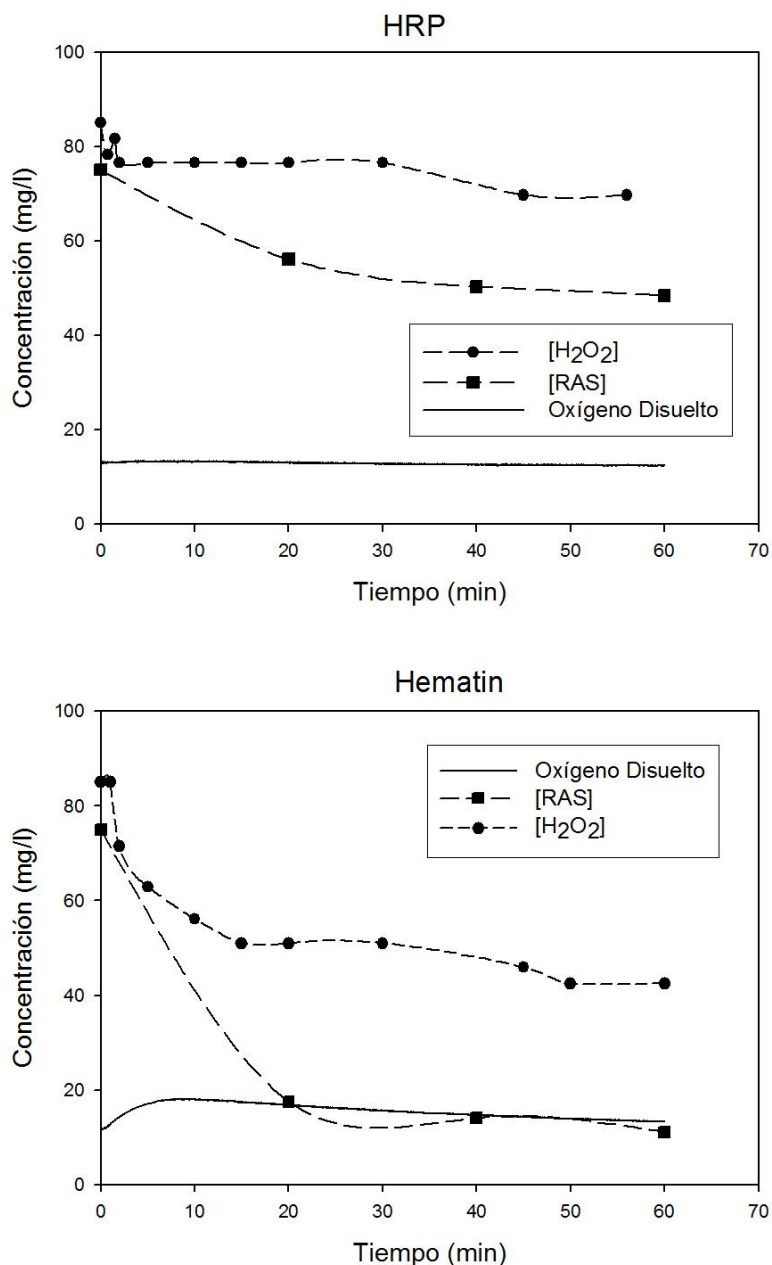


Figura 4.12. Perfiles de Oxígeno disuelto, [RAS] y [H₂O₂]. Condiciones iniciales: [H₂O₂]= 2.5 mM, [RAS]= 75 mg/l, pH= 9, T= 30 °C, [HRP]= 4 mg/l, [Hematin]= 4 mg/l.

Granados- Oliveros y colaboradores estudiaron la formación de radicales inorgánicos y su efecto en la oxidación de compuestos orgánicos. Los resultados les permitieron proponer que en presencia de metaloporfirinas el principal radical formado con H₂O₂ es O₂^{•-}. Este último, es el principal precursor de HO[•], mediante la reacción: $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + O_2$ (Granados-Oliveros et al., 2011, 2010, 2009). Considerando estos resultados en el marco de la discusión respecto al mecanismo de reacción de las metaloporfirinas que se

presenta en el Capítulo 1, es posible suponer que la liberación de O₂ observada puede asignarse a la participación de una vía *pseudo*- catalítica de hematin.

4.3.6. Modelado molecular

Los resultados experimentales obtenidos generaron una serie de interrogantes asociados a las diferencias observadas entre los sistemas de degradación de RAS y de Alizarina, a pesar de las similitudes de sus estructuras. Las principales diferencias observadas fueron: (1) Alizarina presentó altas conversiones con HRP, incluso a mayor concentración de H₂O₂, mientras que RAS no permitió obtener conversiones mayores al 57%. Sin embargo, los valores de conversión de ambos colorantes fueron buenos con hematin como catalizador. (2) Los estudios UV-Visibles del medio de reacción demostraron mecanismos de degradación de estructuras en el caso de RAS, mientras que para Alizarina se observó la formación de productos de condensación. (3) La decoloración de Alizarina catalizada por HRP estuvo acompañada de la producción de O₂, mientras que con hematin se produjo un consumo del mismo. No obstante, la decoloración de RAS con hematin como catalizador provocó un aumento del O₂ disuelto en el medio de reacción, y en presencia de HRP no se observaron cambios significativos en la concentración de O₂.

Tabla 4.3. Resultados de la minimización de MM2 en Kcal/mol (Diferencia de energía estérica asociada a la reacción 1 o 2, ΔS_E) y calculo de PM6 (ΔH_r). $\Delta H_r = \sum \Delta H_{FP} - \sum \Delta H_{FR}$, siendo P productos y R reactivos. LM=modelo ampliado, RM= modelo reducido, R₁=reacción 1, R₂=reacción 2, siendo RAS- 1y RAS- 2 la coordinación de RAS al catalizador a través del -OH 1 o 2.

Sustrato de reacción	Hematin/E ₁		Modelos de HRP/ E ₁			
	MM2	PM6	MM2		PM6	Kcal/mol RM
	ΔS_E Kcal/mol	ΔH_r Kcal/mol	ΔS_E , Kcal/mol		ΔH_r Kcal/mol	
			LM	RM		
R ₁ H ₂ O ₂	- 12	- 24	H ₂ O ₂	- 21	- 24	+15,8
R ₂ RAS- 1	- 37	- 25 (OH1)	RAS- 1	- 29	- 44	- 55
R ₂ RAS- 2	- 26	- 38 (OH2)	RAS- 2	- 47	- 50	- 68

Para intentar dar luz a estas cuestiones se presentan a continuación estudios de modelado molecular realizados por la Dra. Ferreira, que permitieron explorar la absorción de H_2O_2 y RAS sobre E_1 , para hematin y HRP. La metodología empleada para los cálculos se encuentra en el Anexo B. No obstante, es importante aclarar que se emplearon modelos para el sitio de unión a sustrato de HRP, y se mantuvo una molécula de agua coordinada al O de $\text{Fe}=\text{O}$ de E_1 (ver estructura en Figura 13,b). Mientras que en el caso de hematin, se incluyeron seis moléculas de agua próximas a $\text{Fe}=\text{O}$, una de las cuales fue remplazada por los sustratos estudiados (H_2O_2 y RAS). A su vez, se analizaron dos orientaciones distintas de RAS, la forma 1 o RAS-1, a través del $-\text{OH}$ denominado 1 y la forma 2 o RAS-2, a través del $-\text{OH}$ denominado 2 en la Figura 4.13,a. En la Figura 4.13,c se presentan los diferentes modelos usados en los cálculos de MM2 y PM6 para hematin y HRP y el tamaño relativo de los sustratos y los modelos de catalizadores. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.3.

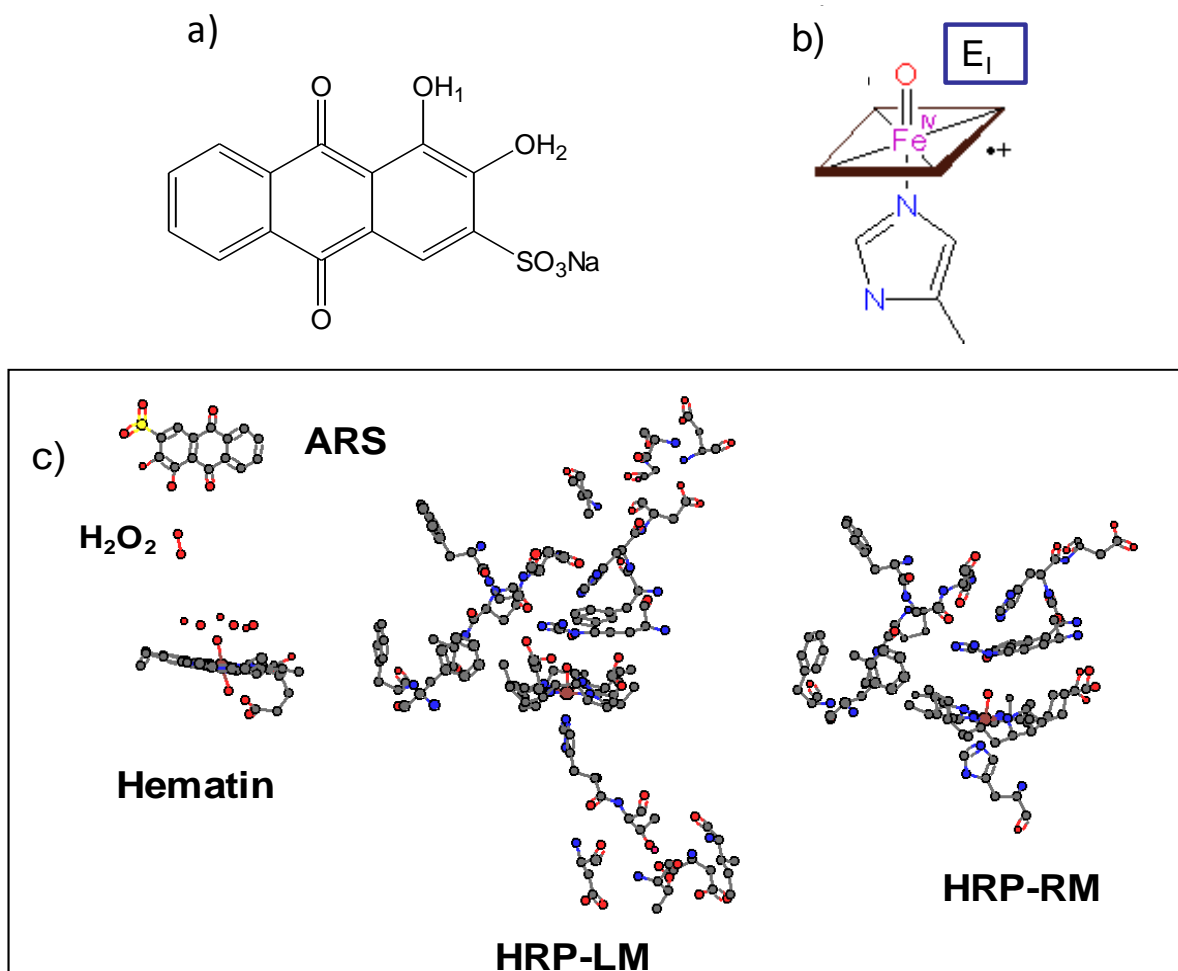


Figura 4.13. a) Estructura de RAS, notar denominación de los $-\text{OH}$. b) Sitio activo de compuesto I de HRP (E_1). c) Modelos empleados para cálculos MM2 y PM6, los átomos de

hidrógeno no se muestran en las figuras. LM: Modelo Ampliado, *en inglés: Large Model*.

RM: Modelo Reducido, *en inglés: Reduced Model*.

La Figura 4.14 muestra el mecanismo propuesto de interacción de HRP (con una molécula de agua coordinada al Fe=O) con RAS. Mientras que la Figura 4.15 muestra el resultado obtenido para RAS, utilizando el modelo reducido para HRP (HRP-RM). Se analizó la coordinación de RAS al sitio de unión al sustrato de HRP con el grupo sulfónico hacia afuera (Forma 1), o apuntando al sitio de unión (Forma 2). La figura muestra con claridad la cavidad de unión a sustrato de HRP y cómo RAS se localiza allí de dos formas diferentes.

Por otro lado, en la Figura 4.16 se muestran las conformaciones de hematin y H₂O₂, y las dos posiciones de coordinación al Fe=O para RAS en hematin. De los resultados es posible observar que la coordinación de una molécula de H₂O₂ a E₁ de HRP es endotérmica (ver el resultado PM6 para RM en la Tabla 4.3). Sin embargo los valores de ΔH_r medidos para la coordinación de RAS en ambos casos (forma 1 y 2), es siempre muy exotérmica. Esto indica que HRP con una molécula de agua coordinada a Fe=O prefiere como sustrato a RAS. Contrariamente, los valores de entalpía calculados para hematin indican que el mismo puede coordinar peróxido de hidrógeno o RAS-1 de manera competitiva. No obstante, la forma 2 de coordinación de RAS, es decir con la molécula orientada perpendicularmente en la sexta posición de coordinación del hierro es la más favorecida entálpicamente (por diferencia de 13 kcal/mol). Asimismo, los resultados obtenidos de MM2 son opuestos, debido a las interacciones estéricas generadas por la posición del grupo sulfónico en RAS-1 vs. RAS-2.

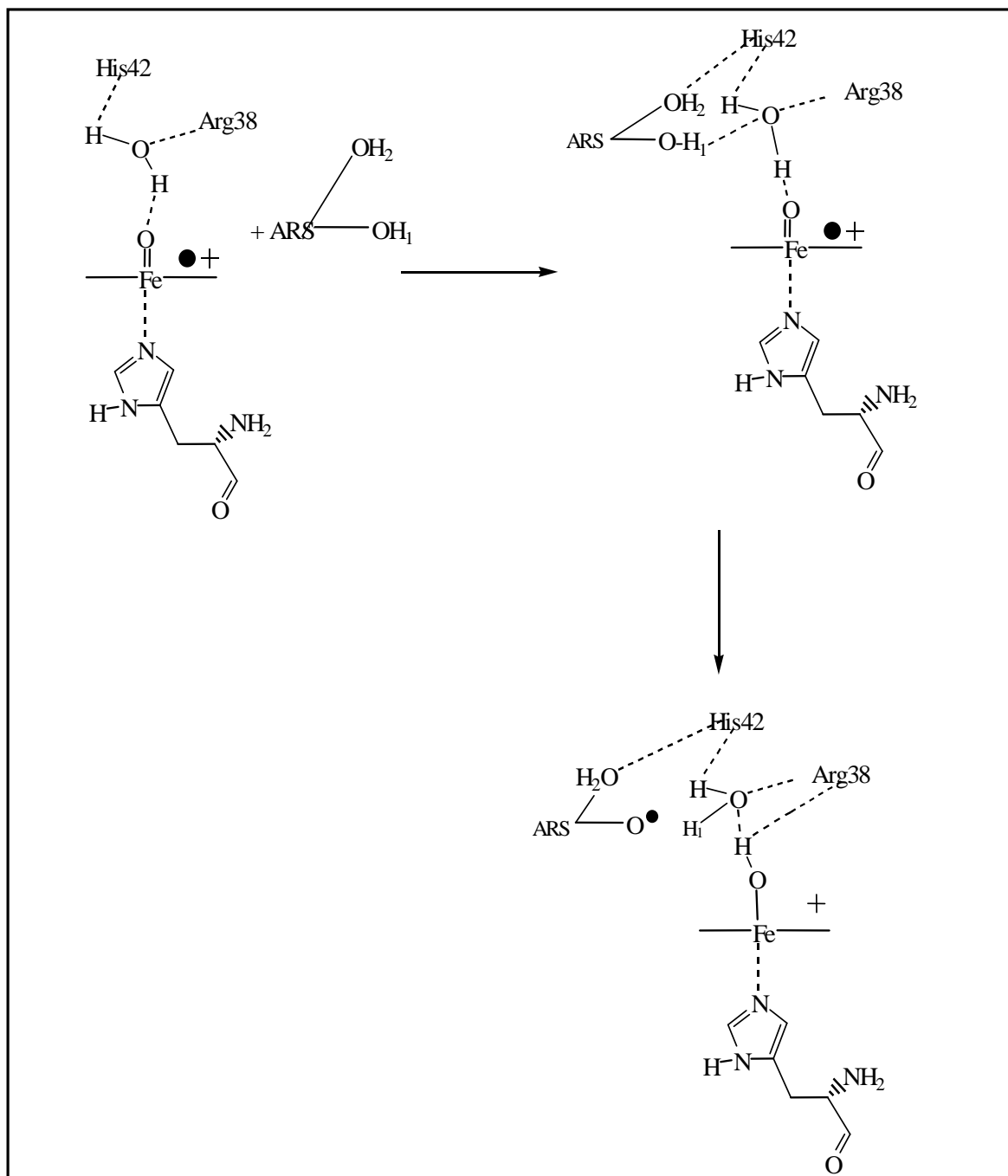


Figura 4.14. Mecanismo de coordinación y reacción con RAS, con una molécula de H₂O coordinada al Fe=O del E₁ de HRP.

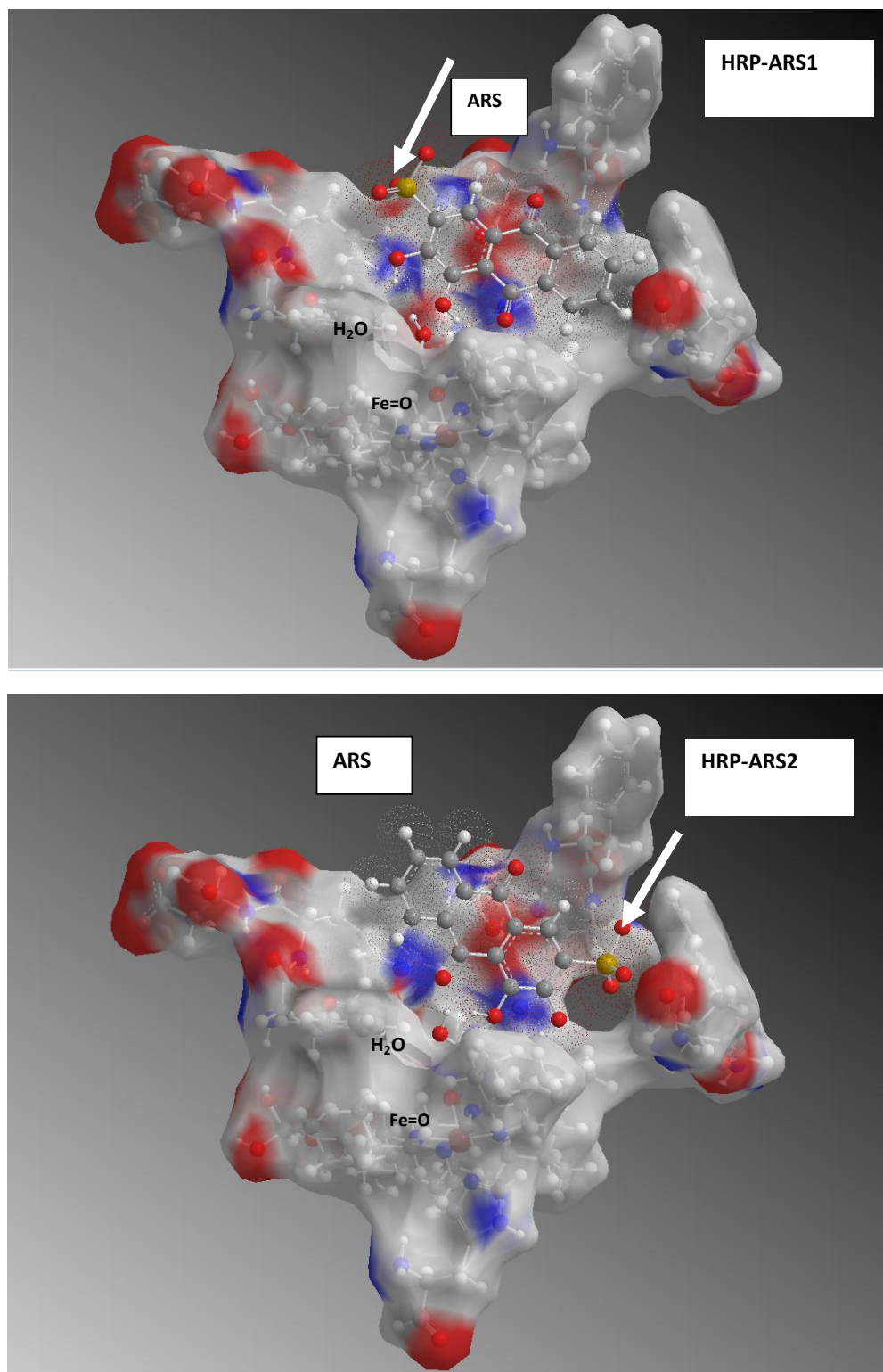


Figura 4.15. Coordinación de RAS al sitio de unión de HRP. Las flechas muestran el grupo sulfónico de RAS en las formas 1 y 2.

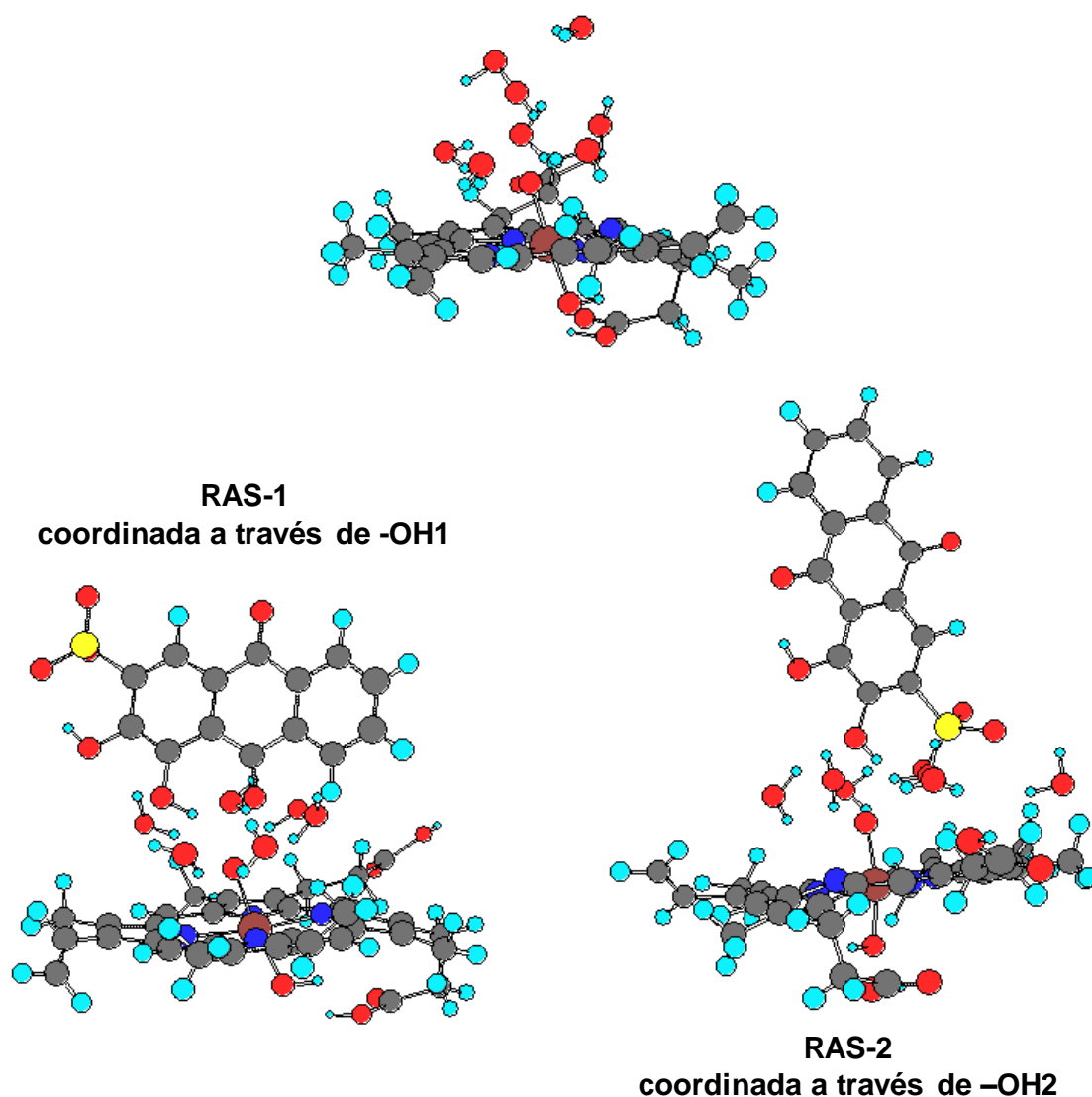


Figura 4.16. Estructuras obtenidas para las mínimas energías estéricas reportadas en la Tabla 4.3 para hematin coordinando H_2O_2 o RAS 1 y 2.

La Figura 4.17 muestra el estrecho contacto entre el agua inicialmente coordinada al $\text{Fe}=\text{O}$, Arg38 e His42 en HRP. Ambas conformaciones (RAS-1 y 2) mostraron enlaces puente H entre RAS y los residuos claves del sitio de enlace a sustrato del modelo de HRP empleado. Es evidente como la conservación de la molécula de agua en la formación E_i , está relacionada a la manera en la que RAS se aproxima al sitio de unión de HRP. Otro aspecto a considerar es cómo esta molécula de agua puede actuar en el ciclo catalítico para producir la protonación de $\text{Fe}=\text{O}$. Las dos formas de coordinación de RAS se ven favorecidas en el caso de RAS-HRP/RM, pero la coordinación de RAS-2 presenta menor entalpía de reacción.

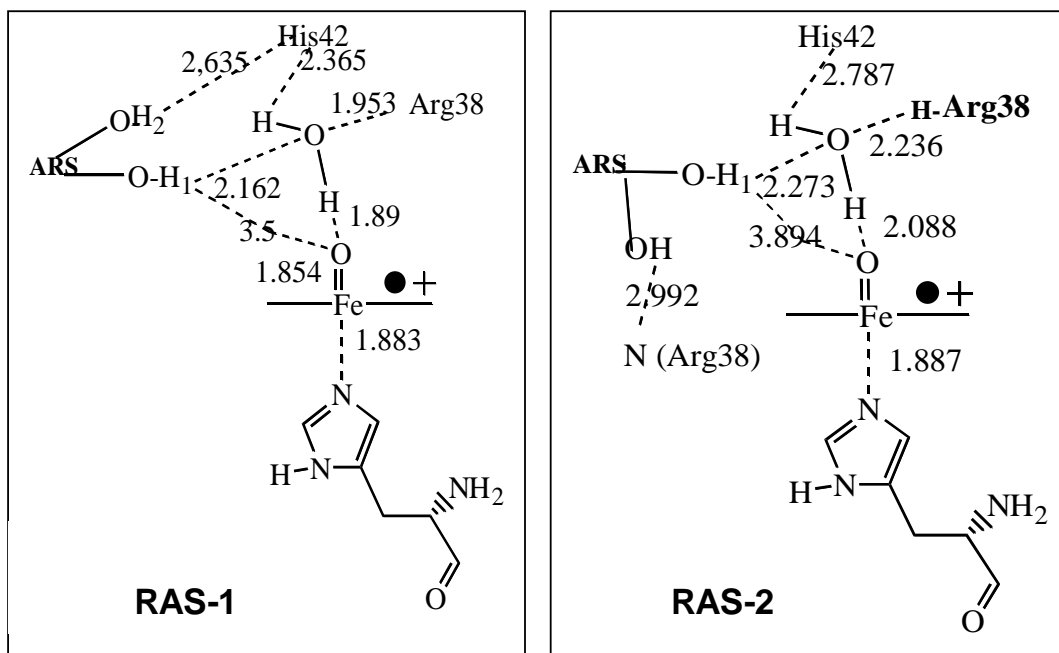


Figura 4.17. Interacciones entre RAS-1 y RAS-2 con los residuos claves de HRP.

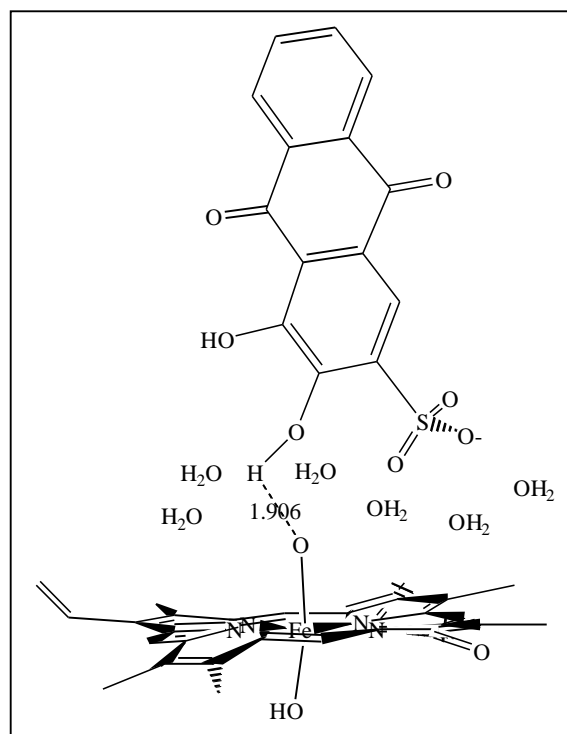
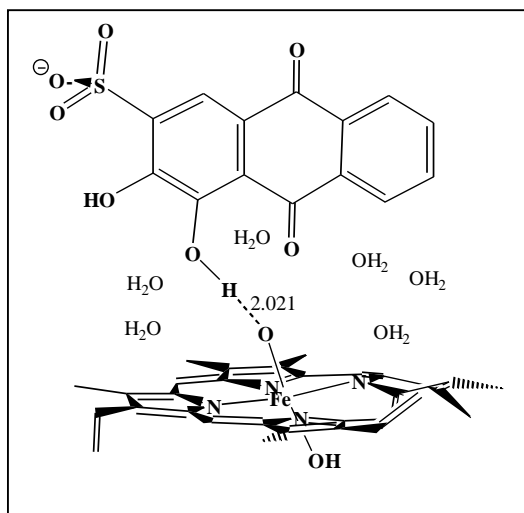


Figura 4.18. Interacciones entre RAS-1 y RAS-2 con hematin.

La Figura 4.18 presenta las longitudes de las interacciones puente hidrógeno obtenidas para la coordinación de RAS-1 y RAS-2 con hematin. En este caso, RAS desplaza la molécula de agua que se encuentra coordinando la sexta posición del Fe. Las distancias de los enlaces puente H entre los -OH (1 y 2) de RAS y el Fe=O son 2.02 Å en el caso de RAS-1 y 1.9 Å para RAS-2; mientras que para E_I de HRP/RM se hallaban entre 3.5 y 4 Å (ver Figura 4.17). A valores alcalinos de pH, la principal forma de coordinación es RAS-1, debido a la ionización de -OH 2.

La Figura 4.19 presenta las estructuras monoméricas y diméricas de Alizarina y RAS. Las estructuras diméricas postuladas, resultaron ser las más estables por minimización de la energía estérica de las estructuras y/o minimización del ΔH_f . Es posible observar como los grupos hidroxilos se orientan hacia los extremos de las moléculas en el caso de RAS. Por el contrario, en caso de los dímeros de Alizarina, los grupos hidroxilos se ubican en el centro, dejando a las estructuras fenólicas en los extremos. Esta diferencia tiene un efecto clave en las distintas afinidades de HRP frente a los dos sustratos. Las características hidrofóbicas de la cavidad de enlace de HRP favorecen la formación del complejo enzima-sustrato. Los dímeros de Alizarina se acomodan en el sitio activo de HRP, interaccionando con estos residuos hidrofóbicos, de manera que los -OH puedan reaccionar con Fe=O---H₂O₂. Mientras que los dímeros de RAS presentan importantes impedimentos electrónicos y estéricos, sumados a las cargas negativas de los sulfonatos, adyacentes a los grupos -OH y ubicadas en los extremos de las estructuras. Esto produce interacciones repulsivas que resultan en una dificultosa coordinación de dímeros de RAS a HRP y la consecuente ausencia de formación de radicales fenólicos.

En el caso del monómero de RAS, el grupo sulfónico se acomoda en el sitio de unión, pero en el caso del dímero, las interacciones estéricas y electrónicas no favorecen la coordinación. El grupo sulfónico cargado puede interactuar con grupos polares a través de enlaces de H o incluso con cargas positivas de los residuos clave de HRP durante la reacción (hierro o quizás HisNH⁺ o ArgNH₂⁺), lo que hace más difícil la adecuada coordinación de RAS para la transferencia de H a E_I y la consecuente generación de radicales de RAS.

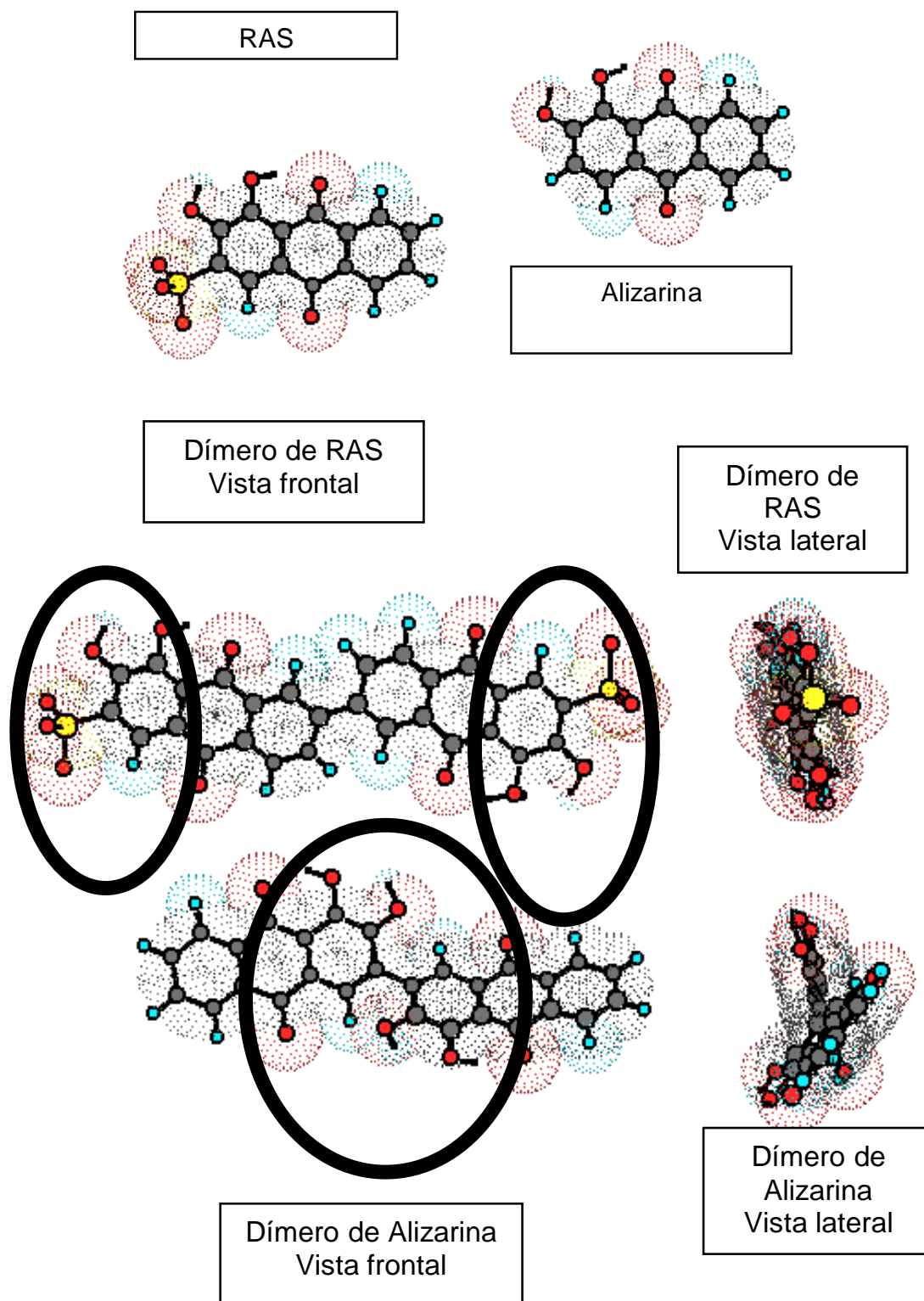


Figura 4.19. Estructuras monoméricas y diméricas de Rojo de Alizarina S y Alizarina.

Estos resultados teóricos obtenidos por la Dra. Ferreira suman información muy valiosa a la explicación de los resultados experimentales obtenidos para alizarina (Pirillo, García Einschlag, et al., 2010b) y RAS como sustratos de HRP en presencia de H_2O_2 . Es notorio, en base a la discusión aquí presente que el bloqueo de HRP debido a la generación de dímeros de RAS es un problema durante la decoloración de estas soluciones. Es posible, por lo tanto, suponer que esta es la principal razón de las bajas conversiones obtenidas con HRP, con un máximo de 57% para soluciones de [RAS]: 75 mg/l, a 45 °C, pH 10.6, 2.5 mg/l de HRP y 3,2 mM de H_2O_2 ; mientras que se obtuvieron conversiones de 90% para soluciones de [Alizarina]:100 mg/l, a 45 °C, pH 7, 25 mg/l de HRP y 21 mM de H_2O_2 .

Otro aspecto a destacar de estos resultados teóricos es que la transferencia de H de RAS al O de $Fe=O$ (E_I de HRP) se lleva a cabo a través de una molécula de agua coordinada a $Fe=O$. Esta molécula de agua es crucial para la transferencia de protones con sustratos de gran volumen, formando parte de una red de enlaces de H que participa de la donación de protones de los sustratos al O de $Fe=O$ de E_I .

4.4. Conclusiones

La optimización de las condiciones de reacción, así como la medición combinada de las concentraciones de Rojo de Alizarina S, peróxido de hidrogeno y oxígeno disuelto en condiciones seleccionadas, permitieron dar respuestas a varias incógnitas planteadas al inicio del capítulo. La naturaleza catalítica de las reacciones de decoloración fue probada por las conversiones despreciables (menores al 3.5%) obtenidas en ausencia de catalizadores. A su vez, la ausencia de precipitados, sumada a la evidencia de formación de productos de menor peso molecular obtenida durante el análisis de los espectros UV-Visible de los medios de reacción permiten postular mecanismos degradativos de oxidación de RAS con ambos catalizadores.

La estructura estérica y electrónica de HRP hace que esta enzima no sea un catalizador adecuado para la oxidación de cierto tipo de colorantes, tales como RAS, incluso cuando es muy eficiente en la degradación de una estructura familiar, como alizarina. Los resultados de modelado molecular permitieron determinar los impedimentos estéricos producidos por la coordinación de estructuras diméricas de RAS, vs. sus análogas de alizarina, al sitio activo de HRP. Fue posible demostrar la participación de una molécula de agua como puente entre HRP y sustratos fenólicos de gran volumen, junto a la red de enlaces de hidrógeno

(altamente sensible a los valores de pH del medio) que colaboran con la transferencia de hidrógeno necesaria para la formación de los radicales orgánicos. Este hallazgo hace hincapié en la especificidad a sustrato de HRP frente a la amplia aplicabilidad de hematin a diferentes tipos de sustratos tales como alizarina y RAS.

Hematin, por su parte, ha demostrado ser un catalizador muy poderoso en la eliminación de alizarina, así como también en la eliminación de RAS, según los resultados que se presentan en este capítulo. Hematin fue capaz de eliminar aproximadamente el 100% de RAS a 40 ° C, pH 9,4, [H₂O₂]: 1,1 mM, y [hematin]:4,4 mg/l. Valores alcalinos de pH, del orden de los valores característicos de los efluentes textiles, permitieron obtener las máximas actividades.

La concentración de peróxido de hidrógeno presentó un efecto negativo, en general, sobre los rendimientos de ambos catalizadores. Sin embargo, a altas concentraciones de oxidante se observa un aumento en los rendimientos catalíticos. No obstante, los resultados de evolución de oxígeno disuelto durante la reacción permiten postular diferentes mecanismos de inactivación para HRP y hematin. En el caso de hematin, es posible proponer la presencia de una vía paralela de reacción por coordinación de H₂O₂ en competencia con el colorante debido a la evolución de oxígeno observada durante la reacción, sumado a los resultados de modelado molecular que confirman la competencia entre RAS y H₂O₂ en la coordinación de E_I para hematin (vía catalítica o *pseudo*-catalítica). Por otro lado, al no detectarse la evolución del oxígeno durante la reacción catalizada por HRP, no hay sustento empírico de la ocurrencia de de reacción que recuperen el estado nativo de la enzima vía evolución de O₂ como producto (vía catalítica o *pseudo*-catalítica). A su vez, el estudio de la coordinación de H₂O₂ con E_I permitió confirmar los resultados de ausencia de producción de oxígeno en el sistema HRP/RAS, debido a los valores positivos calculados para la entalpia de dicha coordinación ΔH_r.

4.5. Resultados publicados

Los resultados que se presentan en este capítulo fueron publicados en:

- XVII Congreso Argentino de Catálisis y VI Congreso de Catálisis del MERCOSUR que se realizó en Salta en el año 2011, bajo el título: “Eliminación de Rojo de Alizarina S

catalizada por hematin y HRP: Análisis de superficie de respuesta.” Autores: Agustina Córdoba, Ivana Magario, María Lujan Ferreira.

- Journal of Molecular Catalyst A: Chemical. “Experimental design and MM2–PM6 molecular modelling of hematin as a peroxidase-like catalyst in Alizarin Red S degradation.” Autores: Agustina Córdoba, Ivana Magario, María Luján Ferreira. 355 (2012), pag: 44-60.

CAPÍTULO 5

DECOLORACIÓN DE NARANJA II

- *Se demuestra el efecto **negativo** del aumento de la concentración de H_2O_2 con ambos catalizadores, siendo este mayor para HRP.*
- *Se confirma la **mayor eficacia** de la aplicación de hematin en reacciones de decoloración, considerando el costo de los catalizadores.*
- *Se confirma la **ruptura del enlace azoico** y la formación de estructuras oxigenadas y alifáticas hidrocarbonadas.*

5.1. Introducción

Naranja II (NaII) es uno de los colorantes azoicos más estudiados debido a la popularidad de su uso. Las vías de eliminación de Naranja II mediante la aplicación de diversas tecnologías y sus eficiencias han sido objeto de innumerables publicaciones. Es posible encontrar en la literatura análisis de tratamientos biológicos (Cardona, Osorio, & Quintero, 2009; Hai, Yamamoto, Nakajima, & Fukushi, 2009; Mutambanengwe, Togo, & Whiteley, 2007), químicos o la combinación de ambos (Lodha & Chaudhari, 2007; Tantak & Chaudhari, 2006). No obstante, la degradación reductiva del enlace azoico producida durante los tratamientos anaeróbicos conduce a la formación de aminas aromáticas carcinogénicas (J. Zhang et al., 2012).

La aplicación de procesos de naturaleza Fenton y foto-Fenton demostró buenos resultados en la eliminación de NaII (Bandara, Morrison, Kiwi, Pulgarin, & Peringer, 1996; J. X. Chen & Zhu, 2010a; Fernandez, Bandara, Lopez, Buffat, & Kiwi, 1999; Maezono, Tokumura, Sekine, & Kawase, 2011). Sin embargo, estos procesos presentan una serie de desventajas entre las que se pueden citar como más importantes: (1) la necesidad de ajustar el pH del sistema a valores ácidos alejados de los valores alcalinos característicos de los efluentes textiles y; (2) la generación de un efluente tratado con altas concentraciones de hierro (Bandara, Nadtochenko, Kiwi, & Pulgarin, 1997; Daneshvar, Aber, & Hosseinzadeh, 2008; Ramirez, Costa, & Madeira, 2005; Scheeren, Paniz, & Martins, 2002). Por estas razones es que existen numerosos esfuerzos direccionados a la obtención de catalizadores tipo Fenton heterogéneos que presenten bajas lixiviaciones de hierro y tengan la capacidad de operar a valores neutros de pH. Altos porcentajes de decoloración de soluciones de NaII por medio de estos sistemas se han reportado en distintos estudios (Hartmann, Kullmann, & Keller, 2010; Liang et al., 2010; Rodríguez, Ovejero, Sotelo, Mestanza, & García, 2010; Tian, Tu, Chen, Chen, & Xiong, 2011). Además, se incluye el efecto de la acción de la luz UV (Foto-Fenton) para aumentar las eficiencias del proceso (Duarte & Madeira, 2010; J. Feng, Hu, Yue, Zhu, & Lu, 2003a, 2003b; Herney-Ramirez, Lampinen, Vicente, Costa, & Madeira, 2008; Lam & Hu, 2007; Manzano, Riaza, Quiroga, & Kiwi, 2009; Ramírez, Godínez, Méndez, Meas, & Rodríguez, 2010). Por otro lado, la producción in situ del H₂O₂ empleado en la decoloración también se presenta en diferentes trabajos científicos (Peralta-Hernández et al., 2008; Ramírez et al., 2010; H. Zhang, Li, Zhong, & Ran, 2011).

Además del empleo de sales de hierro como catalizadores, Naranja II fue sustrato modelo en diferentes estudios de aplicación de “Procesos de Oxidación Avanzada” (AOPs) basados

en la generación de radicales $\text{OH}\cdot$ a partir H_2O_2 y $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Aleboyeh, Kasiri, Olya, & Aleboyeh, 2008; Olya, Kasiri, Aleboyeh, & Aleboyeh, 2008) y TiO_2 (Liang et al., 2010). Shi y colaboradores presentaron resultados de la activación catalítica de peroximonosulfatos para generar radicales sulfatos capaces de degradar NaII, como un AOP alternativo (Shi et al., 2014).

Mediciones de carbono orgánico total (TOC), Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) se incluyen en los estudios de eliminación de contaminantes a los fines de determinar el grado de detoxificación de las soluciones alcanzado. Monteagudo et al. (Monteagudo et al., 2008) obtuvieron disminución de hasta el 100 % de DQO y el 80 % de TOC de soluciones de NaII mediante tratamientos Foto-Fenton asistidos con ferrioxalato a valores ácidos de pH. Por otro lado, Liang y sus colaboradores reportaron disminuciones de TOC de hasta el 30 % en tratamientos Fenton heterogéneos (Liang et al., 2010).

El uso de peroxidasas en la decoloración de NaII presentó excelentes resultados (López, Moreira, Feijoo, & Lema, 2004; López, Valade, et al., 2004; Yousefi & Kariminia, 2010). López y colaboradores estudiaron la degradación de NaII a compuestos oxidados de menor peso molecular, mediada por Peroxidasa de Manganeseo (MnP). No obstante, a pesar del mecanismo degradativo observado, no lograron obtener una completa mineralización del colorante (López, Valade, et al., 2004). Estudios de la degradación de este azocolorante con HRP, llevados adelante por A. Zhang et al. (A. Zhang, Fang, Wang, & Liu, 2013) demostraron la eficacia de esta enzima para alcanzar grados de decoloración del 95.8% en condiciones optimizadas mediante la metodología de la superficie de respuesta. Estos autores analizan el mecanismo de acción de HRP y proponen dos vías de rupturas simétrica y asimétrica del enlace azoico que producen estructuras degradadas del colorante, las cuales posteriormente sufren reacciones de acoplamiento. El estudio de la ruptura del enlace azoico se incluye también en un trabajo de J. Zhang y sus colaboradores, en el cual dos sustratos azoicos (Naranja II y Amarillo Ocaso) se someten a un tratamiento oxidativo con CloroPeroxidasa (CPO) en presencia de H_2O_2 . Los resultados obtenidos en este sistema, presentan evidencia de rupturas tanto simétricas como antisimétricas (J. Zhang et al., 2012). Resultados similares fueron publicados recientemente para la decoloración del azocolorante Crystal Ponceau 6R catalizada por la peroxidasa del poroto de soja (SBP), donde un análisis detallado de intermediarios de reacción le permite a los autores proponer ambos caminos degradativos de ruptura del enlace azo, simétrico y asimétrico, seguidos de oxidación a ácidos carboxílicos, desulfonación y reacciones de oxidación de fenoles (Ali et al., 2013).

T. K. Saha y sus colaboradores presentaron recientes avances en el campo de la catálisis biomimética homogénea, mediante el empleo una porfirina de Mn (Mn^{III} (*meso*- tetrakis (1- metilpiridinio- 4- il)porfirinato) en presencia de H_2O_2 en el tratamiento oxidativo de colorantes azoicos. Este trabajo se enfoca al estudio de las especies de la metaloporfirina participantes en la reacción, respecto de las cuales se postula la formación de intermediarios análogos a E_0 , E_I y E_{II} durante el ciclo catalítico (Saha, Frauendorf, & John, 2013).

Estudios anteriores llevados a cabo por integrantes de nuestro grupo de investigación demostraron la capacidad de hematin en la eliminación del colorante azoico Azul Negro de Eriocromo R, cuyas formas azo e hidrazona se presentan en la Figura 5.1. Estos estudios se efectuaron en condiciones neutras de pH y se obtuvieron decoloraciones del 60 % de soluciones de 25 mg/l de colorante. Además, del estudio UV-Visible de avance de reacción, se observó una disminución inicial de las longitudes de onda características, lo cual es consistente con un mecanismo degradativo. Sin embargo, el espectro presentó un nuevo pico a mayores longitudes de onda, a tiempos prolongados de reacción, lo que permite postular presencia de reacciones de acoplamiento de los productos de la reacción de oxidación que puedan a su vez, actuar como sustrato del catalizador (Pirillo, Einschlag, et al., 2010a).

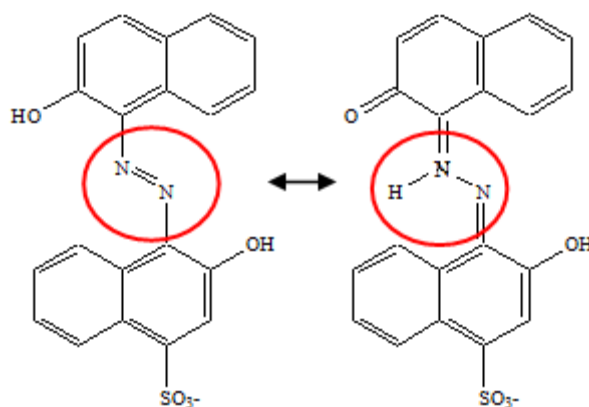


Figura 5.1. Estructura del colorante Azul Negro de Eriocromo R. Formas azo e hidrazona.

Este capítulo evalúa la acción catalítica de hematin frente a HRP en la decoloración de Naranja II empleando la herramienta del diseño de experimentos. Además, se incluyen resultados de demanda química de oxígeno y estudios FTIR y UV-Visibles de las soluciones

luego del tratamiento, a los fines de establecer la presencia de mecanismos degradativos o de acoplamiento de radicales libres, confirmar la destrucción del enlace azoico e inferir respecto a los productos de reacción remanentes en solución.

Los objetivos particulares de este capítulo incluyen:

- Determinar la influencia de las condiciones de reacción en el grado de decoloración de soluciones acuosas de Naranja II.
- Optimizar las condiciones de reacción para maximizar la eficiencia de ambos catalizadores en la reacción de decoloración de NaII.
- Determinar el grado de oxidación de Naranja II alcanzado luego del tratamiento con ambos catalizadores, mediante mediciones de la demanda química de oxígeno de las soluciones obtenidas.
- Analizar el mecanismo de eliminación de Naranja II por medio de análisis de los productos obtenidos durante los tratamientos catalíticos.
- Analizar el efecto de la estructura del sustrato reductor sobre los mecanismos de reacción, degradativos y/o polimerizantes, de ambos catalizadores por comparación de resultados con Azul Negro de Eriocromo R.

5.2. Metodología

5.2.1. Diseño experimental y análisis estadístico

Tanto el diseño experimental (Tabla 4.1, Capítulo 4) como el análisis estadístico aplicado a los sistemas homogéneos Naranja II/hematin/H₂O₂ y Naranja II/HRP/H₂O₂ son análogos a los detallados en la sección 4.2.1 del Capítulo 4.

5.2.2. Reacciones de decoloración de Naranja II

Las reacciones se llevaron a cabo según el procedimiento descripto para Rojo de Alizarina S en la sección 4.2.1 del Capítulo 4. La concentración de NaII se mantuvo constante en todos

los experimentos en 75 mg/l. La evaluación de la eficacia del tratamiento se llevó a cabo a través de las lecturas de absorbancia a 484 nm. Además, los espectros UV-Visible se registraron en un rango de 200- 800 nm.

Para computar los perfiles de conversión de NaII a distintas concentraciones de catalizador (sección 4.3.2, Capítulo 4), alícuotas de 300 µl de solución fueron extraídas a diferentes tiempos de tratamiento hasta un tiempo final de 120 minutos de reacción. Para estas mediciones el volumen total de H₂O₂ se agregó al inicio de la reacción.

5.2.2. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) es una medida aproximada del contenido de materia orgánica presente en una muestra de agua. La DQO consiste en acelerar el proceso de biodegradación que realizan los microorganismos que se encuentran presentes en los cauces de agua naturales, mediante un proceso de oxidación forzada con oxidantes químicos. Así, la degradación biológica de un carbohidrato se expresa como: $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$. La oxidación química de la misma sustancia se expresa como: $C_6H_{12}O_6 + 4 Cr_2O_7^{= } + 32 H^+ \rightarrow 6 CO_2 + 8 Cr^{3+} + 22 H_2O$. Las determinaciones de DQO permiten obtener información a cerca de: (1) la materia orgánica susceptible de ser oxidada químicamente en las soluciones analizadas; y (2) la naturaleza degradativa del mecanismo catalítico de HRP y/o su biomimético, hematin.

Se realizaron determinaciones DQO de las soluciones de Naranja II de acuerdo al método de reflujo cerrado (5520 D), descrito en Standard Methods para valores de DQO menores a 75 mg_{O₂}/l (APHA, 1998). La DQO se determinó en soluciones de NaII sin tratamiento previo y luego de 1, 4 y 24 hs de tratamiento con sistemas de HRP/H₂O₂ o hematin/H₂O₂. Las determinaciones de DQO se realizaron por espectroscopia UV-Visible. Se determinó la absorbancia de las soluciones a $\lambda = 600$ nm y se emplearon soluciones de biftalato de potasio como estándares para la obtención de una curva de calibración.

5.2.3. Caracterización por FTIR de los productos de reacción

Se midieron los espectros de FTIR (Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier) (en el rango de 4600 a 400 cm⁻¹) de muestras sólidas de Naranja II y de las mezclas de reacción luego de 1 h de tratamiento en las condiciones óptimas determinadas por los métodos de superficie de respuesta. Se tomaron alícuotas de 2 ml de solución tratada, se

acidificaron con 250 μl de solución 1 M de HCl y se agitaron durante 5 minutos con 2 ml de Cl_2CH_2 para lograr la extracción de los productos de reacción. Posteriormente, un mililitro del extracto se deshidrató con sulfato de sodio anhidro y se concentró por evaporación a factores por 100 y por 200 para las muestras de reacción catalizadas por HRP y hematin, respectivamente. Posteriormente, 10 μl del extracto concentrado se depositaron en un disco delgado de KBr y el solvente se eliminó por el pasaje de un flujo de aire caliente en dirección paralela al disco. Por otro lado, el colorante sólido se mezcló con KBr en una proporción másica del 1% y se sometió a presión para obtener un disco fino. Los blancos utilizados fueron aire y discos delgados de KBr, para NaII y los extractos de productos de reacción respectivamente. Las mediciones se realizaron con un equipo JASCO FT/IR 5300 (resolución de 4 cm^{-1}) equipado con un detector infrarrojo de sulfato triglicérido deuterado (en inglés: DTGS).

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Análisis de interferentes

La Figura 5.2 presenta el efecto del agregado de H_2O_2 y el catalizador sobre el espectro de absorción de las soluciones de Naranja II en buffer Tris/HCl pH 9. El único efecto provocado por HRP y H_2O_2 en el espectro de NaII es una despreciable disminución de la absorbancia a 484 nm, lo que puede asignarse a la formación de agregados moleculares del colorante. Por su parte y en concordancia con lo observado en el Capítulo 4, la presencia de hematin provoca hipercromicidad a valores de longitudes de onda comprendidos entre 300 y 430 nm. Por otro lado, a altas concentraciones de H_2O_2 (50 mM) el espectro de NaII se ve afectado por un aumento de absorbancia entre 200 y 250 nm debido a la absorción de H_2O_2 .

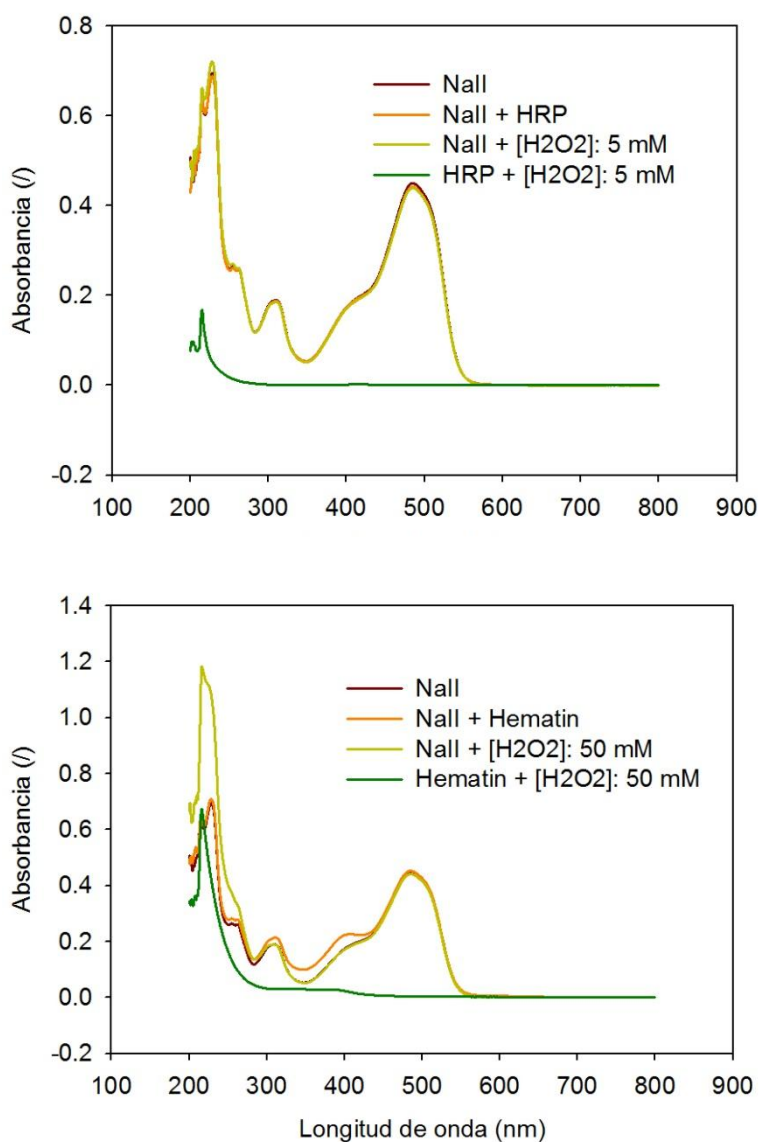


Figura 5.2. Efecto de catalizadores y peróxido de hidrógeno en el espectro de absorción de la solución de Naranja II en buffer pH 9. [NaII]: 75 mg/l; [Catalizador]: 10 mg/l; [H₂O₂]: 5 mM para HRP y [H₂O₂]: 50 mM para hematin.

5.3.2 Reacciones de decoloración de Naranja II

La Figura 5.3 muestra el grado de decoloración alcanzado durante los experimentos, con HRP y hematin. En ninguna de las condiciones testeadas con ambos catalizadores se observó formación de precipitado indicativo de productos oligoméricos de reacción.

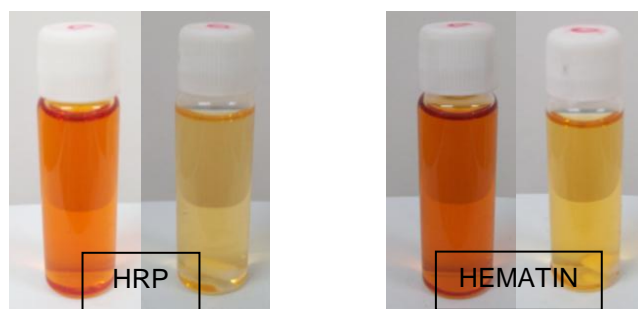


Figura 5.3. Grado de decoloración alcanzado luego de 60 minutos de tratamiento con $[\text{H}_2\text{O}_2]: 1.8 \text{ mM}$, $\text{pH}: 7.4$, $\text{Temp}: 45$, $[\text{Catalizador}]: 2.5 \text{ mg/l}$.

La Figura 5.4 incluye perfiles de decoloración obtenidos en condiciones seleccionadas variando la concentración de catalizador en cada caso. A 2.5 mg/l de catalizador se puede observar una mayor velocidad de reacción con HRP, no obstante los valores obtenidos con hematin son comparables a los obtenidos con la enzima. La elevada conversión obtenidas con 2.5 mg/l de de HRP hacen que sea ineficiente emplear mayores cantidades.

Es importante notar aquí la mayor actividad obtenida con HRP en la decoloración de NaII comparado con RAS. Como se mencionó en los Capítulos 3 y 4 los colorantes poseen la capacidad de dimerizarse en solución. En el Capítulo 4 se atribuyen, en parte, las bajas conversiones alcanzadas con la enzima al impedimento estérico y electrónico producido por los dímeros de RAS en el sitio activo de HRP. NaII puede formar la estructura dimérica estable que se presenta en la Figura 5.5, la cual presenta los grupos oxidrilos hacia el centro. Esta estructura posibilitaría el ingreso al sitio de unión de HRP. Igualmente, los dímeros de NaII poseen en los extremos los grupos sulfónicos cargados negativamente, lo cual puede generar importantes impedimentos electrónicos durante la coordinación al sitio de reacción de la enzima.

En el caso de hematin, las mediciones a 10 mg/l se llevaron a cabo con 25 mM de H_2O_2 y mostraron altas conversiones –comparables a las obtenidas con HRP con menores concentraciones de enzima y oxidante– lo que puede asociarse a un menor rendimiento y selectividad en las reacciones catalizadas por el biomimético.

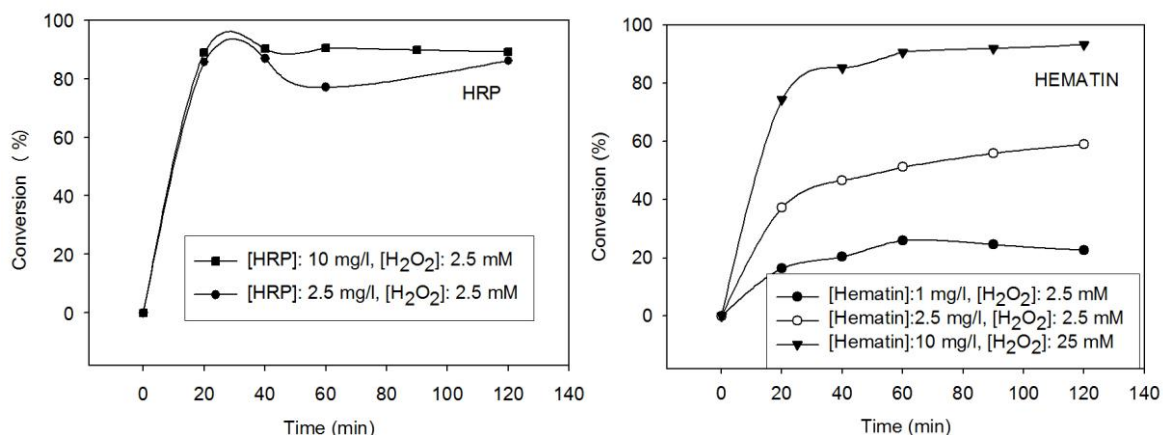


Figura 5.4. Perfiles de conversión de Naranja II. $[\text{NaII}]$: 75 mg l^{-1} ; pH: 9 y Temp: 40°C .

Reacciones de decoloración sin catalizador se llevaron a cabo a pH 9 y 10.6, con una concentración inicial de H_2O_2 de 2.5 mM. Las conversiones obtenidas fueron del 11% y 9.9% respectivamente, evidenciando la naturaleza catalítica de las decoloraciones medidas en el set completo de experimentos.

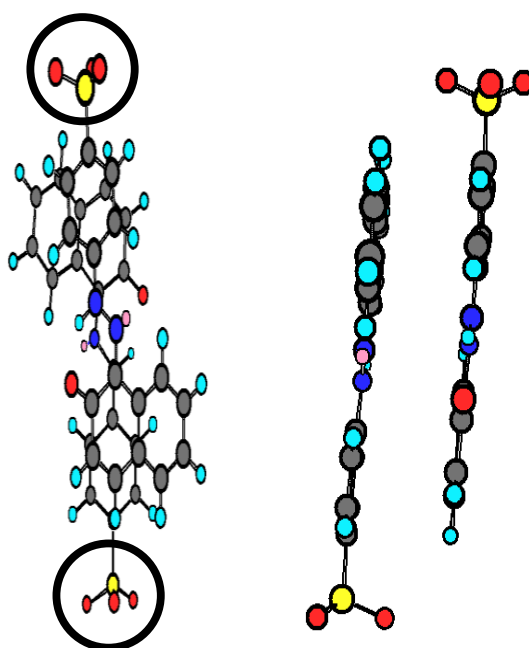


Figura 5.5. Dímeros de NaII. Los círculos negros muestran la posición de los grupos sulfónicos.

La Tabla 5.1 presenta los valores de respuesta obtenidos durante el diseño experimental. HRP alcanzó mayores conversiones y rendimientos catalíticos que hematin. No obstante, los resultados obtenidos con el biomimético resultan comparables con los de la enzima.

Tabla 5.1. Resultados de las conversiones y los rendimientos catalíticos.

Exp. N°	HRP		Hematin	
	Conversión, Y. (%)	Rendimiento Catalítico, Z. (mM _{Colorante} (mM _{H2O2} g _{Catalizador}) ⁻¹)	Conversión, Y. (%)	Rendimiento Catalítico, Z. (mM _{Colorante} (mM _{H2O2} g _{Catalizador}) ⁻¹)
1	87.4 (±2,8) ^a	2995 (±96) ^a	48.6 (±1,5) ^a	1664 (±51) ^a
2	29.9	1423.5	17.7	745.5
3	84.2	2884.1	43.4	1485.1
4	96.8	2591.2	72.3	1934.5
5	88.3	18901.0	34.9	7471.2
6	86.6	2966.9	41.6	1426.2
7	15.8	339.1	15.2	325.1
8	85.4	18272.6	42.9	9194.6
9	91.6	2451.1	86.8	2324.1
10	85.7	6668.9	71.5	5567.9
11	85.4	1556.3	51.3	934.8
12	25.6	1216.8	19.2	912.4
13	82.1	1495.1	55.9	1018.1
14	84.4	1271.4	63.0	949.72
15	87.0	1311.1	73.4	1105.8
16	77.6	3402.1	62.6	2744.0
17	97.7	1883.8	92.4	1781.8
18	52.8	11218.8	13.1	2774.6
19	59.0	12533.0	16.4	3489.2
20	45.5	4350.3	17.8	1697.9
21	14.0	2144.2	4.9	751.8

^a Valores promediados de las repeticiones del punto central.

HRP como catalizador

Los modelos cuadráticos obtenidos por el ajuste de los datos de la Tabla 5.1, para la conversión (Y) y el rendimiento catalítico (Z), a la ecuación 4.1 (Capítulo 4) se presentan a continuación (con los factores representados en sus valores codificados).

$$Y = 86_{(\pm 1.2)} + 43.6_{(\pm 1.9)} X_{pH} + 11.1_{(\pm 1.9)} X_{[HRP]} - 1.6_{(\pm 1.7)} X_{[H_2O_2]} - 43.9_{(\pm 2.9)} X_{pH}^2 -$$

$$25.4_{(\pm 2.7)} X_{[HRP]}^2 + 9.7_{(\pm 5.0)} X_{[H_2O_2]} X_{[HRP]} + 14.8_{(\pm 4.8)} X_{[H_2O_2]} X_{pH} \quad (5.1)$$

$$Z = 2636_{(\pm 585)} - 7983_{(\pm 1013)} X_{[H_2O_2]} - 4405_{(\pm 1086)} X_{[HRP]} + 2265_{(\pm 1110)} X_{pH} + 9951_{(\pm 1780)} X_{[H_2O_2]}^2 + 7340_{(\pm 2929)} X_{[HRP]} X_{[H_2O_2]} \quad (5.2)$$

Estos modelos fueron los más adecuados para representar las relaciones existentes entre las respuestas estudiadas y los factores estadísticamente significativos: para la conversión se obtuvo un coeficiente de determinación R^2 de 98.53% y un $R^2_{ajustado}$ = 97.89%, mientras que para el rendimiento catalítico, R^2 fue 85.46% y $R^2_{ajustado}$ = 81.42%.

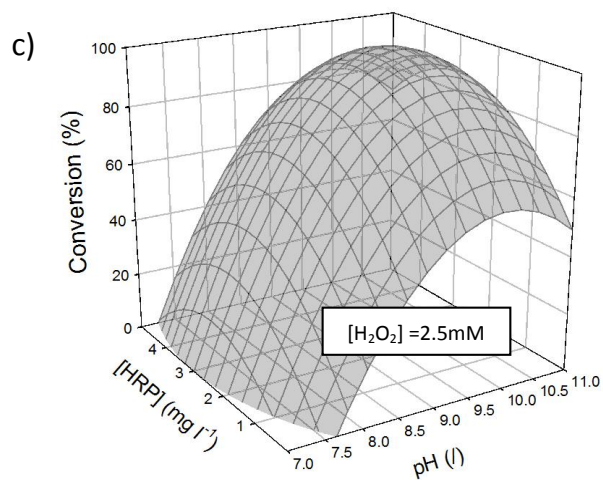
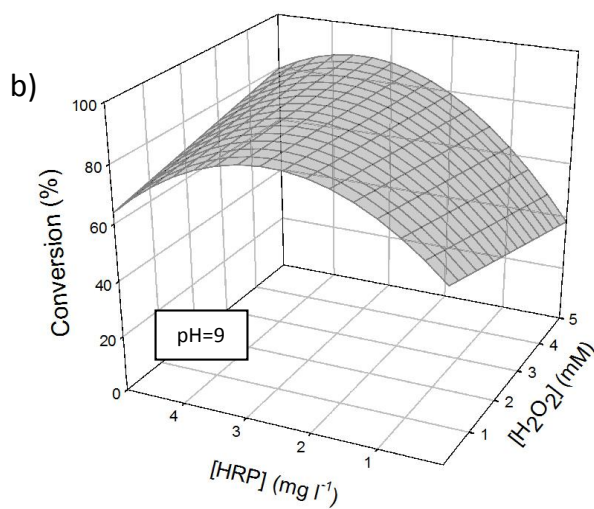
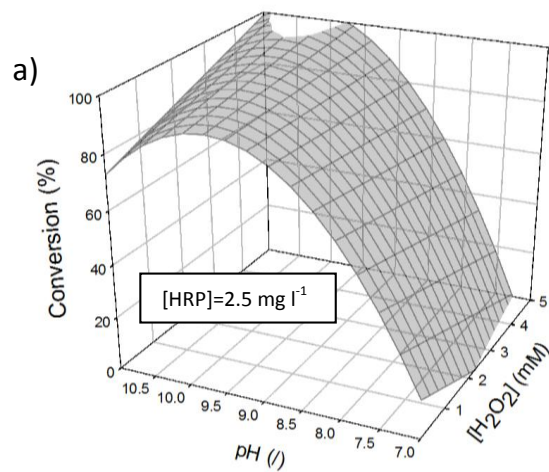
El orden de intensidad en el efecto de los factores estudiados sobre la conversión fue: pH → [catalizador] → [H₂O₂]; mientras que sobre el rendimiento catalítico fue: [H₂O₂] → [catalizador] → pH. El efecto de la temperatura no fue significativo estadísticamente para ninguna de las dos respuestas en el rango estudiado (30 a 50 °C).

Los efectos de pH y de la concentración de HRP alcanzan máximos de conversión en valores intermedios. El efecto de la concentración de H₂O₂, por otro lado, se representa por sus interacciones con los factores: pH y concentración de enzima. La Figura 5.6 muestra las representaciones en 3-D de las ecuaciones (5.1) y (5.2) expresadas en los valores naturales de las variables. La conversión se vio afectada positivamente por altos valores de pH al igual que el rendimiento catalítico. Las especies intermediarias de HRP contienen componentes ácidos y básicos los cuales presentan actividades relativas a los valores de pH. Esto produce la variación de los valores de las constantes cinéticas del ciclo catalítico con el pH del medio de reacción. Existen en la literatura reportes de valores de las constantes cinéticas intervinientes en el mecanismo de reacción de HRP para sustratos fenólicos simples, los cuales demuestran una actividad catalítica casi constante en el rango de pH de 7 a 9, mientras que a valores de pH por encima de 9, esta cae abruptamente (H B Dunford, 1999). En el presente estudio, las mejores conversiones se obtuvieron a pH 10. Este corrimiento en el valor óptimo de pH puede relacionarse a la estructura molecular de Naranja II. Diferentes estudios han demostrado la formación de agregados moleculares en soluciones acuosas neutras de NaII por medio de procesos de dimerización (Asakura & Ishida, 1989; Reeves et al., 1979; Simoncic, 1995). En el Capítulo 3, y en la Figura 5.5 se presentan estructuras diméricas de NaII estabilizadas por enlaces de hidrógeno. El aumento de pH del medio solvente provoca la deprotonación de las moléculas de colorante, lo cual

implica la ruptura de estas estructuras diméricas (Reeves et al., 1979). A su vez, esto produce la pérdida del tautomerismo. NaII tiene un pKa de 10.7, correspondiente al grupo –OH (Abbott et al., 2009). En base a estas consideraciones, es posible inferir que es esperable un aumento de la reactividad de NaII con el aumento de pH del medio. Sin embargo, las estructuras de NaII remanentes en solución a valores de pH altos no presentan el –OH fenólico necesario para la formación de una especie radicalaria por abstracción de H (ver Figura 5.7).

Por otro lado, el pH y la concentración de H₂O₂ interactúan positivamente para la obtención de altas conversiones. Como se mencionó en el capítulo anterior, el aumento de pH provoca la disociación del H₂O₂ (pKa= 11,62) aumentando la concentración de la especie HOO⁻, de mayor reactividad (Rafiquzzaman et al., 1995). Sin embargo, esta interacción se puede asociar también con la descomposición del H₂O₂ inducida por el medio alcalino, lo que produce la generación de las especies activas de oxígeno, OH⁻ y HOO⁻, capaces de actuar sobre Naranja II (Kadla & Chang, 2001). De todos modos, las conversiones obtenidas en ausencia de catalizador a pH 9 y 10.6 permiten considerar a la vía catalítica como la principal vía de degradación del colorante.

El rendimiento catalítico se vio favorecido a bajas concentraciones de H₂O₂. A pesar de que la estequiometría de la reacción de oxidación de NaII es desconocida, el exceso de H₂O₂ puede, o bien permanecer en el medio de reacción sin reaccionar o provocar la inactivación del catalizador mediante su participación en las vías de consumo de H₂O₂ mencionadas en los Capítulos 1 y 4 (formación de E_{III} y P670). Por otro lado, a una concentración media de enzima (3 mg/l) se obtuvieron conversiones casi completas, las cuales decrecieron a mayores concentraciones del biocatalizador. Este efecto puede asociarse a la inactivación que sufre la enzima por ataque de los radicales orgánicos, lo que provoca una disminución relativa del efecto de inactivación por H₂O₂ (Kapeluich et al., 1997; J A Nicell & Wright, 1997; Wagner & Nicell, 2002). El aumento de la concentración de enzima provoca, por lo tanto, un aumento en la concentración de radicales fenólicos. Este incremento de la velocidad de generación de radicales orgánicos con la concentración de HRP disminuye el número de ciclos enzimáticos debido a la inactivación que estos radicales producen, lo que se traduce en las menores conversiones observadas.



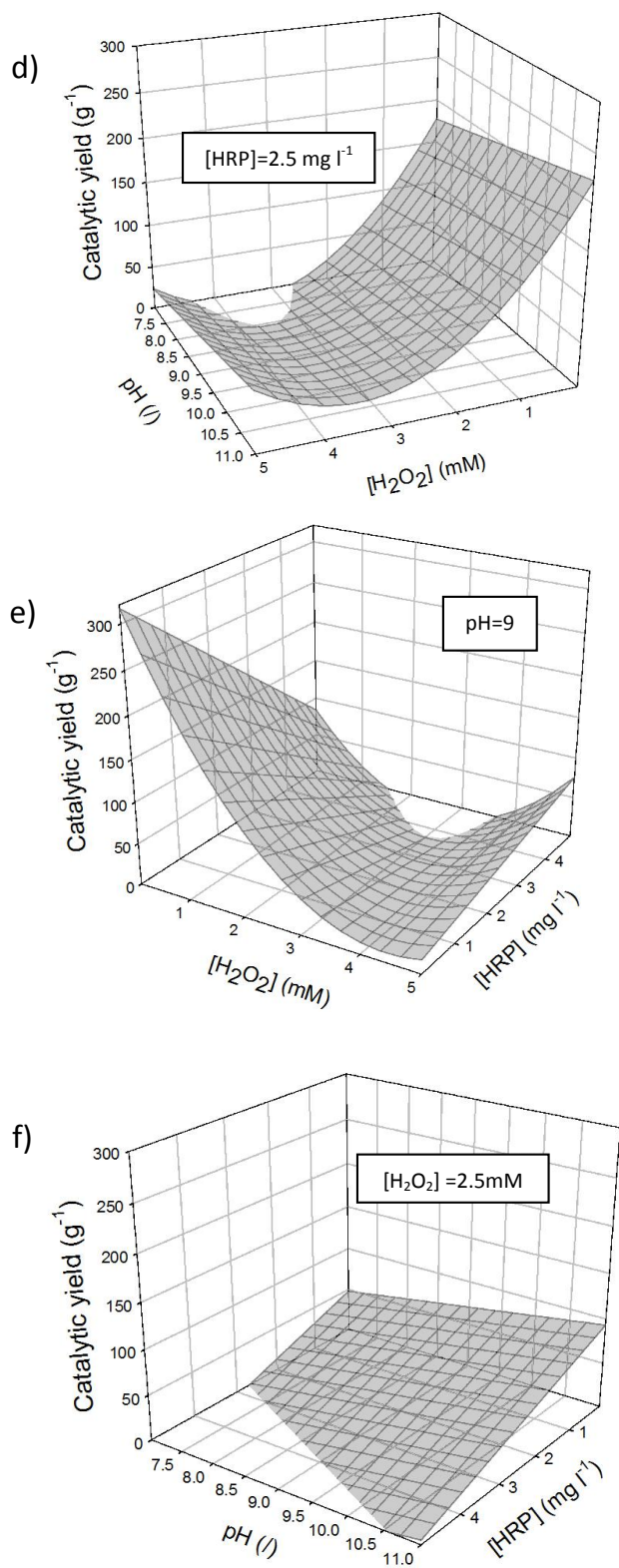


Figura 5.6. Superficies de respuesta para la Conversión y el Rendimiento Catalítico de sistemas HRP/NaII. Los factores no graficados se fijaron en los valores centrales de la región experimental.

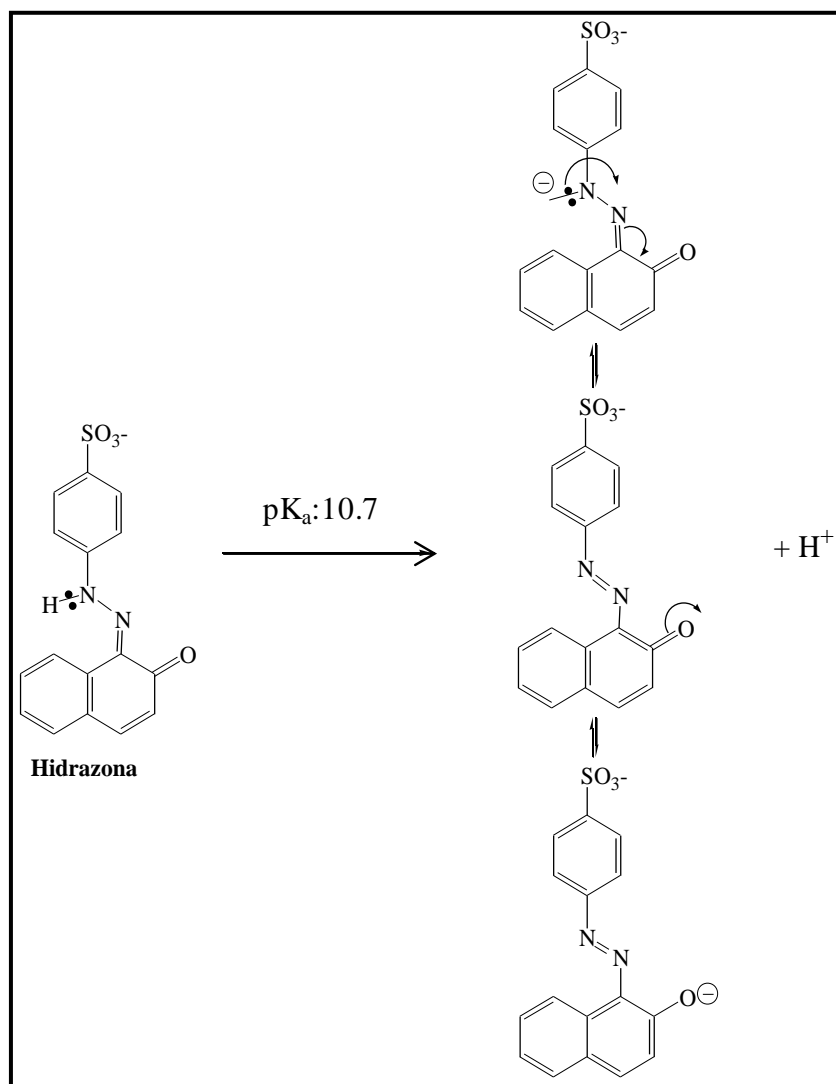


Figura 5.7. Especies presentes en solución a pH mayores a 10.7.

El rendimiento catalítico presentó un valor mínimo a 3 mM de H₂O₂, luego del cual comenzó a aumentar. Además, se observó una interacción positiva de los efectos de pH y concentración de H₂O₂ sobre el rendimiento catalítico y la conversión de NaII. Este efecto puede estar asociado o bien a un menor impacto relativo de inactivación debido al aumento de concentración de enzima; o bien a la reincorporación de HRP en estado nativo al ciclo catalítico principal por la recuperación del intermediario inactivo E_{III} por reacción con H₂O₂ (reacción 1.8, Capítulo 1). Por lo cual el efecto negativo causado por las reacciones laterales sobre el rendimiento catalítico es compensado por la reincorporación de HRP al ciclo principal.

Hematin como catalizador

Las ecuaciones obtenidas por el ajuste de los datos experimentales obtenidos en las decoloraciones catalizadas por hematin se presentan a continuación.

$$Y = 46.7_{(\pm 1.0)} + 37.6_{(\pm 2.0)}X_{pH} + 23.5_{(\pm 2.0)}X_{[Hematin]} + 6.7_{(\pm 1.9)}X_{[H_2O_2]} - 15.1_{(\pm 5.0)}X_{[Hematin]}^2 + 24.1_{(\pm 10.9)}X_{[Hematin]}X_{pH} + 8.6_{(\pm 8.6)}X_{[H_2O_2]}X_{pH} \quad (5.3)$$

$$Z = 1426_{(\pm 181)} - 3517_{(\pm 321)}X_{[H_2O_2]} - 1002_{(\pm 343)}X_{[Hematin]} + 1782_{(\pm 330)}X_{pH} + 4299_{(\pm 550)}X_{[H_2O_2]}^2 \quad (5.4)$$

La bondad del ajuste en ambas ecuaciones se computa por $R^2=98.11\%$ y $R^2_{ajustado}=97.33\%$ para la conversión y $R^2=90.68\%$ y $R^2_{ajustado}=88.82\%$ para el rendimiento catalítico.

La Figura 5.8 muestra las representaciones 3-D de las ecuaciones (5.3) y (5.4). Los principales factores que afectan a las respuestas son, en general, los mismos y con los mismos órdenes e intensidades que los que afectan a HRP. Las superficies de respuesta obtenidas para hematin son más simples que las correspondientes a HRP, y representan menores efectos de interacción y de curvatura.

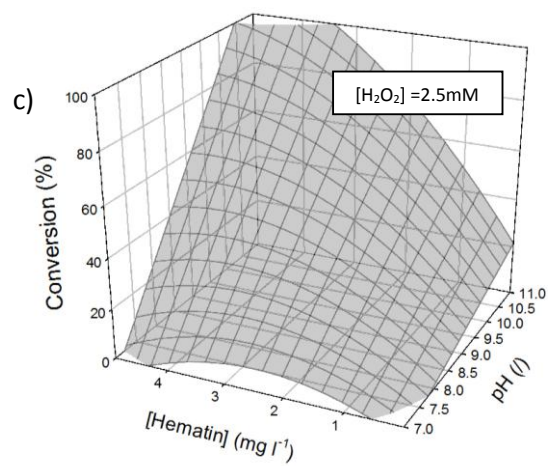
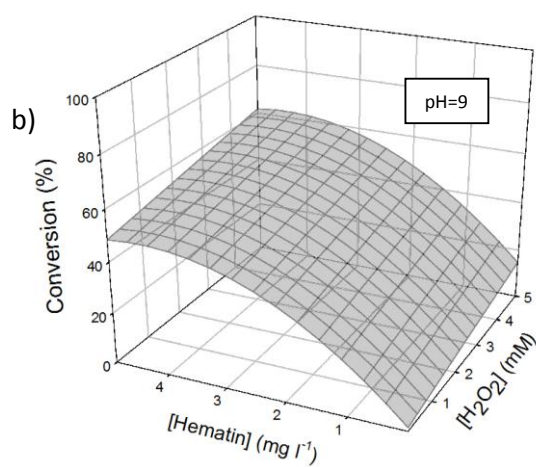
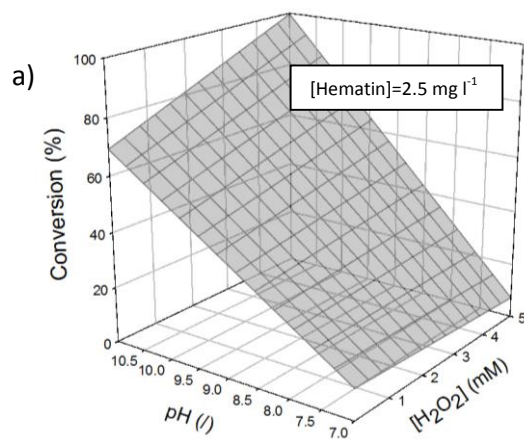
La mayor eficiencia catalítica observada con HRP puede asociarse a los efectos producidos por su estructura proteica sobre el microambiente generado en el sitio activo frente al existente en la sexta posición de coordinación del Fe en la estructura de la porfirina. Estas características estructurales de HRP promueven la ruptura heterolítica, en lugar de homolítica, del enlace O-O de H_2O_2 y a su vez, favorecen la ocupación del sitio activo por otras sustancias, como por ejemplo una molécula de agua, la cual puede prevenir posteriores ataques del sustrato (Stephenson & Bell, 2007a).

La conversión crece linealmente con el pH y no se observa ningún valor óptimo. Este comportamiento es consistente con la ausencia de estructura proteica, la cual regula las condiciones ácido-base del sitio catalítico. En contraste con HRP, se observa una interacción positiva entre la concentración de hematin y el pH del medio de reacción. Este sinergismo observado puede asociarse a la desagregación de dímeros de hematin con el incremento del pH del medio, aumentando la disponibilidad del catalizador para poder someterse al ataque

del sustrato (De Villiers et al., 2007). Además, la interacción positiva entre el pH y la concentración de H_2O_2 se asocia a la deprotonación de H_2O_2 (Rafiquzzaman et al., 1995).

A diferencia de HRP, las conversiones de colorante alcanzadas con hematin se incrementaron continuamente con el aumento de la concentración del catalizador. No se observó un efecto de detrimento de la conversión a altas concentraciones de hematin. Por lo tanto, es posible considerar que hematin resulta insensible al ataque de radicales orgánicos producidos durante la reacción de oxidación de NaII bajo las condiciones de concentración estudiadas, lo que demuestra una clara ventaja asociada a la ausencia de estructura proteica.

Las conversiones de NaII catalizadas por hematin se ven ligeramente favorecidas con el aumento de la concentración de H_2O_2 en el rango de 0.05 a 5 mM (correspondiente a una relación molar $H_2O_2/NaII$ que va de 0.24 a 24). Por otro lado, los rendimientos catalíticos decrecen con el aumento de la concentración de oxidante, hasta alcanzar un mínimo a 3 mM, incrementándose luego. Esto puede significar que el rendimiento catalítico puede recuperarse a altas concentraciones de H_2O_2 a través de las mismas rutas catalíticas propuestas para el sistema HRP. A diferencia de HRP, no se observó interacción con la concentración de catalizador, lo que indica una menor participación de vías de inactivación –como la formación de estructuras análogas a E_{III} y posteriormente P670, y/o el ataque de radicales inorgánicos (como OH^\bullet) al anillo porfirínico– en comparación al mecanismo de la enzima (Cunningham et al., 2001; Stephenson Bell, A.T. , 2005). Por otro lado, si se generan radicales inorgánicos durante el ciclo catalítico de hematin, estos pueden contribuir al aumento de la conversión debido al ataque de los mismos a las moléculas de NaII, a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno.



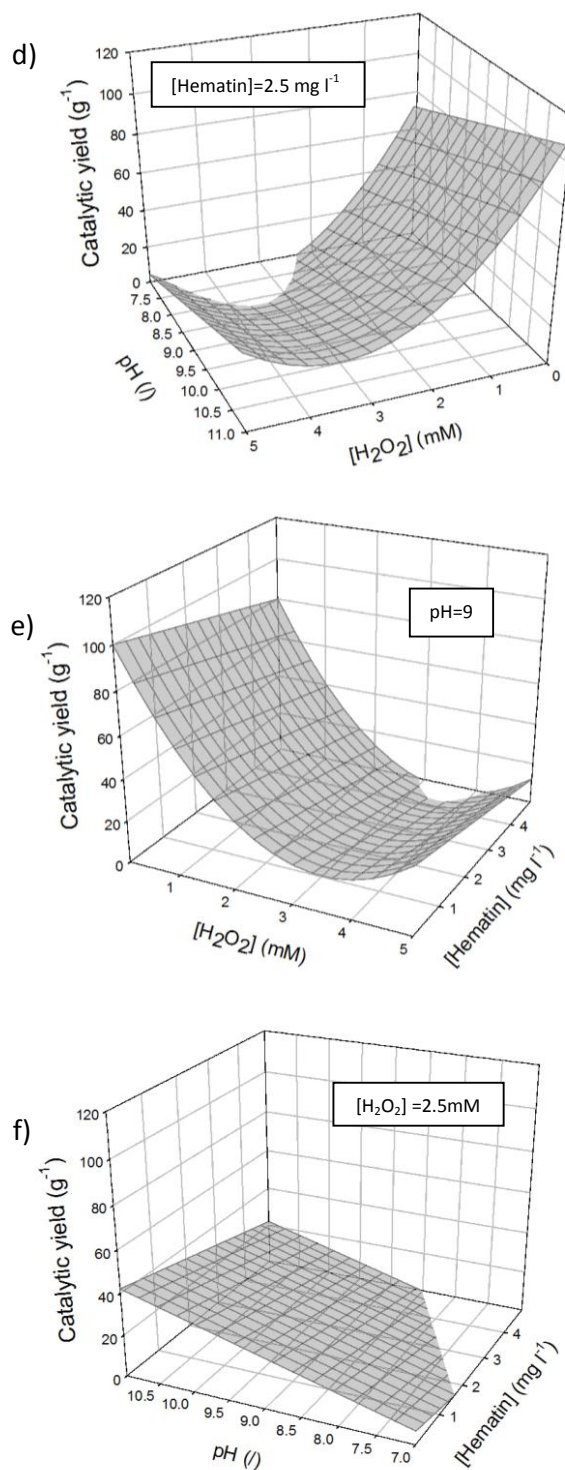


Figura 5.8. Superficies de respuesta para la conversión y el rendimiento catalítico de los sistemas Hematin/Naranja II. Los factores no graficados se fijaron en los valores medios de la región experimental.

5.3.3. Optimización de las condiciones de reacción y validación de los modelos

La selección de las condiciones óptimas de decoloración implica alcanzar un compromiso entre altas conversiones y rendimientos catalíticos aceptables. Esta situación se obtiene para ambos catalizadores a altos valores de pH, bajas concentraciones de H₂O₂ y concentraciones moderadas de catalizador. La Tabla 5.2 muestra los valores propuestos para cada factor en base a la función deseabilidad. Los modelos de superficie fueron sometidos a una validación experimental en condiciones seleccionadas y los resultados obtenidos también se presentan en la Tabla 5.2. La temperatura, que no demostró significancia estadística en las condiciones analizadas se fijó al menor valor analizado (30°C). Esta ausencia de efecto de la temperatura en la reacción de degradación del colorante es indicio de bajas energías de activación de las reacciones implicadas para ambos sistemas, lo cual es esperable en sistemas reactivos que implican la participación de radicales libres (Bandara et al., 1996).

Tabla 5.2. Optimización de las condiciones de reacción y validación de modelos.

	pH (/)	[H ₂ O ₂] (mM)	Catalyst concentration (mg/l)	Conversión (%)		Rendimiento Catalítico (g ⁻¹)	
				Predicted	Experimental	Predicted	Experimental
HRP	10.0 ^a	0.5 ^a	3.0 ^a	91.0 %	95.7 %	14430.0	13398.0
	9.2	0.4	2.13	88.0 %	75.2 %	18416.4	18535.2
Hematin	10.6 ^a	1.0 ^a	4.44 ^a	97.8 %	93.4 %	5717.6	4417.5
	10.6	0.4	4.44	87.1 %	75.3 %	8903.7	8047.3

^a Valores de las variables que maximizan las respuestas estudiadas.

Mediante el empleo de la función deseabilidad, se seleccionaron las condiciones de reacción que permitieron obtener un óptimo compromiso entre altas conversiones y buenos rendimientos catalíticos. Las gráficas resultantes de la función deseabilidad se presentan en la Figura 5.9. Se observa claramente que HRP presenta tres zonas diferentes de actividad enzimática. A baja concentración de H₂O₂, no mayor a 0.5 mM y a concentraciones medias de HRP (2 a 3 mg/l); y otra a altas concentraciones de HRP y H₂O₂. La desactivación de hematin con el incremento de la concentración de peróxido de hidrógeno es menor que la observada para HRP. A pesar de que, para ambos catalizadores, la función deseabilidad es similar, en el caso de hematin es ligeramente más plana.

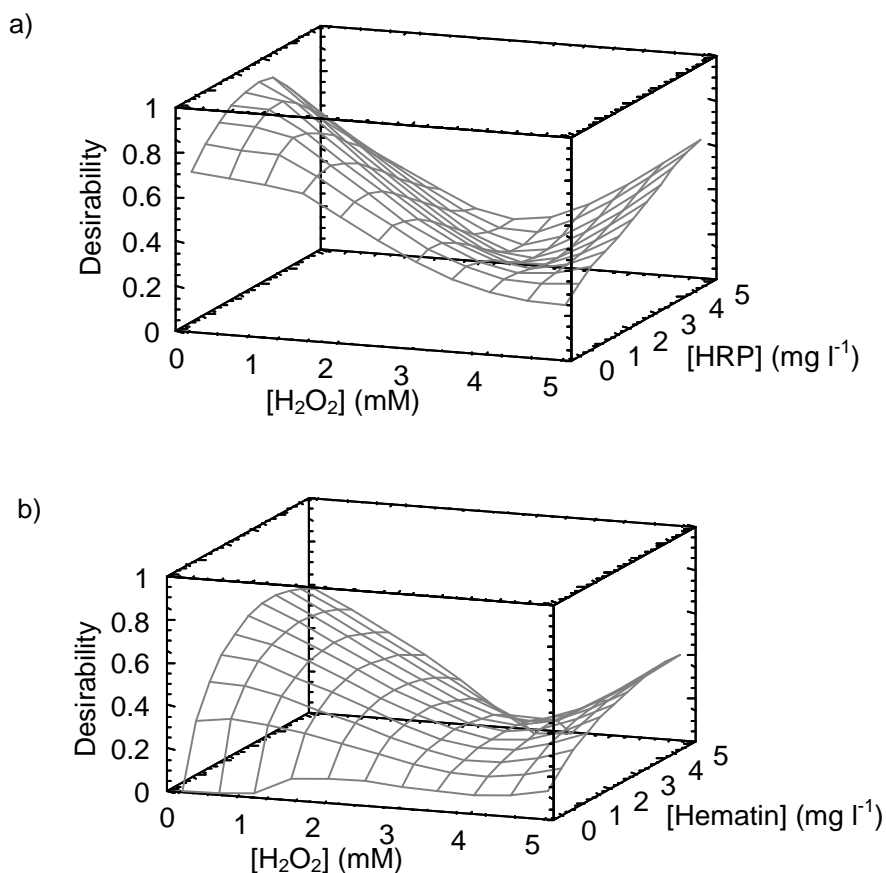


Figura 5.9. Superficies de respuesta estimadas para la función Deseabilidad. **a)** HRP como catalizador, T:40°C, pH:9. **b)** Hematin como catalizador, T:40°C, pH:9.

5.3.4. Demanda Química de Oxígeno de soluciones tratadas

Los valores obtenidos de DQO en las soluciones de NaII decrecen aproximadamente un 30% luego de 1 h de tratamiento con ambos catalizadores. Sin embargo, a mayores tiempos de tratamiento los valores de DQO se incrementan a valores mayores a los obtenidos para las soluciones no tratadas de NaII (ver Tabla 5.3). Inicialmente los valores de DQO decrecen, lo cual se corresponde con la naturaleza oxidativa de la decoloración. El aumento posterior puede, por otro lado, estar asociado a la formación de estructuras orgánicas de menor tamaño producto de la oxidación de NaII que sean degradados más eficientemente. Los productos formados a partir de reacciones radicalarias no controladas, luego de la decoloración son más susceptibles a la oxidación de los agentes oxidantes empleados durante el ensayo de DQO (K₂Cr₂O₇) en comparación con el sustrato de partida, Naranja

II. Ulson de Souza y colaboradores obtuvieron resultados similares luego de aplicar un tratamiento biológico con ozonización a soluciones del colorante azoico Negro Remazol B (S. M. D. A. G. U. de Souza, Bonilla, & de Souza, 2010). Por otro lado, el tratamiento microbiano de los efluentes también produjo un aumento de la DQO cuando colorantes azoicos recalcitrantes se hallaron presentes (Fang, Wenrong, & Yuezhong, 2004). En las decoloraciones estudiadas, ni HRP ni hematin fueron capaces de degradar NaII hasta su mineralización en las condiciones de reacción testeadas, permaneciendo en solución productos de degradación de bajo peso molecular. A pesar de que los rendimientos catalíticos fueron elevados a relativamente bajas relaciones molares $H_2O_2:NaII$, la cantidad de oxidante empleado en las reacciones parece no ser suficiente para mineralizar completamente los intermediarios de reacción. Por otro lado, la técnica DQO parece no ser apropiada como medida del grado de oxidación alcanzado debido al carácter recalcitrante de NaII hacia los reactivos del ensayo.

Tabla 5.3. Valores medidos de DQO en el medio de reacción a 0, 1, 4 y 24 h de tratamiento.

	0 h	1 h	4 h	24 h
	DQO	DQO	DQO	DQO
	(mg O ₂ l ⁻¹)	(mg O ₂ l ⁻¹)	(mg O ₂ l ⁻¹)	(mg O ₂ l ⁻¹)
HRP	22.81	14.12	38.37	47.93
Hematin	20.75	14.78	34.83	44.24

5.3.5. Análisis de productos de reacción

Los radicales de NaII formados por abstracción de hidrógeno en las reacciones 1.2 y 1.3 del mecanismo de HRP (Capítulo 1), pueden observarse en la Figura 5.10. Los posibles productos de acoplamiento de estos radicales presentan importantes impedimentos electrostáticos y estéricos producidos por el grupo sulfónico. Esto, sumado a los valores alcalinos de pH presentes en el medio de reacción que favorecen la repulsión electrostática de las especies; obstaculiza la formación de productos poliméricos de NaII.

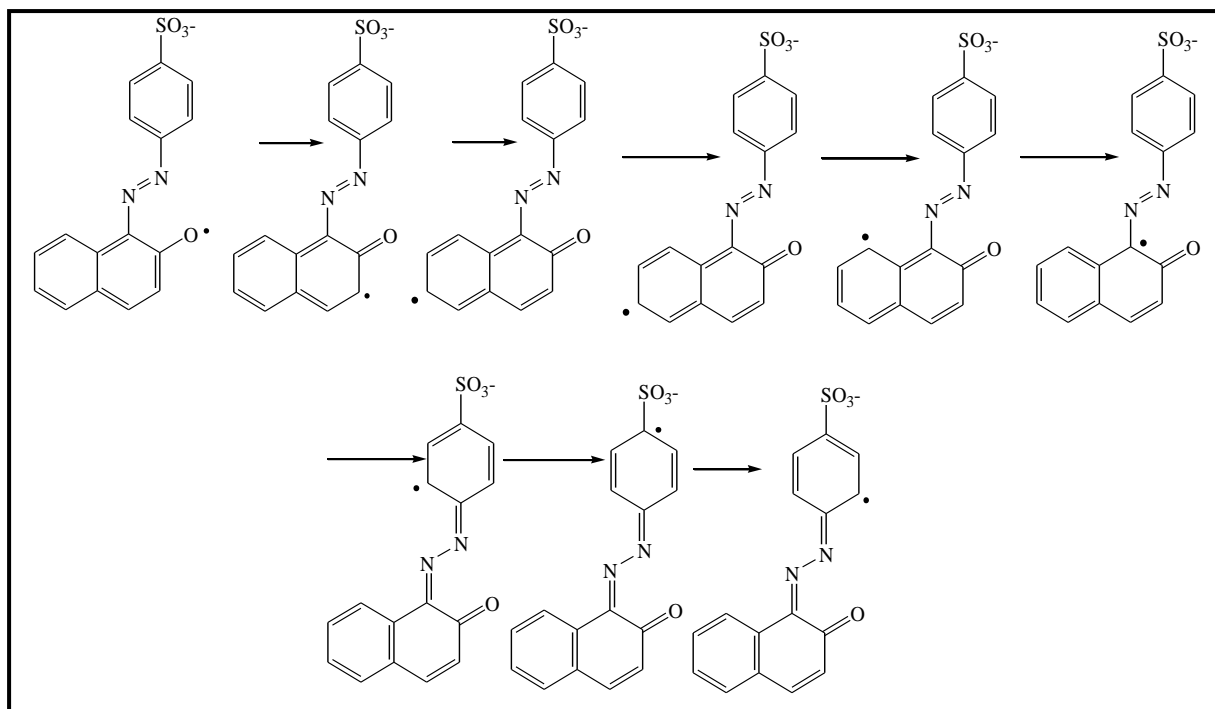
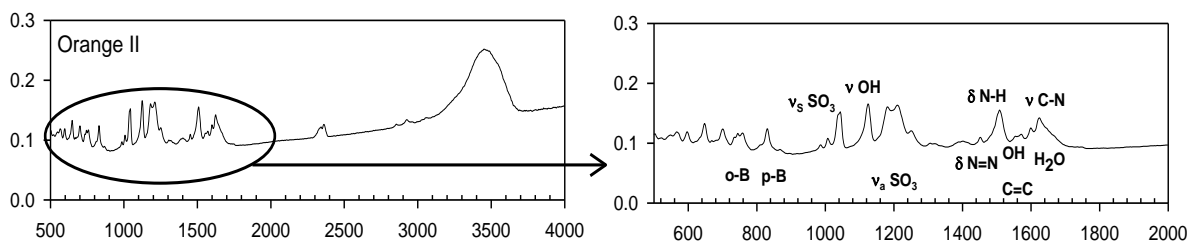


Figura 5.10. Radicales libres formados por abstracción de hidrógeno a partir de Naranja II.

Análisis por espectroscopia infrarroja

La Figura 5.11 muestra el espectro completo FTIR obtenido para Naranja II y para los productos luego de 1 h de reacción con hematin o HRP como catalizadores y H_2O_2 como oxidante. La zona comprendida entre 500 y 2000 cm^{-1} se muestra en detalle.

En el espectro de NaII se observan bandas entre 1600 – 1450 cm^{-1} (estiramiento del enlace $\text{C}=\text{C}$ aromático), 1624 cm^{-1} (estiramiento de $\text{C}-\text{N}$), 1508 cm^{-1} (giro del enlace $\text{N}-\text{H}$), 1452 cm^{-1} (estiramiento de $\text{N}-\text{N}$), 1000 – 1250 cm^{-1} (estiramiento de $\text{S}-\text{O}$ y giro del enlace aromático $=\text{C}-\text{H}$), las cuales son bandas de absorción características de Naranja II en la región infrarroja (Li et al., 2006).



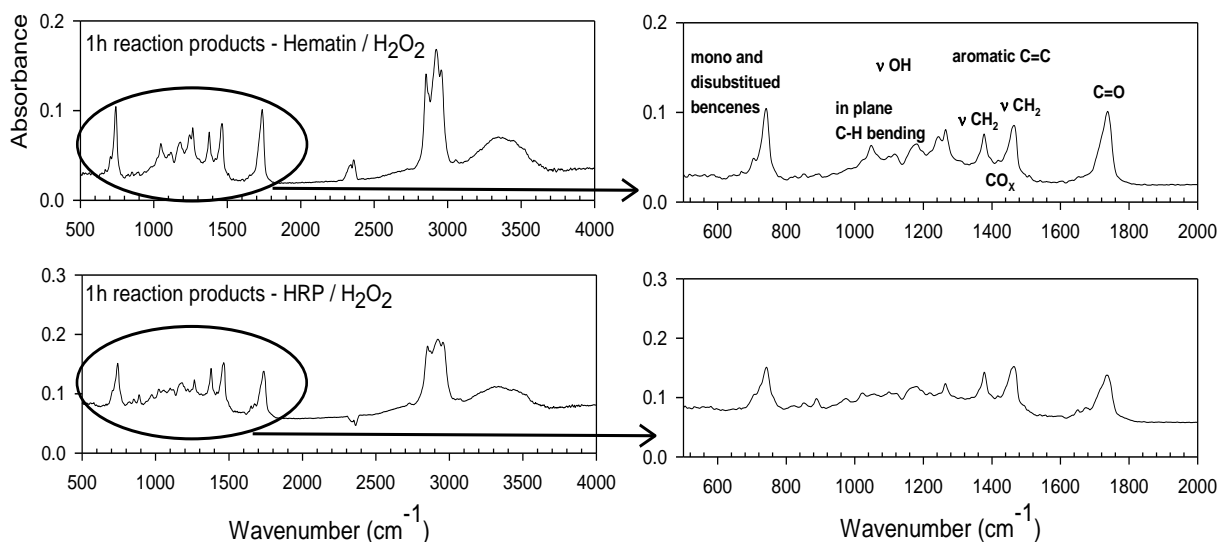


Figura 5.11. Espectro FTIR de Naranja II y sus productos de oxidación luego de 1 h de reacción.

El espectro de NaII también presenta bandas cercanas a 750 cm^{-1} correspondientes al orto-benceno disustituido y a 817 cm^{-1} correspondientes al benceno sustituido en la posición para. La banda ancha observada a 3500 cm^{-1} se asigna a los grupos hidroxilos. Los picos a 1043 y 1209 cm^{-1} son asignables al estiramiento de benceno- SO_3^- y los picos a 1561 y 1124 cm^{-1} son asignables al estiramiento de C-OH y a la deformación del hidroxibenceno (Conley, 1979; Pasto & Johnson, 1981).

Luego de una hora de reacción con ambos catalizadores, la intensidad de las bandas a 1514 cm^{-1} , atribuida a los enlaces N=N , y las bandas de hidrazona o N-H y C-N ha disminuido casi en su totalidad. La ausencia estos picos característicos en los productos observados indica la ruptura de la molécula de NaII por partición del enlace azoico. La misma puede ser simétrica o asimétrica, según se observó por diferentes autores que estudiaron en detalle el mecanismo de degradación de este colorante (A. Zhang et al., 2013; J. Zhang et al., 2012). Los productos de estas rupturas del enlace azoico de NaII se presentan en la Figura 5.12.

Los espectros de los productos de reacción de HRP y hematin son comparables, lo que indica cierta similitud en los mecanismos de catalíticos de oxidación de ambos catalizadores a la vez que se encuentra en concordancia con los resultados DQO. De todas maneras, con HRP se observan algunas diferencias que pueden asociarse a las mayores conversiones de Naranja II. Existen bandas presentes en el espectro de los productos de reacción de HRP que no se encuentran en el espectro correspondiente a los productos obtenidos con hematin.

Hay nuevas bandas cercanas a 900 cm^{-1} y 1028 cm^{-1} . Las bandas a $1120\text{--}1180$, $1240\text{--}1260$ y 1460 cm^{-1} son similares a las publicadas por Li y colaboradores a 1154 , 1270 y 1457 cm^{-1} a pH alcalino asignables al estiramiento de enlaces C=C aromáticos (Li et al., 2006).

No se detectó evidencia de agua residual, especialmente debido a la ausencia de bandas en la región comprendida entre $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, característica de los enlaces HOH. Debido a la carencia de la compensación adecuada para CO_2 del equipo de medición empleado, no es posible asignar las bandas comprendidas entre $2300\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ a enlaces o grupos característicos. Por otra parte, se encontraron nuevas bandas en los productos obtenidos con hematin y HRP a $1700\text{--}1750$, 1460 , 1380 , 1260 y 1240 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} (sólo en el caso de HRP), $1200\text{--}1160$, 1120 , 1040 cm^{-1} (muy clara en el caso de los productos de reacción de hematin), 850 y 750 cm^{-1} . La zona comprendida entre $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ no presentó bandas de absorción.

En la zona entre $2850\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ se observaron nuevas bandas (vibraciones de estiramiento) que junto a las bandas a $1377\text{--}1464\text{ cm}^{-1}$ (vibraciones de flexión) son asignables a grupos metil-metileno. Además, se espera que el metileno se presente aislado o en secuencia de 2, 3 o 4, observando las bandas a $760\text{--}720\text{ cm}^{-1}$ características de las deformaciones de balanceo de los grupos metilenos (Conley, 1979). Hay evidencia de CH_2 debido a la presencia de bandas a $2900\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ y las bandas a $1450\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$. Los grupos terciarios no pueden ser descartados debido a la banda ancha en la zona de $1360\text{--}1410\text{ cm}^{-1}$. Las bandas características pueden ser enmascaradas por la fuerza de la banda de estiramiento de metileno.

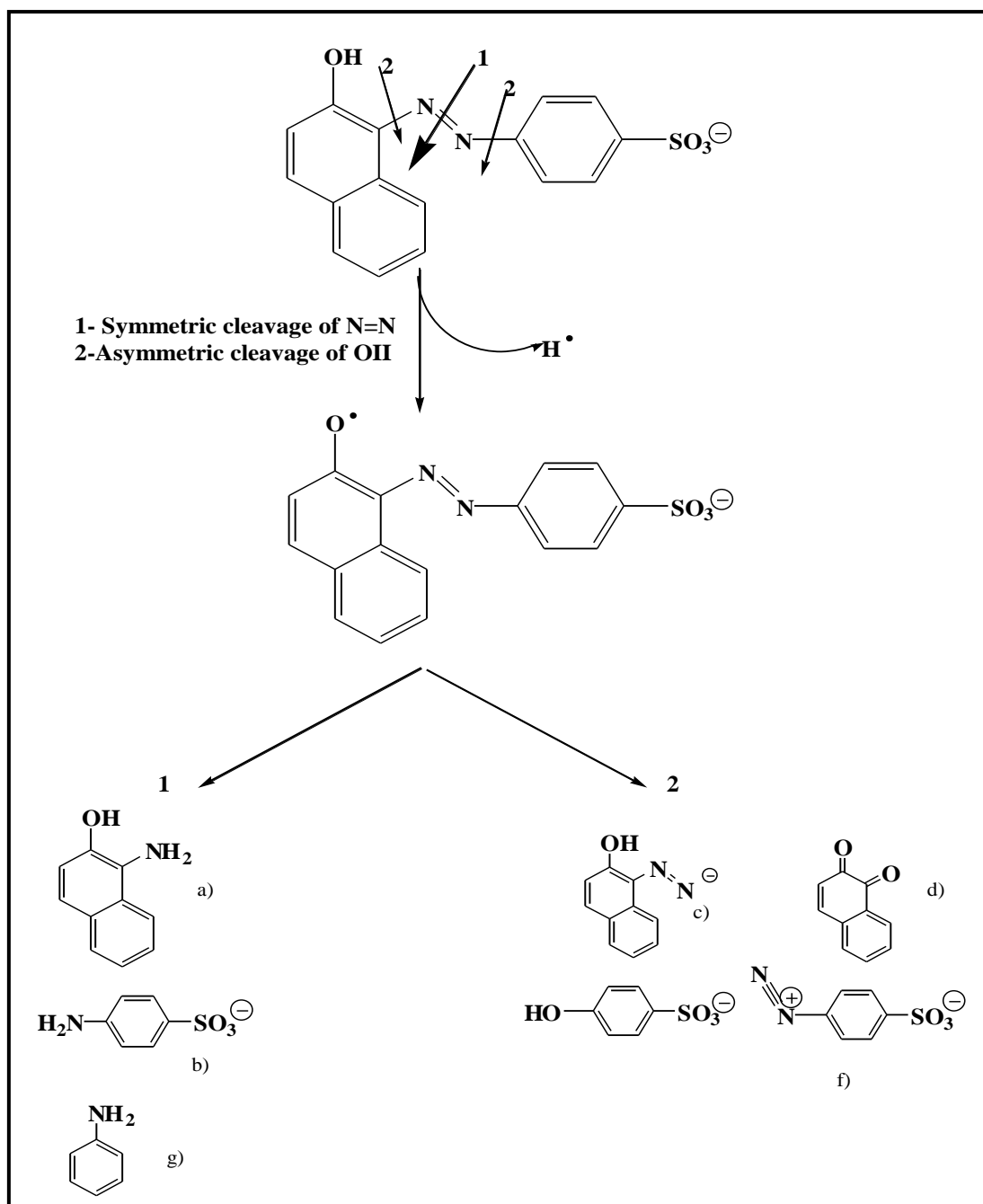


Figura 5.12. Mecanismo de ruptura del enlace azoico y posibles productos de reacción asociados a la ruptura simétrica o asimétrica. a) 1-amino 2- naftol ; b) 4-amino bencen-sulfonato; c) 1-diazo 2-naftol; d) 1,2-naftoquinona; e) 4-hidroxi bencen-sulfonato; f) 4-diazo bencen-sulfonato; g) Anilina.

La presencia de grupos C=O en los productos se confirma por la intensidad y amplitudes de las bandas entre 1700 y 1750 cm^{-1} asignables a estiramiento de C=O de quinonas, aldehídos alifáticos, cetonas alifáticas, y ácidos carboxílicos (Stuart, 2004). Además,

también se encuentran presentes C–O y O–H, representados por la adsorción en las zonas comprendidas entre 1000–1250 cm^{-1} y 3300–3500 cm^{-1} , respectivamente. Por lo tanto, ácidos carboxílicos, alcoholes, aldehídos y cetonas son productos de reacción probables. La banda próxima a 1420 cm^{-1} indica la presencia de grupos carboxílicos en la estructura del producto, como puede ser el ácido acético. La ausencia de bandas entre 1500–1600 cm^{-1} indica que no hay iones carboxilatos libres (Galindo, Jacques, & Kalt, 2000). Si se observan, no obstante, bandas asignables al grupo éter C–O–C (1020–1200 cm^{-1}). Con HRP, el espectro presenta bandas de baja intensidad a 1650 y 1680 cm^{-1} . Estas longitudes de onda asignables a la conjugación de enlaces C=O y C=C pueden atribuirse a la presencia de estructuras conjugadas de grupos carbonilos (de ácidos carboxílicos, cetonas, ésteres o aldehídos conjugados) y anillos aromáticos en los productos obtenidos con HRP (Gavril & Hodson, 2007). Por otro lado, esta banda puede ser asignada a los grupos no aromáticos HC=CH, que sumados a la presencia de grupos carboxílicos están indicando la apertura de los anillos de los intermediarios naftoquinona/p–hidroxifenol resultando en la formación de ácidos carboxílicos.

La debilidad de la absorbancia entre 1650–1430 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de esqueletos aromáticos (representando estiramientos de C=C), indica la presencia de mucha menor proporción de estructuras aromáticas en los productos de reacción frente a las estructuras alifáticas hidrocarbonadas. Los productos de la degradación de Naranja II son principalmente bencenos mono y orto–disustituídos. La presencia de nuevos picos a 850 y 890 cm^{-1} , y 700–760 cm^{-1} pueden estar asociados a la vibración de flexión fuera del plano de C–H de los bencenos sustituidos. Las bandas de p–benceno presentan menor intensidad. Además, hay evidencia de bencenos con sustitución múltiple (banda a 850 cm^{-1}).

El decrecimiento del grupo sulfónico es relativamente importante, quizás por la pérdida como sulfato. Por otro lado, no hay evidencia de aminas primarias (enlace N–H), no obstante la banda a 1265 cm^{-1} puede asociarse a C–N aromático. Es importante aclarar que los productos que contienen grupos sulfónicos o aminas primarias pueden haber sido extraídos débilmente en la fase Cl_2CH_2 debido a la presencia de especies cargadas en el medio de reacción acidificado (pH 3). No se observa un pico a 1350 cm^{-1} , por lo tanto no hay nitratos remanentes en los productos de reacción (Galindo et al., 2000). Adicionalmente, no hay pico a 1528 cm^{-1} por lo que puede concluirse que tampoco se encuentra nitrobenzeno entre los productos analizados.

La Figura 5.12 muestra el mecanismo propuesto acorde a los resultados obtenidos durante el estudio FTIR de los productos obtenidos luego de 1 h de reacción, consistentes con la ruptura asimétrica del enlace azoico. El mismo involucra apertura de anillos de

intermediarios aromáticos con formación de ácidos carboxílicos alifáticos como productos finales. Estos resultados son válidos para la primera hora de reacción en condiciones alcalinas, lo que favorece la adición de grupos hidroxilos a los radicales reactivos aromáticos o alifáticos.

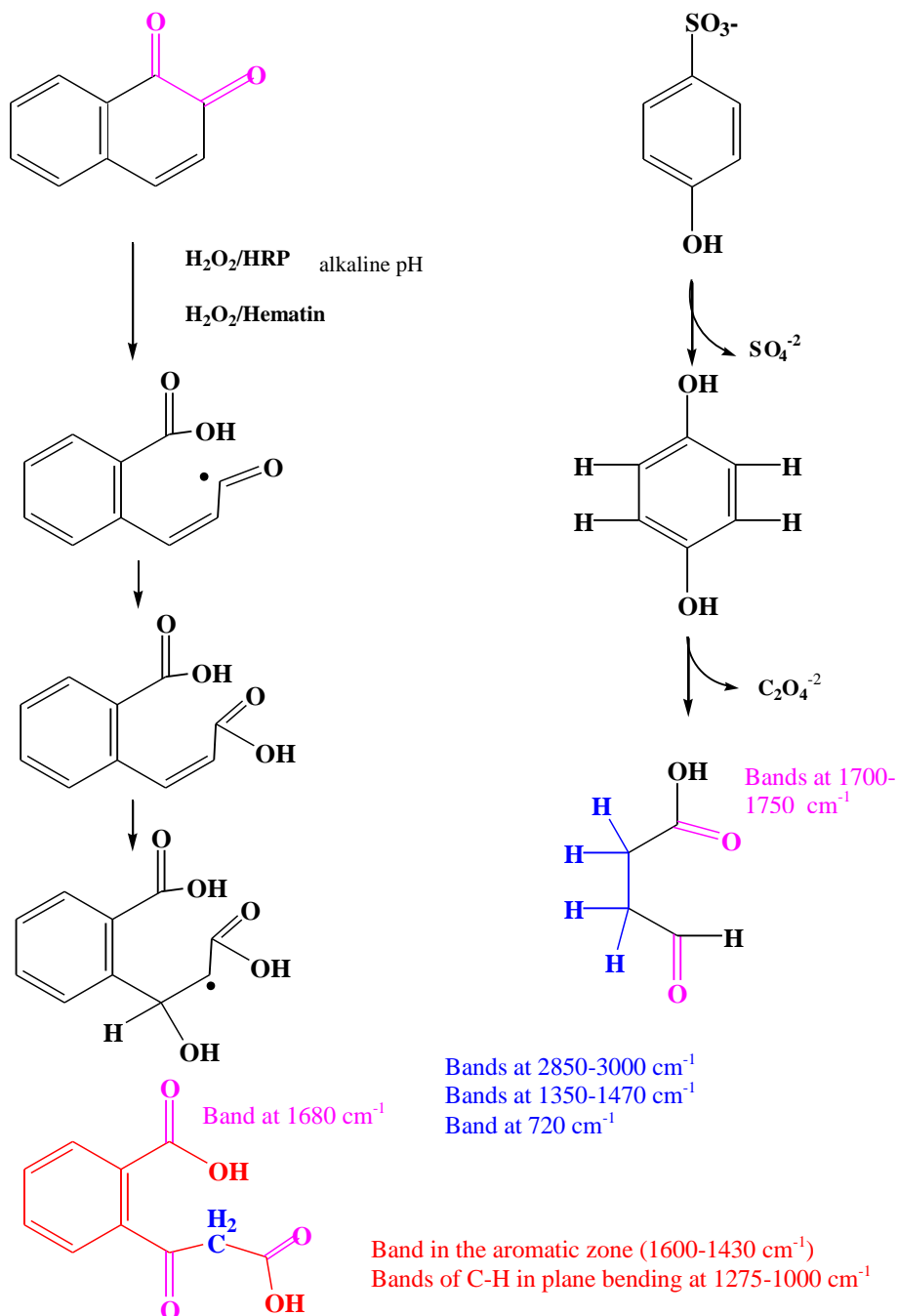


Figura 5.12. Mecanismo propuesto de formación de ácido carboxílico.

J. Xin Chen y L. Zhu publicaron una propuesta de mecanismo degradativo de Naranja II donde demuestran la clara necesidad de varios intermediarios claves para explicar los resultados obtenidos en LC/MS y FTIR (J. X. Chen & Zhu, 2010b). 1,2 naftoquinona fue oxidada por la apertura de uno de los anillos bencénicos para dar lugar a la formación de ácidos y aldehídos aromáticos y alifáticos. No obstante, las bandas a $2720\text{--}2815\text{ cm}^{-1}$ asociadas a aldehídos no están presentes en los espectros FTIR de los productos. Los grupos para-amino benceno o benceno azo-sulfónico pueden ser oxidados por acción de radicales a para-hidroxi fenol y ácidos alifáticos, que incluyen ácido oxálico. Los autores de ese manuscrito dan información de al menos 10 compuestos diferentes que detectaron con el empleo de LC- Ms, muchos de ellos hidrocarburos C4, C5 y C6 oxidados, de fórmula general $C_xH_yO_z$, tales como $C_6H_6O_4$, $C_5H_6O_3$ y $C_4H_6O_3$. El ácido oxálico es considerado el producto final obtenido durante la degradación de Naranja II en solución acidificada, debido a la carencia de reactividad al ataque de radicales $OH\cdot$.

Análisis por espectroscopía UV/visible

Los resultados de los estudios UV/Visible de los productos de reacción luego de 1 y 24 h de tratamiento que se muestran en la Figura 5.13 permiten obtener más información respecto del mecanismo de oxidación de los catalizadores. Los cambios espectrales luego de los tratamientos fueron casi invariantes con las condiciones de reacción. Se observó un corrimiento hipsocrómico del espectro en general. La pérdida total de fuerza de oscilación en espectros UV/visible después de 1 h de reacción es consistente con los espectros FTIR de los productos, los cuales revelan que las estructuras oxidadas alifáticas saturadas están presentes en mayor medida que las estructuras aromáticas. El decrecimiento de la banda a 484 nm indica la ruptura del enlace azoico y la consecuente decoloración, lo cual concuerda con lo observado en los espectros FTIR. A medida que aumenta el tiempo de reacción se produce un corrimiento del pico a 228 nm a 247 nm. Este cambio se asocia a la ruptura del enlace azoico de Naranja II con la consecuente formación de aminas aromáticas. Lo primero que provoca la degradación de NaII es la ruptura del enlace $N=N$. Luego, con el avance de la reacción, se generan aminas aromáticas sustituidas y se observaron corrimientos de las longitudes de onda características. Kim y colaboradores demostraron la formación de ácido sulfanílico, mediante la formación de un pico a 247 nm asociado a sulfanílico (Kim, Lee, Cho, Shim, & Moon, 2005). Es interesante notar que el pico a 247 nm se observa claramente en los espectros de los productos obtenidos con ambos catalizadores. Otro posible co-producto es 1-amino-2-naftol (Hou et al., 2007). La formación de nuevos picos a 260 nm sugiere la destrucción reductiva de las estructuras

conjugadas azoicas, la cual se revela por la presencia en los espectros de múltiples picos estrechos correspondiente a los anillos aromáticos (W. Feng, Nansheng, & Helin, 2000). Por otro lado, López y colaboradores detectaron 1,2-naftoquinona, 2-naftol, 4-hidroxibenzensulfonato, sulfanilato and benzensulfonato como los principales productos de degradación de NaII catalizada por peroxidasa de manganeso (López, Moreira, et al., 2004).

Existen importantes diferencias entre los espectros UV-Visible de los productos de hematin y HRP, especialmente en la zona de 350 nm luego de 1 h de reacción y en la zona comprendida entre 400 y 500 nm luego de 24 h de reacción. En los espectros de productos de reacción catalizada por hematin prácticamente no se observaron diferencias entre 1 y 24 h. En el caso de HRP se producen corrimientos batocrómicos de la banda que se encuentra a 360 nm (luego de 1 h de reacción) hacia 460 nm (luego de 24 h de reacción), y de la zona comprendida entre 200-300 nm. Esto puede asociarse a la formación de productos de oligomerización/condensación entre 1 y 24 h de reacción. Este resultado está en línea con los resultados obtenidos en la degradación de Azul Negro de Eriocromo R en los cuales se observó un corrimiento batocrómico del espectro a tiempos avanzados de reacción (Pirillo, Einschlag, et al., 2010b). Sin embargo, los resultados de FTIR y UV-Visible a 1 h de reacción demuestran la degradación de las estructuras de colorante por ruptura del enlace azoico.

Es posible entonces proponer un mecanismo de escisión rápida del enlace azoico con la consecuente generación de intermediarios aromáticos. Los cuales, una vez formados, se encuentran en una concentración suficiente para ser oxidados por HRP o hematin. Por lo tanto, puede existir un primer paso de degradación con ruptura del enlace azoico con la consecuente generación de quinonas (confirmadas por las bandas a $1750-1650\text{ cm}^{-1}$) junto a otros compuestos, tales como ácido sulfanílico (confirmados por el corrimiento en la región UV-Visible). Las especies remanentes pueden reaccionar lentamente con fenoles estables aumentando la conjugación/condensación y produciendo un efecto batocrómico hacia 450 nm luego de 24 h de reacción con HRP. De todas maneras, la ausencia de bandas asociadas al grupo azoico en los espectros FTIR, indica que los productos no presentan en sus estructuras enlaces $\text{N}=\text{N}$. La estructura probable de los oligómeros es la resultante de la condensación a través de los grupos $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. La Figura 5.14 muestra una reacción de condensación potencial. La decoloración de NaII se produce debido a la ruptura electrofílica del enlace del cromóforo $-\text{N}=\text{N}-$ (J. X. Chen & Zhu, 2010a).

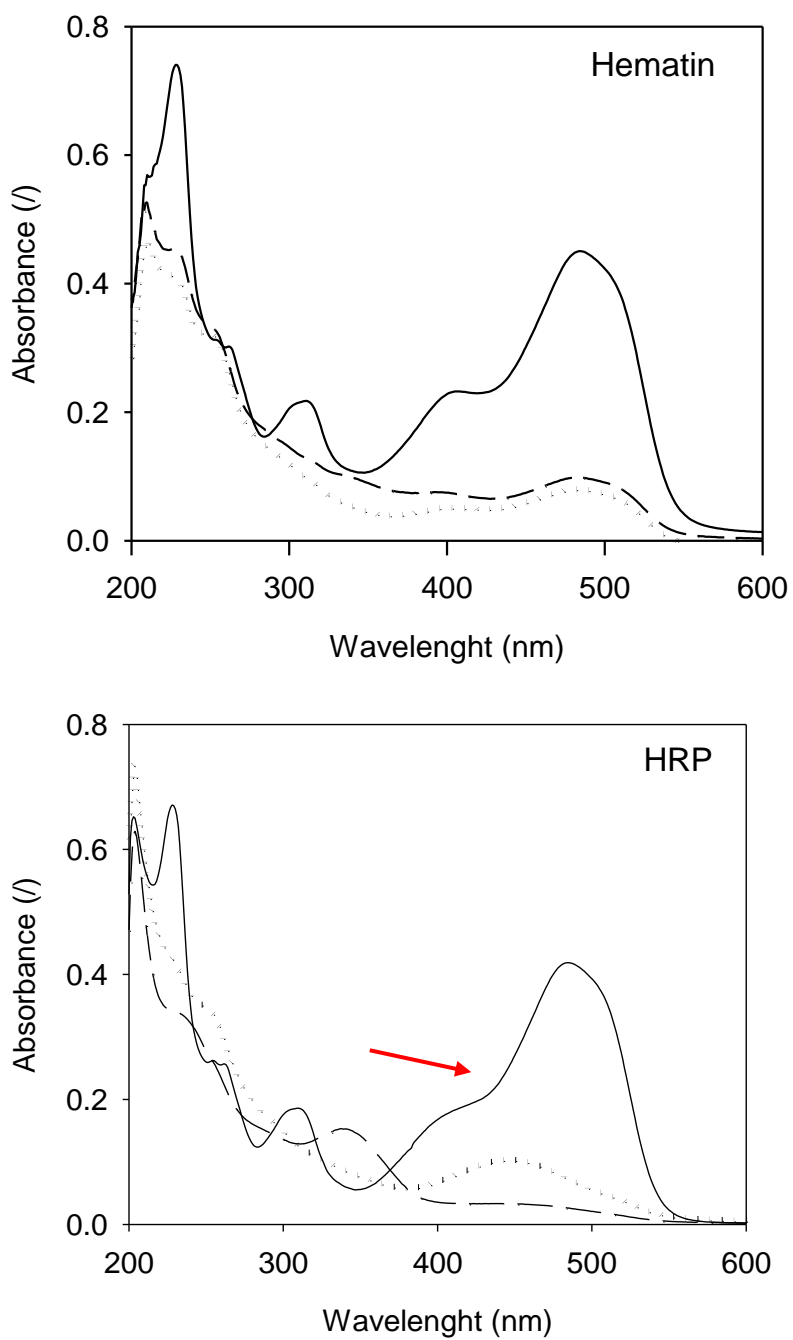


Figura 5.13. Espectro UV/Visible a tiempo inicial (línea continua), a 1 h de reacción (línea cortada) y a 24 h de reacción (línea de puntos) en las condiciones optimas detalladas en la Tabla 3.3.

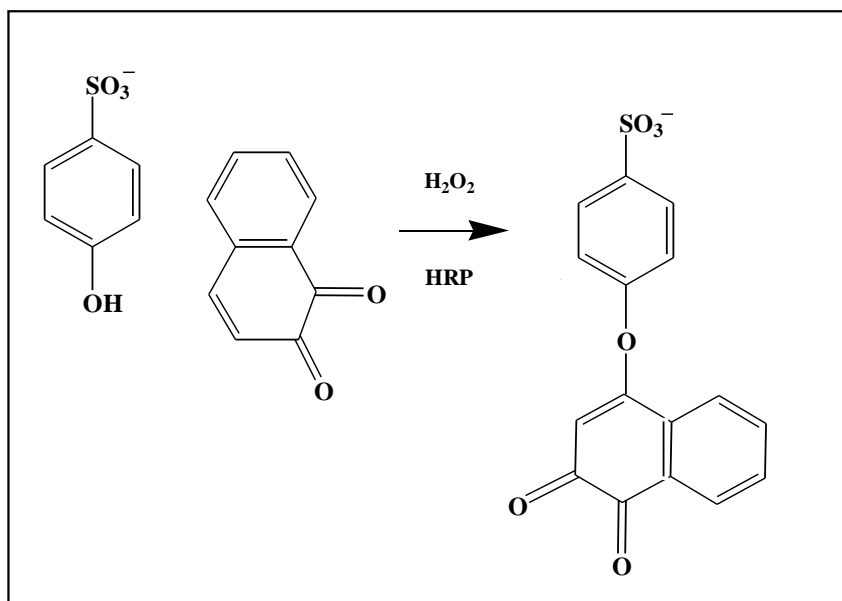


Figura 5.14. Posible producto de condensación obtenido con HRP luego de 24 h de reacción.

En conclusión, la evidencia de la presencia de sulfanilato en los espectros UV-Visible se relaciona a una ruptura simétrica, mientras que la presencia de 1,2-naftoquinona al igual que 4-hidroxy-bencensulfonato muestra una alternativa de ruptura asimétrica. Del análisis FTIR, se obtuvo evidencia de la presencia de grupos sulfonatos en los productos de reacción, así como también de la descomposición parcial a ácidos carboxílicos y compuestos bencénicos sustituidos con estructuras oxidadas en las cadenas hidrocarbonadas saturadas.

5.4. Conclusiones

La metodología de superficie de respuesta permitió evaluar con efectividad las diferentes condiciones de reacción sobre la performance de hematin y HRP en la decoloración de Naranja II. En contraste con los sistemas catalíticos Fenton, los valores de óptima actividad catalítica de HRP y hematin se identificaron en condiciones alcalinas de pH, características de los efluentes textiles. Se alcanzaron conversiones mayores al 92%, de soluciones de 75 mg/l de Naranja II con ambos catalizadores luego de 1 h de tratamiento. Por otro lado, fue posible obtener altas conversiones y rendimientos catalíticos a relaciones molares

H₂O₂:Naranja II relativamente bajas, 2.5 para HRP y 5 para hematin. Las respuestas medidas para hematin resultaron ser menos sensibles a la concentración de oxidante.

En base másica, HRP fue 2 veces más eficiente que hematin, no obstante el precio regular de HRP es alrededor de 20 veces mayor que el del biomimético. Por lo tanto, hematin demostró ser una alternativa efectiva a la enzima en la degradación de este colorante en particular, considerando los costos de los catalizadores.

El diseño experimental Doehlert demostró ser robusto a los fines de obtener un análisis sistemático y consistente con un número limitado de experimentos, y la inclusión del rendimiento catalítico como una respuesta, permitió expandir la aplicación potencial y mejorar el análisis de los datos en forma comparativa.

El análisis de los espectros UV-Visible y FTIR permitió confirmar la ruptura del enlace azoico con el avance de la reacción. Además, ambos espectros señalaron la presencia de una mezcla de productos que contiene principalmente estructuras oxigenadas y alifáticas hidrocarbonadas. En base a los resultados que se presentan en este capítulo, podemos inferir que los intermediarios fenólicos pueden ser degradados con apertura de anillos aromáticos produciendo ácidos carboxílicos y/o condensarse para dar lugar a la formación de oligómeros en el caso de HRP, a largos tiempos de reacción.

5.5. Resultados publicados

Los resultados que se presentan en este capítulo fueron publicados en:

- XVII Congreso Argentino de Catálisis y VI Congreso de Catálisis del MERCOSUR que se realizó en Salta en el año 2011, bajo el título: “Optimización de la eliminación del colorante monoazoico Naranja II catalizada por hematin y peroxidasa de rábano picante (HRP) mediante el análisis de superficie de respuesta.” Autores: Agustina Córdoba, Ivana Magario, María Lujan Ferreira.
- International Biodeterioration and Biodegradation. “Evaluation of hematin-catalyzed Orange II degradation as a potential alternative to horseradish peroxidase.” Autores: Agustina Córdoba, Ivana Magario, María Luján Ferreira. 73 (2012), pag: 60-72.

PARTE II

INMOVILIZACIÓN DE CATALIZADORES

CAPÍTULO 6

INMOVILIZACIÓN DE HEMATIN COMO BIOMIMÉTICO DE PEROXIDASA

- *Se logra un catalizador heterogéneo **activo y eficaz** mediante la inmovilización de hematin sobre quitosano modificado.*
- *Se demuestra la capacidad de este catalizador para decolorar soluciones de Rojo de Alizarina S durante seis **usos consecutivos**.*
- *Se determina la naturaleza **covalente** de la interacción entre quitosano modificado y hematin, sin modificaciones del sitio catalítico.*
- *Se analizan las diferencias de actividad que presenta hematin en las decoloraciones de soluciones de Naranja II y Rojo de Alizarina S.*
- *Se logra aumentar la **rugosidad de las bolillas de vidrio** mediante el tratamiento de decapado ácido, no obstante el aumento del área superficial no fue considerable.*

6.1. Introducción

La inmovilización de enzimas es necesaria para lograr catalizadores eficaces con aplicación a gran escala ya que su elevado costo imposibilita su empleo en sistemas homogéneos. Sin embargo, los problemas que presentan las enzimas inmovilizadas en términos de estabilidad y de inhibición no son menores. Por otra parte, la capacidad de reutilización de un biomimético por medio de su inmovilización permite compensar su reducida actividad frente a los catalizadores enzimáticos. En este sentido, hemin y hematin son metaloporfirinas altamente atractivas, incluso cuando el uso de hematin se ve obstaculizado debido a su baja solubilidad en medios ácidos, siendo la heterogeneización una solución a este problema.

En la literatura reciente es posible encontrar estudios de eliminación de colorantes antraquinónicos y azóicos catalizados por enzimas inmovilizadas en diversos soportes. La inmovilización de peroxidasa de *Aspergillus oryzae* en espumas de sílica permitió obtener conversiones del 83% de soluciones del colorante antraquinónico Remazol Brilliant Blue R a pH 5 (Shakeri & Shoda, 2010). Celebi y colaboradores lograron catalizadores heterogéneos de HRP inmovilizada en soportes sulfonados que demostraron ser activos en la decoloración de Acid Black 1 y Reactive Blue 19. El grado de eliminación de los colorantes reportado fue del 70%, manteniéndose el nivel de decoloración luego de tres reusos (Celebi Arif Kaya, M., Altikatoglu, M., Yildirim, H., 2013). Por otro lado, la inmovilización de HRP en partículas de titanio mejoró la estabilidad de la enzima a las variaciones de pH del medio de reacción. Mientras que el pH óptimo fue 5 para la HRP soluble, este valor ascendió a 7 para la enzima inmovilizada. Después de 5 usos consecutivos, la actividad en la eliminación de colorantes azoicos se redujo cerca del 50%, respecto a los valores obtenidos en el primer uso. Esta declinación en la eficiencia de decoloración fue atribuida a las limitaciones de transferencia de masa provocada por la adsorción de productos de oligomerización sobre los soportes estudiados (Jiang, Tang, Gao, Zhou, & He, 2014). Existen también reportes de aumentos de la estabilidad térmica de HRP producto de su inmovilización en diferentes soportes (Takahashi et al., 2000). La pérdida de actividad respecto a las enzimas solubles se encuentra presente en todos los casos.

La inmovilización de catalizadores biomiméticos es también objeto de estudio en la actualidad. Yao et al. (Yao et al., 2014) presentaron un nuevo sistema biomimético heterogéneo basado en hemin soportado en fibra de carbono. Los resultados de oxidación de un colorante azoico modelo (RR195) demostraron que el catalizador obtenido presentó

estabilidad en una región de pH comprendida entre 1.16 y 9.25, mientras que hemin libre solo fue activo a valores muy ácidos de pH (Yao et al., 2014).

Nuestro grupo de investigación ha estudiado la inmovilización de HRP y hematin sobre magnetita (Saidman et al., 2006). A pesar de lograrse la inmovilización de ambos catalizadores no fue posible analizar la actividad de los mismos debido al alto grado de adsorción de los colorantes sustratos sobre la magnetita en las condiciones neutras de reacción analizadas (Pirillo et al., 2012). Estos resultados previos constituyen la base de los objetivos propuestos para la obtención de catalizadores heterogéneos eficaces, y la consecuente optimización de los procesos de inmovilización.

Los soportes seleccionados

La quitina es el polímero natural de mayor abundancia, después de la celulosa. Presenta una estructura similar a esta, exceptuando la presencia de un grupo acetamida, en lugar de $-OH$ en el C(2) de glucosa (Figura 6.1) (A.F.Roberts, 1992). La quitina ocupa en la naturaleza un rol estructural muy importante, forma parte del exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insectos, así como de las paredes celulares de ciertos hongos y bacterias; y se estima que posee una tasa de reposición en la biósfera que duplica el valor de la correspondiente a la celulosa (Hernández Cocoltzi Aguila Almanza, E., Flores Agustin O., Viveros Nava, E.L., Ramos Cassellis, E., 2009). El principal derivado de la quitina es el quitosano, el cual es un polisacárido lineal producido artificialmente por la desacetilación alcalina de la quitina (ver Figura 6.1). El grado de desacetilación es la principal característica del quitosano, dependiendo del mismo su solubilidad en soluciones acuosas ácidas, su capacidad de adsorción de agua y su resistencia a la biodegradabilidad. Conforme aumenta el grado de desacetilación alcanzado, aumenta la densidad de grupos $-NH_2$ del polímero resultante (A.F.Roberts, 1992). Su uso como soporte enzimático ha sido generalizado en los últimos años debido a su bajo costo, resistencia al desgaste y biodegradabilidad. La inmovilización de HRP en quitosano fué objeto de estudio para su aplicación en biosensores (Gu, Wang, Xia, Wang, & Yu, 2014; Zhan et al., 2013), así como también en la oxidación de compuestos fenólicos (Karim, Adnan, & Husain, 2012; Mohamed, Al-Malki, Kumosani, & El-Shishtawy, 2013; Zhai et al., 2013). Resultados presentados por Karim y colaboradores, demostraron un aumento de la actividad de la enzima inmovilizada mediante entrecruzamiento con un complejo β -ciclodextrina-quitosano (Karim et al., 2012). En trabajos exploratorios llevados a cabo con anterioridad por distintos integrantes de nuestro grupo se observó que quitosano

podría ser un soporte promisorio para HRP y hematin, especialmente para su aplicación en la eliminación de Alizarina (Pirillo et al., 2012). Por otro lado, la capacidad de adsorción de quitosano fue estudiada para diferentes sustratos coloreados mostrando muy buenos resultados (Pirillo, Pedroni, Rueda, & Ferreira, 2009). Esta característica, si bien puede aumentar sus cualidades para ser empleado como soporte de catalizadores en tratamientos de efluentes coloreados, puede a su vez generar problemas de inactivación por bloqueo de los sitios catalíticos debido a la adsorción de reactivos y/o productos oxidados. Considerando este inconveniente es que se evaluó el empleo de (3-Aminopropil)trietoxi silano (APTS) (Figura 6.2) como bloque espaciador entre la matriz polimérica y los catalizadores a soportar.

Dentro de los inconvenientes de aplicación de hojuelas de quitosano como soporte para los catalizadores es importante mencionar su baja resistencia mecánica, así como también las alteraciones en su morfología, lo que impide su aplicación en reactores de flujo continuo.

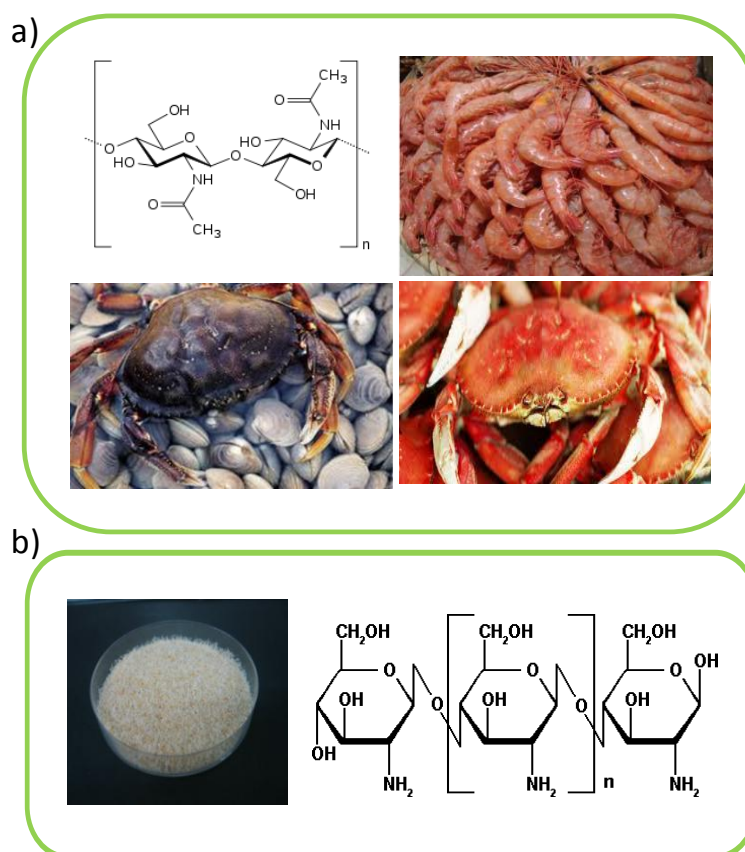


Figura 6.1. a) Estructura de la quitina. b) Estructura del quitosano.

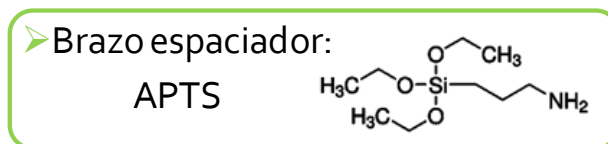
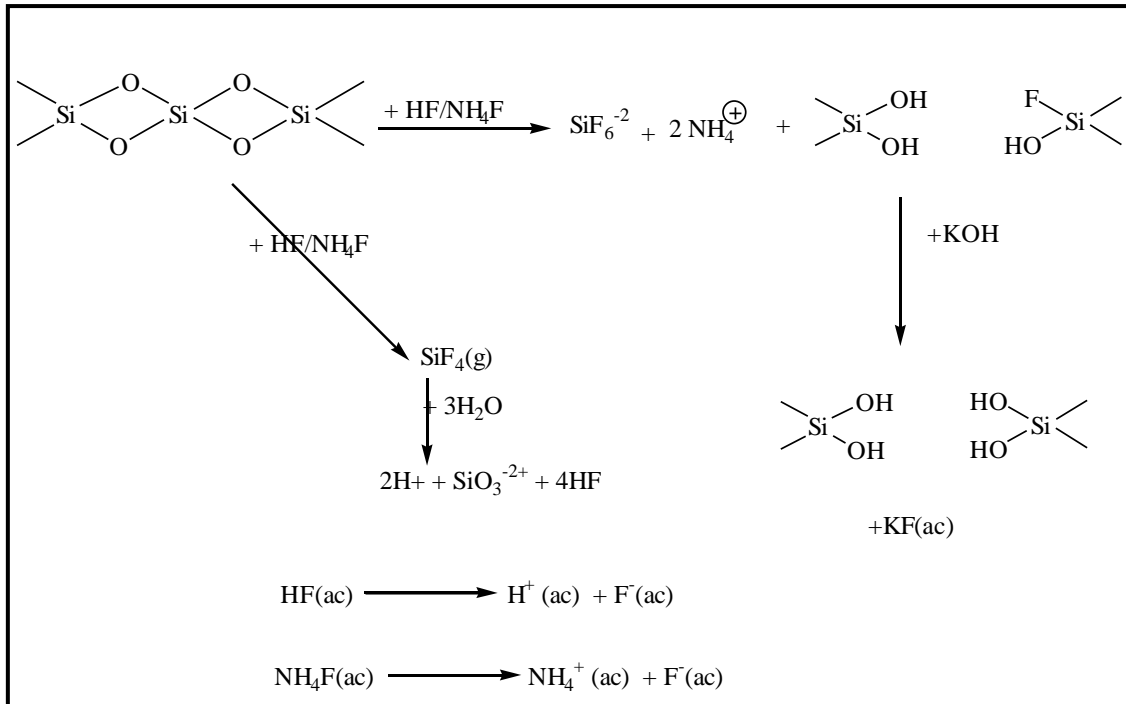


Figura 6.2. Estructura de (3-Aminopropil)trietoxi silano (APTS).

Por otro lado, se incluyen en este capítulo estudios de tratamiento superficial de bolillas de vidrio no porosas a los fines de aumentar su área superficial para ser empleadas como soportes económicos de HRP y hematin. Las reacciones de decapado superficial del vidrio con ácido fluorhídrico fueron descritas por primera vez en el SXVIII (SCHEELE, 1777). El tratamiento con solución concentrada de buffer HF/NH₄F permite suavizar el ataque, dando como resultado mayor homogeneidad en las superficies obtenidas (Etcheverry, 2010). El proceso consiste en el ataque de las moléculas de HF a los enlaces Si-O de las bolillas, lo que permite obtener SiF₄ gaseoso y H₂O. El HF inicia un proceso de intercambio mediante la disociación de un enlace Si-O y la generación de un enlace Si-F (Hoshino, 1999). Finalmente, un tratamiento posterior con KOH produce el intercambio de los iones F por OH, lo que permite obtener superficies decapadas y funcionalizadas. El Esquema 6.1 muestra las reacciones a las que se somete el vidrio durante el tratamiento.

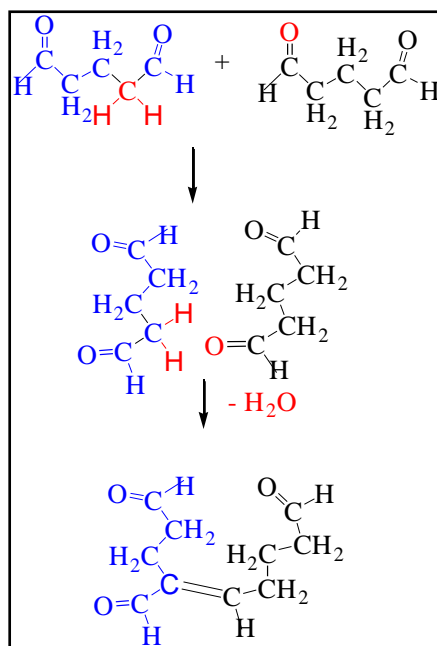
El aumento de rugosidad del vidrio por tratamientos con ácidos o bases fuertes permitió su utilización como soporte de adsorbentes (Bruce & Sen, 2005; Jradi, Daneault, & Chabot, 2011; Xiang Dong Liu, Tokura, Haruki, Nishi, & Sakairi, 2002; Ozmen et al., 2009), soporte de enzimas (Azevedo, Cabral, T.D., & Fonseca, 2004; S. Datta, Christena, & Rajaram, 2012; S. G. Datta et al., 2012; Fu, Hao, Fei, & Ju, 2006; J.L. Gómez et al., 2006; J. Huang et al., 2011; Ikediobi, Stevens, & Latinwo, 1998; Pijanowska & Torbicz, 2008; Szymańska, Bryjak, Mrowiec-Białoń, & Jarzębski, 2007) o en la fabricación de columnas funcionalizadas (Zhou et al., 2010).



Esquema 6.1. Reacciones involucradas durante el tratamiento superficial de vidrio con solución buffer HF/NH₄F, seguido de intercambio con KOH.

Reactivo acoplante

El glutaraldehído (Esquema 6.2) constituye un reactivo bifuncional ampliamente utilizado en inmovilización de enzimas por entrecruzamiento, debido a su capacidad de formar enlaces estables con los grupos amino de las proteínas a valores neutros de pH (Okuda, Urabe, Yamada, & Okada, 1991). El empleo de este compuesto como agente entrecruzante motivó el estudio de su comportamiento en solución, la formación de oligómeros y la naturaleza de los mismos (Hashimoto, Masada, Sumida, Tashima, & Satoh, 1983; Migneault, Dartiguenave, Bertrand, & Waldron, 2004). En soluciones acuosas de glutaraldehído se producen espontáneamente reacciones de condensación aldólica (Esquema 6.2) que dan lugar a la formación de dímeros, trímeros y polímeros (Migneault et al., 2004). Además, según las condiciones de pH del medio, su forma hidratada puede formar un hemiacetal cíclico, sin disponibilidad de grupos aldehídos reactivos. La presencia de estas especies en solución puede influenciar ampliamente en las efectividades alcanzadas durante la inmovilización de enzimas.



Esquema 6.2. Condensación aldólica de glutaraldehído.

Objetivos

Los objetivos propuestos para el presente capítulo son:

- Testeo catalítico preliminar sobre el empleo de quitosano modificado con glutaraldehído como soporte para hematin.
- Optimización del proceso de preparación del inmovilizado para obtener la máxima actividad catalítica sobre la degradación de los colorantes Naranja II y Rojo de Alizarina S
- El análisis de la reacción de acoplamiento de glutaraldehído–hematin mediante estudios FTIR y UV–Visible, con objeto de determinar el enlace soporte–catalizador.
- Aumento de superficie específica de bolillas de vidrio no porosas mediante tratamientos superficiales, para su empleo como soporte de catalizadores.
- Inmovilización de quitosano sobre las bolillas de vidrio pretratadas para aumentar la resistencia mecánica de los catalizadores heterogéneos obtenidos a partir de hojuelas de quitosano.

- Caracterización físico-química de los catalizadores obtenidos mediante FTIR (espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier), SEM (Microscopio electrónico de barrido), o ICP (Plasma de acoplamiento inductivo).
- Evaluación de la actividad catalítica de decoloración en ensayos de reusos de los catalizadores heterogéneos obtenidos.
- Estudio del efecto de (3-Aminopropil)triethoxi silano como bloque espaciador entre hematin-glutaraldehído y quitosano, sobre la actividad del catalizador.

6.2. Técnicas de caracterización y equipamiento

Un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 35 (Massachusetts, EE.UU.) se utilizó para todas las mediciones UV/ Visible. Las determinaciones F-TIR se realizaron con un equipo JASCO 5300 (4 cm⁻¹ de resolución) equipado con un detector detector infrarrojo de sulfato triglicérido deuterado (en inglés: DTGS). Las muestras sólidas se secaron en un horno a 60 °C durante toda la noche. Luego, se mezclaron con KBr a 1% peso/peso y se prensaron para formar un disco delgado. En todas las mediciones se empleó aire como referencia.

Las determinaciones de contenido de hierro total en los catalizadores se realizaron por espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). Para estas mediciones se sometió a las partículas húmedas al ataque ácido (ácido nítrico ultrapurificado) a 200 °C durante 15 minutos utilizando un digestor de microondas MAR-5 (CEM Corporation, EE.UU.) según el método descrito en la norma EPA SW-3052. Se utilizó un espectrofotómetro de emisión atómica de alta resolución con plasma acoplado inductivamente, ICPE-9000 (Shimadzu, Japón).

La modificación superficial de las bolillas de vidrio se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM), con sistema de microanálisis de rayos X dispersivo en Energía (EDX).

6.3. Inmovilización en hojuelas de quitosano modificado

6.3.1. Metodología

6.3.1.1. Diseño experimental

La exploración de las relaciones másicas catalizador/soporte/agente acoplante en la preparación de un catalizador heterogéneo de hematin soportado en quitosano, con glutaraldehído (GA) como agente acoplante, se estudió por medio de el desarrollo de un diseño experimental de tipo Doehlert con dos factores (ver sección 4.2.1) (Doehlert, 1970). Los factores estudiados fueron relación másica GA a quitosano seco ($\text{mmol/g}_{\text{quitosano}}$) y relación másica hematin a quitosano seco ($\text{mmol/g}_{\text{quitosano}}$). Las respuestas medidas fueron: (1) Hematin Soportado ($\text{mmol/g}_{\text{quitosano}}$), (2) Actividad Catalítica en las decoloraciones de NaII y RAS ($\mu\text{mol}_{\text{dye}}/\text{g}_{\text{catalizador húmedo}}$). Luego, la relación entre ambas respuestas; actividad catalítica/hematin soportado (en este caso en base húmeda) permite calcular el valor de la actividad intrínseca de hematin soportado en unidades de $\mu\text{mol}_{\text{dye}}/\text{mg}_{\text{Hematin soportado}}$, la cual al compararse con la actividad correspondiente de hematin en solución permite inferir sobre posibles pérdidas o ganancia de actividad a través del proceso de inmovilización.

La matriz experimental se presenta en la Tabla 6.1 junto a las respuestas obtenidas. El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante el empleo del software comercial Statgraphics Centurion XV.2 (Virginia, EE.UU.). Las respuestas estudiadas se ajustaron a modelos polinómicos multivariados mediante regresión múltiple. Para evaluar la significancia estadística de los factores y sus interacciones se utilizó la prueba ANOVA, y los valores estadísticamente no significativos fueron suprimidos. No obstante, siempre se mantuvo la jerarquía de los modelos (Gutierrez Pulido et al., 2008). La función deseabilidad (DF) se utilizó para obtener la relación entre los factores que maximice las respuestas analizadas (Bezerra et al., 2008; Murphy et al., 2005).

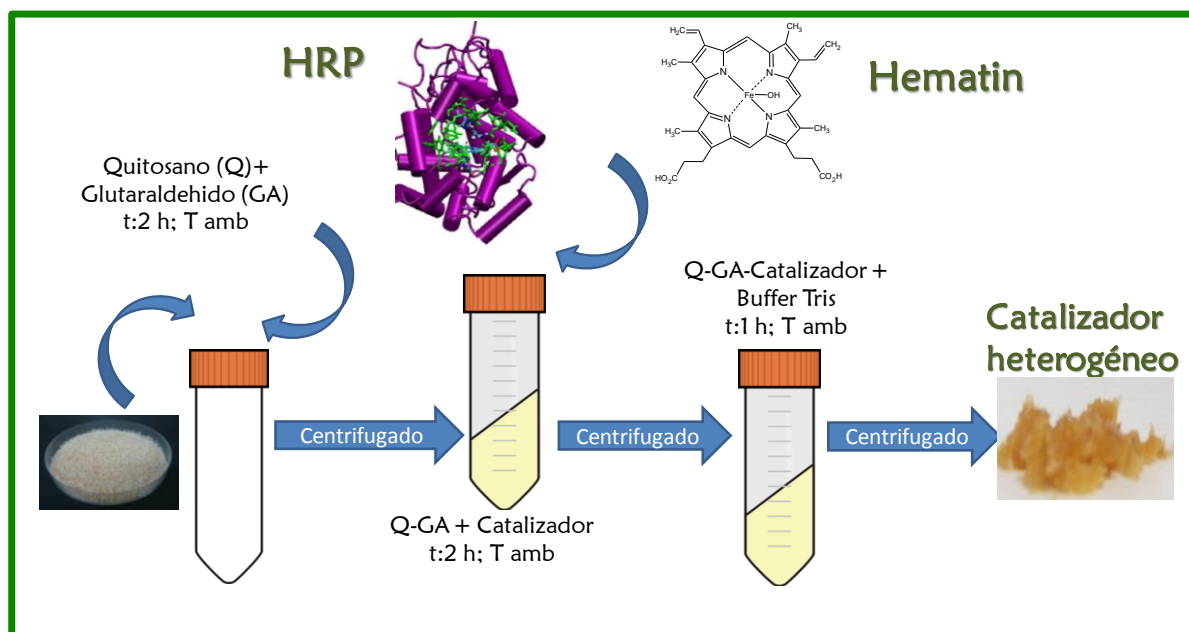
El proceso de preparación del catalizador heterogéneo incluye los siguientes pasos (ver Esquema 6.3): (1) activación de la superficie de quitosano con GA para generar grupos activos $-\text{C}=\text{O}$; (2) procedimiento de inmovilización en el cual ocurre la fijación de hematin o HRP sobre las hojuelas de quitosano; y (3) desactivación de los grupos $-\text{C}=\text{O}$ libres por reacción con una solución concentrada de Tris.

Tabla 6.1. Diseño de experimentos Doehlert para dos factores.

Exp. N°	Factores		Respuestas				
	[GA] (mmol g ⁻¹)	[Hematin] (mmol g ⁻¹)	Hematin soportado (mmol g ⁻¹)	Actividad catalítica -NaII- (μmol _{NaII} (g h) ⁻¹)	Actividad catalítica -RAS- (μmol _{RAS} (g h) ⁻¹)	Actividad intrínseca -NaII- (μmol _{NaII} (mg _{Hematin} h) ⁻¹)	Actividad intrínseca -RAS- (μmol _{RAS} (mg _{Hematin} h) ⁻¹)
1*	2.50	0.095	0.063 (±0.009)	105.1 (±21.5)	128.7 (±45.1)	18.1 (±2.8)	22.1 (±6.5)
2	2.50	0.189	0.094	104.1	117.2	10.8	12.2
3	4.66	0.142	0.070	99.1	127.8	15.5	19.9
4	4.66	0.047	0.044	102.9	90.1	23.2	20.4
5	2.50	0.000	-	34.3**	5.7**	-	-
6	0.33	0.047	0.044	44.2	72.4	14.4	23.6
7	0.33	0.142	0.118	138.0	170.9	14.1	17.5

* Punto central.

** Correspondiente a la adsorción medida de quitosano modificado.



Esquema 6.3. Preparación de los catalizadores heterogéneos.

6.3.1.2. Preparación de los inmovilizados

Activación superficial de quitosano

Con el fin de determinar el rango adecuado de la relación másica entre quitosano y GA, se determinó la densidad superficial de -NH₂ de acuerdo al método de adsorción de NaII en

condiciones alcalinas, propuesto por Bartkowiak y colaboradores (Bartkowiak Roberts, G. A. F., 2007). La descripción del método se incluye en el Anexo C. La densidad superficial de $-NH_2$ fue de $4.6 \text{ mmol}_{NH_2} \text{ g}_{\text{Quitosano}}^{-1}$, correspondiente a 7,3% en peso. Por lo tanto, la relación molar GA: NH_2 utilizados para el diseño Doehlert varió desde 0,56 hasta 1,05.

La activación superficial de quitosano se llevó a cabo en tubos Falcon de 15 ml en los cuales 0.1 g de quitosano se pusieron en contacto con 5 ml de buffer fosfato pH 7 y el volumen correspondiente de solución comercial de GA al 25% p/p (de 0.013 ml a 0.176 ml en cada experimento—ver Tabla 6.1). El tiempo de reacción fue de 2 h con agitación magnética a temperatura ambiente. Finalmente, las hojuelas se centrifugaron (10 min a 3600 rpm) y fueron lavadas 3 veces con 10 ml de buffer fosfato pH 7. Las soluciones de lavado fueron desechadas.

Inmovilización de hematin

Las partículas húmedas obtenidas en la etapa de activación superficial se pusieron en contacto con el volumen correspondiente de solución de hematin (1054,3 mg/l, en NaOH 0,01 N) (de 0 ml a 11,4 ml, ver Tabla 6.1) con agitación magnética a temperatura ambiente. Luego de 2 h de reacción, las partículas se centrifugaron (10 min a 3600 rpm) y se lavaron 3 veces con 10 ml de agua bidestilada. Se tomaron muestras de los sobrenadantes y de las aguas de lavado y se determinó la concentración de hematin en las mismas por medición de la absorbancia a 387 nm, por espectroscopía UV-Visible. El valor de absorptividad utilizado para hematin se determinó experimentalmente mediante la realización de una curva de calibración que se presenta en la Figura 6.3, el valor del mismo es $\epsilon = 0,082437(\text{mg/l})^{-1} = 52.2 (\text{mM})^{-1}$.

Finalmente, se llevó a cabo la desactivación de los grupos $-C=O$ activos mediante el contacto de las partículas húmedas con 5 ml de solución tris 0.5 M, con agitación magnética a temperatura ambiente. Luego de 1 h, las soluciones se centrifugaron (10 min a 3600 rpm) y se lavaron 3 veces con 10 ml de agua bidestilada. Se tomaron muestras del sobrenadante y de las aguas de lavado y se midió la absorbancia a 387 nm para determinar la masa de hematin sin reaccionar que pudo quedar adsorbida e las hojuelas de quitosano modificado.

Cabe aclarar en este punto, que las hojuelas de quitosano correspondientes al experimento N° 5 del diseño experimental se sometieron a todos los pasos del tratamiento de inmovilización, salvo la etapa de inmovilización de hematin. Las decoloraciones medidas

para estas partículas permitieron analizar la capacidad de adsorción de RAS y NaII que posee el quitosano modificado bajo las condiciones propuestas.

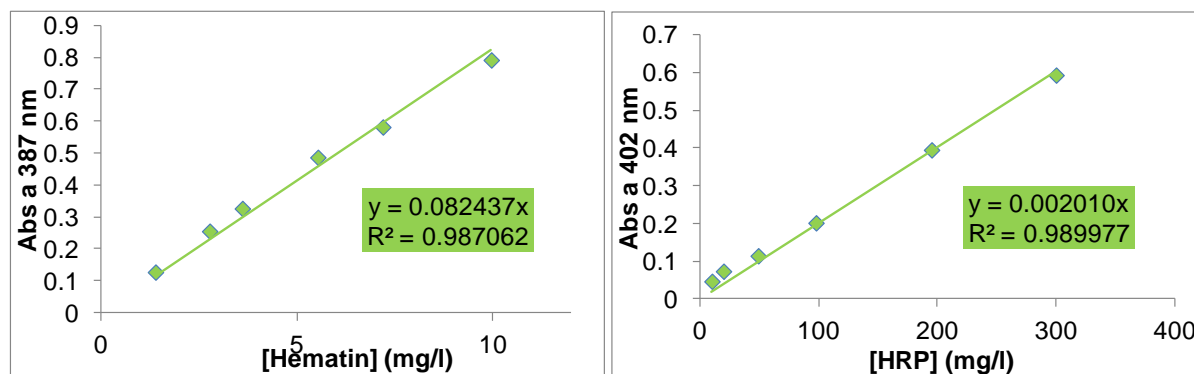


Figura 6.3. Curvas de calibración para hematin (izq) y HRP (der).

A modo comparativo se llevó a cabo la inmovilización de HRP sobre hojuelas de quitosano modificadas con GA. La activación superficial de quitosano y la inmovilización de la enzima se realizaron como se ha descrito para hematin. Las condiciones seleccionadas fueron: 0,33 mmol/g de GA y 60 mg/g de HRP. Las respuestas evaluadas fueron las mismas que las medidas para hematin soportado. La curva de calibración que permitió determinar experimentalmente el valor de absorptividad empleado para HRP $\epsilon=0.002010 \text{ (mg/l)}^{-1}$ se presenta en la Figura 6.3.

6.3.1.3. Mediciones de actividad catalítica

Las condiciones óptimas de decoloración para cada colorante se determinaron en los Capítulos 4 y 5. Para evaluar la actividad catalítica de los catalizadores heterogéneos obtenidos se mantuvieron constantes las relaciones molares hematin:H₂O₂ y hematin:colorante correspondientes a los valores óptimos de operación de los sistemas homogéneos. La Tabla 6.2 presenta las condiciones de reacción empleadas: 10 ml de solución 200 mg/l de RAS o NaII se pusieron en contacto con la masa equivalente de catalizador húmedo correspondiente a cada caso, a los fines de mantener constante la concentración de hematin. Se dio inicio a la reacción con el agregado de H₂O₂. Las reacciones de decoloración de NaII se llevaron a cabo en buffer carbonato/bicarbonato pH 10.6 (hematin) y pH 10 (HRP). Las reacciones de decoloración de RAS se realizaron en buffer tris pH 9 con ambos catalizadores. Luego de 1 h, las soluciones se centrifugaron (10

min a 3600 rpm), se tomaron muestras de los sobrenadantes y se realizaron las mediciones de absorbancia a las longitudes de onda seleccionadas (484 nm para NaII y 511 nm para RAS) para determinar el grado de decoloración alcanzado.

Tabla 6.2. Condiciones de reacción empleadas en las medidas de actividad.

	Hematin		HRP	
	OII	ARS	OII	ARS
[Hematin] (mg/l)	12	10.5	8.1	6.6
[H ₂ O ₂] (mmol/l)	2.7	6.6	1.36	6.6
pH	10.6	9	10	9

Para estudiar el comportamiento en reusos de los catalizadores obtenidos se realizaron cinco reacciones consecutivas de decoloración de soluciones de Rojo de Alizarina S. Las condiciones de reacción empleadas fueron [H₂O₂]: 6.6 mM, [Hematin]:10.5 mg/l , [RAS]: 200 mg/l y pH 9. Se determinó la actividad del catalizador luego de 1 h de reacción en cada uso. Además, se evaluaron las conversiones obtenidas para 24 h de reacción en el sexto uso de los catalizadores.

6.3.1.4. Caracterización de catalizadores

Se analizó la interacción GA:hematin, mediante el seguimiento de la absorbancia UV-visible de una solución acuosa que contenía 0.29 mM de GA y 0.0029 mM de hematin. Esta reacción se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo (Perkin-Elmer) a temperatura ambiente y se tomaron mediciones del avance de la reacción en el tiempo.

Los espectros FTIR de hematin, quitosano, quitosano activado con GA, hematin soportado y HRP soportado se registraron en el intervalo de 4600–400 cm⁻¹.

Finalmente, se analizó el contenido de hierro total de los sólidos obtenidos en los puntos centrales del diseño experimental (experimento N° 1, Tabla 6.1) mediante espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES).

6.3.1.5. APTS como bloque espaciador

Se utilizó APTS como un bloque espaciador, con el fin de evaluar el efecto de la separación entre hematin y la superficie de quitosano. Una muestra de 0,1 g de quitosano se puso en contacto con 77,6 µl de APTS 98% en 5 ml de buffer fosfato pH 7, con agitación magnética a temperatura ambiente. Luego de 2 h de reacción, las soluciones se centrifugaron (10 min a 3600 rpm) y se lavaron 3 veces con 10 ml de agua bidestilada. Finalmente, la activación superficial de quitosano y la inmovilización del catalizador se realizaron como se detalló previamente en la sección 6.3.1.1, en las siguientes condiciones: 0.87 mmol/g de GA y 0.134 mmol/g de hematin. La cantidad de hematin soportado, la actividad catalítica y la actividad catalítica intrínseca fueron evaluados para ambos colorantes. El catalizador obtenido se caracterizó como se describe en la sección anterior. La Tabla 6.4 presenta la nomenclatura utilizada para nombrar los catalizadores.

Tabla 6.3. Acrónimos de los catalizadores heterogéneos.

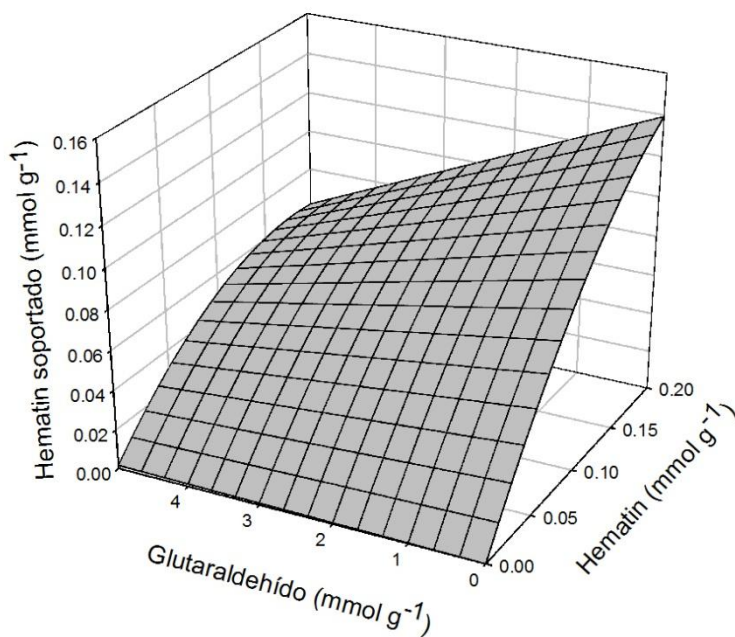
Acrónimos	Componentes
Q-GA-HRP	Quitosano-Glutaraldeído-HRP
Q-GA-Hem	Quitosano-Glutaraldeído-Hematin
Q-APTS-GA- Hem	Quitosano-(3-Aminopropil)triétoxisilano -Glutaraldeído-Hematin

6.3.2. Resultados

6.3.2.1. Inmovilización de Hematin

Las superficies de respuesta obtenidas mediante el ajuste de los datos experimentales a modelos cuadráticos se presentan en la Figura 6.4. No fue posible inmovilizar hematin empleando bajas concentraciones de biomimético. Por otra parte, a altas concentraciones de hematin, los mejores resultados se obtuvieron para aquellos puntos del diseño que fueron modificados en condiciones de baja concentración de GA. Este resultado puede atribuirse a la presencia de oligómeros de GA sobre la superficie de quitosano, de diferentes grados de entrecruzamiento y peso molecular, los cuales pueden dificultar la adecuada interacción hematin-GA (Migneault et al., 2004; Shlomo Margel, 1980). La masa de hematin

soportado, cuantificado por mediciones UV–visibles del biomimético en los sobrenadantes, fue corroborada por el análisis de contenido total de hierro de los catalizadores sólidos mediante ICP. Los resultados se presentan en la Tabla 6.4. La concordancia existente entre ambas determinaciones confirma la inmovilización de hematin además de indicar la ausencia de lixiviación del metal durante la inmovilización. Por otro lado, durante la etapa final del proceso de inmovilización que involucra una desactivación con solución concentrada de Tris se produce la liberación de hematin desde el quitosano modificado. El hematin liberado puede provenir de: (1) hematin desorbido no unido covalentemente a quitosano debido al contacto con solución alcalina de Tris (pH 10 aproximadamente), lo que favorece la disolución de la metaloporfirina (De Villiers et al., 2007); o (2) la pérdida de hematin inmovilizado por ruptura de interacciones covalentes con el soporte. La presencia de hierro en las partículas permite descartar la segunda de las opciones.



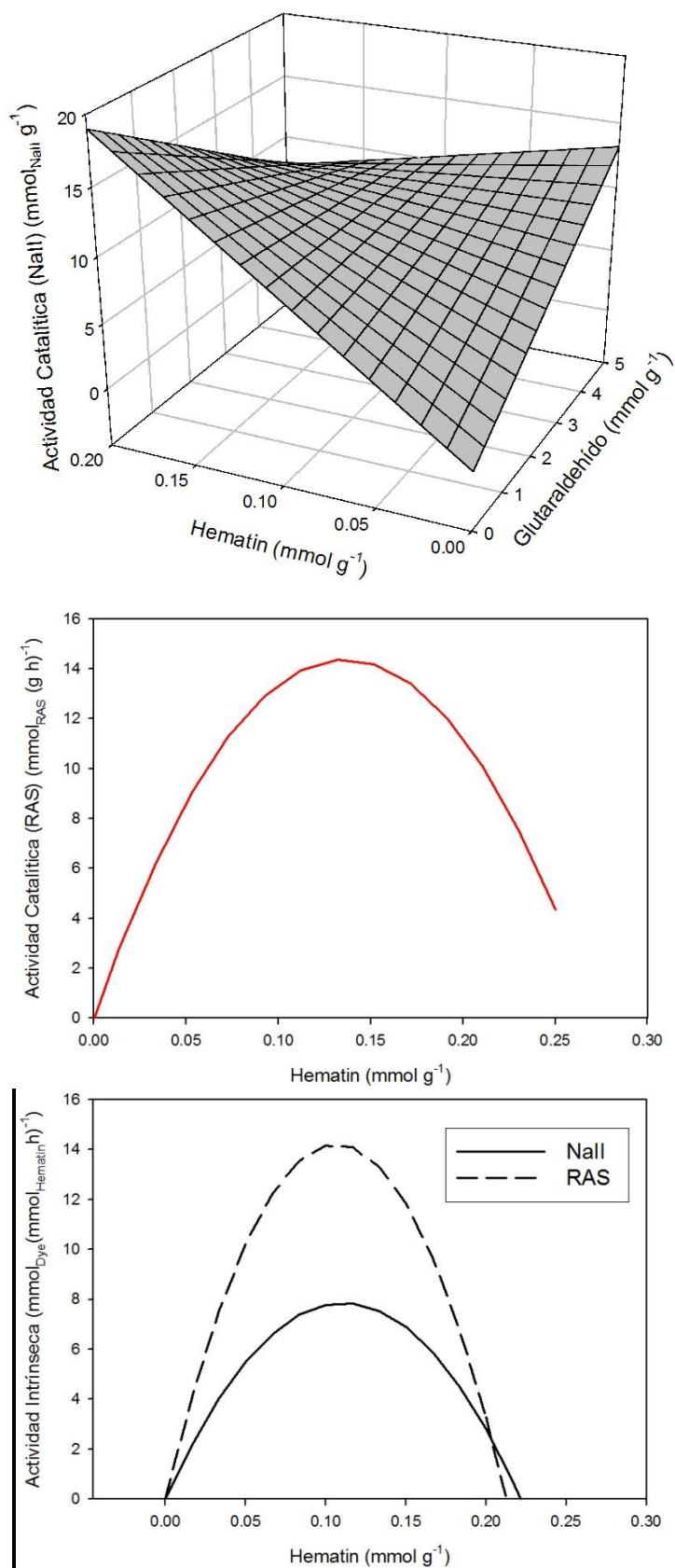


Figura 6.4. Funcionalidad obtenida mediante el ajuste de las respuestas de la Tabla 6.1 a modelos cuadráticos.

A su vez, las mediciones de la actividad catalítica e intrínseca en la decoloración de soluciones de NaII y RAS confirmaron la inmovilización del biomimético en la superficie quitosano (Figura 6.4). La actividad catalítica obtenida en la eliminación de NaII fue consistente con los resultados de hematin soportado. Por su parte, las actividades catalíticas medidas en la decoloración de RAS resultaron ser independientes de la concentración de GA. Esta respuesta presentó un máximo a valores medios de carga de hematin.

Tabla 6.4. Determinación del contenido de hierro total de los catalizadores soportados mediante espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente vs. espectroscopía UV-Visible.

	ICP	UV-Visible
Fe (mg g _{wet catalyst} ⁻¹)	0.591 _(±0.070)	0.508 _(±0.040)
Hematin (mmol g _{wet catalyst} ⁻¹)	0.011 _(±0.001)	0.009 _(±0.001)

Las actividades intrínsecas calculadas para ambos colorantes resultaron ser independientes de la carga de GA. Una alta masa de hematin fue requerida para obtener rendimientos de inmovilización del 95%. Sin embargo, la actividad de hematin soportado (actividad intrínseca) con ambos sustratos presentó un máximo a 0,1 mmol_{Hematin}(g h)⁻¹, disminuyendo posteriormente. La existencia de este máximo para la actividad intrínseca puede asignarse a: (1) la modificación del catalizador por formación de enlaces covalentes con quitosano modificado que afecten su capacidad catalítica; (2) la agregación de metaloporfirina en la superficie quitosano (Bruce, 1991; Lindsay Smith & Lower, 1991) o formación de dímeros de hematin; o (3) el acceso restringido del sustrato al hierro del sitio catalítico de hematin. No obstante, considerando la independencia de la actividad intrínseca respecto a la concentración de GA, puede descartarse la opción (1). Por lo tanto, es posible proponer que las interacciones entre el agente de acoplamiento y hematin no producen desactivación.

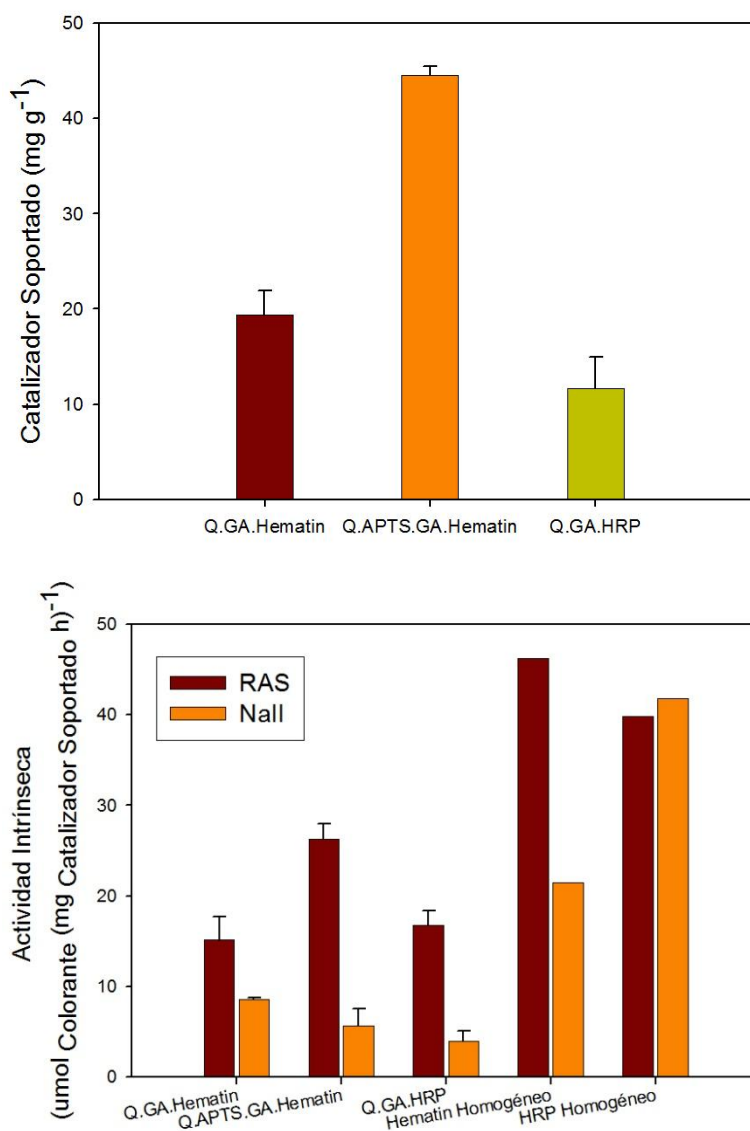


Figura 6.5. a) Catalizador soportado. Las condiciones de inmovilización empleadas fueron: hematin: 85 mg/g_{quitosano}, y GA: 0.87 mmol/g_{quitosano} para Q-GA-Hematin y Q-APTS-GA-Hematin; HRP: 60 mg/g_{quitosano} y GA: 0.33 mmol/g_{quitosano} para Q-GA-HRP; y APTS: 3.435 mmol/g_{quitosano} para Q-APTS-GA-Hematin. b) Actividad catalítica intrínseca de los catalizadores homogéneos y heterogéneos.

La actividad intrínseca de los catalizadores homogéneos y heterogéneos se presenta en la Figura 6.5,b. La disminución de la actividad de hematin inmovilizado vs. hematin libre se observó no sólo para NaI, sino también para RAS. Con RAS como sustrato, la actividad intrínseca se redujo de 46 (biocatalizador homogéneo) a 15 (μmol_{RAS} mg_{Hematin} h)⁻¹ (para

Q-GA-Hem). En la decoloración del sustrato azoico, la actividad intrínseca disminuyó desde 21,5 hasta 8,6 $\mu\text{mol}_{\text{OII}} (\text{mg}_{\text{Hematin h}})^{-1}$, no obstante, este valor es en realidad menor debido a la adsorción de NaII sobre quitosano. La adsorción de NaII sobre hojuelas activadas no fue despreciable (ver Tabla 6.1) y produce per se un grado de decoloración no-catalítico. Estas diferencias encontradas en la disminución de la actividad a causa de la inmovilización pueden radicar en los efectos causados por las estructuras de los sustratos. Ambos sustratos presentan un grupo sulfónico que aumenta su polaridad y el consecuente impedimento electrostático. Asimismo, la diferencia radica en que RAS posee una estructura plana, mientras que NaII presenta un enlace sencillo que permite su rotación (Figura 6.6), lo cual puede dificultar el acceso a la sexta posición de coordinación de Fe en hematin, debido a un mayor impedimento estérico.

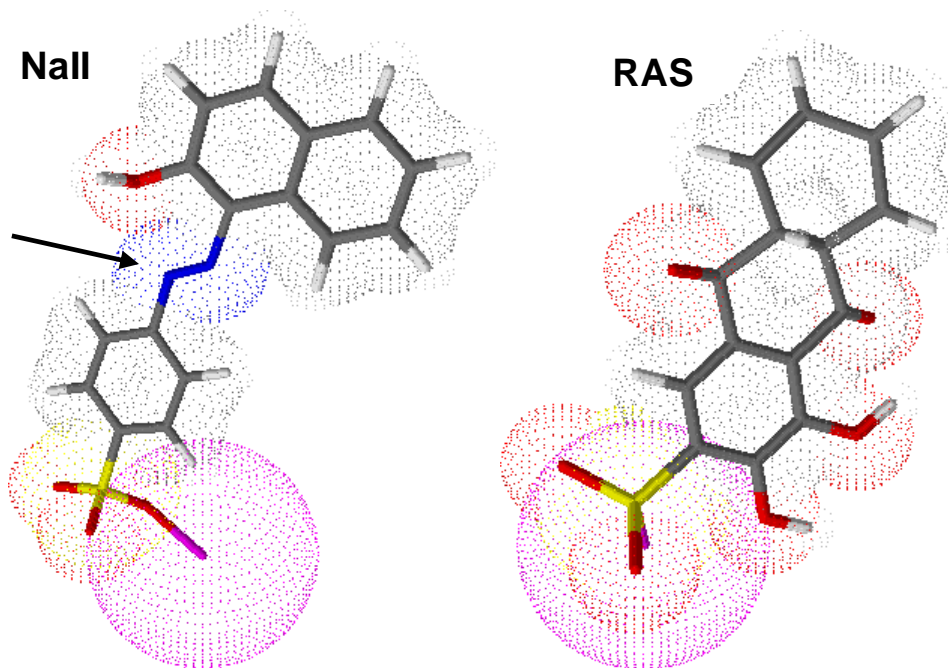


Figura 6.6. Estructuras de NaII y RAS. La flecha indica el punto de rotación de la molécula.

Esta dificultad de Naranja II para acceder al sitio catalítico puede resultar en una mayor relación molar H_2O_2 -sustrato fenólico en la vecindad del mismo lo que puede generar dos rutas principales de reacción, mencionadas en el Capítulo 1. Por un lado, la inactivación de la metaloporfirina por reacción con exceso de H_2O_2 (Cunningham et al., 2001; Stephenson Bell, A.T. , 2005), y por otro, la participación de vías catalítica o *pseudo*-catalítica de reacción con la consecuente formación de O_2 , análogas a las vías propuestas para HRP

(Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001; Vlasits et al., 2010). En estudios previos de degradación de RAS catalizada por hematin en sistemas homogéneos (Capítulo 5) se observó un aumento en la concentración de O_2 durante el avance de reacción. Sumado a esto, la estructura de hematin permite que esta metaloporfirina pueda ser considerada como un biomimético de las catalasas.

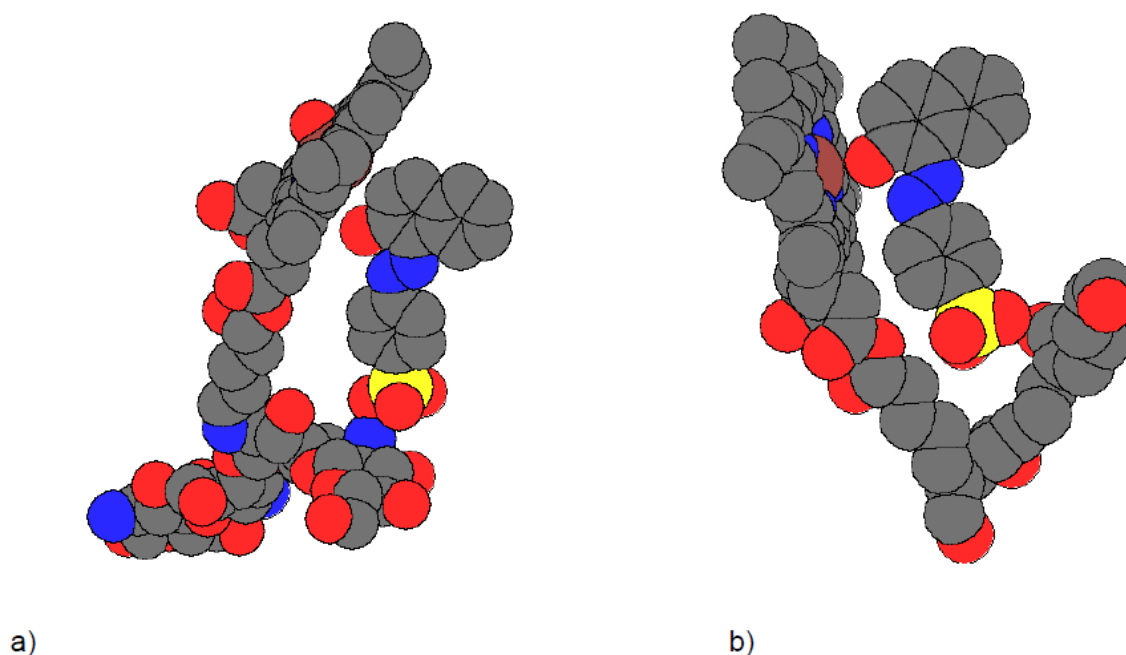


Figura 6.7. Interacciones de Naranja II con las posibles estructuras de catalizadores heterogéneos obtenidos. a) Interacción entre NaII, hematin (unido por un monómero de GA) y quitosano. b) Interacción entre NaII, hematin y poliglutaraldehído. Referencias: en amarillo: átomo de azufre, en gris: átomo de carbono, en azul: nitrógeno, en rojo: oxígeno, los hidrógenos no se grafican.

La Figura 6.7 muestra la interacción entre hematin inmovilizado en quitosano y NaII. Este polímero demostró capacidad de adsorber fuertemente colorantes azoicos y antraquinónicos (Pirillo et al., 2009) y en la Tabla 6.1 se aprecia, en el experimento 5, que el grado de adsorción es 7 veces mayor para NaII comparado con RAS. Las moléculas de colorante pueden fijarse a la matriz polimérica del catalizador de manera tal que puedan producir un bloqueo del acceso al Fe de hematin, tal como lo muestra la Figura 6.7,b.

Optimización del proceso de inmovilización de hematin

La optimización de las condiciones de inmovilización se obtuvo considerando un adecuado equilibrio entre la eficiencia de inmovilización y el grado de decoloración alcanzado para ambos colorantes. Esto fue posible mediante el cálculo de la función deseabilidad (Figura 6.8). El valor que maximiza las respuestas estudiadas corresponde a un inmovilizado que debe ser activado con 0.33 mmoles de GA por gramo seco de hojuelas con contacto posterior de 0.19 mmoles de hematin.

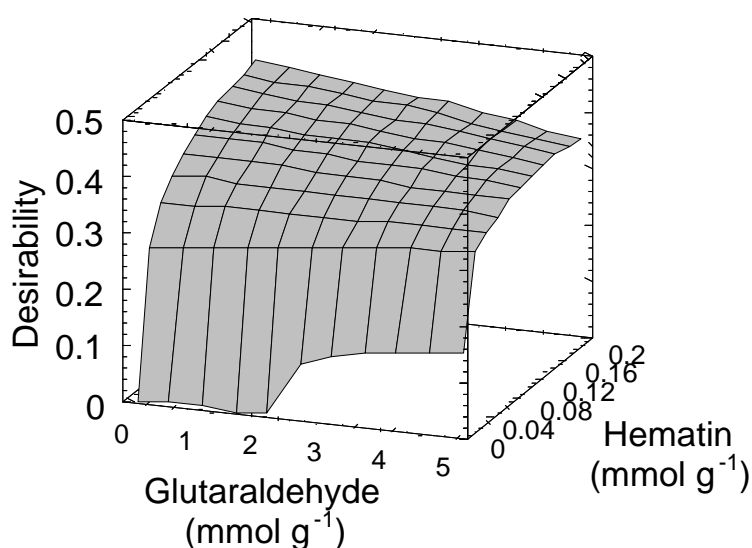


Figura 6.8. Función deseabilidad considerando las respuestas: hematin soportado, actividad intrínseca y actividad catalítica de decoloración de NaII y RAS.

6.3.2.2. Inmovilización de HRP

A los fines de evaluar a hematin como una potencial alternativa a HRP, se estudió el rendimiento de inmovilización de la enzima, en condiciones análogas a las empleadas para el biomimético. Las respuestas obtenidas se presentan en la Figura 6.5. El porcentaje de eliminación alcanzado para NaII se encuentra dentro de los márgenes del porcentaje que quitosano es capaz de adsorber físicamente (ver Tabla 6.1, Exp. N ° 5). Sin embargo, con RAS como sustrato, la actividad intrínseca disminuyó en un 58% respecto a la obtenida con el biocatalizador homogéneo. Estos resultados nos permiten postular que el anclaje del catalizador genera dificultades de acceso al sitio catalítico, en particular para sustratos de mayor volumen, como lo es Naranja II. Al igual que con hematin, la inactivación por rutas

paralelas que involucran el ataque de H_2O_2 (ver Capítulo 1) puede activarse debido al aumento de la relación molar H_2O_2 a sustrato fenólico en la vecindad del sitio catalítico (H B Dunford, 1999). Por último, es necesario considerar la inactivación de la enzima por ataques de radicales orgánicos, la cual aumenta con la inmovilización (Kapeluich et al., 1997; J A Nicell et al., 1995; Wagner & Nicell, 2002). Xialing y colaboradores publicaron resultados que prueban que los radicales orgánicos formados permanecen en las cercanías de la enzima y promueven su inactivación (Cai Xialing, 2009).

6.3.2.3. APTS como bloque espaciador entre hematin y la matriz polimérica

Los problemas de acceso postulados para sustratos voluminosos, así como el bloqueo del sitio catalítico producto de la adsorción de los colorantes sobre quitosano dieron lugar al estudio de la incorporación de APTS como bloque espaciador entre quitosano modificado y hematin. La Figura 6.9 presenta las posibles disposiciones de hematin con el empleo de APTS y en ausencia del mismo. Las respuestas obtenidas de actividad catalítica y actividad intrínseca se presentan en la Figura 6.5. La Figura 6.5,a muestra los valores de hematin soportado con y sin APTS, donde se observa un aumento de más del 100% en la masa de hematin fijada. Por su parte, la actividad intrínseca medida en la decoloración de Naranja II sigue siendo muy baja. Sin embargo, en el caso de RAS, la misma se redujo de 46,2 (catalizador homogéneo) a 26,3 $\mu\text{mol}_{\text{ARS}} \text{mg}_{\text{Hematin}}^{-1}$ (para Q-APTS-GA-Hem). Este aumento en la actividad intrínseca obtenida con el empleo de APTS puede asignarse a una mejora en la accesibilidad del sustrato.

Es posible analizar molecularmente los efectos estéricos responsables de la pérdida de actividad en la oxidación de los colorantes. La Figura 6.10 muestra las vistas laterales de la interacción NaII-hematin inmovilizado. Puede observarse la existencia de una interacción repulsiva cuando NaII se encuentra cerca del sitio catalítico. Hay una posibilidad del 50% de que el sustrato coordine al Fe en su sexta posición libre, en lugar de aproximarse a la quinta posición de coordinación del Fe en hematin, ocupada por el grupo $-OH$. Si el sustrato se aproxima a hematin como en el caso de la Figura 6.10,c se presentan impedimentos estéricos y electrónicos adicionales. En el caso de RAS, estas restricciones son menores debido a la naturaleza plana de la estructura del colorante antraquinónico.

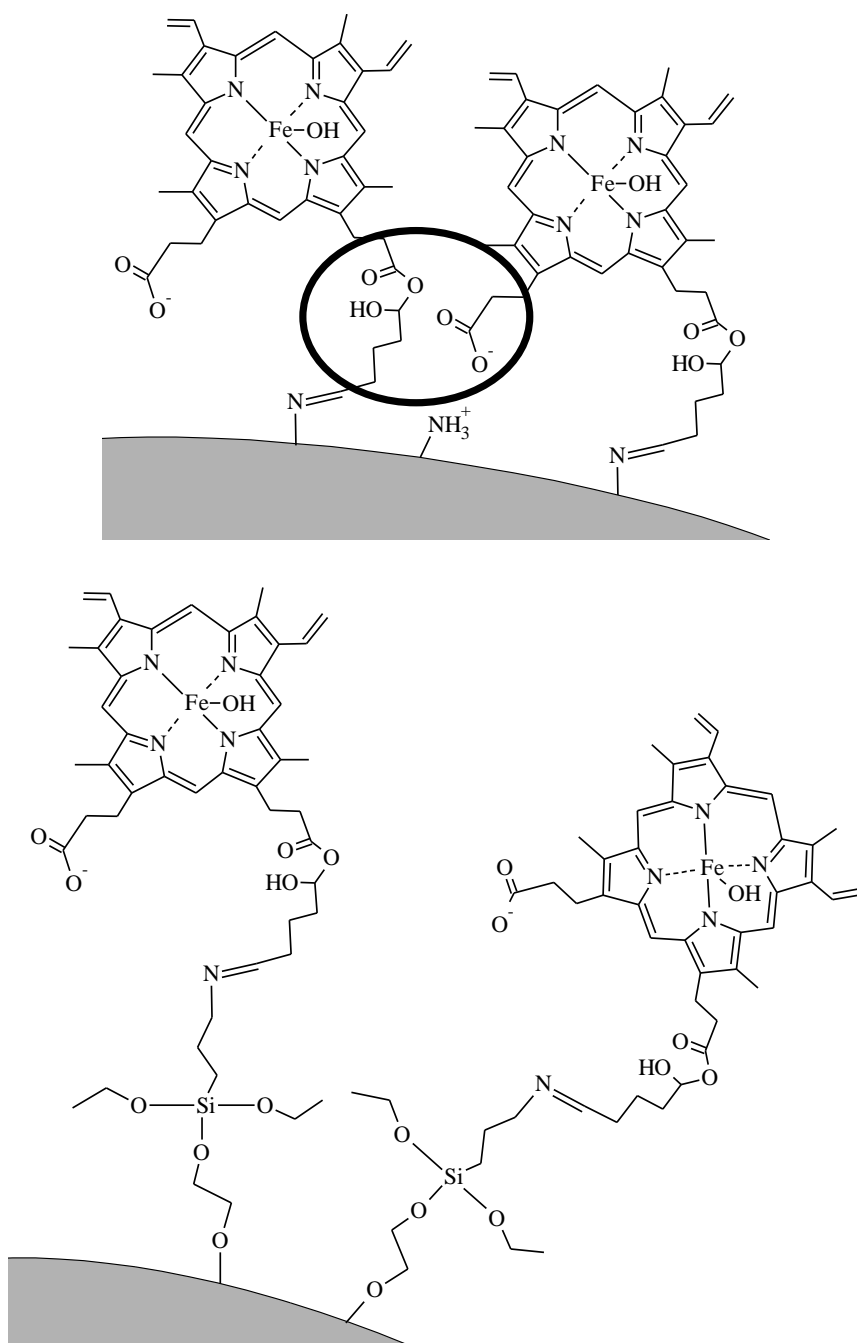
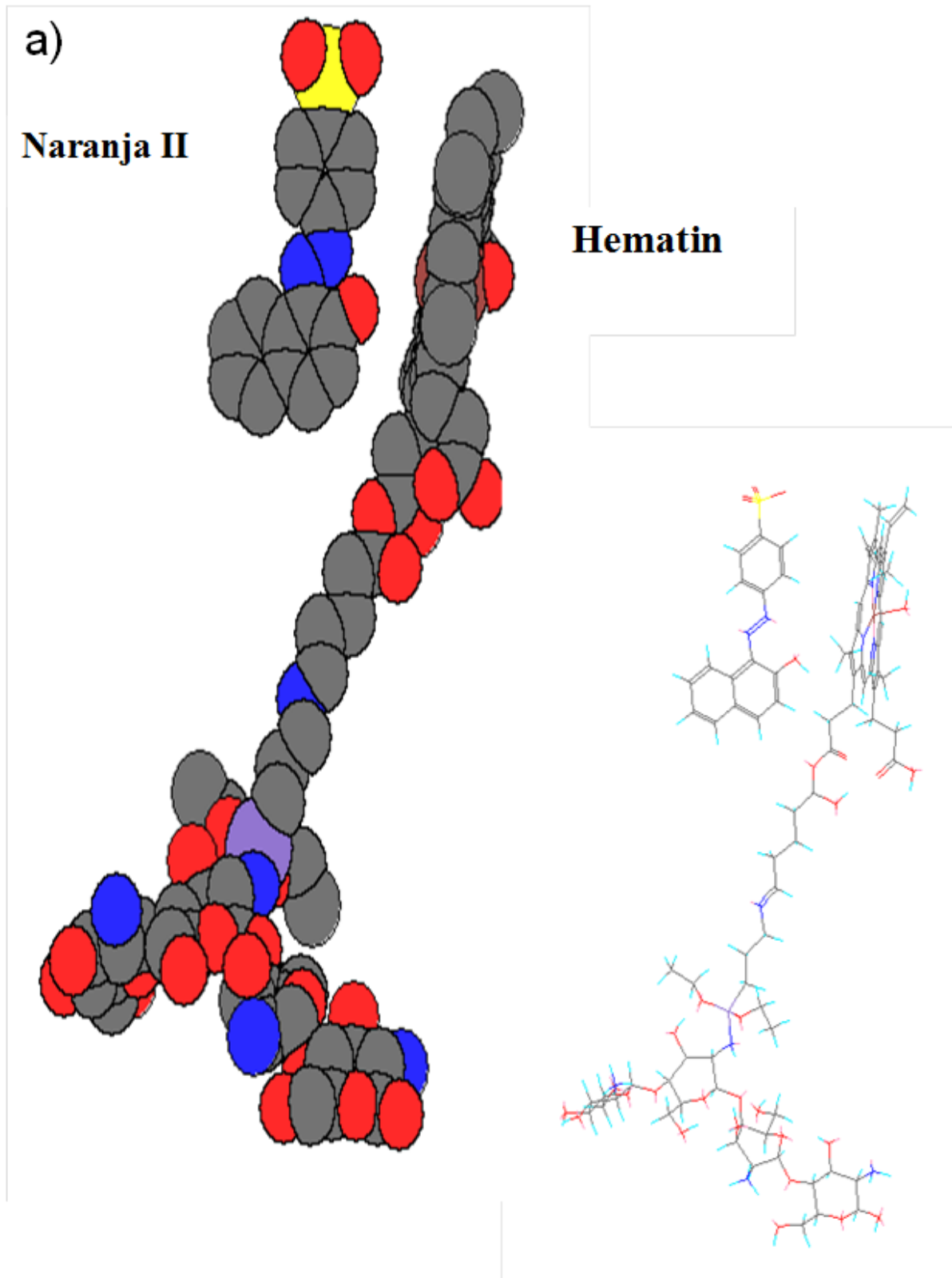
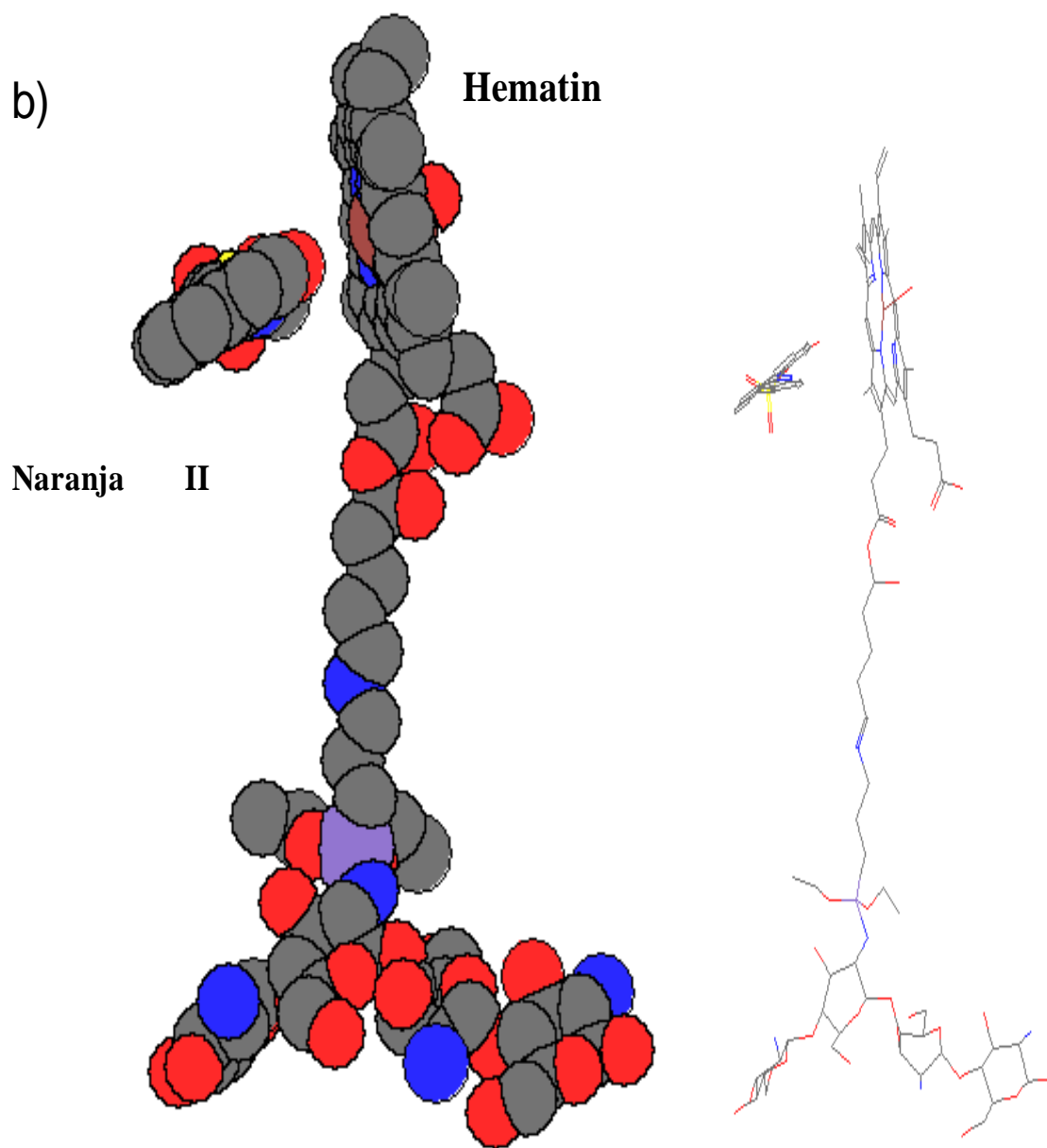


Figura 6.9. Efecto de el empleo de APTS como bloque espaciador en la estructura del catalizador heterogéneo obtenido por inmovilización de hematin. Las imágenes ilustran el caso en que la interacción hematin-GA involucra la formación de un enlace ester entre los grupos carboxílicos sutituyentes del anillo porfirínico y los grupos aldehídos de GA.





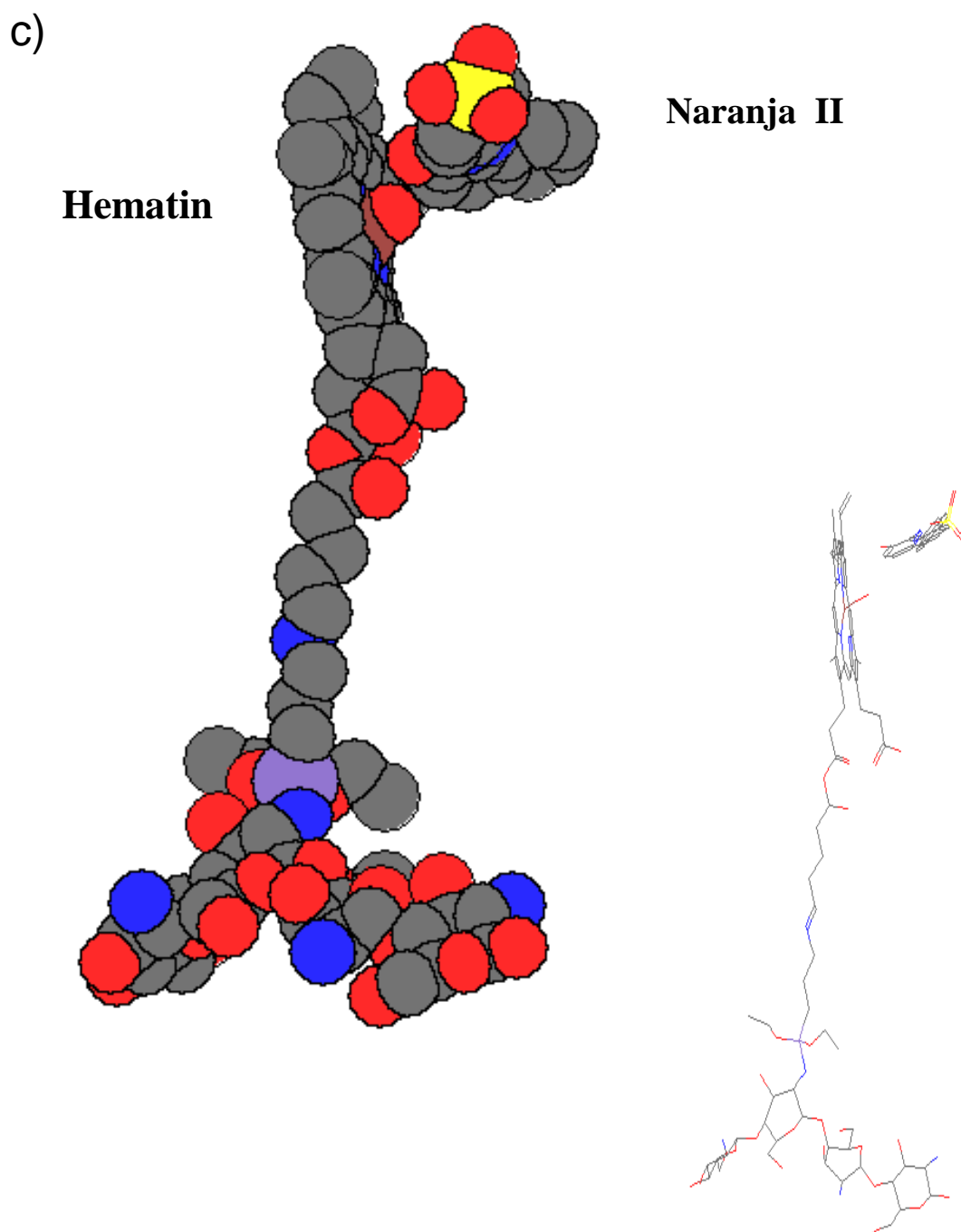


Figura 6.10. Interacción espacial sustrato–catalizador. a) Localización I de Naranja II, por el lado de la sexta posición de coordinación del Fe. b) Localización II de Naranja II, por el lado de la sexta posición de coordinación del Fe. c) Localización III de Naranja II, por el lado de la quinta posición de coordinación del Fe.

6.3.2.4. Reusos de los catalizadores

Los resultados obtenidos durante la evaluación del comportamiento en reusos de los catalizadores obtenidos se presentan en la Figura 6.11 y la Tabla 6.5. El catalizador Q-APTS-GA-Hematin presentó la mayor actividad intrínseca en el primer uso presentando una importante disminución en los usos siguientes. Sin embargo, las conversiones medidas para 24 h de reacción, en el sexto reuso fueron el 70% y 60% de los valores medidos en el primer uso (para 1h de reacción), con C-APTS-GA-Hematin y C- GA-Hematin, respectivamente. Por otro lado, HRP mantuvo su actividad hasta el cuarto reuso, luego del cual se observa una inactivación que le impide oxidar el sustrato luego de cinco ciclos de uso.

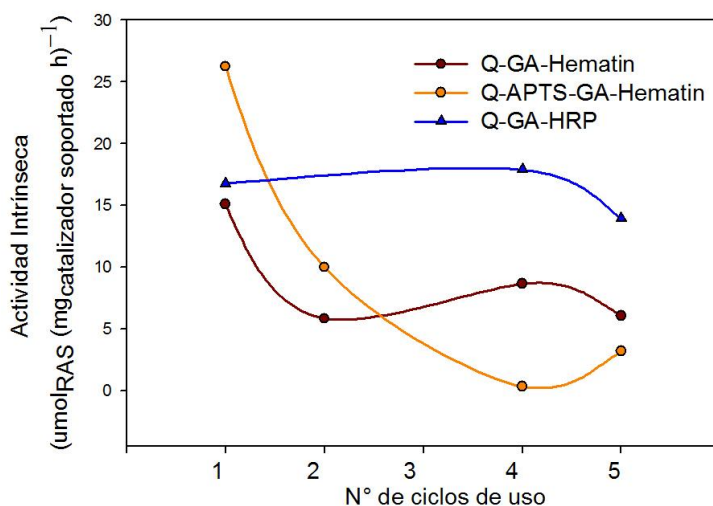


Figura 6.11. Actividad en reusos de los catalizadores heterogéneos obtenidos en la decoloración de RAS.

Tabla 6.5. Conversiones de RAS obtenidas en el primer uso -1 h de reacción- y en el sexto reuso -24 h de reacción-.

	Conversiones para el 1º ciclo de uso ~1 h-	Conversiones para el 6º ciclo de uso ~24 h-
Q-GA-Hematin	29.5(±5.76)	17.8(±3.28)
Q-APTS-GA-Hematin	48.7(±4.04)	34.1(±4.95)
Q-GA-HRP	20.0(±1.44)	0.9(±1.00)

6.3.2.5. Caracterización por FTIR

La Figura 6.12 presenta ejemplos de las vibraciones de tensión simétrica y anti simétrica, flexión y torsión que se observan en los espectros FTIR.

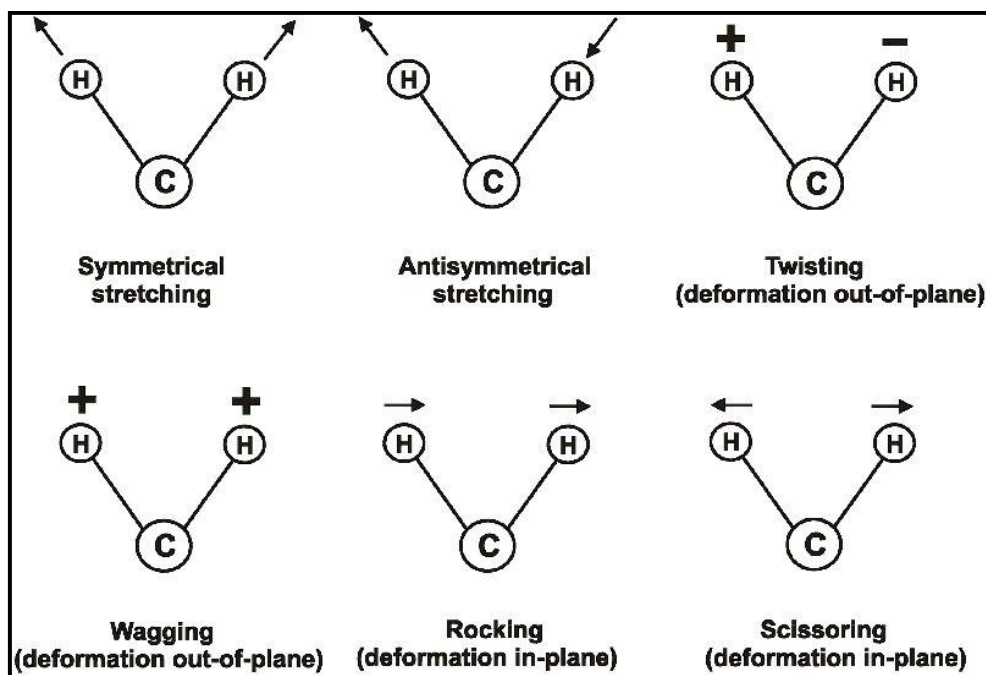
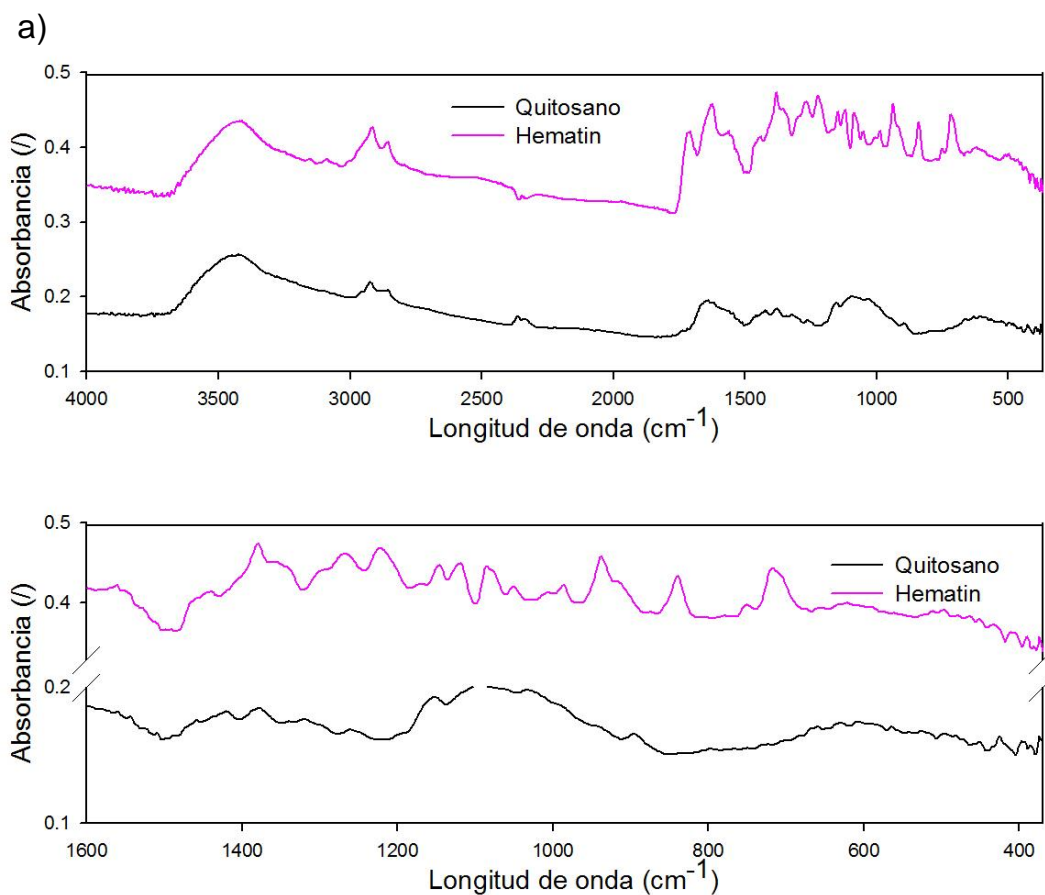


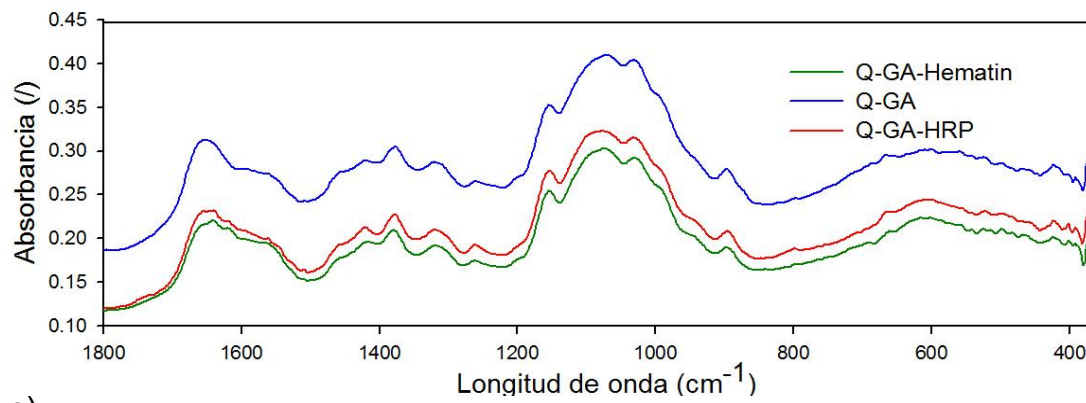
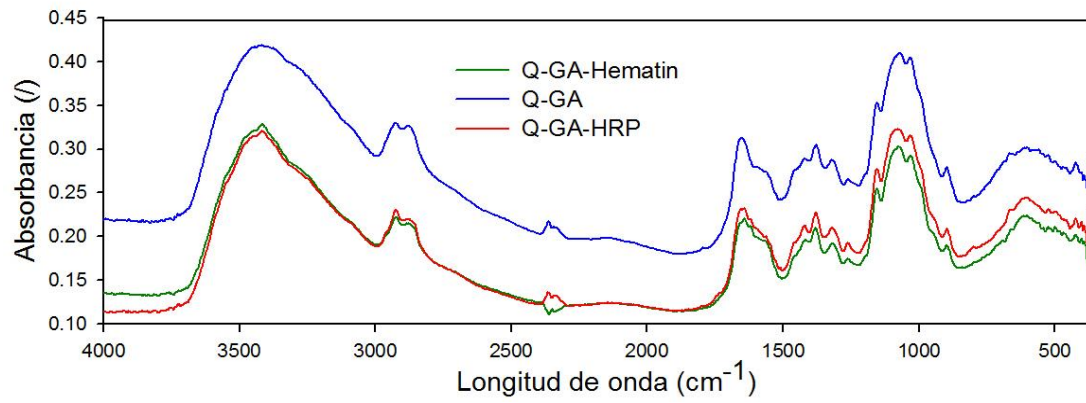
Figura 6.12. Vibraciones capaces de generar picos de absorbancia en espectros FTIR.

Los espectros FTIR de los catalizadores obtenidos en las diferentes etapas de inmovilización se presentan en la Figura 6.13. El espectro de quitosano presenta sus picos característicos: los picos de vibración de C–H a 2962 y 2853 cm^{-1} , y en 895 cm^{-1} el pico correspondiente a la tensión del enlace C–H de los grupos anoméricos de quitosano. La presencia de $-\text{CH}_2$ fue confirmada por la banda de absorción a 1421 cm^{-1} , mientras que las banda a 1378 cm^{-1} son asignables a las deformaciones de enlace $-\text{CH}$ y $-\text{CH}-\text{CH}_3$ (Ily Maza Mejía, 2007). Los picos observados a 1036 y 1099 cm^{-1} fueron asignados a las vibraciones del esqueleto de quitosano (A.F.Roberts, 1992). Las vibraciones correspondientes a enlaces $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$ con fuertes interacciones de enlaces puente hidrógeno, presentan bandas de absorción entre 3600 y 3200 cm^{-1} , mientras que enlace C–N presenta una señal a 1230 cm^{-1} (Conley, 1979). Por último, el pico a 1154 cm^{-1} es asignable a las vibraciones de tensión de los enlaces C–O–C (A.F.Roberts, 1992).

La modificación superficial producto del agregado de GA provocó ligeros cambios en los espectros FTIR de quitosano. Se observó el crecimiento del pico a 2878cm^{-1} , asignable a estiramiento simétrico de $-\text{CH}_2$. El pico a 1378 cm^{-1} también creció. Además, aparece un nuevo pico a 1650 cm^{-1} que puede ser asociado a los enlaces $\text{C}=\text{C}$, producto de la condensación aldólica de GA (Migneault et al., 2004; Shlomo Margel, 1980). Mientras que no se observa el pico a 1750 cm^{-1} , característicos del grupo $-\text{C}=\text{O}$.



b)



c)

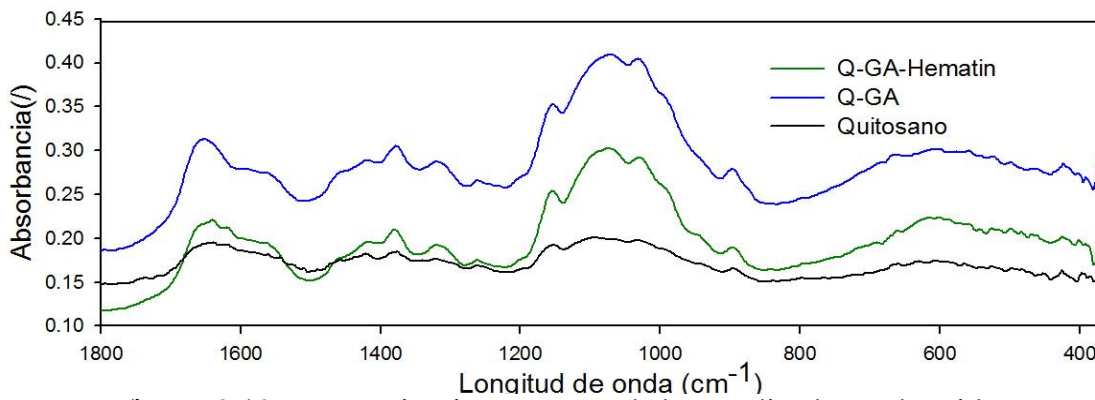
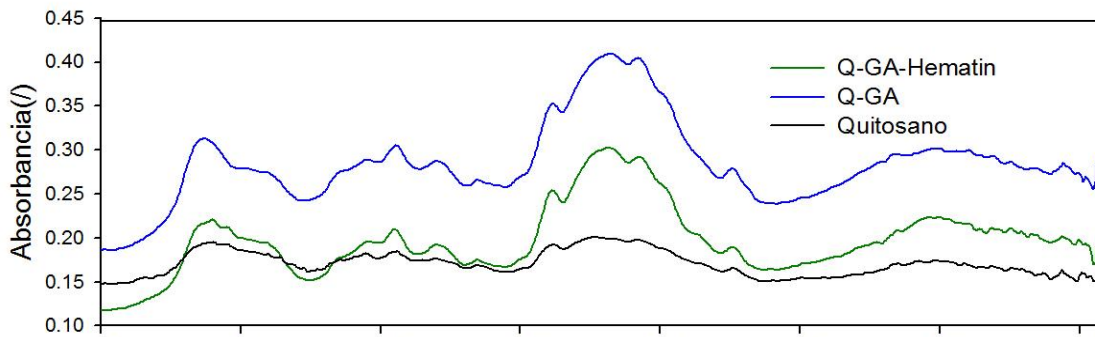


Figura 6.13. Caracterización por FTIR de los catalizadores obtenidos.

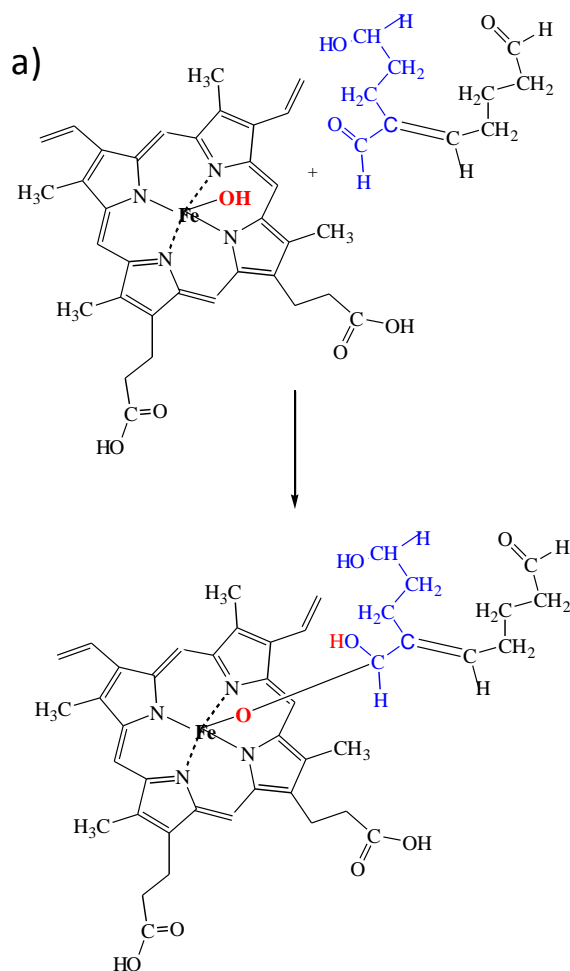
El espectro de Q-GA-HRP presentó bandas de absorción en la región correspondiente a las amidas I, a 1640 y 1650 cm^{-1} , asignables al estiramiento del enlace C=O. Además, se observaron también los picos característicos de las amidas II a 1625, 1530 cm^{-1} y 1510 cm^{-1} , asignables al estiramiento de N-H y C-N. Este resultado demuestra que la estructura secundaria de la proteína se conserva, luego del procedimiento de inmovilización (Elkaoutit, Naranjo-Rodriguez, Domínguez, & Hidalgo-Hidalgo-De-Cisneros, 2011; Monier et al., 2010; Q. Xu et al., 2006).

El espectro de hematin presentó picos a 2920 y 2854 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones simétricas y asimétricas de C-H y C-H₂. También se encontraron los picos correspondientes a la deformación simétrica y asimétrica del átomo de H de -CH₃, a 1450 y 1380 cm^{-1} . Se observaron, a su vez, el pico a 1625 cm^{-1} asignable a las vibraciones de estiramiento del enlace C=C; y el pequeño pico a 3090 cm^{-1} asociado a las vibraciones de estiramiento de =CH₂, mientras que las absorciones entre 1000 y 800 cm^{-1} se asignan a vibraciones de flexión del enlace =C(H). Por otro lado, la presencia de enlaces C-N se confirmó por los picos a 1360 y 1270 cm^{-1} (doblete producto de la conjugación del doble enlace). Las bandas características del grupo carbonilo se observan a: 1710 cm^{-1} (correspondiente al estiramiento de C=O), 920 cm^{-1} asignadas a la flexión fuera de plano del enlace C-O-H; y 1240 cm^{-1} al estiramiento de C-O (Conley, 1979). Además, los picos correspondientes a las vibraciones de O-H y N-H están presentes entre 3200 y 3600 cm^{-1} (Amaravathi, Babu, & Chandramouli, 2007). Los picos a 940, 990 y 1010 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de esqueleto porfirínico (G. Huang et al., 2012; Parker, 1983; Thomas & Martell, 1958). La banda a 1091 cm^{-1} se asigna a C-H pirrólicos (De Villiers et al., 2007). La presencia de picos correspondientes a vibraciones de O-H y N-H permitió descartar la presencia de dímeros π - π o μ -oxo de hematin productos de la condensación de la metaloporfirina en la superficie del sólido (Maitra et al., 2011). Los picos a 1091 y 1625 cm^{-1} confirmaron la presencia de hematin en los catalizadores obtenidos.

6.3.2.6. Caracterización del enlace hematin-glutaraldehído

Las posibles interacciones covalentes entre GA y hematin incluyen: (1) reacción entre el grupo -OH de la quinta posición de coordinación del hierro de hematin con el grupo aldehído de GA; o (2) reacción entre un grupo carboxílico de la porfirina y el grupo aldehído de GA (Figura 6.14).

La interacción de hematin-GA puede ser analizada por medio de las señales observadas en los espectros FTIR presentes en la Figura 6.13, c. En los mismos se observan dos bandas características del grupo éster a 1170–1070 cm^{-1} correspondientes al estiramiento simétrico y anti simétrico de los enlaces $-\text{C}=\text{O}-\text{O}-\text{C}$, respectivamente (Stuart, 2004), y bandas entre 1310–1100 cm^{-1} asignables al enlace $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. Sumado a esto, las bandas características del grupo carbonilo no se encuentran presentes (Stuart, 2004). Estas observaciones son consistentes con una interacción covalente entre el ácido carboxílico de hematin y el grupo aldehído de la GA, en lugar de una unión a través del $-\text{OH}$ de hematin de su quinta posición de coordinación. La estructura propuesta se muestra en la Figura 6.15.



b)

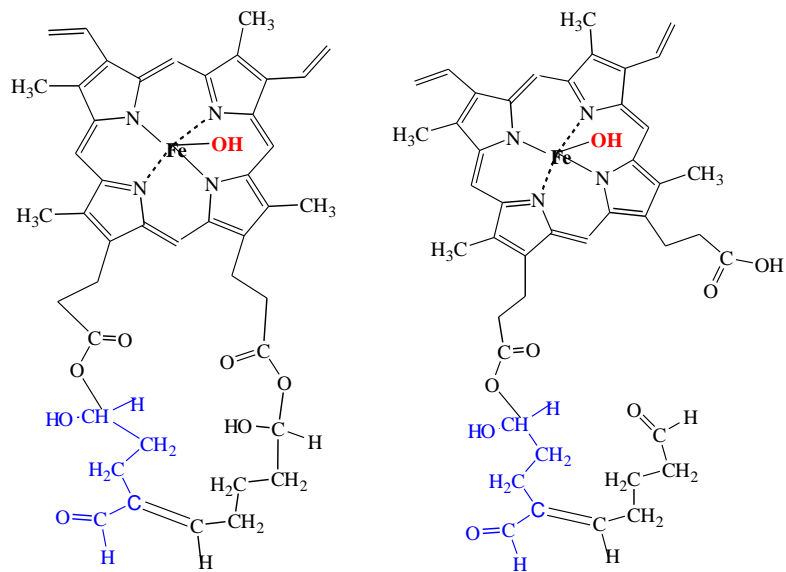


Figura 6.14. a) Formación de enlace hemiacetal por reacción entre el grupo $-OH$ de la quinta posición de coordinación del hierro de hematin con el grupo aldehído de GA. b) Formación de enlace ester por reacción entre un grupo carboxílico de la porfirina y el grupo aldehído de GA.

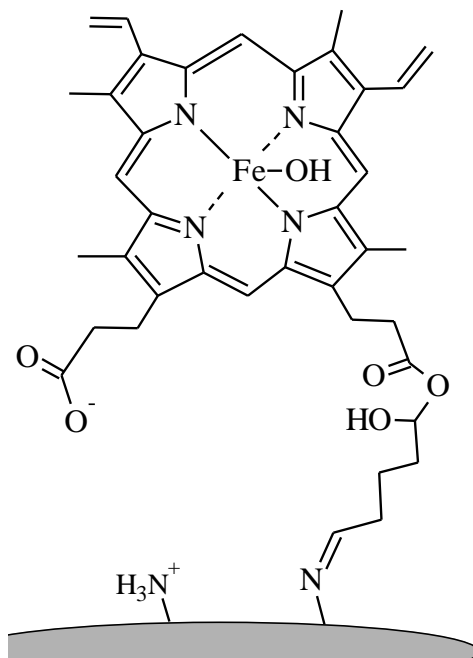


Figura 6.15. Interacción covalente entre los grupos $-NH_3$ de quitosano, glutaraldehído y hematin.

La Figura 6.16 muestra los espectros UV-Visible del avance de reacción hematin-GA. El aumento en la absorbancia a 233 nm se asigna a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ producto de la formación de enlaces C=C, a causa de la condensación aldólica de GA (Migneault et al., 2004; Shlomo Margel, 1980). Además, se observó la formación de una banda débil a 285 nm, asignable a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ del enlace C=O. Sin embargo, no hay evidencia de modificaciones del sitio catalítico de hematin en el estudio UV-Visible, ya que no hay alteraciones en la banda de Soret (De Villiers et al., 2007). La formación de enlaces covalentes que afectan el anillo porfirínico puede ser descartada. Aún más, debido a la disposición espacial de hematin, la agregación de la metaloporfirina puede descartarse también.

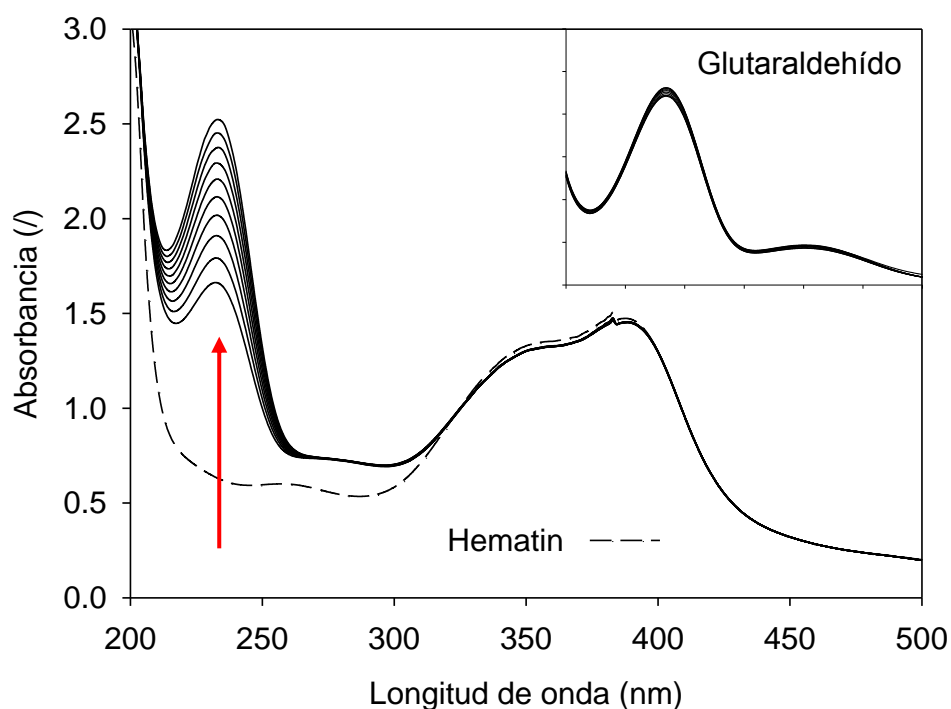


Figura 6.16. Espectro UV-Visible de la interacción entre 0.029 mM de hematin y 29 mM de GA. En el recuadro superior derecho se muestra el espectro de GA 29 mM en NaOH 0.3 mM (equivalente a la solución de hematin).

6.3.3. Conclusiones

El empleo de quitosano modificado como soporte permitió la obtención de un catalizador heterogéneo económico, alternativo a HRP. Las herramientas de diseño experimental y

análisis estadístico demostraron nuevamente su capacidad de analizar paralelamente diferentes variables y las interacciones entre las mismas a partir de un trabajo experimental eficiente. La función deseabilidad por su parte permitió establecer las condiciones óptimas de inmovilización en GA: 0,33 mmol/g y hematin: 0,19 mmol/g.

Los catalizadores obtenidos de hematin soportado, si bien fueron menos activos que la metaloporfirina libre, presentaron buenas actividades de decoloración de RAS y NaII. Sumado a esto, mantuvieron la capacidad de decolorar soluciones de RAS después de seis usos consecutivos.

La caracterización de los catalizadores confirmó la inmovilización de hematin, y la interacción covalente entre los grupos carboxílicos del anillo porfirínico y aldehídos de glutaraldehído. Fue posible además descartar posibles alteraciones del sitio catalítico durante el proceso de inmovilización. Es decir, no se observaron modificaciones del anillo porfirínico por interacción covalente con quitosano modificado, ni formación de dímeros covalentes de hematin sobre los soportes. Asimismo, fue posible descartar la lixiviación del hierro durante el proceso de inmovilización.

En base a los resultados se puede concluir que la disminución de actividad producto de la inmovilización se debe a la restricción del acceso de los sustratos fenólicos al sitio catalítico y al resultante aumento de la relación molar H_2O_2 a sustrato fenólico. El uso de APTS como bloque espaciador es una herramienta sencilla y válida para resolver estos inconvenientes. La mayor "movilidad" adquirida por hematin, producto de esta separación desde la matriz polimérica aproxima el comportamiento del sistema heterogéneo a las reacciones con el catalizador soluble, de tal manera que el impedimento estérico producido durante la coordinación de los sustratos coloreados es significativamente menor. Aún así, este último catalizador fue menos activo hacia NaII en comparación con RAS debido a un mayor impedimento estérico causado por la libre rotación del enlace azoico. Debido a la mayor concentración local de moléculas de NaII en la vecindad de las hojuelas asociado a su gran capacidad de adsorción, sería esperable una mayor actividad con NaII en relación a RAS. Evidentemente, la interacción productiva del sustrato al sitio activo pareciera ser el aspecto más relevante en la actividad.

A los fines de desarrollar catalizadores heterogéneos que puedan ser aplicables a gran escala es imprescindible mejorar la resistencia mecánica de las hojuelas de quitosano. Con objeto de resolver este problema es que se estudió el empleo de bolillas de vidrio no porosas como soportes.

6.4. Inmovilización de hematin en bolillas de vidrio no porosas

La necesidad de aumentar la resistencia mecánica de los catalizadores obtenidos por inmovilización de hematin en hojuelas de quitosano modificado con APTS y GA, es que se propone el empleo de bolillas de vidrio como soporte. Estas bolillas de vidrio no porosas se caracterizan por su alta resistencia y bajo costo, cumpliendo así con las características necesarias para su aplicación en el desarrollo de sistemas de tratamiento de efluentes.

Esta etapa de preparación de catalizadores heterogéneos incluye una etapa previa de estudio del decapado ácido de las bolillas de vidrio no porosas, con el objeto de aumentar la superficie de las mismas. Una segunda etapa de inmovilización de quitosano sobre las bolillas y por último la inmovilización de hematin sobre las partículas obtenidas.

6.4.1. Metodología

6.4.1.1. Modificación superficial de las bolillas de vidrio

Tratamiento con $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}$

El decapado de las bolillas de vidrio consistió en poner en contacto 10 g de bolillas de vidrio no porosas (diámetro= 2 mm) con 100 ml de solución buffer compuesta por: 1.79 M de NH_4F + 0.328 M de HF, pH: 5, a una temperatura de 45°C (Etcheverry, 2010). La reacción se llevó a cabo en un reactor batch de acero inoxidable con cierre hermético bajo agitación magnética (Figura 6.17). Para evitar que el ataque del ácido fluorhídrico al material del reactor, se incorporó un recipiente plástico dentro del mismo, donde se produjo el decapado.

El tiempo de tratamiento fue de 4 horas, luego del cual se provocó el corte de la reacción por disminución de la temperatura y dilución del medio ácido con el agregado de 100 ml de H_2O destilada. Las bolillas fueron filtradas y enjuagadas con abundante agua destilada, y se contactaron con 200 ml de agua destilada bajo agitación magnética durante 24 hs para eliminar vestigios de ácido. Se registró el valor inicial y final de pH del agua de lavado. Por último, las bolillas tratadas se secaron en estufa a 80°C durante 2 h.

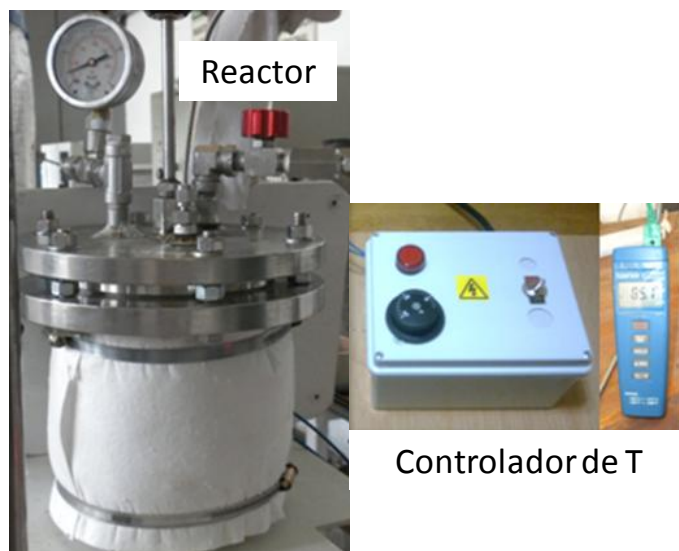


Figura 6.17. Reactor batch de acero inoxidable con control de temperatura.

Tratamiento con KOH

Para funcionalizar la superficie de las bolillas con grupos –OH se pusieron en contacto con una solución de KOH 4 N a 70°C durante 24 hs con agitación magnética en el reactor de acero inoxidable de la Figura 6.17. Luego del tratamiento se filtraron y enjuagaron con abundante agua destilada (Xiang Dong Liu et al., 2002; Ozmen et al., 2009).

6.4.1.2. Inmovilización de quitosano

En una primera etapa se contactaron las bolillas tratadas con una solución de 4% p/v de quitosano en ácido acético 4% v/v con agitación magnética a temperatura ambiente durante 9 h, luego de las cuales se separan de la solución por filtración.

En una siguiente etapa, se pusieron en contacto durante 1 h con agitación magnética, con una solución de NaOH al 10% para favorecer la fijación del quitosano sobre la superficie del vidrio. Las bolillas obtenidas se filtraron, se lavaron con agua destilada hasta pH constante del agua de lavado y se secaron en una estufa a 60°C durante toda la noche.

Las bolillas resultantes se someten a una reacción de entrecruzamiento con 4 ml de solución de GA al 25% y 6 ml de buffer fosfato pH 7 0.1 M, durante 7 h a temperatura ambiente con agitación magnética. Posteriormente, se filtran, se lavan con abundante agua destilada y se secan en un horno de vacío a 100°C durante una noche.

6.4.1.3. Inmovilización de hematin

Para dar lugar a la inmovilización de hematin, se contactan 5 mg de bolillas tratadas luego de los tratamientos de la sección 6.4.1.1 y 6.4.1.2, con 15 ml de solución de hematin 890 mg/l en NaOH 0.01 N, durante 4 h con agitación magnética. Se separan por filtración los catalizadores obtenidos y se lavan tres veces con 15 ml de agua bidestilada. Se toman muestras del sobrenadante y de las aguas de lavado y se determina la absorbancia a 387 nm para determinar por balance de masa el contenido de hematin soportado.

Finalmente, se lleva a cabo la desactivación de los grupos $-C=O$ libres, mediante la reacción de las bolillas con 15 ml de solución de Tris 0.5 M durante 4 h, con agitación magnética a temperatura ambiente. Las bolillas obtenidas se separan por filtración y se lavan tres veces con 15 ml de H₂O destilada. Se toman muestras del sobrenadante y de las aguas de lavado y se determina la absorbancia a 387 nm.

6.4.1.4. Caracterización del soporte y de los catalizadores obtenidos

Se obtuvieron micrografías SEM/EDAX de las bolillas sin tratar, de las bolillas sometidas al tratamiento de decapado con NH₄F/HF y de las bolillas obtenidas luego del tratamiento con KOH.

Se realizó una determinación de la densidad de amino superficial de acuerdo al método de adsorción de NaI en condiciones alcalinas, propuesto por Bartkowiak y colaboradores (Apéndice C) (Bartkowiak Roberts, G. A. F., 2007) a las bolillas resultantes del tratamiento de inmovilización de quitosano (sección 6.4.1.2).

Para las medidas actividad de los catalizadores heterogéneos obtenidos se coloraron: 5.0 g de catalizador en 20 ml de solución de RAS de 200 mg/l, a pH 9 y se añadieron 23 μ l de H₂O₂ (8.9 M) para dar inicio a la reacción. La decoloración se llevó a cabo a temperatura ambiente con agitación magnética. Se tomaron muestras del sobrenadante a las 24 h de transcurrida la reacción y se analizó la absorbancia a $\lambda = 511$ nm por espectroscopia UV-Visible para determinar el grado de decoloración.

6.4.2. Resultados

6.4.2.1. Modificación superficial de las bolillas de vidrio

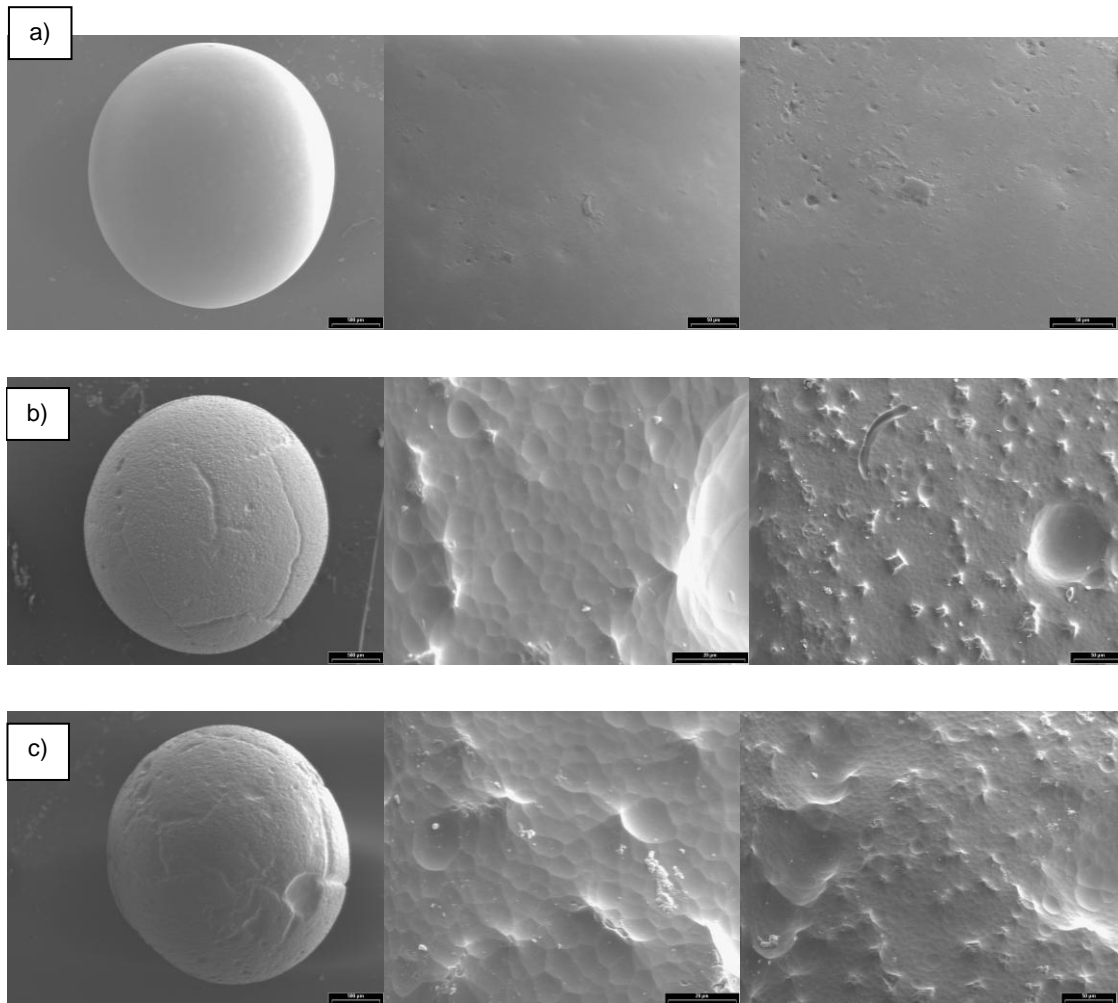


Figura 6.18. a) Bolillas de vidrio sin tratar. b) Bolillas de vidrio luego del tratamiento con HF/NH₄F a 45°C. c) Bolillas de vidrio luego del tratamiento con KOH a 70°C.

La Figura 6.18 presenta las micrografías SEM de las bolillas de vidrio sin tratar y las bolillas obtenidas luego del tratamiento de decapado ácido y del tratamiento de funcionalización con NaOH. Se observa en las Figuras 6.18 b y c la generación de una ligera rugosidad en la superficie del vidrio, respecto a la superficie del vidrio sin tratar (Figura 6.18, a). Es notorio el efecto de decapado ácido alcanzado, no obstante es necesario aumentar la violencia del tratamiento para lograr un aumento de superficie tal que permita su utilización eficiente como soporte de catalizadores. Por su parte, el tratamiento con KOH mostró un ligero incremento del daño sobre las bolillas. Resultados similares fueron presentados por otros autores en trabajos donde se observó el aumento de la rugosidad de la superficie del vidrio durante la etapa de activación con bases fuertes a altas temperaturas, incluso en tiempos de contacto cortos, que fueron desde 1h a temperaturas de 80°C (Ikediobi et al., 1998), 50

minutos a 50 °C (X D Liu, Tokura, Nishi, & Sakairi, 2003), y hasta 30 y 15 minutos (Xiang Dong Liu et al., 2002; Ozmen et al., 2009) con NaOH a 100 °C.

6.4.2.2. Inmovilización de quitosano

Durante la etapa de inmovilización de quitosano, las bolillas no mostraron un incremento de peso significativo, que pueda asociarse a quitosano adsorbido sobre la superficie de las mismas. En línea con este resultado, el valor medido de $-NH_2$ superficial fue del 0.01% en peso de bolillas, lo que indica que no fue posible inmovilizar quitosano sobre la superficie de las bolillas.

Liu y colaboradores han publicado estudios en los cuales obtuvieron porcentajes del inmovilización de quitosano del 0.3% p/p sobre bolillas de vidrio no porosas activadas con NaOH (X D Liu et al., 2003; Xiang Dong Liu et al., 2002). Por otro lado, Zhou y colaboradores publicaron un estudio de funcionalización de una columna capilar mediante la inmovilización exitosa de carboximetil quitosano (Zhou et al., 2010). La principal diferencia respecto a nuestros resultados radica en la silanización de la superficie del vidrio llevada a cabo en todos los estudios aquí mencionados. Luego de la activación con NaOH, el vidrio se puso en contacto con una solución de APTS en tolueno, lo cual produjo su silanización, y posteriormente se trató con glutaraldehído. Es posible inferir, por lo tanto, que una mayor separación desde la superficie promueve un menor contacto con el quitosano polimérico, así como también, la presencia de grupos $-C=O$ confiere mas actividad al soporte favoreciendo la interacción con el polímero.

Finalmente, durante la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído, el peso de las bolillas aumentó el 1.26 %, lo cual puede asignarse a la adsorción de poliglutaraldehído presente en la solución (Migneault et al., 2004; Shlomo Margel, 1980).

6.4.2.3. Inmovilización de hematin

Según los valores medidos de hematin en el sobrenadante y las aguas de lavado puede afirmarse que no fue posible inmovilizar hematin sobre las partículas. Por lo tanto, es posible inferir que la diferencia de peso asociada a la adsorción de poliglutaraldehído en la superficie de las partículas de vidrio no necesariamente implica la disponibilidad significativa de grupos $-C=O$ reactivos.

Por otro lado, el estudio de actividad en la decoloración de RAS dió como resultado una conversión del 4.8% en 24 h de reacción. Esta conversión se encuentra en los márgenes de la posible oxidación por acción de H₂O₂ en ausencia de catalizador (ver Capítulo 5).

6.4.3. Conclusiones

El pretatamiento de decapado con HF/NH₄F, propuesto para aumentar la superficie de las bolillas de vidrio, permitió aumentar la rugosidad de las bolillas de vidrio. Sin embargo, es necesario analizar el efecto del tiempo de contacto, así como también las temperaturas de reacción, para lograr un efecto más marcado que permita la aplicación de estas bolillas como soportes resistentes y eficaces.

No fue posible inmovilizar quitosano sobre la superficie del vidrio, y teniendo en cuenta la bibliografía existente en el tema es posible suponer que la silanización de las bolillas de vidrio es necesaria para aumentar su reactividad.

Por su parte, fue posible confirmar la adsorción de glutaraldehído sobre la superficie del vidrio. Sin embargo, la presencia de poliglutaraldehído en solución nos permite suponer la adsorción de oligómeros sobre la superficie del vidrio, los cuales poseen una muy baja proporción de grupos aldehídos libres, capaces de interactuar con hematin. Esta puede considerarse la principal causa por la cual no fue posible inmovilizar el biomimético.

Finalmente, las bolillas resultaron ser inactivas en la decoloración de RAS, en línea con la ausencia de fase activa de catalizador en las mismas.

6.5. Resultados publicados

Los resultados que se presentan en este capítulo fueron publicados en:

- V Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, realizado en La Plata en el año 2012, bajo el título: “Inmovilización de peroxidasa y hematin sobre quitosano con glutaraldehído como agente acoplante.” Autores: Agostina Córdoba, Ivana Magario, María Lujan Ferreira.
- Journal of Chemical Technology and Biotechnology: “Modified chitosan as an economical support for hematin: Application in the decolorization of anthraquinone

and azo dyes.” Autores: Agustina Córdoba, Ivana Magario, María Luján Ferreira.
DOI 10.1002/jctb.4475.

PARTE III

ESTUDIOS CINÉTICOS

CAPÍTULO 7

ESTUDIO CINÉTICO Y MODELADO DE SISTEMAS HOMOGÉNEOS HEMATIN/H₂O₂

- *Se demuestra la capacidad de hematin de **producción de O₂** en presencia de sustratos fenólicos.*
- *Se presenta evidencia de la formación del **intermediario E_I** con ambos catalizadores.*
- *Se establece que la etapa limitante de las velocidades de reacción de hematin es la formación de E_I.*
- *Se confirma el mecanismo pseudo-catalítica de consumo de H₂O₂ para HRP.*
- *Se obtienen buenos ajustes al **modelo catalítico** con una propuesta de inactivación por blanqueamiento a partir de E₀.*

7.1. Introducción

La cinética química es la disciplina que estudia la velocidad con la que transcurre una transformación química. Desde el punto de vista del aprovechamiento industrial de una reacción, se obtiene como resultado una “ley de velocidad empírica” sobre la cual se basa la elección de la configuración de reactores más apropiada. Es una práctica habitual, sin embargo, basarse en estudios cinéticos con objeto de soportar o descartar propuestas de mecanismos de reacción para lograr predecir el curso de una reacción en un rango de condiciones diferente al estudiado. De todas maneras, determinar la naturaleza exacta de la secuencia de reacciones que componen un mecanismo es una rigurosa labor basada en el análisis de diferentes estudios cinéticos acoplado a la caracterización de intermediarios y productos de reacción. Como resultado, se identifica un mecanismo de reacción como el *más probable*, considerando además la posibilidad de que nuevos estudios puedan refutarlo. De esta manera, se proponen modelos de acción lo más simples posibles, que se van complejizando solo si existe falta considerable de concordancia con la observación experimental. A la hora de determinar el mecanismo de reacción de hematin, el estudio de las reacciones en ausencia de sustrato fenólico nos permite obtener información respecto a dos importantes etapas: (1) la etapa de activación del estado nativo de hematin por reacción con H₂O₂; y (2) las etapas de inactivación del catalizador por reacciones no productivas con el oxidante. La formación de E_I y las reacciones de HRP con el agente oxidante han sido objeto de estudio de numerosos trabajos de investigación (H B Dunford, 1999; H Brian Dunford, 2002; Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001; Loew, Harris, & Dupuis, 1997; J A Nicell & Wright, 1997; Reihmann & Ritter, 2006; Rich & Iwaki, 2007; Veitch, 2004; Vlasits et al., 2010; Vojinovic et al., 2004). Estos estudios, entre otros, permitieron dilucidar los mecanismos de activación de HRP, así como la naturaleza de los intermediarios catalíticos activos e inactivos, y su mecanismo de producción de O₂ en ausencia de sustrato fenólico conocido como “actividad catalasa” de las peroxidasas.

Estudios similares hacen foco en la determinación del mecanismo de acción de distintas metaloporfirinas (Bell et al., 1991; Bruice, Balasubramanian, Lee, & Smith, 1988; Hodges et al., 1997; S. Nam, Renganathan, & Tratnyek, 2001; W. Nam, Han, et al., 2000; REBELO, PEREIRA, SIMOES, NEVES, & CAVALEIRO, 2005; Stephenson & Bell, 2007b; Traylor & Xu, 1987). Una discusión detallada de las mismas se desarrolló en el Capítulo 1. No obstante, aún no hay certezas y los principales aspectos aún no dilucidados incluyen: (1) el tipo de ruptura del enlace O–O del reactivo peroxídico; (2) la naturaleza de los intermediarios catalíticos intervinientes; (3) la generación de radicales inorgánicos como O₂^{•-}, los cuales son altamente reactivos e inespecíficos.

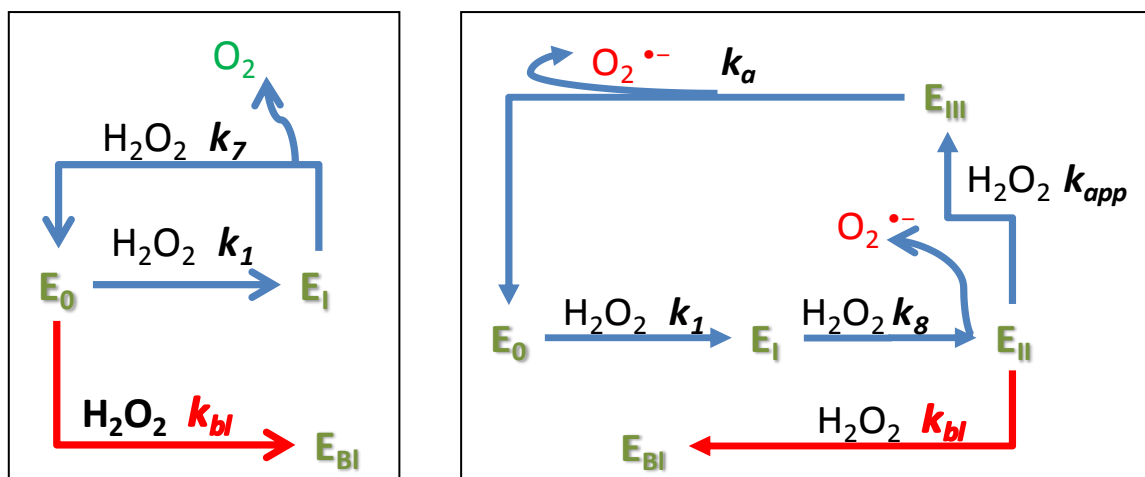
A la hora de proponer un mecanismo posible de reacción, a la luz de los resultados que se presentan en los capítulos anteriores, partimos de la premisa de que el biomimético es capaz de formar los mismos intermediarios de reacción (E_I y E_{II}) que HRP.

En el Capítulo 2 se demostró que la velocidad de reacción de cooxidación de fenol/AAP presenta una dependencia lineal con las concentraciones de hematin y H₂O₂. Sin embargo, a concentraciones de peróxido de hidrógeno mayores a 10 mM, se observó una velocidad de reacción cuasi-constante a (0.3 mg/l de hematin a pH 7). Sumado a esto, la dependencia de la velocidad de reacción con la relación molar H₂O₂:hematin disminuye linealmente a valores inferiores a 3000, manteniéndose casi constante para relaciones mayores de peróxido:catalizador (Figura 2.3, Capítulo 2). Estas observaciones indican la participación de reacciones alternativas a altas concentraciones de oxidante, las cuales no se relacionan necesariamente a la formación de compuestos inactivos, ya que la reacción de cooxidación no se detiene. Los resultados aquí mencionados son consistentes con una propuesta de reacción que incluya: (1) vías de inactivación a baja concentración de oxidante que permita explicar la disminución de la velocidad con el aumento de H₂O₂:hematin; y (2) vías de recuperación paralelas al mecanismo principal, para concentraciones altas de H₂O₂, que expliquen el amesetamiento de la velocidad con la relación peróxido:catalizador (para relaciones molares H₂O₂:hematin > 3000).

Los resultados de optimización de las condiciones de reacción que se presentan en los Capítulos 4 y 5 permiten observar una recuperación del rendimiento catalítico a altas concentraciones de oxidante y hematin, para lo cual se propone también la participación de vías alternativas de recuperación hacia especies activas del catalizador. A su vez, las mediciones de oxígeno disuelto que se presentan en el Capítulo 4 muestran la producción de oxígeno molecular en presencia de hematin, mientras que los resultados de modelado molecular demostraron la capacidad del intermediario catalítico E_I del biomimético para coordinar a una molécula de H₂O₂, compitiendo con el sustrato fenólico.

El mecanismo de acción de hematin (Esquema 1.6) propuesto por Akkara et al. implica una vía catalítica “complejizada” que involucra la coordinación de 2 moléculas de H₂O₂ para la formación de los intermediarios E_I y E₀ además de la reversibilidad de la reacción de regeneración del estado nativo con producción de oxígeno durante su activación (Akkara et al., 2000).

En base a todo lo anterior, se proponen inicialmente dos mecanismos simples de consumo de H₂O₂, la vía catalítica y la *pseudo*-catalítica, las cuales se detallan en el Esquema 7.1 y que representan a su vez los mecanismos probables de acción para HRP, en ausencia de sustrato fenólico.



Esquema 7.1. Izquierda: Mecanismo Catalítico de consumo de H₂O₂ con producción de oxígeno. Derecha: Mecanismo *Pseudo*-catalítico de consumo de H₂O₂ con producción de radicales O₂^{•-}.

En ambos mecanismos se incluyen, además, vías de inactivación reportadas anteriormente por I. Cunningham y sus colaboradores durante el estudio de las vías de inactivación de la porfirina sintética F₂₀TPFeCl (Tetra-*kis*(pentafluorofenil)-21H,23H-Cloroporfina de Fe(III)), durante la epoxidación catalítica de alquenos en presencia de H₂O₂ (Cunningham et al., 2001).

El modelado cinético y la estimación de constantes de velocidad por medio del ajuste a datos experimentales, se emplean como herramientas para discernir entre ambos mecanismos. El objetivo de este capítulo es identificar la principal ruta de acción de hematin-H₂O₂ para optimizar las condiciones de operación en vistas de su aplicabilidad en la degradación de colorantes fenólicos. Se persigue, además, responder los siguientes interrogantes, planteados en el Capítulo 1:

- (1) ¿La ruptura del enlace O–O es homolítica o heterolítica en las condiciones a estudiar?
- (2) ¿Son las especies reactivas de oxígeno las responsables de la oxidación de los sustratos orgánicos? O se forman radicales orgánicos por abstracción de H, de manera análoga a HRP.

7.2. Metodología

El desarrollo del presente capítulo incluye una etapa experimental de recolección y análisis de datos cinéticos, seguida de una etapa de modelado matemático y parametrización.

7.2.1. Etapa experimental

7.2.1.1. Determinación de perfiles de concentración de H₂O₂

Los perfiles de consumo de H₂O₂ se determinaron en el marco de un proyecto integrador, realizado por Cecilia Cabrera y Andrés Cornaglia bajo la dirección de las Dras. Ivana Magario y Adriana Brandolin. Las condiciones de los experimentos se detallan en la Tabla 7.1. Se realizaron 15 experimentos, distribuidos en 4 series de distinta concentración de hematin. Las reacciones se condujeron en buffer carbonato/bicarbonato 0.01M, pH 10,6, con un volumen de reacción de 50 ml. Se tomaron alícuotas de 1 ml a distintos tiempos de reacción y se determinó la concentración de H₂O₂ por titulación iodométrica con un error en la determinación del 2,02% (I. M. Kolthoff E. J. Meehan, Stanley Bruckenstein, 1972). En todos los casos la temperatura se mantuvo a 30°C, y el sistema se agitó magnéticamente, mediante el empleo de un baño térmico (ver Figura 7.1).

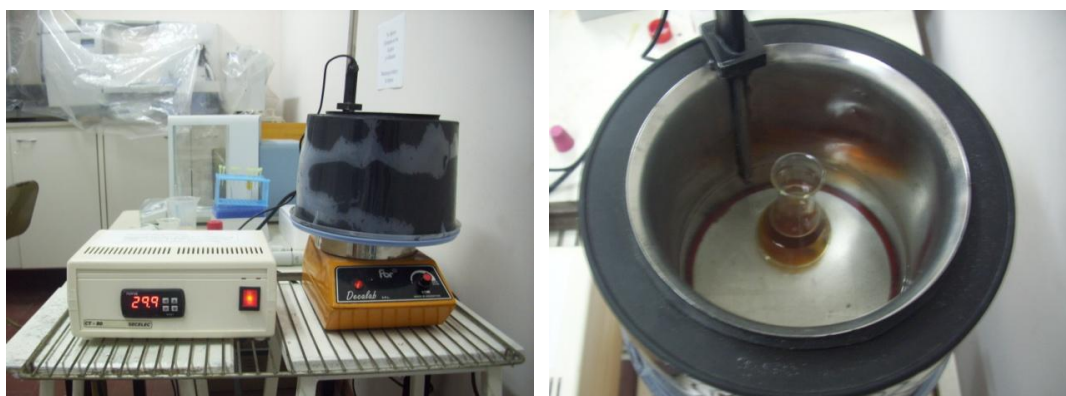


Figura 7.1. Baño termostatzado con agitación magnética.

7.2.1.2. Determinación de perfiles de oxígeno disuelto

Los perfiles de oxígeno disuelto fueron obtenidos por la Dra. Magario, con un sensor Pasco passport Dissolved Oxygen PS-2108 (California, EE.UU.). La reacción se llevó a cabo con agitación magnética a 25 °C, en buffer fosfato 0.1 M pH 7 en un volumen final de 50 ml. Los catalizadores empleados fueron HRP y hematin. El agregado de H₂O₂ se realizó en una etapa para dar inicio a la reacción. Las condiciones experimentales fueron: [catalizador]: 6 mg/l, [H₂O₂]: 17 mM. Además, se presentan resultados extras de la medición de oxígeno disuelto para sistemas fenol/H₂O₂ y AAP/fenol/H₂O₂ con ambos catalizadores en las

siguientes condiciones: [catalizador]: 6 mg/l, [H₂O₂]: 17 mM, [fenol]: 8.35 mM, [AAP]:0.11 mM y pH:7.

Tabla 7.1. Condiciones de reacción empleadas.

Exp N°	[hematin] (mg/l)	[H ₂ O ₂] ₀ (mM)	Relación molar [H ₂ O ₂]:[hematin]	[H ₂ O ₂] _f (mM)	-r _[H₂O₂] (mM/min)
1*	10	2.4	152	0.97	1.1046
2*	10	4.8	304	2.74	2.2069
3	10	7.3	462	4.29	3.1677
4	10	9.6	608	5.79	4.7470
5*	17	2.4	88	0.08	1.5576
6*	17	7.3	269	0.00	4.0397
7	17	9.6	354	3.49	6.2485
8*	25	2.4	61	0.00	1.6690
9*	25	4.8	122	0.64	2.9323
10*	25	7.3	185	2.40	5.6888
11	25	9.6	243	3.76	5.8887
12*	30	2.4	51	0.00	2.3904
13*	30	4.8	101	0.00	3.6659
14	30	7.3	154	1.03	4.6473
15	30	9.6	203	2.15	8.9938

*Experimentos empleados en la parametrización de los modelos.

7.2.1.3. Análisis UV-Visible del avance de reacción

Las modificaciones del espectro UV-Visible de hematin/HRP, producto de la interacción con el agente oxidante fueron estudiadas para dos concentraciones de H₂O₂. Las reacciones se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo con una concentración de catalizador de 5 mg/l. Las concentraciones de H₂O₂ empleadas fueron 0.56 y 4.7 mM. El medio de reacción utilizado fue buffer carbonato/bicarbonato pH 10, con una concentración de 0.1 M para hematin, y 0.01 M en caso de HRP. El espectro UV-Vis se midió previo al agregado de peróxido y luego de la adición del oxidante durante 60 minutos de reacción a intervalos de minutos.

7.2.2. Modelado

Modelos cinéticos

Para describir el comportamiento de un sistema nos planteamos diferentes modelos matemáticos basados en principios físicos, químicos, termodinámicos, de fenómenos de transporte y cinéticos. Los parámetros involucrados en estos modelos pueden estimarse en base a datos experimentales, con objeto de emplear, posteriormente, el modelo con fines predictivos (Englezos & Kalogerakis, 2000). Los mecanismos de reacción que se analizan en este capítulo pueden formularse como modelos matemáticos que expliquen el comportamiento cinético del sistema. Estos consisten en un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) y algebraicas que resultan de plantear el balance molar para cada compuesto interviniente en un reactor discontinuo, cuyos parámetros ajustables son las constantes cinéticas significativas.

La descripción matemática del **mecanismo catalítico** del Esquema 7.1 obtenida en función de los balances de H₂O₂, O₂, e intermediarios catalíticos participantes se presenta a continuación:

$$\frac{d[E_0]}{dt} = - (k_1 + k_{bl}) [E_0][H_2O_2] + k_7 [E_I][H_2O_2] \quad (7.1)$$

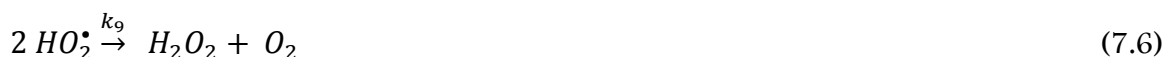
$$\frac{d[E_I]}{dt} = k_1 [E_0][H_2O_2] - k_7 [E_I][H_2O_2] \quad (7.2)$$

$$\frac{d[E_i]}{dt} = k_{Bl} [E_0][H_2O_2] \quad (7.3)$$

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = - k_1 [E_0][H_2O_2] - k_7 [E_I][H_2O_2] \quad (7.4)$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_7 [E_I][H_2O_2] \quad (7.5)$$

El modelo matemático del **mecanismo pseudo-catalítico** del Esquema 7.1 produce la formación de O₂ con el agregado de la siguiente reacción (Haber & Willstätter, 1931):



Las ecuaciones que representan este modelo se detallan a continuación.

$$\frac{d[E_0]}{dt} = -k_1 [E_0][H_2O_2] + k_a[E_{III}] \quad (7.7)$$

$$\frac{d[E_I]}{dt} = k_1 [E_0][H_2O_2] - k_8[E_I][H_2O_2] \quad (7.8)$$

$$\frac{d[E_{II}]}{dt} = k_8 [E_I][H_2O_2] - (k_{app} + k_{Bl})[E_{II}][H_2O_2] \quad (7.9)$$

$$\frac{d[E_{III}]}{dt} = k_{app} [E_{II}][H_2O_2] - k_a[E_{III}] \quad (7.10)$$

$$\frac{d[E_i]}{dt} = k_{Bl} [E_{II}][H_2O_2] \quad (7.11)$$

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = -k_1 [E_0][H_2O_2] - k_8[E_I][H_2O_2] - (k_{app} + k_{Bl})[E_{II}][H_2O_2] + k_9 [HOO^\bullet]^2 \quad (7.12)$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_9 [HOO^\bullet]^2 \quad (7.13)$$

Estimación de parámetros

La estimación de las constantes de velocidad de cada uno de los modelos, en base a los datos experimentales, se realizó mediante el empleo del software comercial gPROMS 3.2 (general PROcess Modeling System, Process System Enterprise Ltd., Londres, Reino Unido). Para esto se trabajó con la herramienta de estimación de parámetros de gPROMS, la cual resuelve el problema de estimación luego de recibir información del modelo, de proporcionar valores (iniciales) para cada una de las constantes cinéticas y de las condiciones de contorno para cada EDO. La estimación de parámetros tiene como objetivo encontrar el valor de las constantes de un modelo de manera tal que el perfil simulado se ajuste con determinado grado de desviación a los perfiles experimentales para cada medición experimental.

Una de las ventajas del software seleccionado para esta tarea, gPROMS, reside en la posibilidad de efectuar modelado dinámico, es decir a partir de datos del estado transiente y estacionario de las reacciones estudiadas. A su vez, presenta la posibilidad de ajustar los parámetros del modelo de varianza.

El programa permite la selección de tres modelos de varianza: (1) de varianza constante, para el cual el error medido presenta una desviación estándar (ω) constante; (2) de varianza constante relativa, en el cual el error medido depende de la magnitud del valor medido; y (3) de varianza heteroscedástica, donde el error medido depende de los valores medidos proporcionalmente a $z^{1/2}$ (Process Systems Enterprise ., 2004). Los dos primeros

modelos incluyen un parámetro, ω , mientras que el modelo de varianza heteroscedástica incluye además el parámetro γ .

La función de estimación de parámetros de gPROMS se basa en la evaluación simultánea de dos tipos de parámetros, los parámetros del modelo planteado y aquellos correspondientes al modelo de varianza de la variable medida, seleccionado entre las opciones propuestas por el programa (Process Systems Enterprise ., 2004).

La parametrización es una tarea de optimización en donde se intenta minimizar una función objetivo que involucra el error definido como función de las diferencias cuadráticas entre los valores modelados y los experimentales. Asumiendo que los errores (ϵ_{ijk}) son independientes, presentan distribución normal con media cero y varianza σ_{ijk} , la función objetivo se define como:

$$\theta = \frac{N}{2} \ln (2\pi) + \frac{1}{2} \min_{\theta} \left\{ \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NV_i} \sum_{k=1}^{NM_{ij}} \left[\ln (\sigma_{ijk}^2) + \frac{(\tilde{z}_{ijk} - z_{ijk})^2}{\sigma_{ijk}^2} \right] \right\} \quad (7.14)$$

En donde:

N: Número total de mediciones tomadas durante los experimentos realizados, empleados para la parametrización.

θ : Conjunto de parámetros a ser estimados, cuyos valores aceptables se encuentran sujetos a un intervalo definido por el usuario.

NE: Número de experimentos realizados, empleados para la parametrización.

NV_i: Número de variables medidas en el experimento i.

NM_{ij}: Número de mediciones de la variable j th en el experimento i th.

σ_{ijk}^2 : Varianza de la medición k th de la variable j en el experimento i. Determinanda mediante el modelo de varianza de las variables medidas.

\tilde{z}_{ijk} : Valor de la medición k th de la variable j en el experimento i.

z_{ijk} : Valor k th de la variable j en el experimento i predicho por el modelo.

Este proceso de estimación emplea resolvidores intrínsecos de gPROMS que consisten en algoritmos numéricos cuya función es resolver el problema mediante métodos numéricos iterativos. El solver MAXLKHD se implementó para la estimación de parámetros, siguiendo el método de máxima verosimilitud (Process Systems Enterprise ., 2004). El solver estándar DASOLV se empleó para la integración de las ecuaciones del modelo y sus ecuaciones de sensibilidad. Este último se basa en fórmulas de diferenciación hacia atrás (en inglés, backward differentiation Formulae, BDF) con paso de tiempo variable. La herramienta de estimación de parámetros de gPROMS emplea el test estadístico χ^2 (95 %) para determinar la bondad del ajuste del modelo. Si la suma de los residuos ponderados es menor que el valor de Chi-cuadrado (χ^2 (95%)), se obtiene un buen ajuste (“good fit”).

La sensibilidad de las constantes de velocidad a evaluar se determinó mediante análisis de sensibilidad global del modelo dinámico, para el cual se realizan simulaciones con valores iniciales de las constantes y, variaciones del $\pm 20\%$ de los mismos.

En la parametrización de ambos modelos, las concentraciones iniciales de catalizador (E_0), y H_2O_2 se fijaron en base a las condiciones experimentales. Mientras que las concentraciones iniciales de O_2 , así como la de los intermediarios catalíticos se valoraron en cero. A su vez, no se consideró la suposición de estado estacionario de los intermediarios catalíticos.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Perfiles de consumo de H_2O_2

Los perfiles de consumo de H_2O_2 obtenidos se presentan en la Figura 7.2. De todos los perfiles cinéticos obtenidos puede establecerse un consumo de H_2O_2 de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor que la concentración molar de hematin, lo que indica la presencia de un ciclo catalítico. Por otro lado es importante mencionar, que determinaciones de la concentración de H_2O_2 en el tiempo, en ausencia de catalizador no presentaron disminución de la concentración, hecho que afirma la actividad catalítica de hematin en este sistema reactivo además de la estabilidad química de H_2O_2 en el medio buffer utilizado.

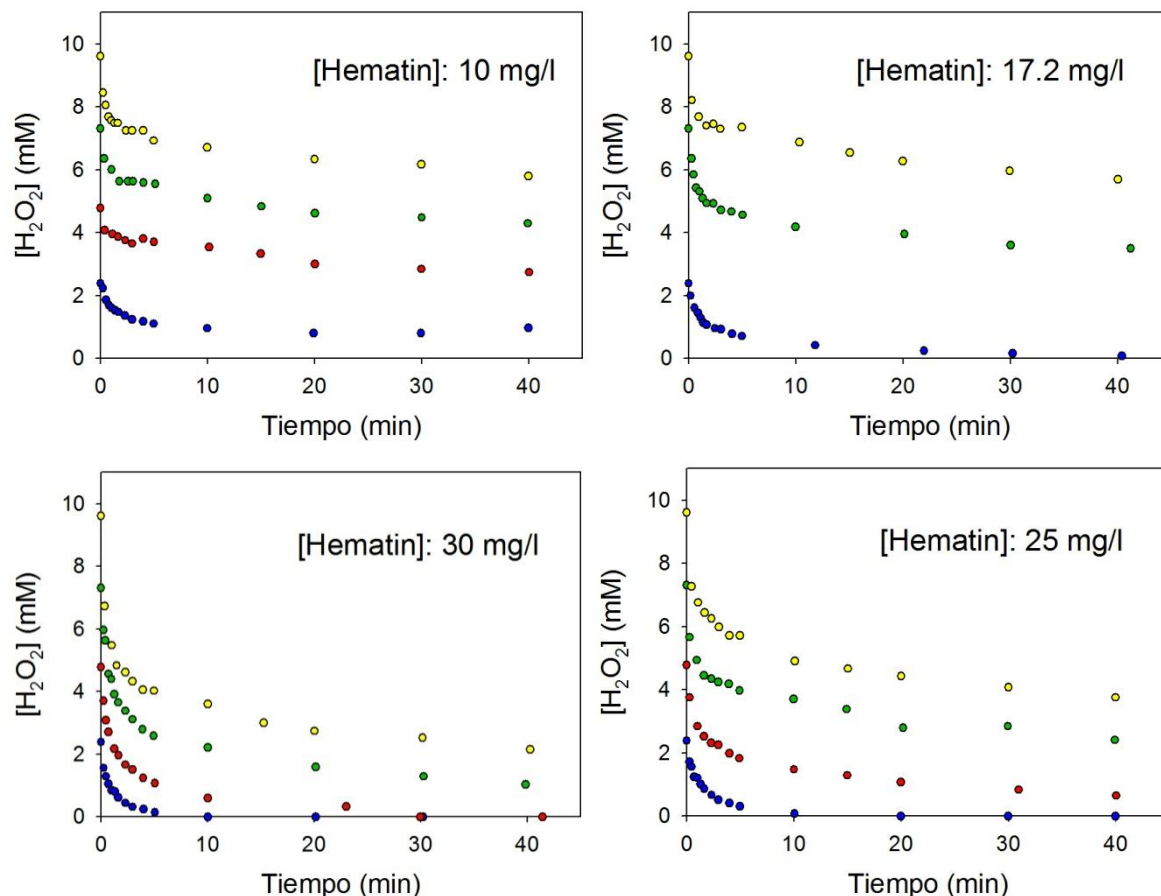


Figura 7.2. Perfiles de consumo de H₂O₂. [H₂O₂]: 2.4mM (●), [H₂O₂]: 4.8 mM (●), [H₂O₂]: 7.3 mM (●), [H₂O₂]: 9.6 mM (●).

Se observa un comportamiento bifásico, compuesto por una primera etapa (en general hasta los 5 minutos de reacción) caracterizada por una alta velocidad de consumo de peróxido, la cual disminuye ampliamente para la etapa posterior de reacción. A su vez, en la mayoría de los casos no se consume el peróxido en su totalidad, lo cual es evidencia de la formación de un intermediario catalíticamente inactivo, o de mucha menor actividad (Cunningham et al., 2001). Sólo cuando la relación molar H₂O₂/hematin es baja la conversión del primero es completa y esto reafirma la hipótesis anterior. La Figura 7.3 muestra las velocidades de consumo de H₂O₂, en la segunda etapa de reacción. Se observa que la concentración inicial de H₂O₂ no afecta significativamente las velocidades de consumo. Sin embargo, las velocidades registradas son mayores a mayor concentración de catalizador.

Cada perfil concentración–tiempo obtenido se ajustó a una función exponencial de tipo:

$$y = ae^{-bx} + c \quad (7.15)$$

Luego, la derivada a tiempo cero de cada curva es el producto de los parámetros a y b obtenidos por la regresión.

$$-\left(\frac{dy}{dx}\right)_{t=0} = -r_0 = ab \quad (7.16)$$

De esta manera se obtuvieron las velocidades iniciales para cada concentración inicial de peróxido incluyendo en la regresión los puntos correspondientes a los 5 primeros minutos de reacción, fundamentalmente para evitar los efectos provocados por la presencia de productos de reacción. Las velocidades iniciales se presentan en la Tabla 7.1.

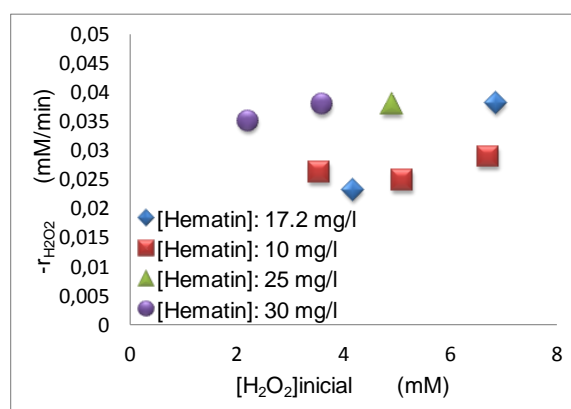


Figura 7.3. Velocidad de consumo de H₂O₂ (una vez inactivado el catalizador) frente a la concentración inicial de H₂O₂ para distintas concentraciones de hematin.

La Figura 7.4 muestra la variación de las velocidades iniciales con la concentración inicial de H₂O₂ y de catalizador. De la gráfica de $-r_{H_2O_2}$ vs. $[H_2O_2]$, puede observarse que el buen ajuste de los puntos a una curva lineal indica una cinética de primer orden respecto a la concentración de peróxido. Este hecho puede indicar que la etapa controlante de la velocidad es la etapa de activación del catalizador con H₂O₂. A su vez, la pendiente de las rectas aumenta a medida que aumenta la concentración de catalizador empleada, lo cual es acorde con la intervención de hematin para la descomposición de H₂O₂. Por su parte, la dependencia de la velocidad inicial de reacción con la concentración de catalizador también es lineal. Las rectas obtenidas no pasan por el origen, lo que indica la posibilidad de un consumo no catalítico de H₂O₂ que aumenta mientras mayor es la concentración de H₂O₂ utilizado. Sin embargo, en ausencia de catalizador no se registró ninguna disminución de la concentración de H₂O₂. No obstante, analizando las bondades del ajuste

lineal que se presentan en ambas figuras, no es posible descartar una relación polinómica de mayor orden entre la velocidad de reacción y la concentración de H₂O₂, la que puede evidenciarse por el valor de R² para el ajuste lineal (0.86) frente al valor de R² para el ajuste a una función cuadrática (0.96) para el caso de 30 mg/l de hematin.

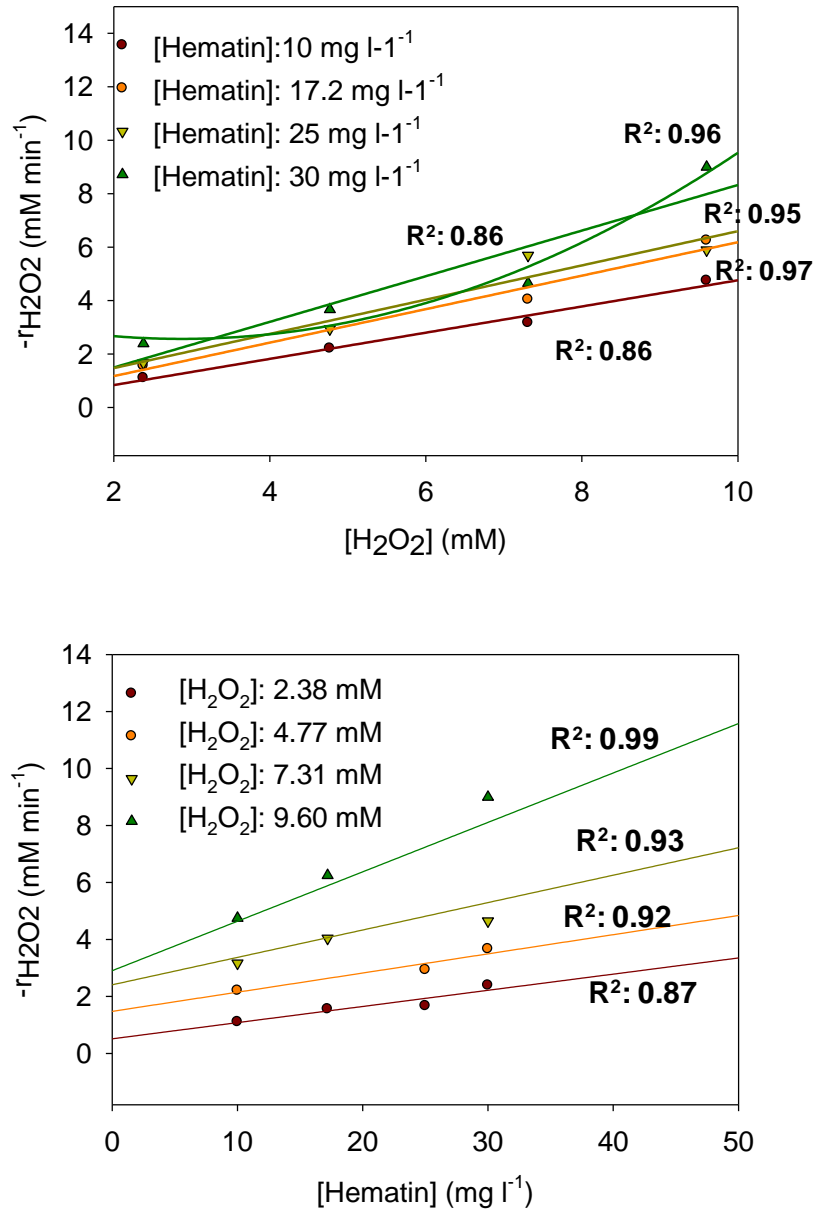


Figura 7.4. Variación de la velocidad de consumo de H₂O₂ con la [H₂O₂] y [hematin].

La Figura 7.5 presenta la velocidad de reacción en función de la relación molar H₂O₂:hematin. Lo primero que es necesario mencionar es que para sistemas hematin/fenol/AAP/ H₂O₂ a pH: 7, el comportamiento observado era el inverso, es decir la velocidad de degradación del fenol disminuía con el aumento de la relación

oxidante:catalizador. En este caso, para las concentraciones más bajas de hematin analizadas (10 mg/l y 17.2 mg/l) se observa una dependencia lineal de la velocidad con el aumento de la relación oxidante:catalizador, lo cual nos permite inferir que existe un solo mecanismo de reacción posible sin evidencia de inactivación del catalizador.

No obstante, para concentraciones de 25 y 30 mg/l de catalizador, se observó una relación compleja de la velocidad inicial de reacción con la relación de H₂O₂:hematin. Este comportamiento puede indicar: (1) que existen vías de consumo de peróxido extras; y/o (2) que para altas concentraciones de hematin, el mismo se encuentra formando oligómeros inicialmente, los cuales se desagregan en función de la concentración de H₂O₂ del medio de reacción.

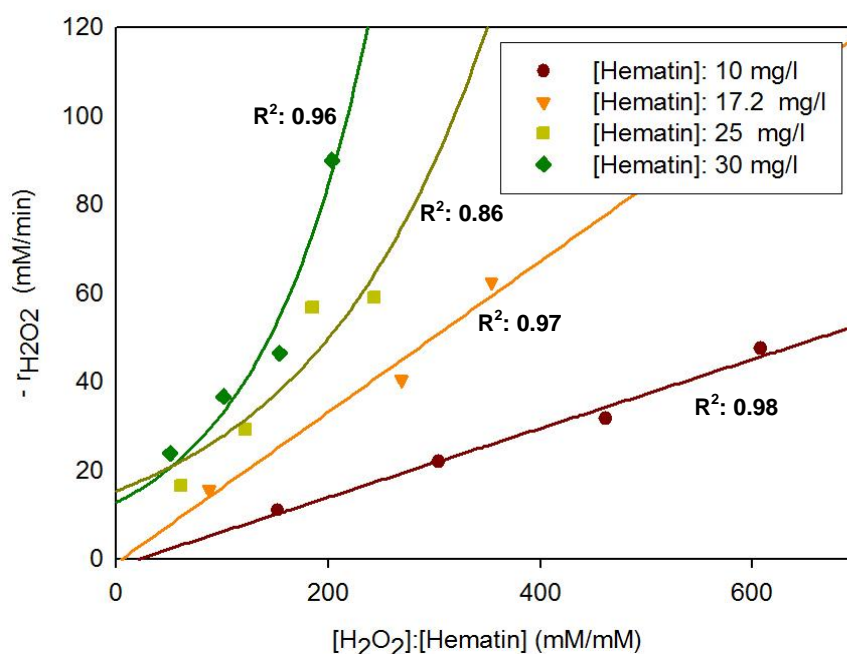


Figura 7.5. Velocidad inicial de consumo de peróxido de hidrógeno en función de la relación molar $[H_2O_2]:[Hematin]$.

7.3.2. Producción de O₂

La Figura 7.6 muestra la evolución de oxígeno obtenida para sistemas hematin/H₂O₂ y HRP/H₂O₂, junto a perfiles de oxígeno disuelto para los mismos sistemas en presencia de fenol y AAP/fenol. Se observa un claro aumento en la concentración de O₂ en presencia de H₂O₂ como sustrato único con ambos catalizadores. Sin embargo la producción es mayor, y a mayores velocidades en el sistema catalizado por hematin en comparación con HRP.

Los resultados que se presentan en el Capítulo 4 evidenciaron que en los sistemas RAS/H₂O₂/HRP no se genera O₂. Similares resultados entregaron las mediciones de la reacción AAP/Fenol/H₂O₂/HRP y fenol/H₂O₂/HRP (Figura 7.6). Estos resultados nos permiten afirmar que la vía de producción de O₂ de HRP se ve inhibida en presencia de sustratos fenólicos, en analogía con los estudios publicados por Hernández-Ruiz (Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001).

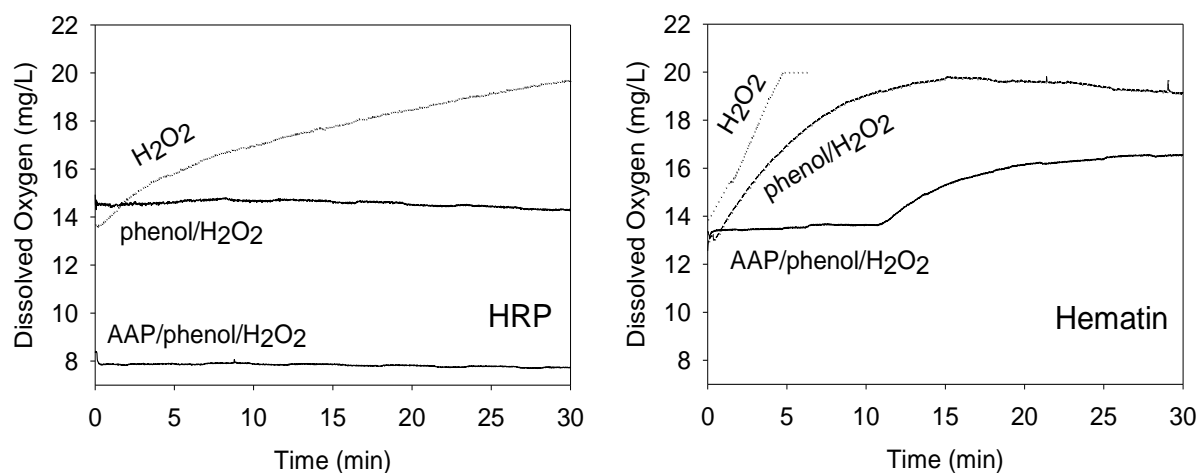
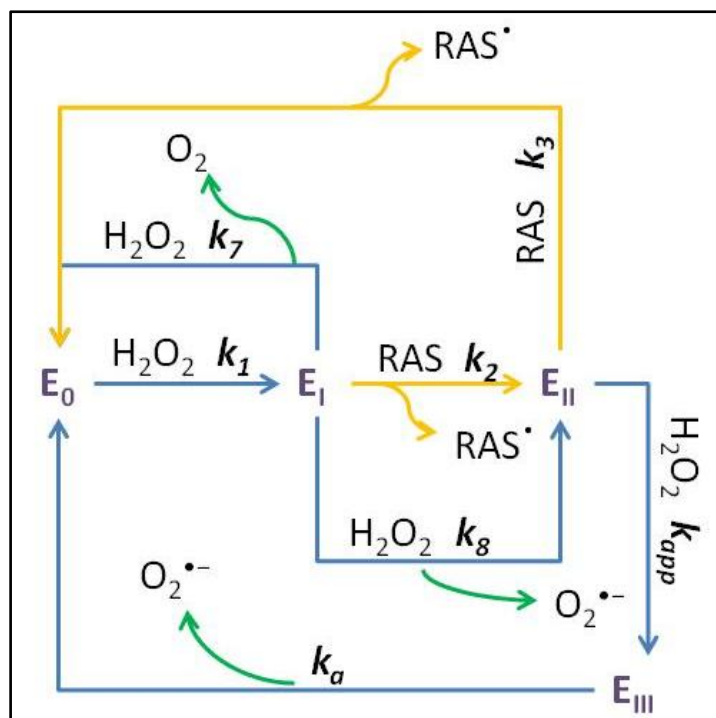


Figura 7.6. Evolución de perfiles de oxígeno disuelto catalizada por HRP y hematin para sistemas catalizador/H₂O₂. [Catalizador]: 6 mg/l, [H₂O₂]: 17 mM.

Del análisis de los estudios de modelado molecular, pudimos determinar que el compuesto 1 (E₁) de ambos catalizadores puede interaccionar con H₂O₂ como sustrato reductor, en condiciones alcalinas de pH (ver Esquema 7.2). No obstante, en el caso de la enzima el compuesto 1 presenta mucha mayor selectividad hacia los sustratos fenólicos, mientras que E₁ de hematin no demostró preferencias significativas entre Rojo de Alizarina S (RAS) y peróxido de hidrógeno (Capítulo 4). Con hematin como catalizador se observó una evolución importante de oxígeno desde el principio de la reacción en el sistema de fenol/H₂O₂. Por otro lado, durante el estudio de la reacción de oxidación de RAS, también se observó producción de O₂ para el sistema catalizado por hematin. Sin embargo, en ausencia de sustrato fenólico la velocidad de producción de O₂ es mayor, lo que puede vincularse la coexistencia para ambos sistemas de la vía catalítica en competencia con la vía peroxidica.



Esquema 7.2. Reacciones posibles entre los intermediarios catalíticos de hematin propuestos, H₂O₂ y Rojo de Alizarina S (RAS), sin considerar vías de inactivación.

Los resultados obtenidos para el sistema hematin/AAP/fenol/H₂O₂ demuestran la ausencia de producción de O₂ en una primera etapa de la reacción. De este estudio se pudo concluir que esta etapa de no liberación de oxígeno coincide con el período en el cual se agota AAP en el medio de reacción. Luego de agotado este reactivo, el cual reacciona con los radicales fenoxi formados, se observa un claro incremento en la concentración de O₂. Esto permite postular dos posibles hipótesis: (1) que la vía de generación de oxígeno gaseoso en presencia de sustrato fenólico se asocia directamente a la participación de los radicales orgánicos formados durante el ciclo catalítico; o (2) que las moléculas de AAP presentes en el medio de reacción actúen capturando radicales inorgánicos formados en el ciclo de reacciones de hematin. A la luz de estos resultados, podemos inferir que durante la catálisis de hematin se generan radicales inorgánicos que intervienen en etapas posteriores de degradación de los radicales fenoxilos. Este hecho se sustenta, a su vez, en la ausencia de polimerización de fenol observada con hematin, en contraposición a los resultados obtenidos con la enzima (Capítulo 2). Los radicales inorgánicos que participarían en la degradación de fenoxi pueden ser los mismos radicales superóxido (HO₂[•]) resultantes de un mecanismo pseudo-catalítico.

No obstante estas consideraciones, es necesario mencionar que las vías de inactivación incluidas en los modelos propuestos del Esquema 7.1 (conocidas como inactivación por

blanqueamiento) pueden provocar la liberación de Fe⁺³. En este caso, el hierro puede actuar como un catalizador en reacciones de tipo Fenton, favoreciendo la producción de oxígeno (I Magario et al., 2012).

7.3.3. Análisis UV-Visible: reacciones HRP/H₂O₂ y hematin/H₂O₂

En la Figura 7.7 se muestran los espectros para HRP y hematin a diferentes concentraciones de H₂O₂ y pH 10. Se observa, en primer lugar, una clara diferencia en los valores de absorbancia obtenidos para hematin vs. HRP, siendo menores para HRP. Estos bajos valores de absorbancia son característicos de la presencia de agregados moleculares de la enzima en el medio de reacción (Ziemys & Kulys, 2005). La presencia de buffer y la elevada concentración de HRP aumentan dicha agregación. Sin embargo, esta agregación no afecta a la reacción enzimática con H₂O₂ debido al pequeño tamaño de la molécula de peróxido de hidrógeno.

Se observan tres bandas asignadas a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ en metaloporfirinas: α , β (bandas Q), y γ (o banda Soret). Las bandas Soret están situadas entre 380 y 420 nm, mientras que las bandas de Q están presentes entre 500 y 650 nm (H B Dunford, 1999; Rich & Iwaki, 2007). El compuesto 1 (E_I) de la peroxidasa muestra una disminución importante de la intensidad de la banda a 403 nm debido a cambios en el coeficiente de absorción, ϵ de 102 a 53,8 10⁻³ M⁻¹ cm⁻¹, mientras que el hombro a 380 nm se pierde. También presenta dos bandas de absorción entre 495–500 nm y 641–650 nm (Loew et al., 1997). E_{II} presenta una banda Soret de alta absorción ($\epsilon=105$ 10⁻³ M⁻¹ cm⁻¹) a 420 nm y un doblete a 527–555 nm. Finalmente, E_{III} es un complejo férrico superóxido que presenta una banda Soret a 417 nm, con otras bandas Q a 580 y 544 nm (H B Dunford, 1999).

La interacción de hematin con H₂O₂ produce la formación de E_I, tal como lo hace también en el caso de HRP. La disminución de la banda a 395 nm y el hombro 370 nm es evidente con ambas concentraciones de peróxido. A 4.7 mM de H₂O₂, las bandas ubicadas en 395 nm y 345–350 nm son similares en la absorbancia, mientras que el pico a 345–350 nm es mayor en importancia relativa a 0.56 mM de H₂O₂. La disminución de la absorbancia de la banda a 370 nm, junto a su desplazamiento hacia 345–350 nm es también notable, con un mayor efecto para 4.7 mM de H₂O₂, como es esperable. La Figura 7.8 muestra la disminución de la banda Soret de hematin para ambas concentraciones de H₂O₂. Es evidente como tanto la velocidad como la magnitud de este corrimiento hipocrómico aumentan mientras mayor es la concentración inicial de peróxido de hidrógeno.

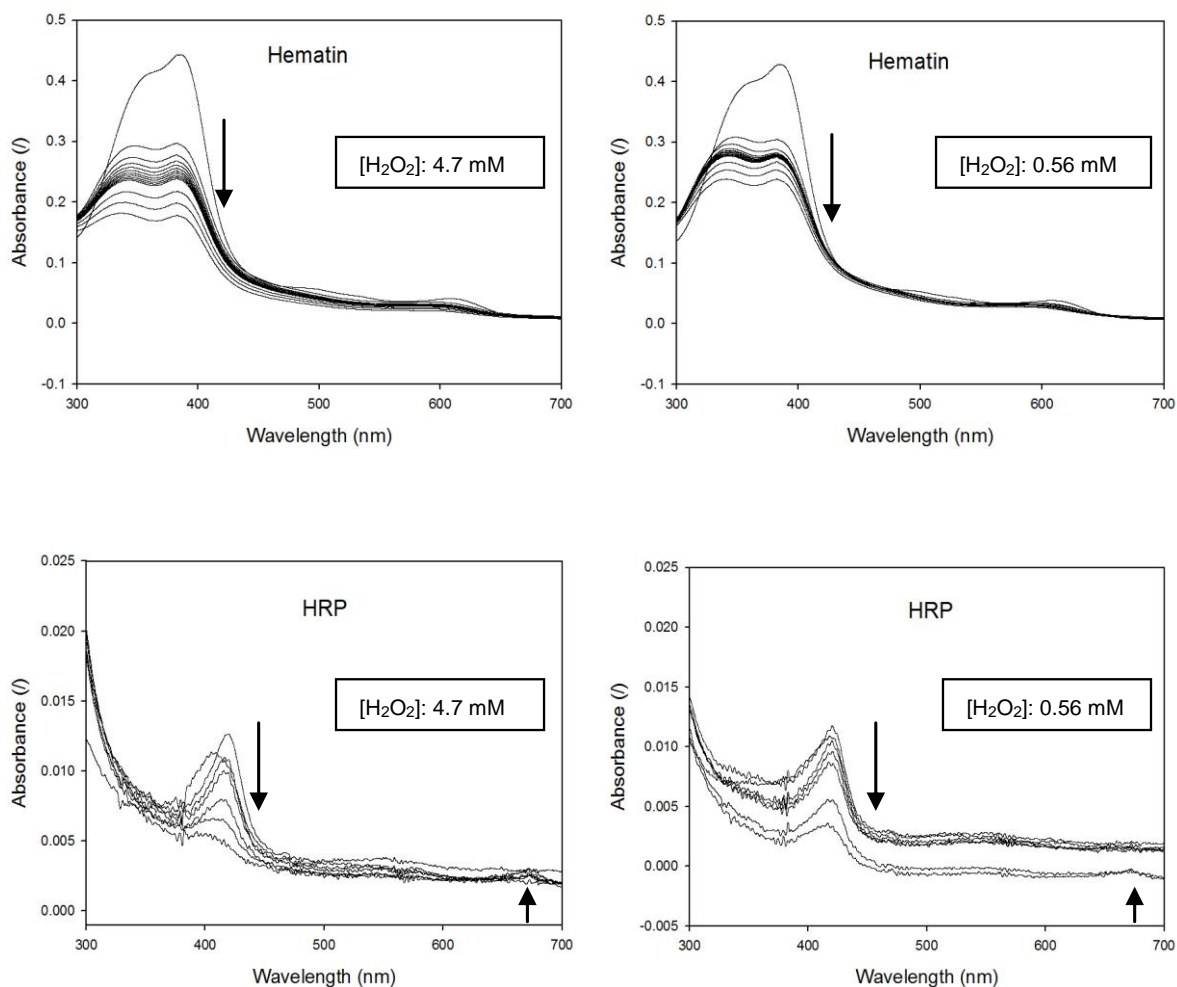


Figura 7.7. Espectro UV-Visible de Hematin-HRP con H₂O₂ a diferentes concentraciones de oxidante. Condiciones de reacción: pH= 10, T= 30 °C, [Hematin]= 5 mg/l, [HRP]= 5 mg/l. Para hematin [buffer]= 0.1 M; para HRP [buffer]= 0.01 M.

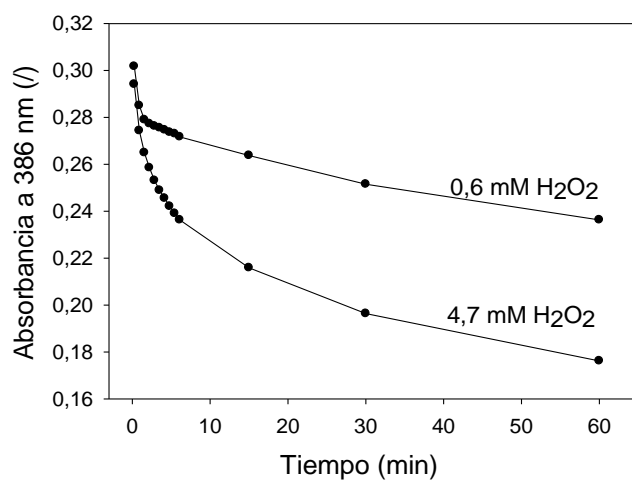
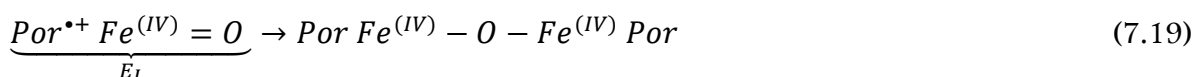


Figura 7.8. Disminución de la banda Soret de hematin a distintas concentraciones de H₂O₂.

Un pico a 372 nm ha sido asignado al ion férrico y puede ser utilizado para detectar la formación de E_I. Con el avance de reacción, se genera una forma inactiva de hematin. Como se mencionó anteriormente, hay dos rutas principales de hematin en la reacción con peróxido de hidrógeno: (1) la vía catalítica o pseudo-catalítica con E_I como intermediario; y (2) las vías de inactivación por reacciones de oxidación de la metaloporfirina con H₂O₂, conocidas como blanqueamiento. Sin embargo, puede también considerarse la posibilidad de formación de dímeros covalentes de hematin, como una reacción secundaria de E_I.

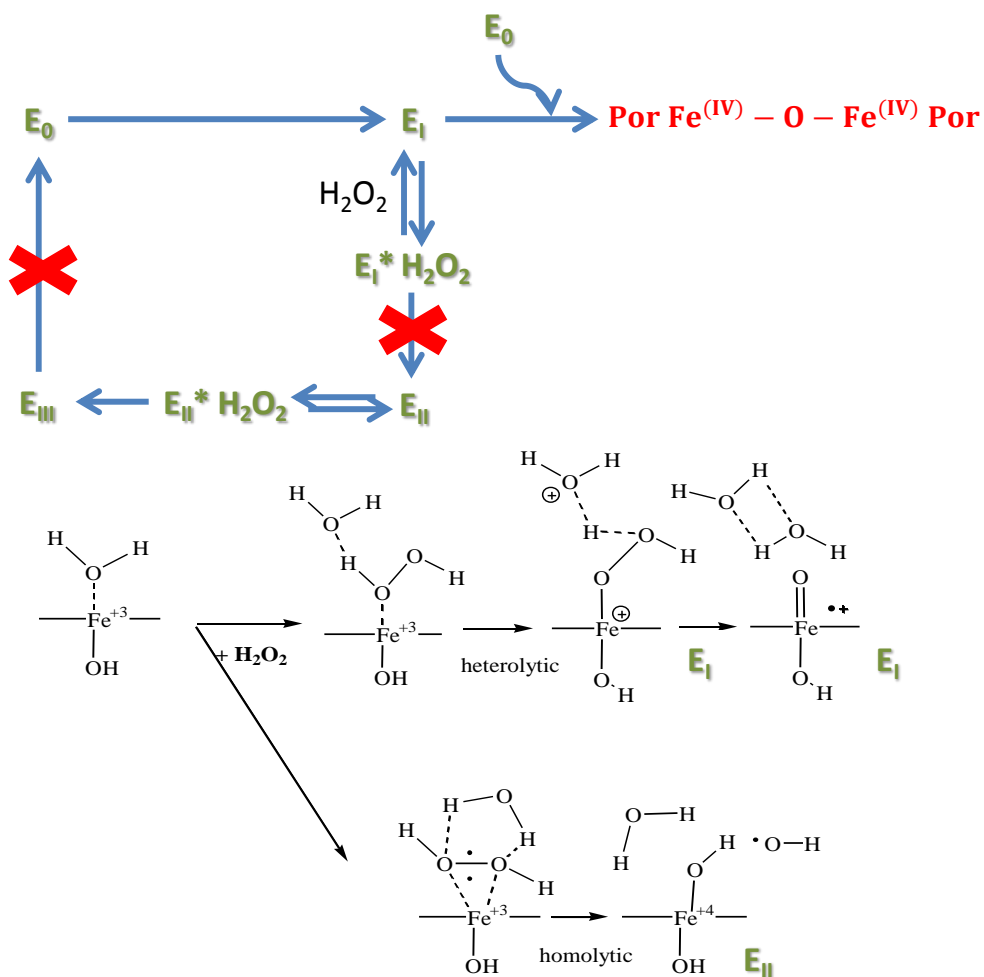


Una mayor cantidad de peróxido de hidrógeno disponible favorece la formación de E_I, y por lo tanto una mayor dimerización es posible. El Esquema 7.3 muestra las diferentes especies de hematin que pueden estar presente en la descomposición del peróxido de hidrógeno. Se incluye también la participación de una molécula de agua en la formación de E_I/E_{II} en solución acuosa. La vía heterolítica de ruptura del peróxido de hidrógeno genera E_I, mientras que la vía homolítica produciría E_{II}. Puesto que no se observa evidencia de la formación de E_{II} en el estudio de los espectros UV/Visible es posible descartar la vía homolítica de descomposición de H₂O₂. A su vez, no se observa evidencia de la vía pseudo-catalítica de producción de oxígeno, debido a que no se detectó la presencia de E_{II} ni E_{III}.

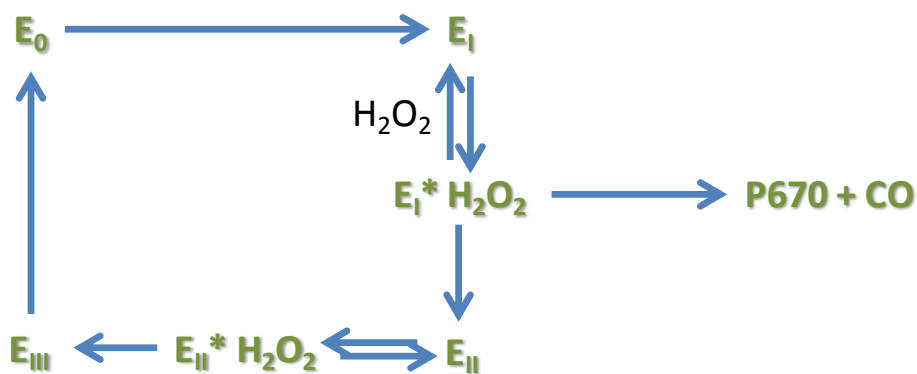
Por su parte, el perfil de reacción de HRP con peróxido de hidrógeno demuestra un aumento inicial de la banda ubicada entre 400–420 nm, asignable a la desagregación parcial de la enzima producto de la interacción con H₂O₂, seguida de una disminución constante de la misma. Se observa también la formación de E_I, debido a la disminución constante de la absorbancia a 403 nm con el avance de reacción. Sin embargo no se evidencian las bandas a 495–500 y 641–650. Se observa, además, para la reacción con 4.7 mM de H₂O₂ un corrimiento de la banda a 403 nm hacia 417–420 nm que puede asociarse a la formación de E_{III}. Por último, la generación de P670 (compuesto producto de la inactivación suicida de HRP) parece evidente producto del aumento de la banda a 670 nm.

El Esquema 7.4 presenta las principales especies presentes durante la interacción de HRP con peróxido de hidrógeno en las condiciones seleccionadas. La presencia de E_{III} nos permite confirmar la vía pseudo-catalítica como la responsable de la formación de O₂, en

contraposición a los resultados de simulación computacional publicados por Hinner y colaboradores (Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001).



Esquema 7.3. Especies que pueden estar presentes en los sistemas porfirinas de Fe/H₂O₂.



Esquema 7.4. Especies que pueden estar presentes en los sistemas HRP/H₂O₂.

7.3.4. Modelo Pseudo-catalítico: Parametrización

Los valores iniciales empleados para la estimación de los parámetros del modelo pseudo-catalítico se presentan en la Tabla 7.3. El valor de k_1 fue determinado experimentalmente durante el desarrollo del Proyecto Integrador de Cecilia Cabrera y Andrés Cornaglia, a partir de datos de consumo de NaII y H₂O₂ (Cabrera & Cornaglia, 2011). El valor de k_{bl} se extrae del trabajo de Cunningham (Cunningham et al., 2001). Los valores de k_{app} y k_a se extraen de las estimaciones realizadas por Carvalho y colaboradores para el sistema HRP/H₂O₂/fenol/AAP (Carvalho et al., 2006), mientras que el valor de k_8 se fijó a 10 veces el valor optimizado de k_3 (H B Dunford, 1999). El modelo de varianza seleccionado fue de varianza constante y el valor inicial del parámetro del mismo fue ω : 0.5.

Tabla 7.3. Valores iniciales de las constantes de velocidad del modelo.

Constante cinética (mM ⁻¹ min ⁻¹)	Valores Iniciales (mM ⁻¹ min ⁻¹)
k_1	6.60
k_8	1.80
k_{app}	6.78
k_a (min ⁻¹)	0.13
k_{bl}	0.06

El modelo no entregó buenos ajustes a los datos experimentales durante la parametrización. No fue posible en ninguna estimación obtener valores confiables de las constantes cinéticas. Por su parte, k_8 , k_{app} y k_a tienden a cero en todas las estimaciones realizadas, en línea con resultados obtenidos por la Dra. Magario durante el modelado de las reacciones propuestas para el sistema hematin/H₂O₂/fenol/AAP, en el cual los valores optimizados fueron del orden de 10⁻⁸ (resultados que no se incluyen en esta tesis). Los resultados obtenidos permiten postular que este mecanismo de reacción no es adecuado para predecir los consumos de H₂O₂ observados. Esto implicaría además:

- Descartar la formación del intermediario catalítico E_{II} y E_{III} en ausencia de sustratos fenólicos. Esta afirmación que es además consistente con las evidencias obtenidas durante el estudio UV-Visible de la reacción hematin/H₂O₂.
- Descartar vías de reacción responsables de la formación de radicales O₂^{•-} como precursores de O₂.

- Finalmente, en ausencia de sustrato orgánico, se descarta la inactivación propuesta a partir del estado E_{II}, en contraposición a lo observado por Cunningham y colaboradores durante el estudio del mecanismo de Tetra-kis(pentafluorofenil)-21H,23H-Cloroporfina de Fe(III) (F20TPPFeCl) (Cunningham et al., 2001).

7.3.5. Modelo Catalítico: Parametrización

Los valores iniciales empleados para la estimación de los parámetros del modelo catalítico se presentan en la Tabla 7.4, junto a los valores optimizados de los mismos. Los valores iniciales empleados para k_1 y k_7 fueron determinados experimentalmente durante el desarrollo del Proyecto Integrador de Cecilia Cabrera y Andrés Cornaglia, mediante la linearización de las expresiones de velocidad de consumo de sustrato bajo suposiciones de estado estacionario de los intermediarios catalíticos (Cabrera & Cornaglia, 2011). El valor inicial de k_{b1} se fijó en un valor 50 veces menor a k_7 . El modelo de varianza seleccionado fue de varianza constante.

Tabla 7.4: Valores iniciales y optimizados de las constantes de velocidad del modelo.

Constante cinética (mM ⁻¹ min ⁻¹)	Valores Iniciales (mM ⁻¹ min ⁻¹)	Valores Optimizados (mM ⁻¹ min ⁻¹)
k_1	6.6	16.416 \pm 1.510
k_7^*	20.9*	20.9*
k_{b1}	0.4	0.328 \pm 0.033
Valor inicial del modelo de varianza		ω : 0.5
Modelo de varianza optimizado		ω : 0.289 \pm 0.026
Residuos ponderados		127.02
χ^2 (95%)		150.99

El valor de k_7^* se fijó durante la parametrización del modelo.

Este modelo permitió obtener un muy buen ajuste a los datos experimentales. No obstante, los valores obtenidos para las constantes en la primera estimación no fueron confiables, por lo cual se realizó un análisis de sensibilidad para determinar cuáles eran las constantes cuyos valores afectan significativamente a los resultados del modelo. Un total de siete simulaciones se llevaron a cabo fijando el valor de los parámetros a su valor inicial y analizando el efecto de una variación de $\pm 20\%$ en el valor de los mismos. Las condiciones de las simulaciones fueron: [H₂O₂]₀: 4.77 mM y [E]_t: 25 mg/l. La Figura 7.9 presenta el resultado de las simulaciones realizadas durante este estudio de sensibilidad. Es posible

observar que el valor de k_7 no altera las predicciones del modelo, por lo que se fijó en 20.9 (mM min)⁻¹. El modelado permite determinar que los datos experimentales son consistentes con la vía propuesta de inactivación del catalizador (blanqueamiento) a partir del estado nativo (E₀), como fue planteado con anterioridad para metaloporfirinas de origen sintético (Cunningham et al., 2001).

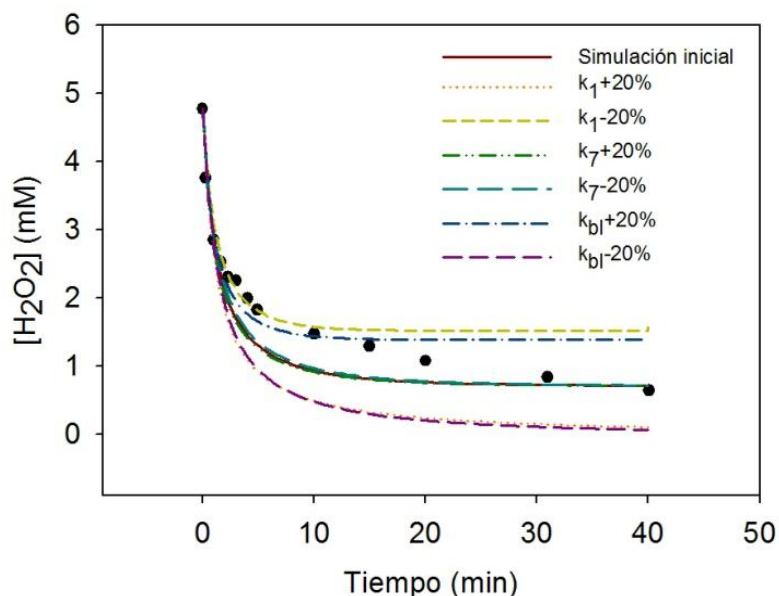
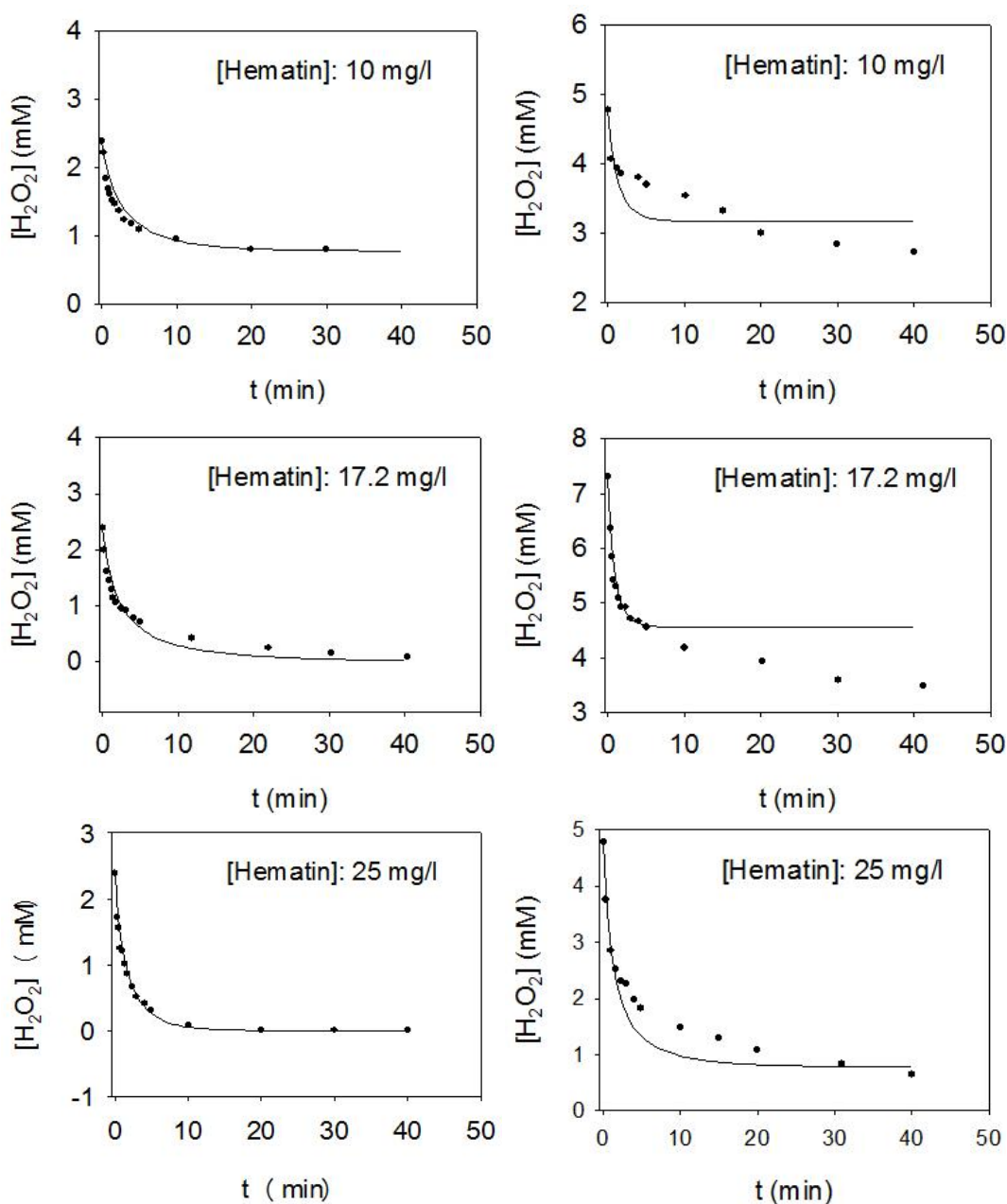


Figura 7.9. Análisis de sensibilidad de las constantes del modelo.

Los resultados obtenidos permiten postular como más probable a la vía catalítica de producción de O₂ propuesta para hemoperoxidasas en ausencia de sustrato orgánico (Vlasits et al., 2010). A su vez, los valores estimados de las constantes cinéticas del modelo indican que la etapa de activación de hematin es la etapa controlante de la velocidad.

Las Figuras 7.10 y 7.11 presentan los perfiles de consumo de H₂O₂ experimentales vs. predichos por el modelo a diferentes concentraciones de hematin y H₂O₂. Los perfiles de la Figura 7.10 corresponden a los experimentos empleados para la parametrización. Es posible observar la consistencia entre las predicciones del modelo y los datos experimentales. Los puntos experimentales que no fueron empleados para la parametrización (Figura 7.11) muestran un buen ajuste durante los primeros minutos de reacción. Sin embargo, con el avance de reacción, el consumo de H₂O₂ predicho por el modelo se encuentra subestimado. Las predicciones del modelo indican que luego de esta etapa inicial de elevada velocidad de consumo de oxidante se produce la inactivación del catalizador, razón por la cual la concentración de H₂O₂ debería permanecer constante. De todos modos, los resultados muestran que para estos experimentos, que presentan una

elevada relación H₂O₂:hematin, existen reacciones no consideradas en el modelo que consumen H₂O₂ luego de la inactivación de E₀. Del análisis de los perfiles de H₂O₂ fue posible afirmar que la velocidad de consumo de oxidante, luego de la primera etapa de reacción es independiente de la concentración inicial de H₂O₂, pero dependiente de la concentración de catalizador (Figura 7.3). Este hallazgo indica que las reacciones de consumo de peróxido no consideradas en el modelo implican la participación de hematin, siendo esto consistente con la ausencia de consumo de peróxido observada en ausencia de catalizador.



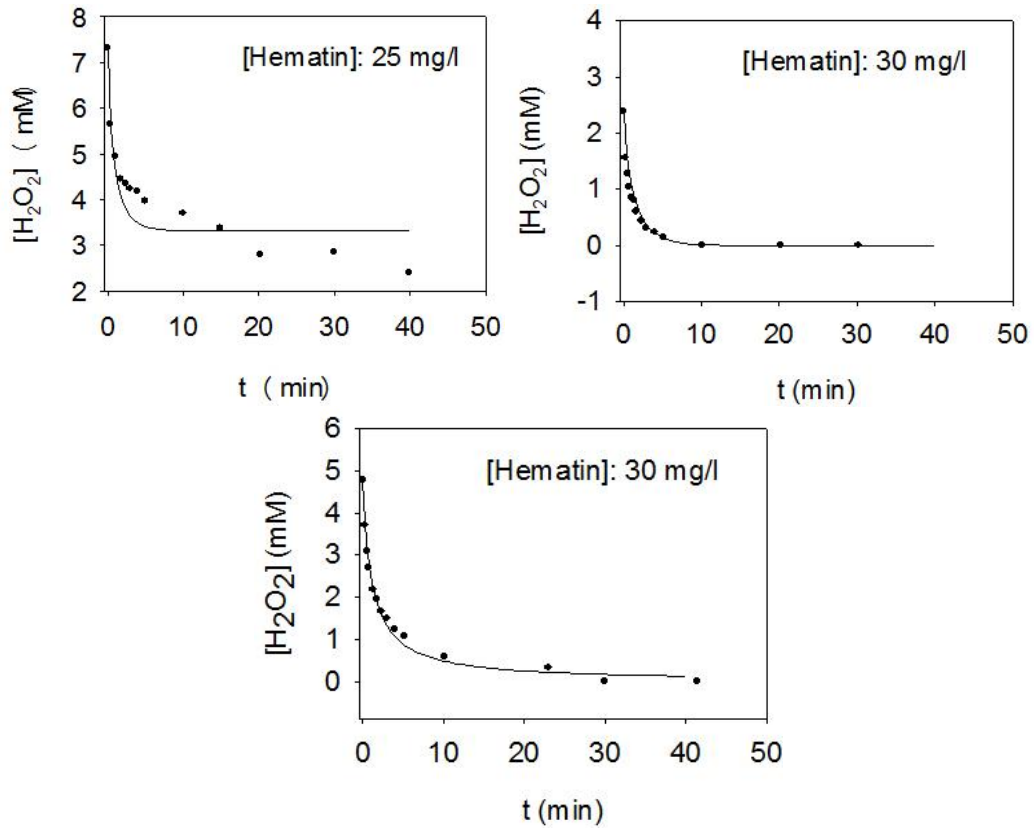
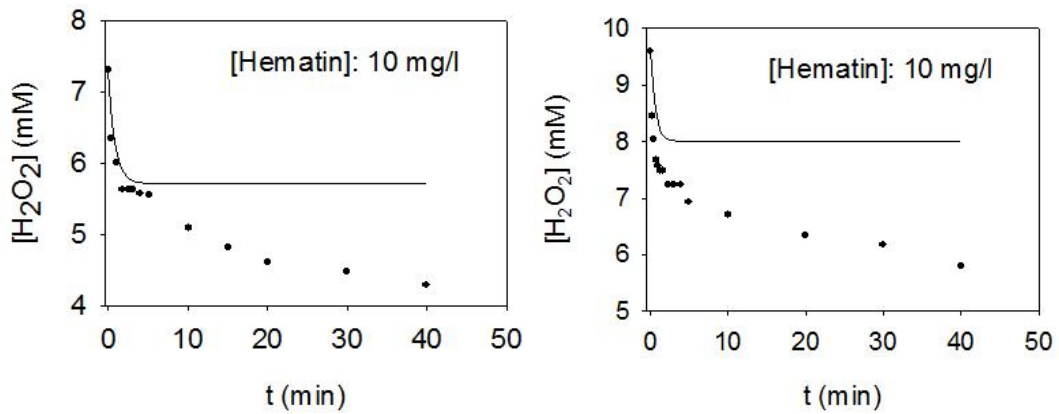


Figura 7.10. Perfiles experimentales (puntos) y predichos (líneas) de consumo de H₂O₂. Condiciones empleadas para la parametrización.



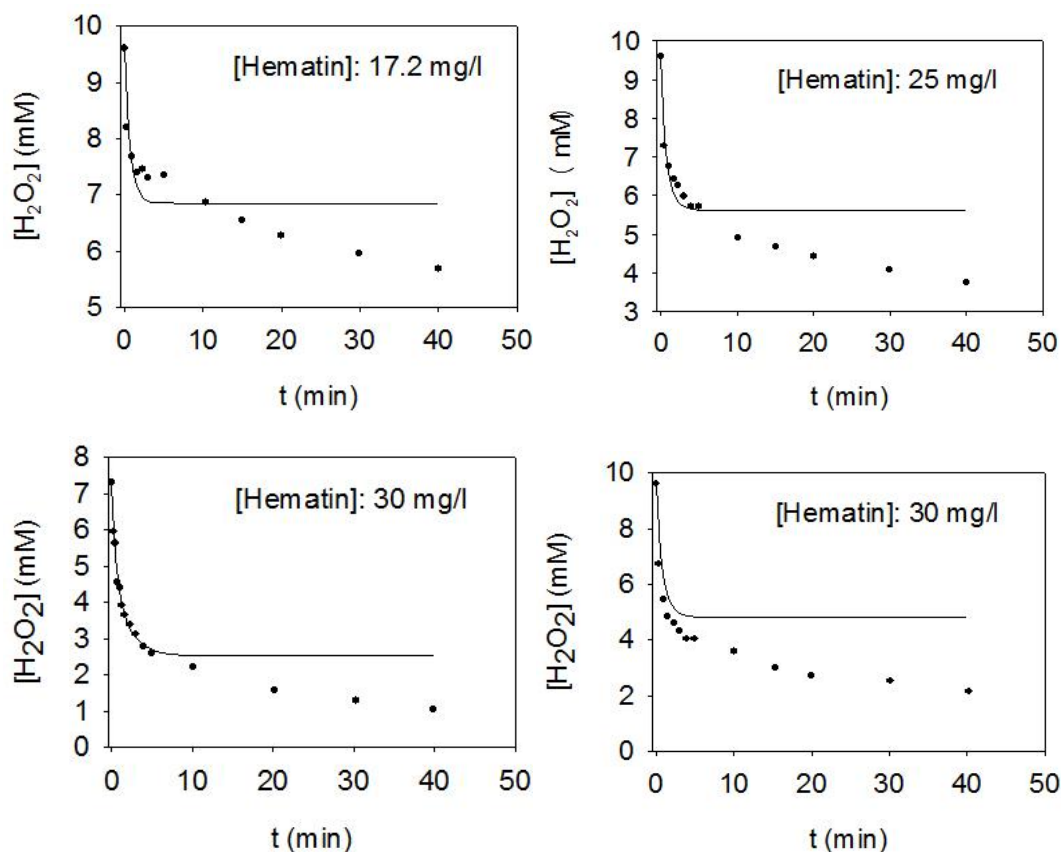


Figura 7.11. Perfiles experimentales (puntos) y predichos (líneas) de consumo de H₂O₂. Condiciones no empleadas para la parametrización.

Del análisis de la Figura 7.10 podemos observar que a 10 mg/l, el modelo ajusta a 2,38 mM de H₂O₂, pero no a 4,77. A 17.2 mg/l de hematin, el modelo ajusta también a 2.38 mM de oxidante, mientras que subestima consumo de peróxido de hidrógeno a 7,31 mM. A 25 mg/l de catalizador, el modelo presenta desviaciones paulatinas de los resultados experimentales con el aumento de la concentración inicial de sustrato. Estas desviaciones, al igual que las que se observaron para el caso de [hematin]: 10 mg/l y [H₂O₂]: 4.7 mM, sobreestiman el consumo en una fase de la reacción y lo subestima en la fase siguiente. Este comportamiento puede estar asociado a la presencia de tetrámeros, trímeros, dímeros y monómeros de hematin, cuyas concentraciones aumentan con la concentración de hematin. A su vez, presentan una distribución en el medio de reacción que implica concentraciones decrecientes de aglomerados de mayor número de moléculas, es decir [tetrámeros] < [trímeros] < [dímeros]. Esta distribución puede verse afectada por la concentración de H₂O₂, ya que es posible pensar que a menor concentración de oxidante se produce un aumento de la concentración de asociaciones de menor número, lo que explica los buenos ajustes obtenidos para los puntos de 2.38 y 4.7 mM. Por lo tanto, la velocidad de disociación de oligómeros dependería de la concentración de H₂O₂.

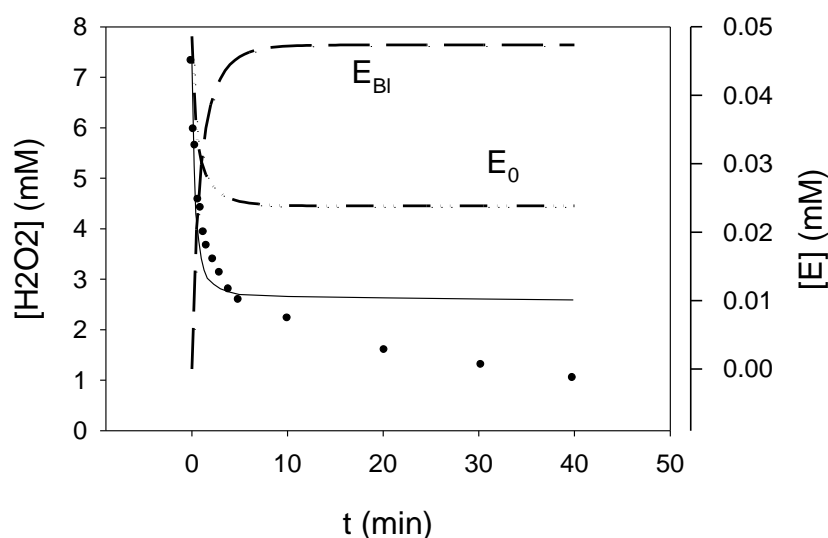


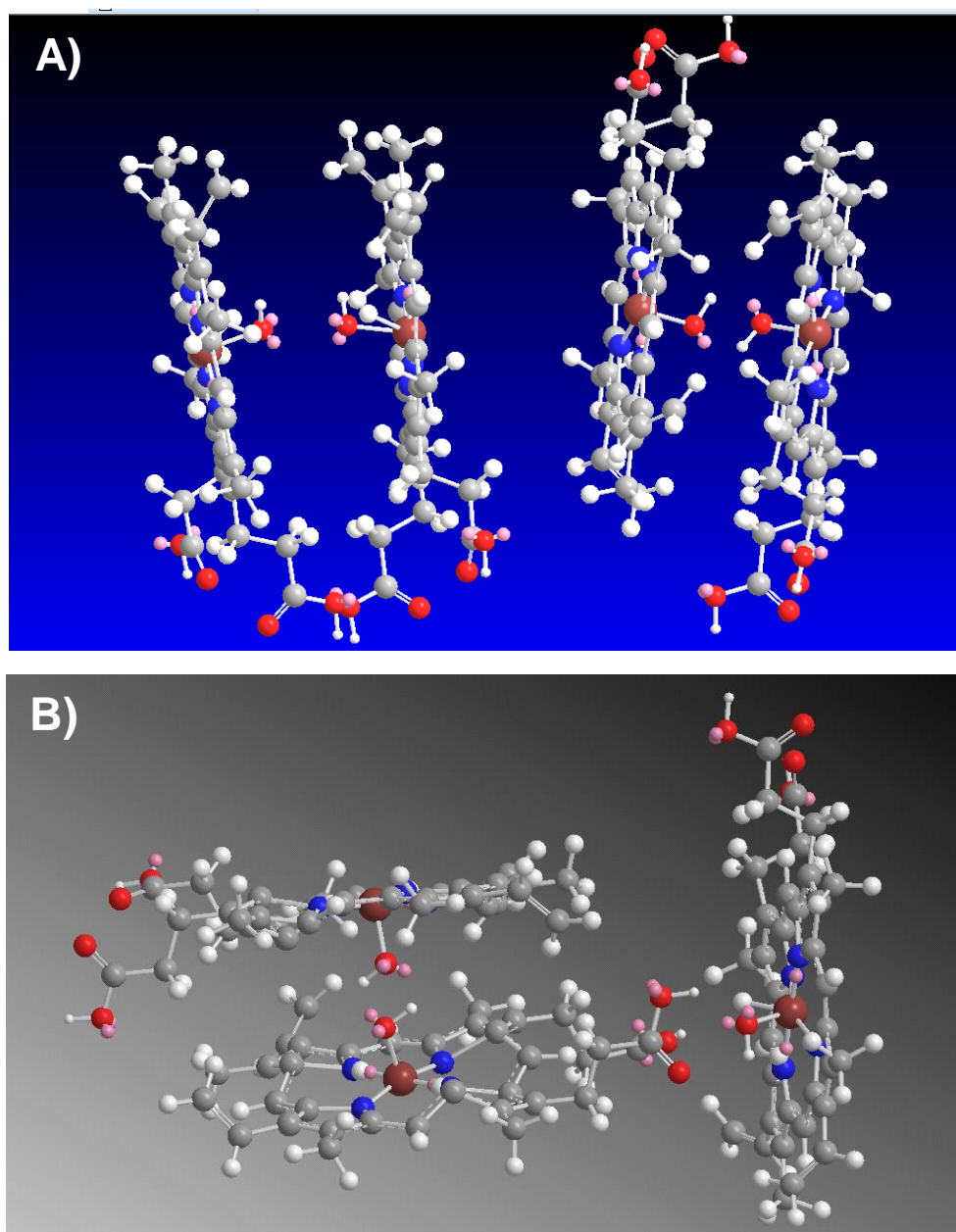
Figura 7.12. Perfiles de consumo de H₂O₂ experimentales (puntos) y modelados (líneas) frente a perfiles de evolución de especies catalíticas, correspondiente a [Hematin]:30 mg/l, [H₂O₂]:7.31 mM.

La Figura 7.12 presenta el perfil simulado de concentración de E₀ y E_{BI} junto al perfil de consumo de H₂O₂ predicho vs. experimental. Es posible observar que al aumentar la concentración de E_{BI} tiene lugar el consumo de sustrato por reacciones no contempladas en el modelo catalítico. Este comportamiento bifásico puede deberse a: (1) El intermediario catalítico E_{BI} no es inactivo, sino que presenta mucha menor actividad que E_I. (2) La liberación de Fe⁺³ durante el blanqueamiento, lo cual permite que se desencadenen reacciones del tipo Fenton que consumen H₂O₂ y producen radicales inorgánicos altamente reactivos. Este tipo de reacciones pueden provocar un consumo extra de H₂O₂, además de producir O₂ según las reacciones 7.20 y 7.21 (I Magario et al., 2012; Paolo Zucca, Rescigno, Rinaldi, & Sanjust, 2014). No obstante, el elevado pH del medio estas reacciones no deberían contribuir significativamente.



Una tercera opción que explique el comportamiento bifásico encontrado es: (3) la generación de radicales HOO⁻ en paralelo debido a reacciones de disociación de especies diméricas, triméricas o tetraméricas de hematin.

La capacidad de hematin de formar dímeros de naturaleza covalente (μ -oxo) o no covalente (π - π) se discutió en el Capítulo 1. Sin embargo, las características de las moléculas de hematin le permiten formar agregados (dímeros, trímeros y tetrameros) en solución, mediante interacciones puente hidrógeno. Las estructuras potenciales de estos agregados se presentan en la Figura 7.13.



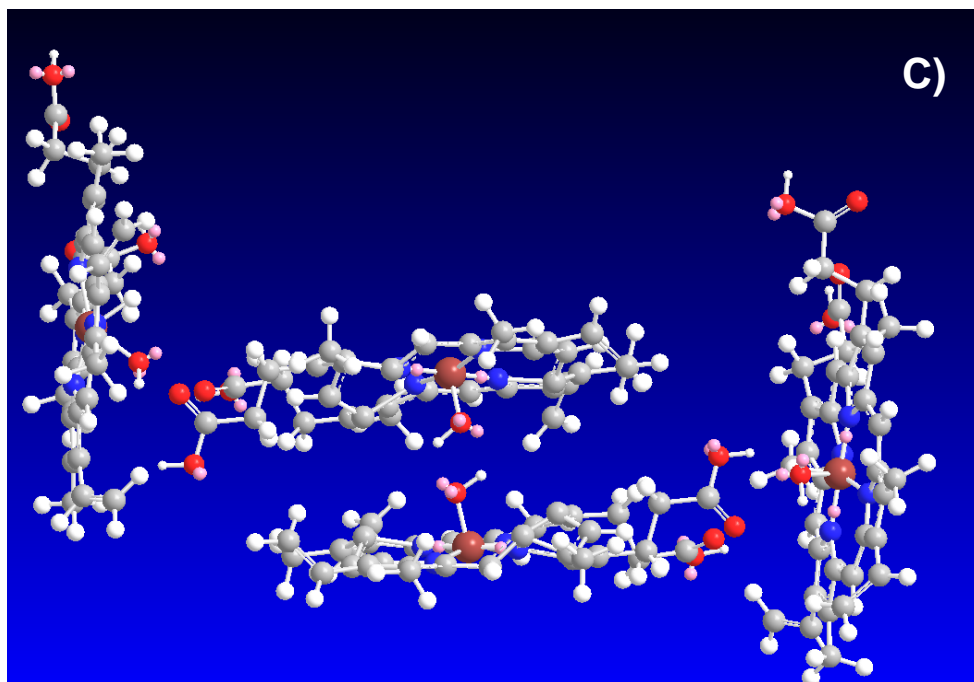
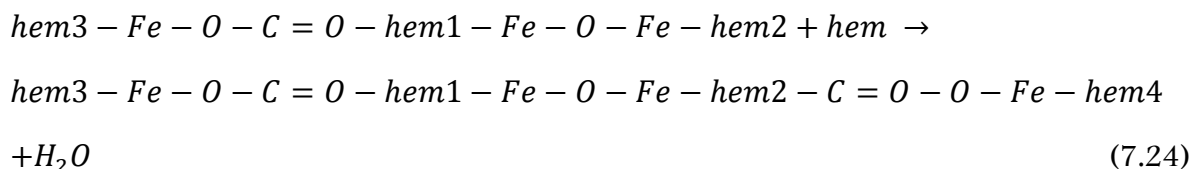
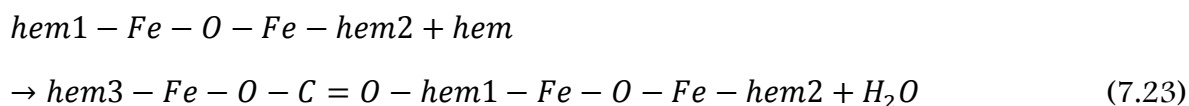
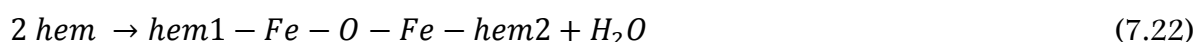


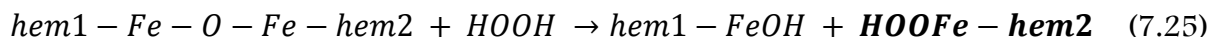
Figura 7.13. A) Dímeros de hematin unidos por interacciones puente hidrógeno que involucran grupos carboxílicos (izquierda) y hidroxilos (derecha). B) Trímeros de hematin y D) Tetrámeros de hematin unidos por interacciones puente hidrógeno.

Por otro lado, los grupos carboxilatos laterales de hematin pueden reaccionar con el hidroxilo que ocupa la 5^o posición de coordinación del Fe y generar trímeros/tetrámeros producto de la formación de grupos ésteres, según las reacciones que se plantean a continuación.



Estas reacciones de formación de oligómeros de hematin pueden tener lugar en soluciones alcalinas, en ausencia de H₂O₂. En presencia de peróxido de hidrógeno, los grupos ésteres y

éteres pueden regenerar los grupos –OH u –COOH, con potencial liberación de hem–Fe–OOH. La ecuación 7.25 presenta esta reacción para el caso de un dímero de hematin.



La importancia que pueden adquirir las reacciones de este tipo es creciente a mayores concentraciones de hematin y H₂O₂. Por lo tanto, las desviaciones que presenta el modelo a altas concentraciones de oxidante pueden asociarse a la presencia de estructuras del tipo HOOFe–hem2 activas, además de los intermediarios catalíticos propuestos. Estas especies HOOFe–hem2 pueden generar radicales (OH•) o aniones (OH[–]) durante su descomposición, los cuales pueden atacar al H₂O₂ mediante mecanismos paralelos, no considerados en el modelo. A concentraciones relativas elevadas de H₂O₂ se produce la ruptura de tetrámeros y trímeros de baja actividad, a dímeros y monómeros más activos. Este aumento relativo del número de sitios de reacción in situ genera mayor consumo de oxidante de lo esperado. Posiblemente esto ocurre por vías de reacción mediadas por hematin, pero no a través del mecanismo análogo al de las peroxidasas, en el que se basa nuestro estudio.

Por otro lado, es importante considerar que el pH alcalino del medio de reacción favorece a la formación de la especie nucleofílica HO₂[–], asociada a reacciones que pueden consumir peróxido de hidrógeno del medio y generar oxígeno disuelto. Durante una recopilación de datos de diversos estudios de delignificación alcalina, Paolo Zucca y colaboradores concluyen en que altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, a valores de pH entre 10 y 11 producen un medio de reacción con cantidades comparables de H₂O₂ y HO₂[–], lo cual favorece el desencadenamiento de las siguientes reacciones de producción de radicales inorgánicos y O₂ gaseoso (Paolo Zucca et al., 2014).





Reacciones de esta naturaleza deben considerarse en un medio de reacción con elevada concentración de H₂O₂. A su vez, la generación de HO₂⁻ podría estar mediada por la especie hem-FeOOH:



Lo cual permite explicar la ausencia de consumo de oxidante monitoreada para nuestras condiciones de reacción en sistemas sin catalizador.

7.4. Conclusiones

La recopilación de estudios de interacción hematin:H₂O₂ que se presentan en este capítulo permitió determinar diferentes cuestiones que conciernen a las etapas de inactivación y producción de O₂.

De las determinaciones experimentales de consumo de H₂O₂ es posible confirmar la acción catalítica de hematin en ausencia de sustrato fenólicos. A su vez, la etapa de formación de E_I se evidencia como la etapa limitante de la velocidad. No obstante se observa un comportamiento bifásico, caracterizado por una etapa inicial de alta velocidad de consumo, seguido de una etapa menor velocidad de consumo de H₂O₂, independiente de la concentración de este sustrato.

Los estudios de producción de oxígeno disuelto, por su parte, demuestran la capacidad de ambos catalizadores de producir O₂ a partir de H₂O₂. Hematin demostró capacidad de producción de O₂ en presencia de RAS y fenol. No obstante, estas vías de tipo catalíticas se anulan en presencia de sustratos fenólicos para los sistemas catalizados por HRP.

Por otro lado, fue posible recolectar evidencia espectroscópica de la formación del intermediario E_I con ambos catalizadores. A su vez, los espectros de reacción de HRP permitieron determinar la presencia de E_{III}, afirmando la vía pseudo-catalítica de consumo de H₂O₂. Hematin, por su parte, no mostró evidencia de la formación de E_{II} ni E_{III}, lo que puede indicar la presencia de un camino catalítico de reacción.

El modelado cinético permitió descartar las vías catalíticas de formación de O₂⁻, así como también las vías de inactivación a partir del estado E_I de hematin. Por otro lado, el mecanismo catalítico otorgó un buen ajuste de los datos experimentales para sistemas con

bajas relaciones molares H₂O₂:hematin, incluyendo una vía de inactivación por blanqueamiento propuesta a partir del estado nativo (E₀). No obstante, a altas concentraciones de oxidante, el consumo del mismo es sub-estimado por el modelo propuesto. Esto se asocia a la presencia de reacciones secundarias de consumo de peróxido que no se consideran en el modelo, pero que se encuentran ligadas a la presencia del catalizador. Se proponen tres posibles causas que explican estos resultados:

- (1) la formación de un intermediario de reacción de menor actividad que E₁, pero no necesariamente inactivo durante la etapa de blanqueamiento;
- (2) la liberación de Fe⁺³ al medio de reacción durante la misma etapa, el cual es capaz de catalizar reacciones de este tipo; y
- (3) la presencia de oligómeros de hematin de baja actividad, los cuales pueden romperse durante la reacción aumentando el número de sitios catalíticos disponibles, o generar radicales inorgánicos altamente reactivos durante su degradación.

No obstante estas conclusiones, es menester mencionar que estudios de determinación de O₂ realizados por la Dra. Magario en sistemas AAP/fenol/H₂O₂/hematin demuestran la existencia de una relación entre la producción de oxígeno y los radicales fenoxi presentes en un medio de reacción con pH neutro. Esto puede indicar que, en presencia de sustrato fenólico, la producción de oxígeno en sistemas catalizados por hematin puede no estar asociada a esquemas de reacción de tipo catalíticos, sino mas bien a la existencia de radicales inorgánicos en el medio de reacción, al menos en parte.

7.5. Resultados publicados

Los resultados que se presentan en este capítulo fueron publicados en:

- XXIII Congreso Iberoamericano de Catálisis que se realizó en Santa Fe en el año 2012, bajo el título: “Estudio cinético-mecanístico de la acción degradativa de hematin: interacción con el agente oxidante.” Autores: Cecilia Cabrera, Andrés Cornaglia, Ivana Magario, Agostina Córdoba y María Lujan Ferreira.
- III Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos que se realizó en Los Cocos en el año 2014, bajo el título: “Modelado cinético de la reacción de descomposición de H₂O₂ catalizada por hematin.” Autores: Agostina Córdoba, Ivana Magario y María Lujan Ferreira.

CAPÍTULO 8

ESTUDIO CINÉTICO Y MODELADO DE REACCIONES DE DECOLORACIÓN

DE NARANJA II

- *Se postula una vía de **inactivación** por formación de un complejo no productivo entre NaII o agregados de NaII y hematin.*
- *Se determina un consumo de oxidante en presencia de Naranja II mayor al medido para un sistema equivalente, sin sustrato fenólico.*
- *Se postuló un **modelo cinético** que presentó buenos ajustes a los perfiles experimentales de consumo de colorante para sistemas homogéneos.*
- *Se demostró la **capacidad predictiva del modelo**.*
- *El consumo de peróxido de hidrógeno fue considerablemente subestimado por el modelo.*

8.1. Introducción

A los fines de diseñar un sistema de tratamiento de efluentes, el estudio de la cinética de decoloración de diferentes tintes fenólicos es imprescindible. Existen diferentes maneras de estudiar los mecanismos de reacción, así como también de estimar el valor de las constantes cinéticas de los mismos. El análisis de datos cinéticos, junto a estrategias de linearización y ajuste de curvas de concentración vs. tiempo, así como la aplicación de métodos cinéticos de competencia de sustratos, fueron útiles a los fines de determinar valores experimentales de distintas constantes de velocidad (José L. Gómez et al., 2007; Hammami, Bellakhal, Oturan, Oturan, & Dachraoui, 2008; J A Nicell & Wright, 1997; James A. Nicell, 1994). No obstante, la optimización de los valores de las constantes cinéticas que permiten ajustar un modelo a diferentes datos experimentales de decoloración catalizada por HRP o biomiméticos de la enzima no abundan en la literatura.

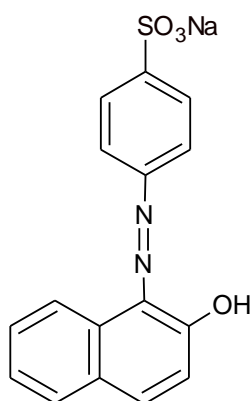


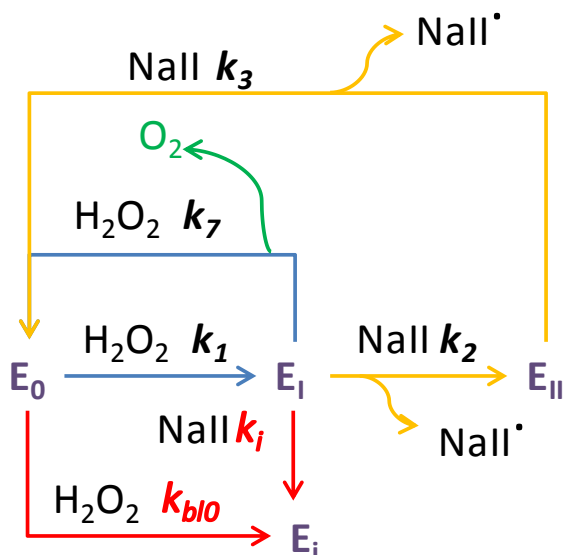
Figura 8.1. Estructura química de Naranja II (C.I. 15510).

Por otro lado, la aplicación de métodos de perturbación para determinar el valor de las constantes cinéticas de una serie de reacciones, constituye una forma alternativa de estudiar la cinética (Lazman & Yablonsky, 2008; Richardson, Volk, Lau, Lin, & Eyring, 1973). La aplicación de este método al estudio de vías de inactivación para activadores TAML (Ligando Macrocíclico Tetra-Amido) como miméticos de peroxidasa en la decoloración de soluciones de Naranja II fue analizada por Emelianenko y sus colaboradores (Emelianenko et al., 2014). Este estudio emplea un método basado en la teoría de perturbación singular, que permite analizar las ecuaciones asociadas a la evolución rápida del sistema en las condiciones de borde, de manera separada a aquellas asociadas a la evolución lenta y en donde es válida la aproximación de estado

cuasi-estacionario. Esta aproximación se diferencia de los métodos de optimización de múltiples variables que se enmarcan en el *modelado cinético* (Emelianenko et al., 2014).

Dentro de los trabajos que aplican el modelado cinético a la eliminación de azocolorantes podemos mencionar el estudio de realizado por Tizaoui y colaboradores, quienes publicaron el análisis del mecanismo de oxidación con ozono del azocolorante reactivo Naranja 16, en el cual utilizaron el solver de Microsoft Excel para estimar los parámetros del mecanismo propuesto (Tizaoui & Grima, 2011). A su vez, existen reportes de modelados cinéticos de degradación de colorantes mediante tratamientos fotocatalíticos (UV/TiO₂) (Daneshvar, Rabbani, Modirshahla, & Behnajady, 2004; Sleiman, Vildoza, Ferronato, & Chovelon, 2007), así como también fotooxidativos (UV/H₂O₂) (Daneshvar et al., 2008; Modirshahla & Behnajady, 2006).

El presente capítulo presenta resultados de los estudios de cinética de reacción y modelado cinético para la reacción de oxidación de Naranja II (NaII, Figura 8.1) catalizada por hematin, con peróxido de hidrógeno como sustrato oxidante. En el Capítulo 7 se presentaron resultados de análisis de la interacción de hematin-oxidante, y parametrización de las constantes cinéticas para diferentes mecanismos de reacción propuestos. Esto permitió postular que hematin, en presencia de peróxido de hidrógeno presenta un mecanismo catalítico de reacción con formación de oxígeno y sin producción de radicales inorgánicos por vías catalíticas.



Esquema 8.1. Mecanismo de reacción propuesto para sistemas H₂O₂/NaII catalizados por hematin.

Se propone el mecanismo de reacción que se presenta en el Esquema 8.1, para sistemas con NaII. Las vías de activación del catalizador con peróxido de hidrógeno (k_1) y de producción de O_2 (k_7) se mantienen; mientras que se incluyen las reacciones de formación de radicales orgánicos NaII \cdot (k_2 y k_3). A su vez, la inactivación por blanqueamiento con H_2O_2 a partir del estado E_0 de hematin (k_{BI}) también se conserva. No obstante, en base a los efectos de la naturaleza del sustrato discutidos en los Capítulos 4 y 5, se incluye una nueva reacción de inactivación a partir del estado E_i que involucra una interacción no productiva del mismo con NaII o agregados del colorante (k_i).

El objetivo general de este capítulo es estudiar la capacidad del mecanismo propuesto para modelar el comportamiento del sistema. Los objetivos particulares planteados son: (1) determinar la consistencia de las vías de inactivación y los intermediarios propuestos, (2) optimizar el valor de las constantes cinéticas para poder incluirlas en el diseño de un sistema de tratamiento de efluentes en estudios futuros; y (3) analizar el efecto de la inmovilización sobre la cinética del catalizador.

8.2. Metodología

8.2.1. Etapa experimental

8.2.1.1. Sistemas homogéneos de decoloración de Naranja II

Determinación de perfiles de decoloración

Los perfiles experimentales de consumo de NaII se determinaron en el marco de un proyecto integrador, realizado por Cecilia Cabrera y Andrés Cornaglia bajo la dirección de las Dras. Ivana Magario y Adriana Brandolin. Las condiciones de los experimentos se detallan en la Tabla 8.1. Se realizaron 29 experimentos, distribuidos en series de distinta concentración de NaII. La concentración de catalizador fue 10 mg/l en la mayoría de las corridas experimentales, sin embargo se llevaron a cabo corridas a 3 mg/l y 17.2 mg/l de hematin. Las reacciones se condujeron en buffer carbonato/bicarbonato 0.01M, pH 10,6, con un volumen de reacción de 50 ml. El medio de reacción estuvo compuesto en todos los casos por las alícuotas correspondientes de soluciones madre de NaII y hematin (956 mg/l en medio NaOH 0.1 M), mas el volumen necesario de buffer carbonato/bicarbonato, mientras que el H_2O_2 se añadió a $t=0$ (en un solo agregado) para dar inicio a la reacción. En todos los casos la temperatura de reacción se mantuvo a 30°C, y el sistema se agitó magnéticamente mediante el empleo del baño térmico (Figura 7.1, Capítulo 7). Se tomaron muestras (300 μ l) a distintos tiempos de reacción y se determinó la concentración del colorante por espectrofotometría UV-Visible, determinando la absorbancia a 484 nm. Se

utilizaron cubetas plásticas para tal fin, las cuales contenían en todos los casos 2.7 ml de solución de H₂SO₄ 1 M, para frenar la reacción. El tiempo durante el cual se monitoreó la reacción fue de 40 minutos.

Tabla 8.1. Condiciones de reacción empleadas.

Exp N°	[NaII] (mg/l)	[NaII] (mM)	[Hematin] (mg/l)	[H ₂ O ₂] (mM)
1	400**	1.14	10	2.4
2	400**	1.14	10	4.8
3	400**	1.14	10	7.3
4	400**	1.14	10	9.6
5	300*	0.86	10	2.4
6	300*	0.86	10	4.8
7	300*	0.86	10	7.3
8	300*	0.86	10	9.6
9	300*	0.86	3	9.6
10	300*	0.86	17.2	7.3
11	300*	0.86	17.2	9.6
12	250*	0.71	10	2.4
13	250*	0.71	10	4.8
14	250*	0.71	10	7.3
15	250*	0.71	10	9.6
16	200*	0.57	10	2.4
17	200*	0.57	10	4.8
18	200*	0.57	10	7.3
19	200*	0.57	10	9.6
20	100*	0.29	10	2.4
21	100*	0.29	10	4.8
22	100*	0.29	10	7.3
23	100*	0.29	10	9.6
24	50*	0.14	10	4.8
25	50*	0.14	10	7.3
26	50*	0.14	10	9.6
27	25	0.07	10	7.3
28	5	0.014	10	4.8
29	5	0.014	10	7.3

*Experimentos empleados en la estimación de k_2 y k_3 .

**Experimentos empleados en la estimación de k_1 .

Cada perfil concentración– tiempo obtenido se ajustó a una función exponencial de tres parámetros:

$$y = ae^{-bx} + c \quad (8.1)$$

Luego, la derivada a tiempo cero de cada curva es el producto de los parámetros a y b obtenidos por la regresión.

$$-\left(\frac{dy}{dx}\right)_{t=0} = -r_0 = ab \quad (8.2)$$

De esta manera se obtuvieron las velocidades iniciales para cada experimento.

Determinación de consumo de H₂O₂

Durante la realización del experimento N° 8 de la Tabla 8.1 ([NaII]: 300 mg/l, [H₂O₂]: 9.6 mM; [Hematin]: 10 mg/l) se determinó, además la cinética de consumo de H₂O₂, obteniendo a diferentes tiempos de reacción muestras de 1 ml, cuya concentración de H₂O₂ fue determinada por iodometría, procediendo de la manera detallada en el Capítulo 7.

8.2.1.2. Sistemas heterogéneos

Los experimentos que se presentan en esta sección fueron realizados por Belen Andali y Esteban Ottonello en el marco del desarrollo de un Proyecto Integrador, bajo la dirección de la Dra. Ivana Magario y la codirección de Agustina Córdoba. Hematin se inmovilizó sobre quitosano modificado con amino-propil-trietoxi-silano (APTS) y glutaraldehído (GA), siguiendo las condiciones de inmovilización detalladas en el Capítulo 6, incluyendo una posterior etapa de secado de las hojuelas obtenidas a temperatura ambiente, hasta peso constante. Los catalizadores obtenidos presentaron 32.9 mg_{Hematin}/g_{Quitosano seco}. Se llevaron a cabo reacciones de decoloración de NaII en las condiciones que se presentan en la Tabla 8.2. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, mientras que el pH del medio se mantuvo en 10.6, mediante el empleo de buffer carbonato/bicarbonato 0.1 M. El volumen de reacción fue de 25 ml, cada corrida experimental contenía 25 mg de catalizador heterogéneo seco y en todos los casos la reacción se inició con el agregado de la cantidad correspondiente de H₂O₂. Se tomaron muestras de 0.5 ml a distintos tiempos de reacción, las cuales se diluyeron en 0.5 ml de buffer previamente enfriado en baño de hielo y se centrifugaron durante 2 min a 13000 rpm con el objeto de separar el catalizador insoluble y detener la reacción. Finalmente se registró la absorbancia a 484 nm.

Tabla 8.2. Condiciones de reacción empleadas.

Exp N°	[NaII] (mg/l)	[NaII] (mM)	[Hematin] (mg/l)	[H ₂ O ₂] (mM)
1	400	1.14	32.9	24
2	300	0.86	32.9	24
3	200	0.57	32.9	1.36
4	200	0.57	32.9	2.7
5	200	0.57	32.9	6
6	200	0.57	32.9	18
7	200	0.57	32.9	24
8	100	0.29	32.9	24
9	50	0.14	32.9	24

8.2.2. Modelado y parametrización

8.2.2.1. Modelo cinético

El modelo cinético de decoloración de NaII, correspondiente a las reacciones incluidas en el Esquema 8.1, se basa en los resultados obtenidos del modelado de la reacción hematin/H₂O₂ del Capítulo 7. La descripción matemática del mecanismo propuesto, obtenida en función de los balances de masas de sustratos, productos, catalizador e intermediarios catalíticos participantes se presenta a continuación. Se incluye una etapa de inactivación del catalizador por formación de un complejo no productivo entre E_I/NaII y/o agregados de NaII.

$$\frac{d[E_0]}{dt} = - (k_1 + k_{bl}) [E_0][H_2O_2] + k_7[E_I][H_2O_2] + k_3[E_{II}] [NaII] \quad (8.3)$$

$$\frac{d[E_I]}{dt} = k_1 [E_0][H_2O_2] - (k_7[H_2O_2] + k_2[NaII] + k_i[NaII])[E_I] \quad (8.4)$$

$$\frac{d[E_{II}]}{dt} = - k_3 [E_{II}][NaII] + k_2[NaII][E_I] \quad (8.5)$$

$$\frac{d[E_{Bl}]}{dt} = k_{Bl} [E_0][H_2O_2] + k_i[NaII][E_I] \quad (8.6)$$

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = - k_1 [E_0][H_2O_2] - k_{Bl} [E_0][H_2O_2] - k_7[E_I][H_2O_2] \quad (8.7)$$

$$\frac{d[NaII]}{dt} = -(k_2 + k_i) [E_I][NaII] - k_3[NaII][E_{II}] \quad (8.8)$$

8.2.2.2. Estimación de parámetros

La estimación de las constantes de velocidad del modelo en base a los datos experimentales, se realizó con el software comercial gPROMS 3.2 (general PROcess Modeling System,

Process System Enterprise Ltd., Londres, Reino Unido), de manera análoga a la descrita en la sección 7.2.2 del Capítulo 7. Las constantes de velocidad de reacción k_1 , k_7 y k_{B1} se fijaron en el valor optimizado obtenido para la parametrización del modelo catalítico, en ausencia de NaII.

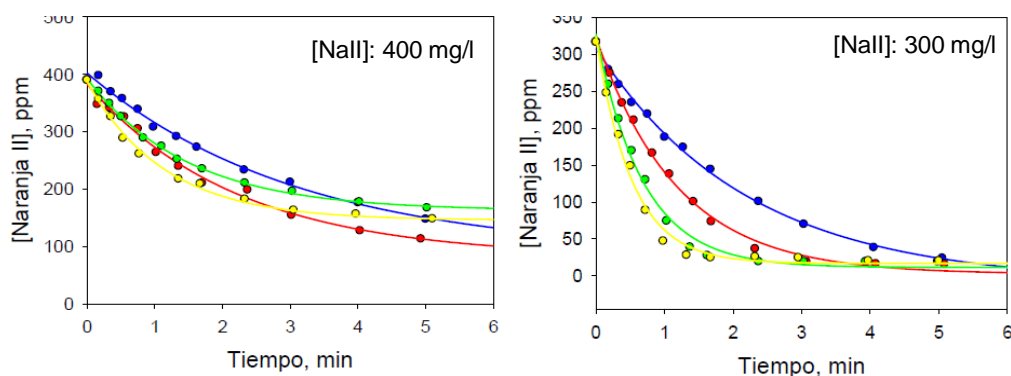
Para la parametrización, las concentraciones iniciales de catalizador (E_0), NaII y H_2O_2 se fijaron en base a las condiciones experimentales. Las concentraciones iniciales de NaII* y O_2 , así como la de los intermediarios catalíticos se valoraron en cero. No se consideró la suposición de estado estacionario de los intermediarios catalíticos. A su vez, se asumió que los radicales NaII* formados durante el ciclo catalítico participan de reacciones de degradación a compuestos oxidados con ruptura del cromóforo, sin afectar la naturaleza del catalizador ni de los sustratos, un supuesto que puede depender de las condiciones experimentales e invalidarse a altas concentraciones de colorante.

8.3. Resultados y discusión

8.3.1. Cinéticas de decoloración de NaII en sistemas homogéneos

Los perfiles de consumo de sustrato obtenidos para cada experimento de la Tabla 8.1 se presentan en la Figura 8.2. Se grafica el avance de reacción hasta los 5 minutos, debido a que es el tiempo para el cual sucede la principal transformación en todos los experimentos realizados.

Las velocidades de decoloración aumentan con las concentraciones de NaII y de H_2O_2 en el rango estudiado. No obstante, para los sistemas con 400 mg/l de NaII se observa una marcada disminución de las velocidades de reacción respecto a 300 mg/l. Por otro lado, es posible observar como a bajas concentraciones de colorante la conversión alcanzada es casi completa para todas las concentraciones de H_2O_2 analizadas.



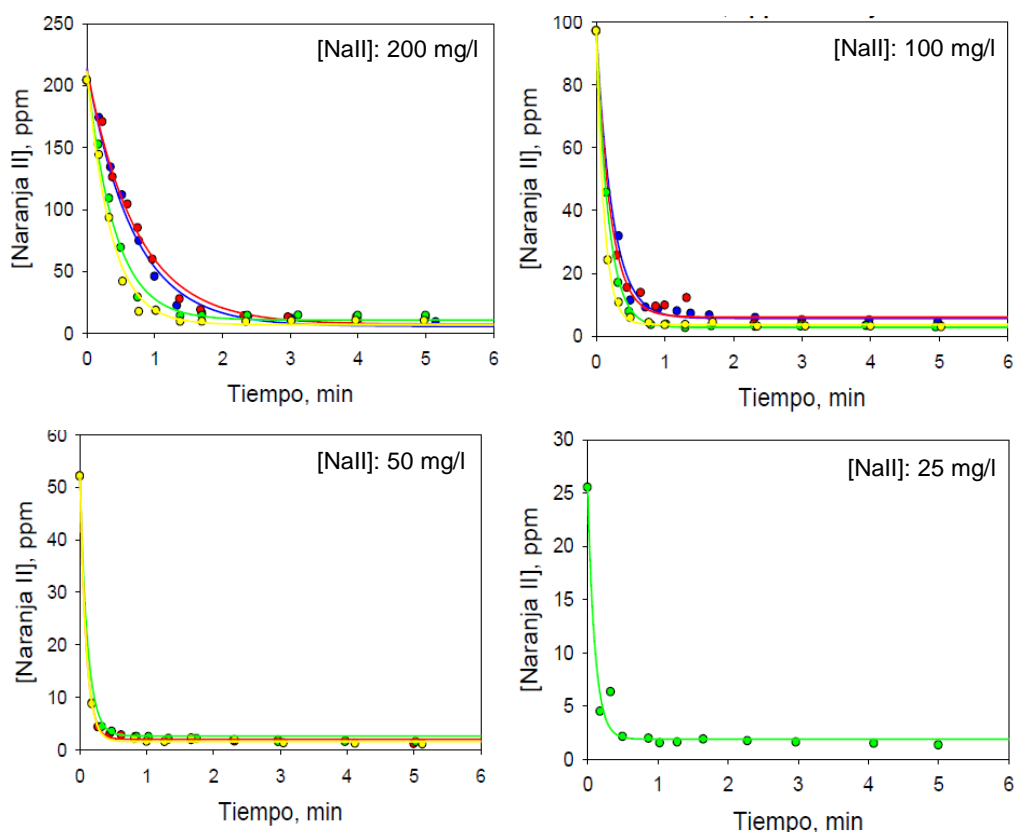


Figura 8.2. Perfiles de consumo de NaII. [hematin]: 10 mg/l; [H₂O₂]: 2.4mM (●), [H₂O₂]: 4.8 mM (●), [H₂O₂]: 7.3 mM (●), [H₂O₂]: 9.6 mM (●).

Las velocidades iniciales de decoloración ($-r_{\text{NaII}}$) se determinaron a partir de las regresiones de tres parámetros (ecuación 8.1) que se representan por las líneas continuas de la Figura 8.2. La Figura 8.3 presenta la variación de la velocidad de consumo de sustrato con la concentración inicial de NaII. Es posible observar que el aumento de concentración de NaII produce un aumento de velocidad de consumo de sustrato, para una concentración de oxidante constante, hasta que se alcanza un estado de saturación. Sin embargo a medida que aumenta la concentración de NaII, se observa un efecto de inhibición por sustrato que produce una caída en las velocidades de reacción. Esta inhibición puede asociarse a: (1) una interacción no productiva entre hematin y NaII, o dímeros de NaII (presentes en el medio de reacción) que produzca el bloqueo del Fe de hematin (Pirillo, Einschlag, et al., 2010a). (2) Inhibición reversible causada por coordinación de productos como ácidos orgánicos al Fe de hematin tal y como se ha reportado ya en sistemas Fenton (J. Feng, Hu, & Yue, 2006; Moncayo-Lasso, Torres-Palma, Kiwi, Benítez, & Pulgarin, 2008). (3) Inactivación irreversible por ataque de intermediarios radicalarios al anillo porfirínico (E Nagababu & Rifkind, 2000; Zucca et al., 2014; Florence, 1985; Erika Nagababu & Rifkind, 2004). Estos efectos pueden involucrar, en mayor o menor medida, a cualquier intermediario catalítico de hematin. No obstante, suponiendo que los productos de reacción

no afectan la velocidad inicial de decoloración, la interacción no productiva entre el catalizador y NaII o sus agregados se propone como la principal causa de la inhibición observada.

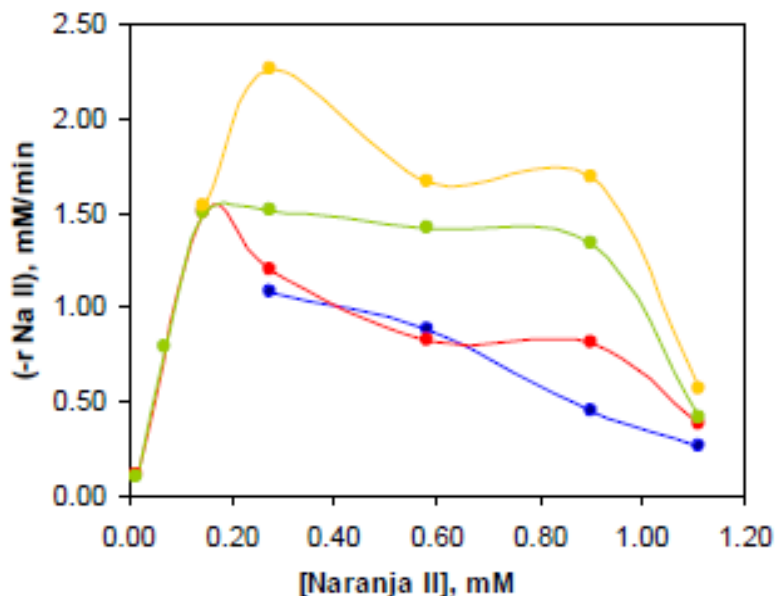


Figura 8.3. Velocidad inicial de consumo de NaII vs. [NaII]₀. [H₂O₂]: 2.4 mM (●); [H₂O₂]: 4.8 mM (●); [H₂O₂]: 7.3 mM (●); [H₂O₂]: 9.6 mM (●).

Cinética del oxidante

La Figura 8.4 presenta las conversiones obtenidas de NaII y H₂O₂. Es posible notar que ninguno de los dos sustratos alcanza el 100% de conversión, lo cual puede asociarse a la participación de vías de inactivación del catalizador, como la vía de blanqueamiento a partir del estado nativo (E₀) postulada en el Capítulo 7 (Cunningham et al., 2001). A su vez, puede determinarse la estequiometría aparente de la reacción en un valor aproximado a 6.6 moles de H₂O₂ por mol de NaII. La misma se aleja del valor teórico de 1 mol de H₂O₂ a 2 moles de NaII, indicando un consumo de oxidante mayor al previsto por el mecanismo peroxidático.

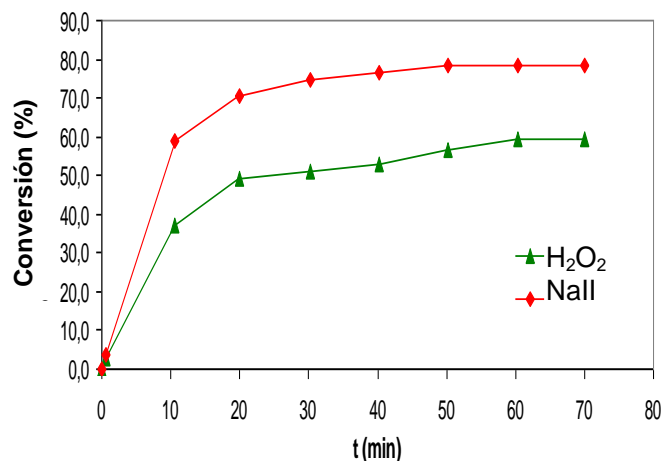


Figura 8.4. Conversión de NaII y H₂O₂ en tiempo (izquierda). [NaII]: 300 mg/l, [hematin]: 10 mg/l, [H₂O₂]: 9.6 mM.

La Figura 8.5 muestra los milimoles de H₂O₂ consumidos a 40 min de reacción vs. [H₂O₂]₀ para distintas concentraciones de NaII. Se manifiesta un aumento de los milimoles de H₂O₂ consumidos con el aumento de la concentración inicial de oxidante. Además, este aumento es mayor para los sistemas con mayor [NaII]₀. Por otro lado, a iguales condiciones de pH y concentraciones de H₂O₂ y catalizador, se registró un consumo de oxidante mayor en presencia de Naranja II (Cabrera & Cornaglia, 2011). Estas observaciones son indicio de la relación variable de consumo de oxidante por mol de NaII. Las posibles reacciones no consideradas en el mecanismo modelo pueden ser: (1) reacciones entre productos de degradación de NaII con H₂O₂. En el Capítulo 7 se presentaron vías de reacción que implican la acción de HO₂⁻ en la generación de radicales inorgánicos altamente reactivos, los cuales pueden ser responsables de reacciones de degradación de los productos de oxidación de NaII (Paolo Zucca et al., 2014). (2) Reacciones catalíticas en las que los mismos productos de degradación de NaII, como 1-amino 2-naftol, 4-amino bencen-sulfonato, 1-diazo 2-naftol, 4-hidroxi bencen-sulfonato y anilina, pueden ser sustratos de hematin (ver Figura 8.6) (Pirillo, García Einschlag, et al., 2010b; Saidman et al., 2006). Ambas hipótesis son avaladas por evidencia de que el consumo de sustrato oxidante es mayor en los sistemas con NaII, vs. el mismo sistema sin Naranja II.

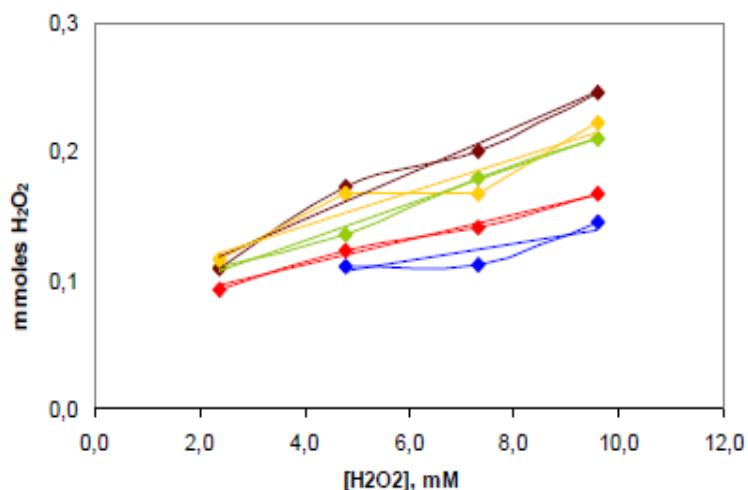


Figura 8.5. Milimoles globales de H₂O₂ consumidos vs. concentración inicial de H₂O₂ para diferentes concentraciones de NaII. [NaII]: 52.1 mg/l (◆), [NaII]: 97.2 mg/l (◆), [NaII]: 204.1 mg/l (◆), [NaII]: 316.7 mg/l (◆), [NaII]: 390.1 mg/l (◆).

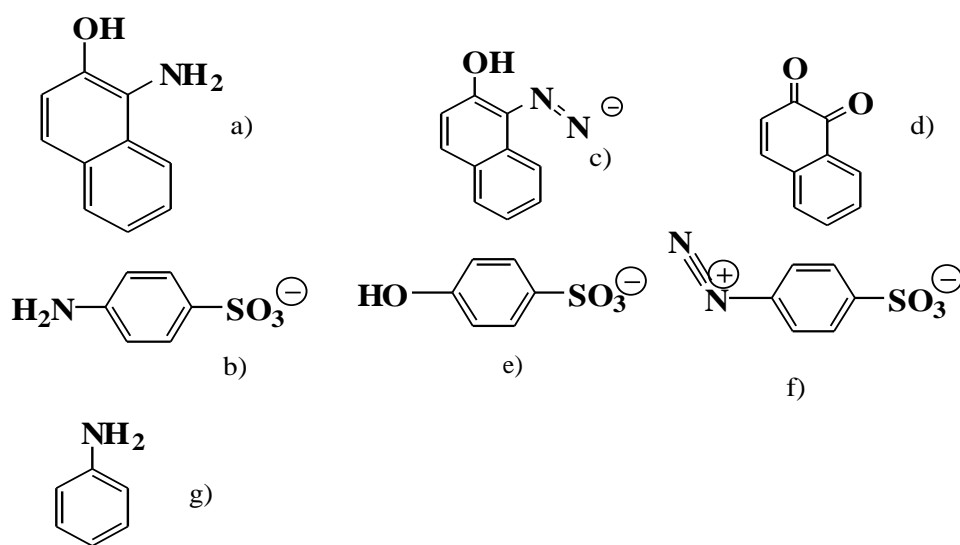


Figura 8.6. Posibles productos de reacción asociados a la degradación de Naranja II catalizada por hematin. a) 1-amino 2- naftol ; b) 4-amino bencen-sulfonato; c) 1-diazo 2-naftol; d) 1,2-naftoquinona; e) 4-hidroxi bencen-sulfonato; f) 4-diazo bencen-sulfonato; g) Anilina.

8.3.2. Modelado Cinético: Parametrización de sistemas homogéneos

Los valores de las constantes involucradas en el modelo catalítico de consumo de H₂O₂ se fijaron en los valores optimizados en el Capítulo 7. Por otro lado, el valor inicial empleado

para la parametrización de las restantes constantes se presenta en la Tabla 8.3. El valor de k_2 se fijó en el mismo valor empleado para k_7 , para no favorecer ninguna vía de reacción posible de E_1 ; mientras que el valor de k_3 se fijó a 0.1 veces el valor inicial de k_2 (H B Dunford, 1999). El modelo de varianza seleccionado fue de varianza constante y el valor inicial del parámetro del mismo fue ω : 0.1.

Tabla 8.3. Valores iniciales de las constantes de velocidad del modelo.

Constante cinética ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Valores Iniciales ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Valores Optimizados ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
k_1^*	16.416*	16.416*
k_2	20.9	448.93 \pm 99.93
k_3	2.09	51.868 \pm 10.51
k_7^*	20.9*	20.9*
k_{BI}^*	0.328*	0.328*
k_i	0.01	0
Valor inicial del modelo de varianza		ω : 0.1
Modelo de varianza optimizado		ω : 0.1352 \pm 0.0121
Residuos ponderados		146.49
χ^2 (95%)		342.46

*Constantes cuyos valores se fijaron durante la parametrización del modelo.

Este modelo permitió obtener un muy buen ajuste a los datos experimentales, como puede observarse en los valores de χ^2 (95%) vs. residuos ponderados que se presentan en la Tabla 8.3. Los valores obtenidos para las constantes k_2 y k_3 resultaron confiables en una primera estimación, mientras que k_i toma el valor del límite inferior (cero en este caso).

De análisis de los resultados experimentales obtenidos fue posible determinar la existencia de alguna vía de inactivación por sustrato. A los fines de incluir esto en el modelo propuesto, se analiza la presencia de una vía de reacción que involucra la interacción no productiva de NaII, o dímeros de NaII, con E_1 . No obstante, los experimentos empleados durante esta primera parametrización excluyeron a aquellos cuya [NaII]: 400 mg/l. Esto planteó la necesidad de llevar adelante una nueva estimación de k_i , fijando todas las constantes cinéticas a sus valores optimizados y empleando los experimentos correspondientes a [NaII]: 400 mg/l. El resultado de esta segunda estimación se presenta en la Tabla 8.4.

Tabla 8.4. Valor estimado de k_i y estadísticos de la estimación.

Constante cinética ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Valores Iniciales ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Valores Optimizados ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
k_i	0.01	$8.339_{\pm 0.814}$
Valor inicial del modelo de varianza		$\omega: 0.1$
Modelo de varianza optimizado		$\omega: 0.109_{\pm 0.0147}$
Residuos ponderados		54.96
χ^2 (95%)		70.99

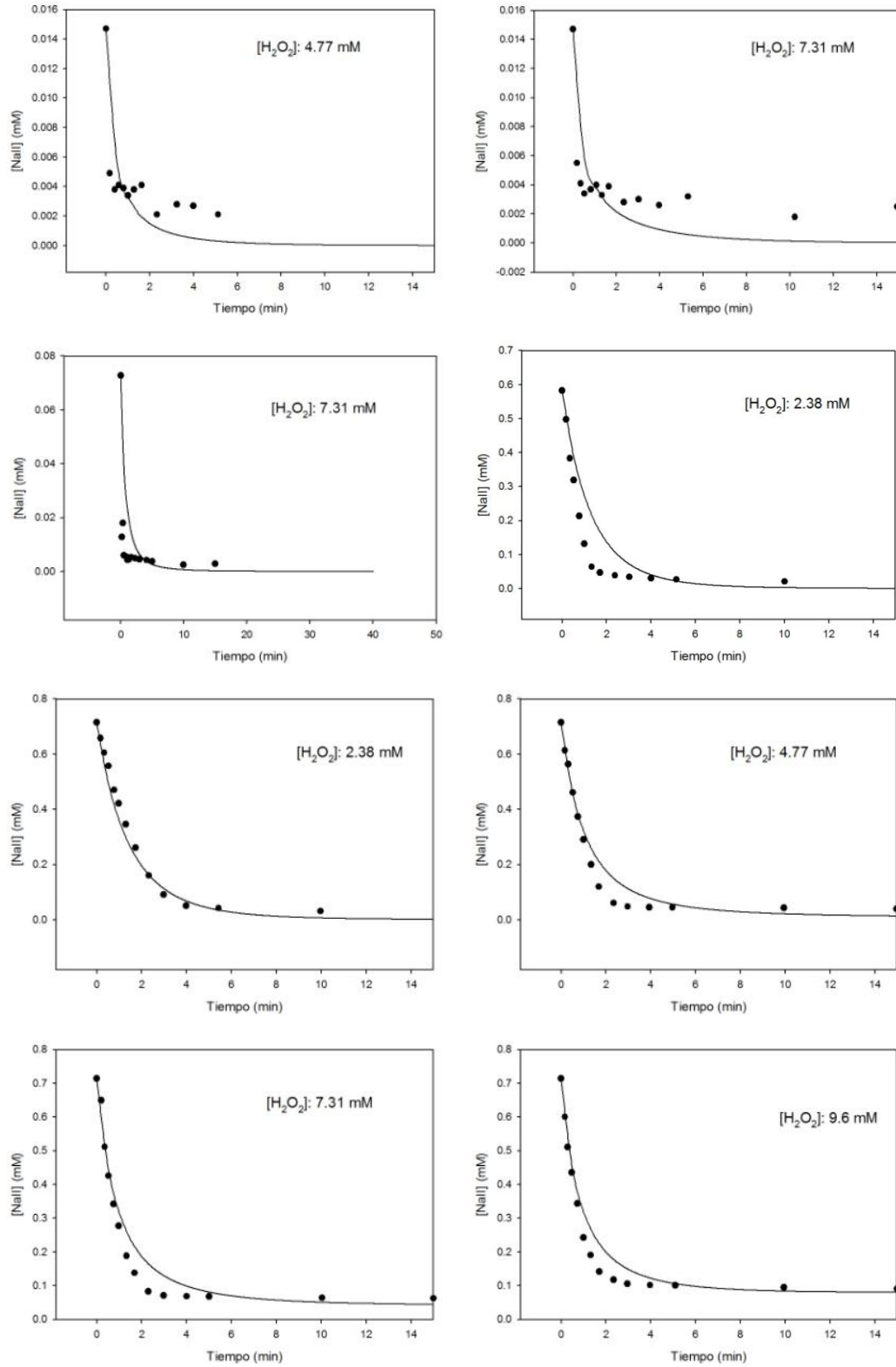
Las Figuras 8.7, 8.8 y 8.9 presentan los perfiles de consumo de NaII experimentales vs. predichos por el modelo, luego de la segunda estimación, a diferentes condiciones de reacción.

La primera de las figuras presenta experimentos que otorgan un muy buen ajuste a los resultados experimentales, tanto en los momentos iniciales de la reacción, como para la etapa de amesetamiento de la conversión medida. Es posible observar de la Figura 8.7 excelentes resultados para experimentos de 250 (0.71 mM) y 300 mg/l (0.86 mM) de NaII. Es importante destacar, además, que los resultados experimentales de 5 y 25 mg/l de NaII (0.014 y 0.07 mM) no se emplearon para la estimación, lo cual pone en evidencia las bondades predictivas del modelo.

Por otro lado, los perfiles de la Figura 8.8 incluyen condiciones experimentales que presentan un buen ajuste de las decoloraciones finales alcanzadas en cada corrida experimental. No obstante, las velocidades iniciales de decoloración se encuentran subestimadas por el modelo. Esta mayor degradación de NaII medida a altas concentraciones de H_2O_2 puede significar que el valor de k_7 se encuentra sobre estimado, es decir que la vía catalítica (k_7) se inhibe en presencia de sustrato orgánico respecto del sistema sin sustrato estudiado en el capítulo anterior, al igual de HRP (Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001), lo que trae aparejado un mayor flujo de reacción entre E_I y NaII. Sin embargo, resultados de modelado molecular demostraron que la coordinación de E_I con Rojo de Alizarina S no presentaba preferencia respecto a H_2O_2 , a diferencia de HRP, en sistemas a pH 9 (ver Capítulo 4).

El sistema con [NaII]: 300 mg/l, [H_2O_2]: 9.6 mM y [hematin]: 3 mg/l presentó conversiones finales de NaII predichas menores a la obtenida experimentalmente. Esto implica la posibilidad de que las vías de inactivación propuestas se encuentren sobre-estimadas. Sin embargo, existe un mejor ajuste durante la etapa inicial de la reacción, incluso para la elevada concentración de H_2O_2 que se empleo en este experimento. Esto, nos permite inferir

que la inactivación propuesta a partir de E_0 (k_{BI}) no es la que está generando la disociación entre los puntos experimentales y el perfil predicho por el modelo.



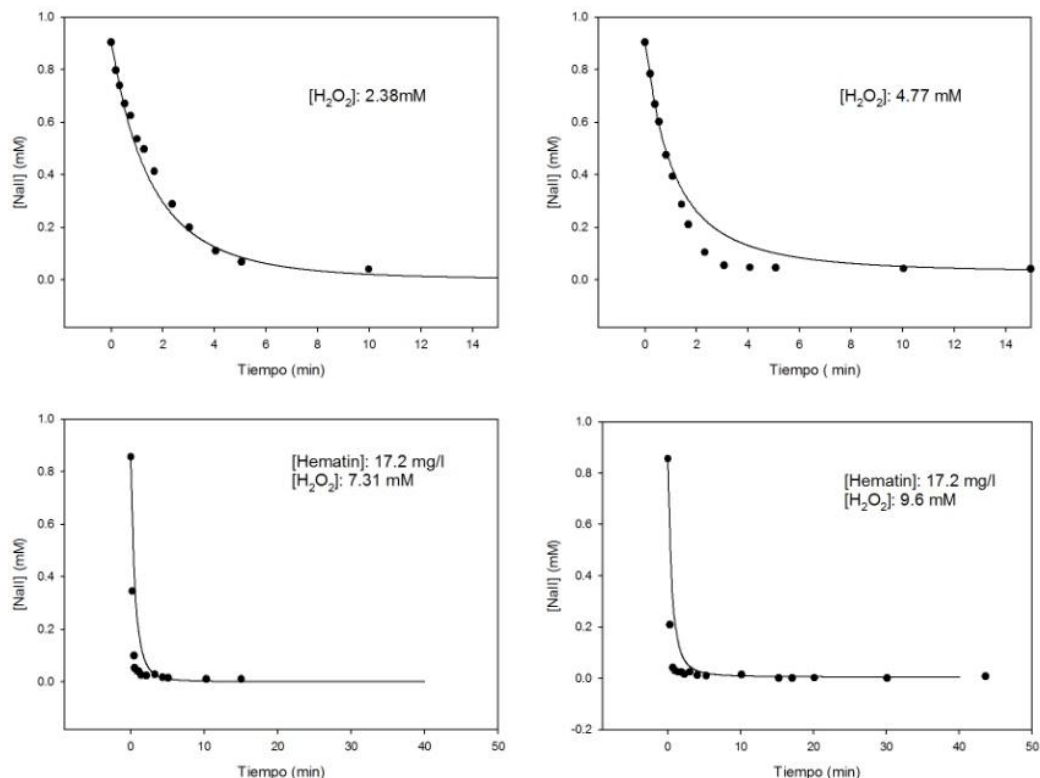
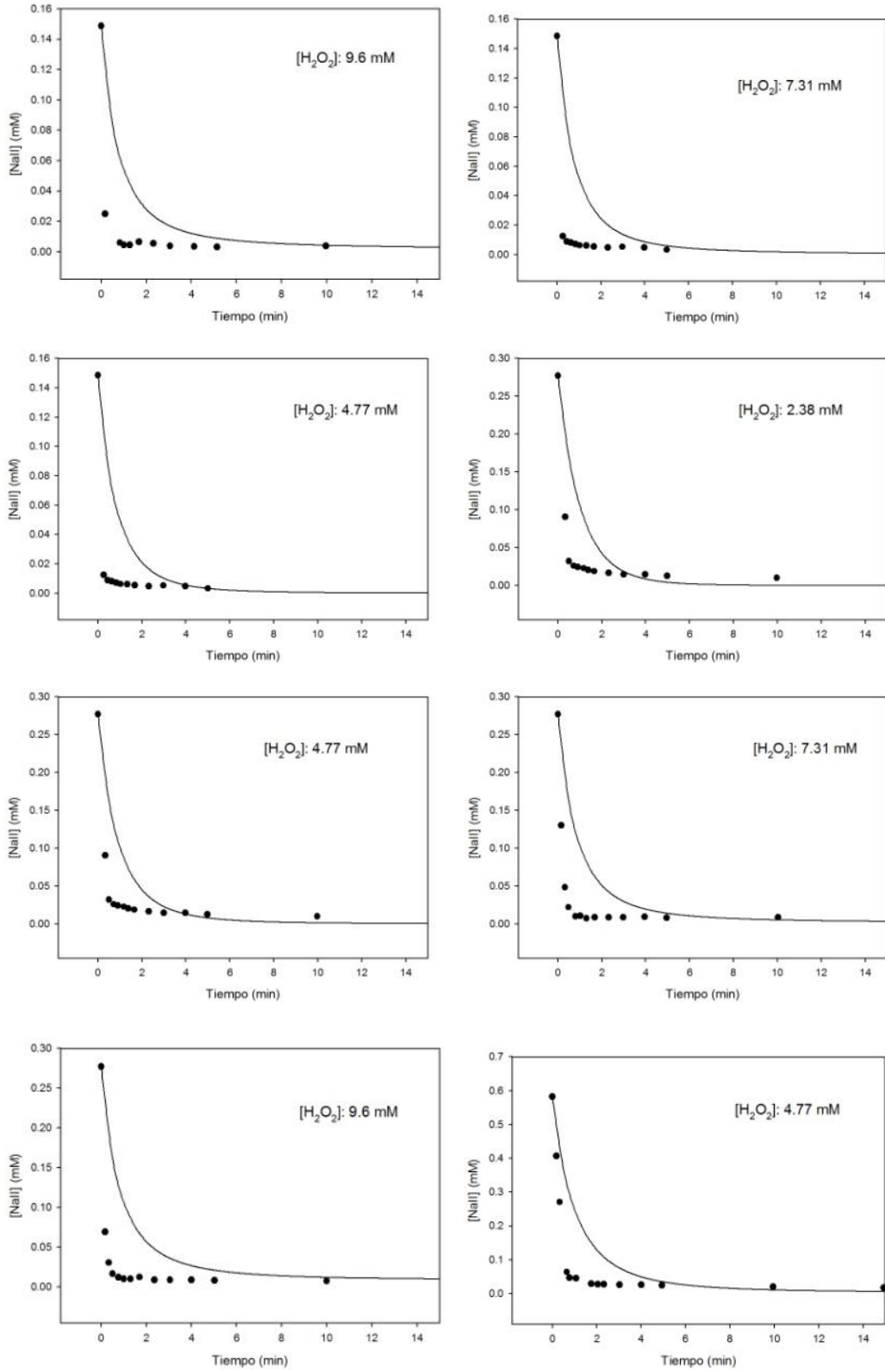


Figura 8.7. Perfiles experimentales (puntos) y predichos (líneas) de decoloración de NaII.

La Figura 8.9, por su parte, muestra los resultados del modelo para sistemas con 400 mg/l de Naranja II. Para estos sistemas experimentales, la decoloración medida fue en todos los casos, menor a la predicha. Este hecho puede asociarse directamente a un mayor grado de inactivación por sustrato, lo que implica que el valor de k_i se encuentra sub-estimado. Las posibles inactivaciones producto del ataque de radicales orgánicos formados durante la reacción, o por ataque de especies reactivas de oxígeno presentes en el medio no se incluyeron en el modelo cinético estudiado (Emmert Iii Thomas, J., Hon, B., Gengenbach, A. J., 2008; Florence, 1985; REBELO et al., 2005). Además, como se mencionó anteriormente, existe la posibilidad de inactivación reversible por coordinación de productos ácidos al Fe de hematin, o simplemente se observa una disminución del consumo de NaII, debido a que existen productos de la oxidación del colorante que pueden ser sustratos de hematin, presentando mejores afinidades con el catalizador. Sin embargo del análisis de la figura podemos inferir que la inactivación por acción de NaII podría asociarse a la formación de complejos no productivos con agregados de NaII, ya que la disociación entre los resultados experimentales y predichos tiene lugar, en la mayoría de los casos, desde el inicio de la reacción.



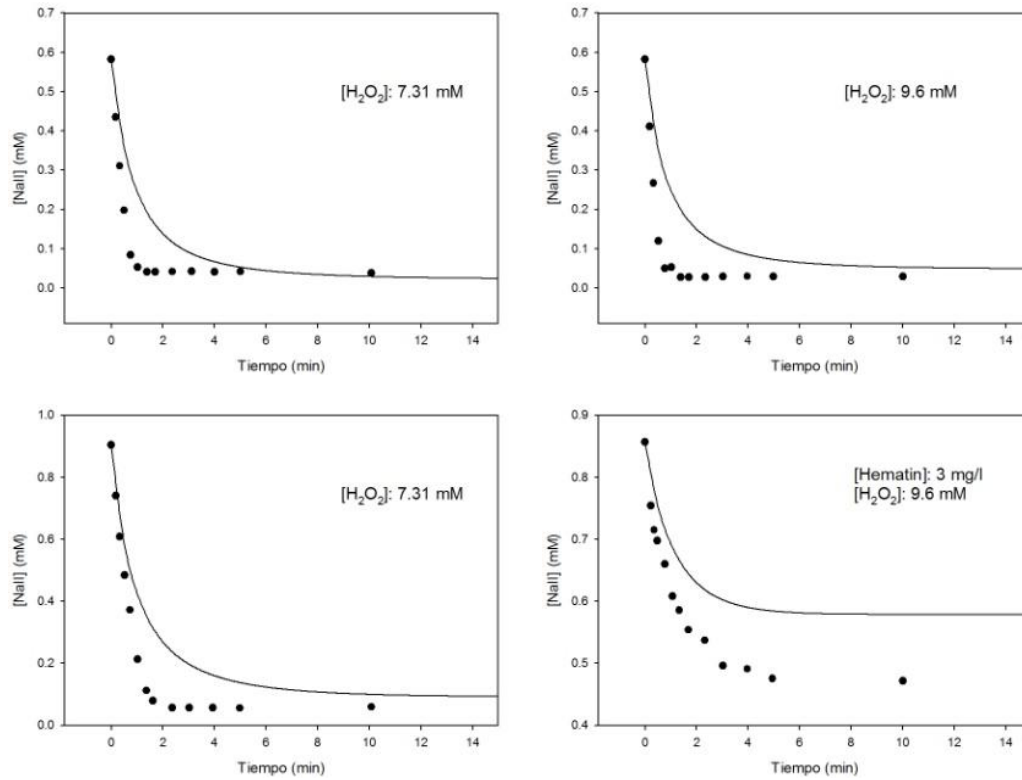


Figura 8.8 Perfiles experimentales (puntos) y predichos (líneas) de decoloración de NaII.

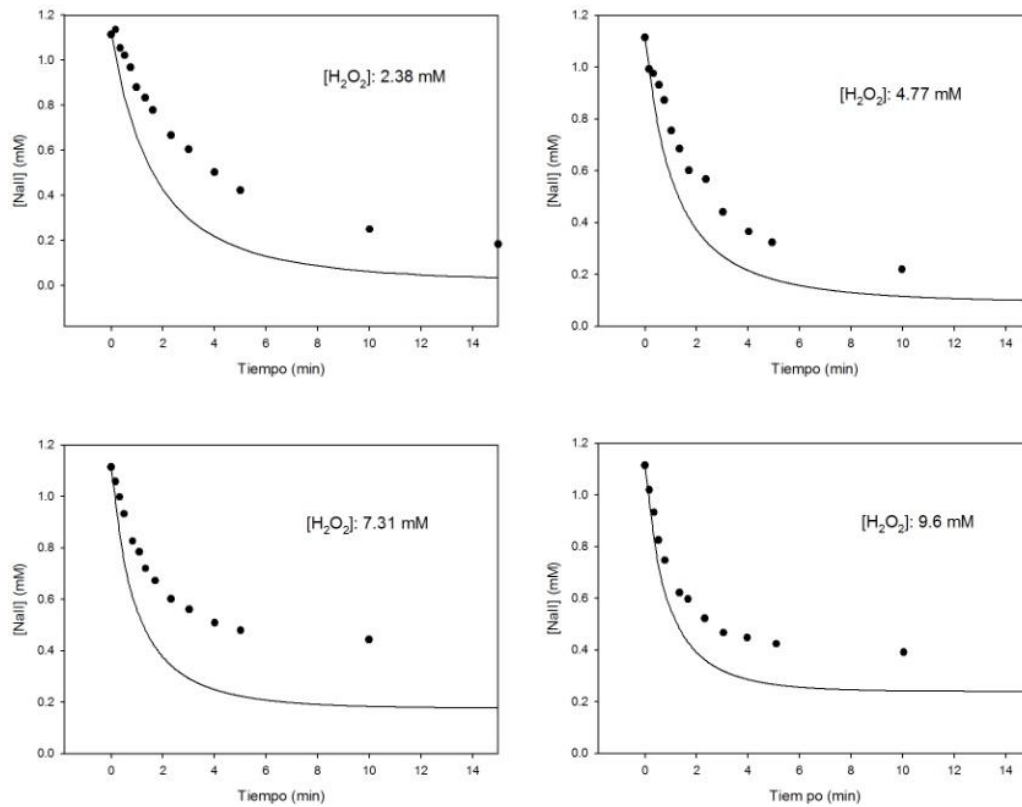


Figura 8.9. Perfiles experimentales (puntos) y predichos (líneas) de decoloración de Naranja II para sistemas con 400 mg/l de Naranja II.

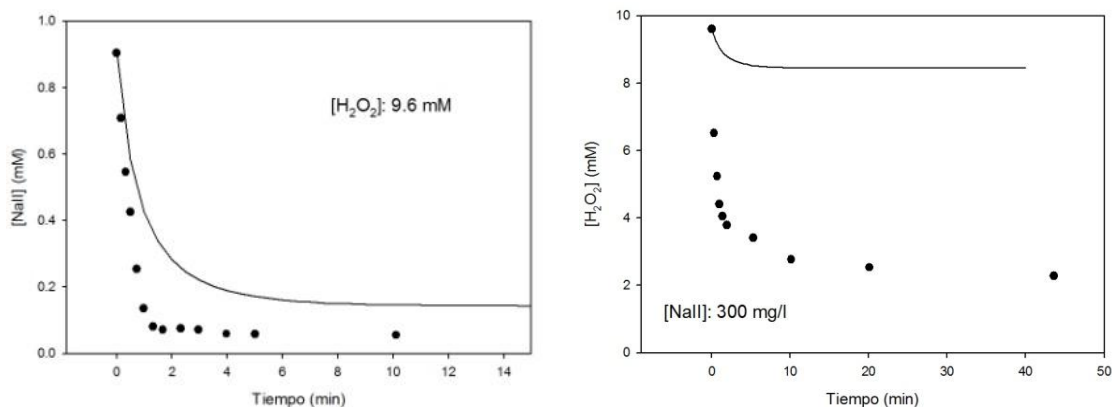
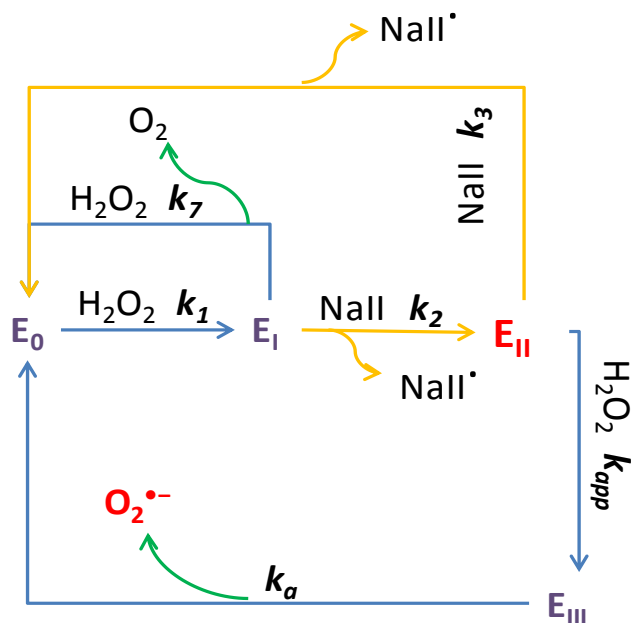


Figura 8.10. Perfiles experimentales (puntos) y predichos (líneas) de consumo de H₂O₂.
[NaII]: 300 mg/l, [H₂O₂]: 9.6 mM, [hematin]: 10 mg/l.

Finalmente se presenta en la Figura 8.10 el perfil experimental y el predicho por el modelo, de la concentración de H₂O₂, para el experimento para el cual fue medido ([NaII]: 300 mg/l, [H₂O₂]: 9.6 mM, [hematin]: 10 mg/l). Se observa una clara subestimación del consumo de H₂O₂ por el modelo utilizado. Es importante mencionar que el perfil de NaII para el mismo experimento también se encuentra subestimado, no obstante la diferencia entre el consumo de oxidante medido con el predicho es significativamente mayor. Numerosas vías de consumo de oxidante, tanto catalíticas como no catalíticas, han sido mencionadas a lo largo de esta tesis. En el Capítulo 7 se descartó la posible formación de la especie E_{II} durante la reacción en ausencia de sustrato fenólico. Sin embargo, esto no implica que la reacción mediante la cual E_{II} es capaz de generar radicales superóxido (O₂⁻) por reacción con H₂O₂ pueda ser descartada, principalmente cuando la presencia de sustratos fenólicos permite la formación de E_{II}. El mayor consumo de H₂O₂ que se presenta en presencia de NaII (mmol de H₂O₂ por mmol de NaII) mencionado en la sección anterior puede, por lo tanto asociarse a esta reacción (ver Esquema 8.2). Esta reacción puede generar un aumento del consumo de oxidante, así como también un aumento de la velocidad de oxidación de colorante, e incluso de la velocidad de formación de O₂.



Esquema 8.2. Posible aumento del consumo de H₂O₂ producto de la participación de las reacciones de E_{II} con peróxido de hidrógeno (k_{app} y k_a).

8.3.3. Sistemas heterogéneos de decoloración de Naranja II

Los resultados de las decoloraciones obtenidas para las soluciones de NaII con hematin inmovilizado se presentan en la Figura 8.11. Es posible observar una brusca disminución de las velocidades de reacción con el catalizador inmovilizado respecto al sistema homogéneo. Esta pérdida de actividad puede asociarse a la etapa de secado que se añadió al proceso de inmovilización desarrollado en el Capítulo 6.

Las velocidades de reacción se obtuvieron mediante la regresión de los datos experimentales, de manera análoga a la propuesta para los sistemas de decoloración homogéneos. Las líneas continuas de la Figura 8.11 representan las regresiones exponenciales de tres parámetros a las que se ajustaron los datos experimentales. La Figura 8.12 muestra la variación de las velocidades iniciales de decoloración con la concentración de ambos sustratos, donde puede observarse que la misma aumenta conforme aumentan las concentraciones de H₂O₂ y de NaII, sin mostrar indicios de inactivación por sustrato.

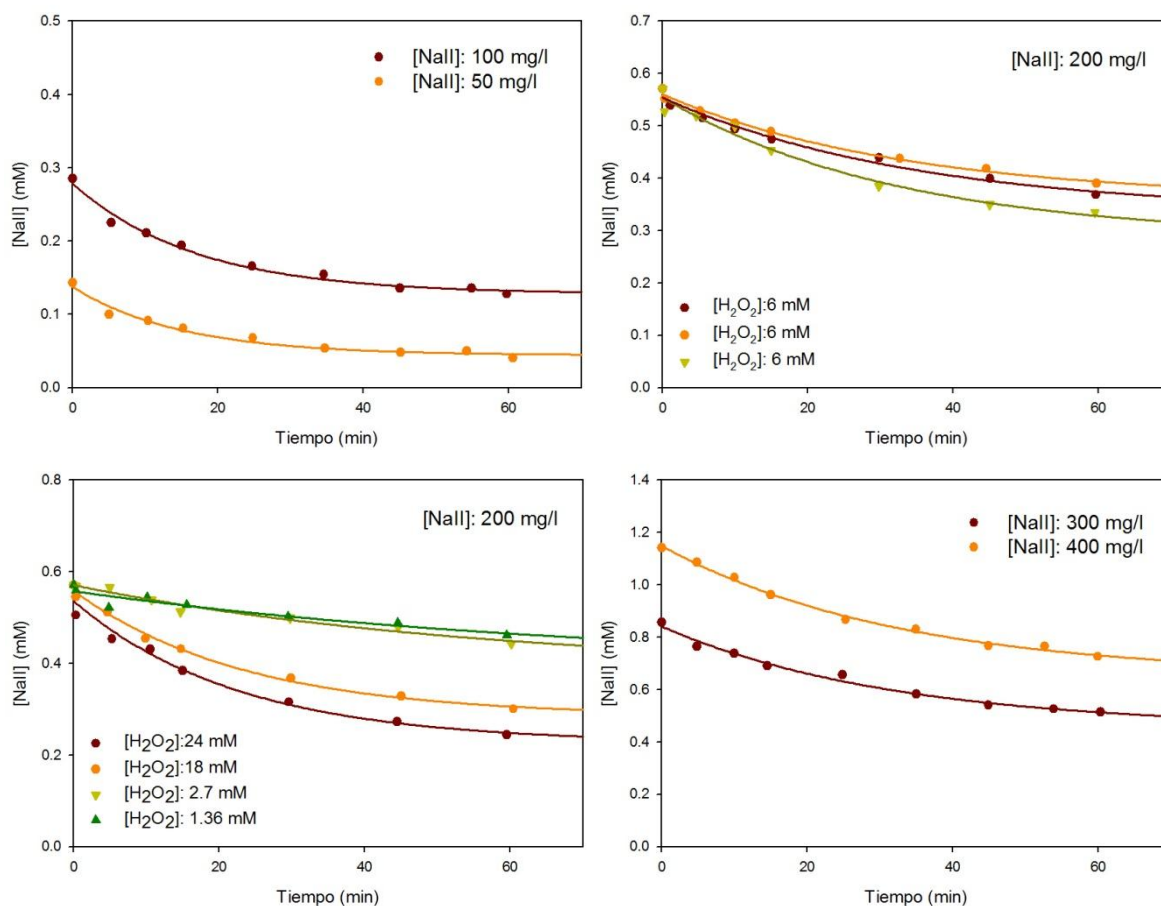


Figura 8.11. Perfiles experimentales de decoloración de Naranja II obtenidos para sistemas heterogéneos, con el catalizador inmovilizado sobre hijuelas de quitosano modificadas con amino- propil- trietoxi- silano y glutaraldehído.

La presencia de oligómeros de hematin, como los que se mencionan en el Capítulo 7, sobre la superficie del soporte modificado puede ser responsable de las pérdidas de actividad producidas durante la inmovilización (Dascombe et al., 2005; Trivedi, Chand, Maulik, & Bandyopadhyay, 2005; Yonathan Parra, Rosa E. Ferrer, 2011). La alta concentración de catalizador empleada durante la inmovilización, permite pensar en la presencia de dímeros, trímeros e incluso tetrameros en solución, los cuales pueden inmovilizarse sobre las hojuelas de quitosano, durante el contacto con las mismas. No obstante, la disminución de actividad que presentó el catalizador inmovilizado empleado en estos experimentos se encuentra muy alejada de la reportada en el Capítulo 6. Estos resultados nos permiten asociar esta brusca inactivación a la etapa de secado del catalizador heterogéneo.

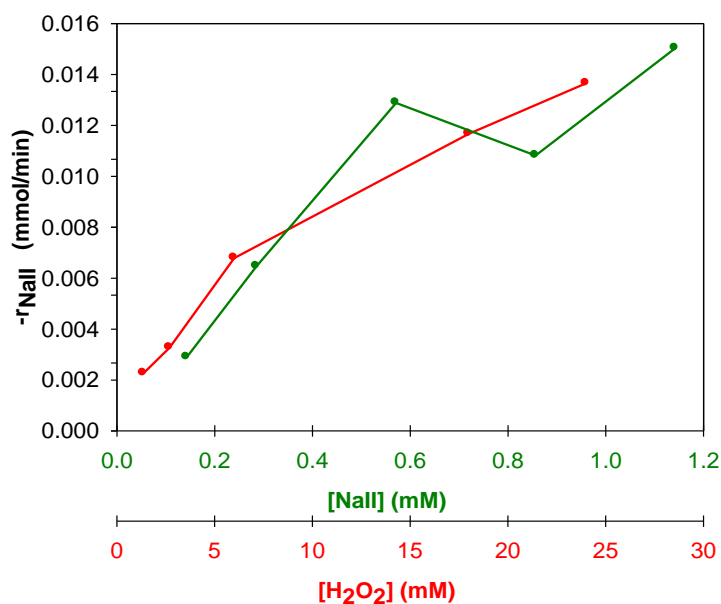


Figura 8.12. Dependencia de la velocidad inicial de decoloración con la concentración de NaII y H₂O₂.

A los fines de analizar el efecto de la inmovilización sobre las constantes de velocidad del modelo propuesto se llevaron a cabo simulaciones de las condiciones experimentales empleadas con el catalizador heterogéneo y los valores optimizados de las constantes cinéticas presentes en las Tablas 8.3 y 8.4. El resultado de la simulación obtenida para el experimento con [NaII]: 200 mg/l, [H₂O₂]: 24 mM se presenta en la Figura 8.13. La línea azul es la correspondiente a tal simulación, lo que demuestra la importante disminución de actividad que resulta durante la etapa de inmovilización de hematin. A los fines de cuantificar esta inactivación es que se llevo a cabo una simulación con las constantes valuadas al 40% de su valor optimizado, la cual corresponde a la línea verde. Finalmente, una simulación con las constantes valuadas al 1 % de su valor optimizado se acerca aun más a los resultados experimentales (línea roja), sin embargo, a elevados tiempo de reacción aumenta la desviación respecto a la decoloración observada.

Con este valor de las constantes al 1% como valor inicial, se realizó una nueva estimación. El modelo de varianza utilizado fue heteroscedástico (ver sección 7.2.2, Capítulo 7). Los resultados de la parametrización se presentan en la Tabla 8.5.

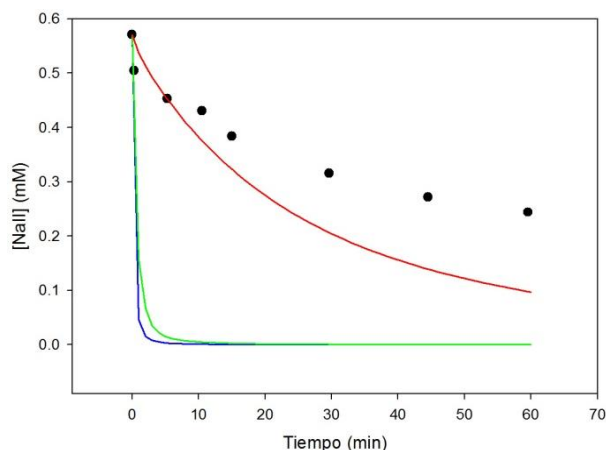


Figura 8.13. Datos experimentales vs. simulaciones para los valores de las constantes optimizadas de las tablas 8.2 y 8.3 (línea azul), para los valores de las constantes optimizadas al 40% (línea verde), y al 1 % (línea roja). Condiciones de reacción: [NaII]: 200 mg/l, [H₂O₂]: 24 mM.

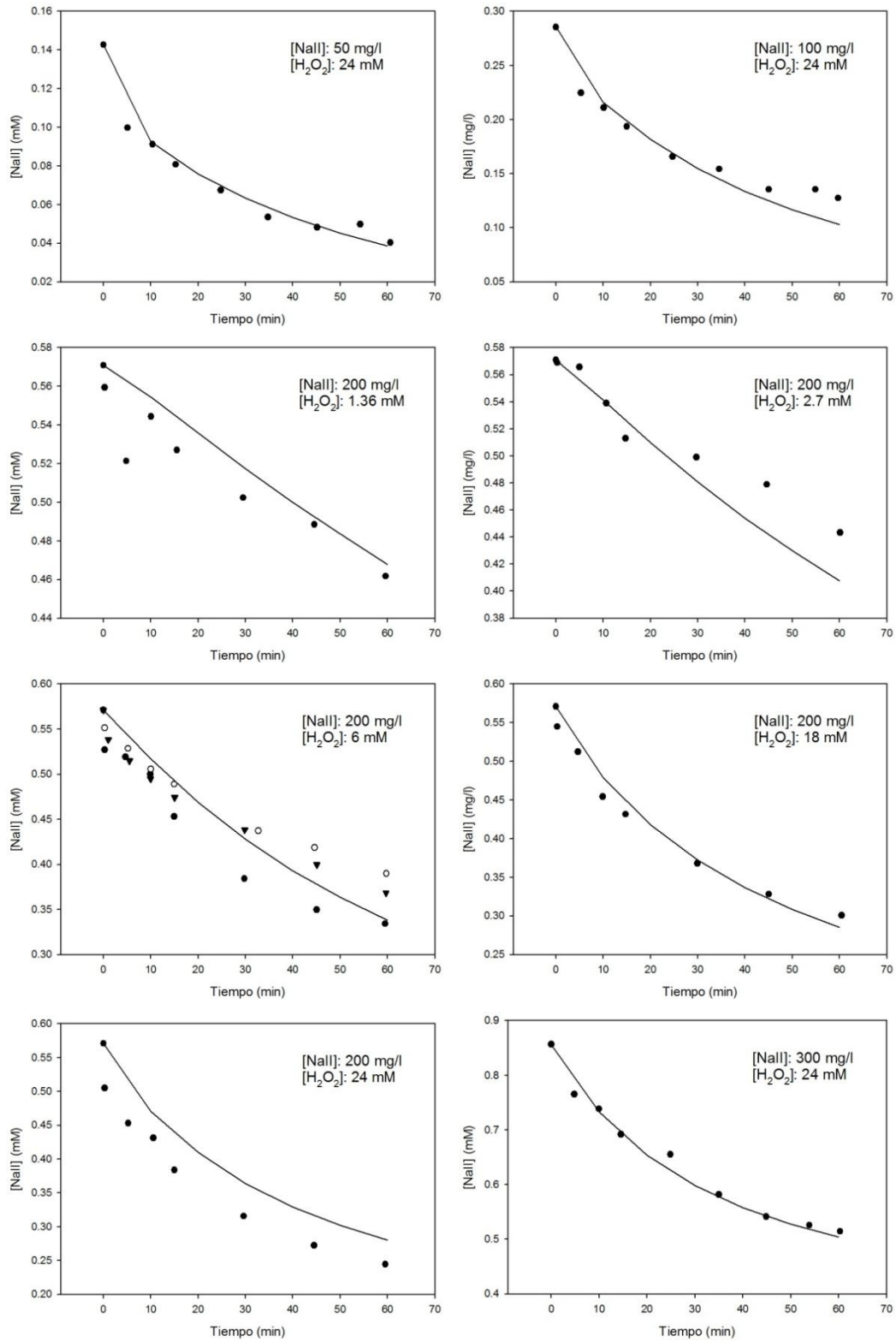
Tabla 8.5. Valores iniciales de las constantes de velocidad del modelo.

Constante cinética (mM ⁻¹ min ⁻¹)	Valores Iniciales (mM ⁻¹ min ⁻¹)	Valores finales (mM ⁻¹ min ⁻¹)
k ₁	0.164	0.0172 _{±0.0033}
k ₂	4.489	7.248*
k ₃	0.519	0.3025 _{±0.0834}
k ₇	0.209	0.01*
k _{B1}	0.003	0.0038*
k _i	0.008	0.0173*
Valor inicial del modelo de varianza		ω: 0.05; γ: 0.5
Residuos ponderados		91.70
χ ² (95%)		107.52

*Constantes cuyos valores NO pudieron ser estimados con confianza.

El modelo otorgó un buen ajuste a los datos experimentales, como puede observarse en los valores de χ² (95%) vs. residuos ponderados que se presentan en la Tabla 8.5. Se efectuó una primera estimación, en la cual se logró optimizar el valor de k₃, y una segunda estimación fijando k₃, que permitió optimizar el valor de k₁. Sin embargo, solo fue posible estimar los valores de estas dos constantes con confianza, para los datos experimentales disponibles. No obstante, se realizaron simulaciones de la decoloración de NaII fijando el valor de las constantes al obtenido durante las estimaciones, los cuales a pesar de no estar

optimizados, nos permiten realizar algunas inferencias respecto a las bondades del modelo. Estas simulaciones se presentan en la Figura 8.14.



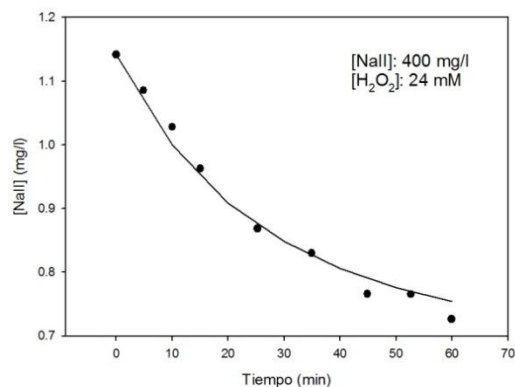


Figura 8.14. Datos experimentales (puntos) vs. simulaciones (líneas) obtenidas con las constantes cinéticas de la Tabla 8.5.

A pesar de que las constantes cinéticas no pudieron ser optimizadas en su totalidad, las simulaciones demuestran que el modelo se ajusta a los resultados experimentales adecuadamente. Como puede observarse de la Tabla 8.5, el valor optimizado de k_1 disminuye tres órdenes de magnitud respecto del homogéneo, lo cual demuestra una disminución de la afinidad de E_0 por H_2O_2 . Esto nos permite inferir la presencia de oligómeros de hematin, ya que el pequeño tamaño de la molécula de peróxido de hidrógeno le debería permitir un fácil acceso al sitio de reacción, a pesar de estar inmovilizado el catalizador. En línea con estas observaciones, el valor de k_3 disminuye dos órdenes de magnitud respecto al catalizador soluble.

8.4. Conclusiones

Las bondades de los estudios teórico-experimentales de la cinética de reacción se ponen de manifiesto por los resultados que se presentan en este capítulo.

Los resultados obtenidos para el sistema homogéneo de decoloración de NaII permitieron nuevamente confirmar la naturaleza catalítica de la degradación. A su vez, los experimentos demostraron que no se obtienen las completas conversiones de los sustratos, lo cual demuestra una clara inactivación del catalizador. En línea con esta observación, los resultados mostraron que para altas concentraciones de Naranja II se produce una disminución de la velocidad inicial de reacción, la cual puede atribuirse a la formación de un complejo no productivo entre NaII o agregados de NaII y hematin.

Por último, el consumo de oxidante en presencia de NaII fue mayor al medido para un sistema equivalente, sin sustrato fenólico. Esto permite postular que existen reacciones entre

distintos productos de degradación de NaII con H_2O_2 , o bien, que estos productos de degradación de NaII pueden ser sustratos de hematin.

El modelado cinético del sistema catalítico homogéneo presentó excelentes ajustes en estadíos avanzados de la reacción. Para experimentos con bajas concentraciones de oxidante, como también para aquellos experimentos con concentraciones medias de colorante se observaron, a su vez, buenos ajustes de las velocidades iniciales de decoloración. Para los sistemas con 5 y 25 mg/l de NaII, el modelo puso de manifiesto su capacidad predictiva. Los valores de las constantes optimizadas demostraron que k_2 resulta ser aproximadamente 10 veces el valor de k_3 , al igual que para HRP.

Para altas concentraciones de H_2O_2 (en general 7.3 y 9.6 mM), las predicciones del modelo demuestran una subestimación de la velocidad inicial de reacción, lo cual puede estar relacionado a que la presencia de sustrato fenólico puede provocar la anulación de la vía catalítica de reacción o una disminución en el flujo de la misma. Por otro lado, a bajas concentraciones de hematin (3 mg/l), las conversiones finales alcanzadas son mayores que las predichas por el modelo. No obstante, a altas concentraciones de colorante (400 mg/l) se observa el comportamiento opuesto. Además, el consumo de peróxido de hidrógeno fue considerablemente subestimado por el modelo, lo que se asignó a la presencia de distintas vías de consumo de oxidante no incluidas en el modelo (k_{app} y k_a), con producción de radicales $O_2\cdot$ como las que se discuten en el Capítulo 7.

Las cinéticas de decoloración del sistema heterogéneo, por su parte, demostraron una importante disminución de las velocidades intrínsecas de decoloración (mmol de NaII consumido por mg de hematin), respecto a las obtenidas para el catalizador soluble. Las elevadas concentraciones de hematin que se emplean durante la etapa de inmovilización del catalizador nos permiten considerar la inmovilización de oligómeros de hematin, lo que puede explicar la disminución de actividad observada. No obstante, los catalizadores obtenidos resultaron activos en las reacciones de decoloración, lo cual representa una ventaja operativa importante respecto a los sistemas solubles.

Por último, las estimaciones realizadas para el sistema heterogéneo permitieron optimizar los valores de k_1 y k_3 , siendo estos del orden del 0.1% y 1% de los valores optimizados para los sistemas solubles.

8.5. Resultados publicados

Parte de los resultados que se presentan en este capítulo fueron publicados en:

- XXIII Congreso Iberoamericano de Catálisis que se realizó en Santa Fe en el año 2012, bajo el título: “Estudio cinético– mecanístico de la decoloración de Naranja II catalizada por hematin.” Autores: Andrés Cornaglia, Cecilia Cabrera, Ivana Magario, Agostina Córdoba, Adriana Brandolín y María Lujan Ferreira.

CAPÍTULO 9

ESTUDIO CINÉTICO Y MODELADO DE REACCIONES DE DECOLORACIÓN DE ROJO DE ALIZARINA S

- Se evidencia una vía de ***inactivación por sustrato fenólico*** asignable a la interacción no productiva de hematin con moléculas o agregados moleculares del colorante.
- Se confirma un ***mecanismo degradativo*** de reacción con formación de estructuras antraquinoides oxidadas, benzoquinonas y radicales benzoquinónicos e hidroxycumarinas, las cuales derivan en ácidos ftálico y bencénico.
- La parametrización del modelo propuesto para Rojo de Alizarina demuestra la ***mayor afinidad*** de hematin hacia este colorante.

9.1. Introducción

Avanzar en el estudio de la cinética de decoloración del sistema hematin/ H_2O_2 nos permite completar la caracterización del catalizador. Estudios de modelado cinético de la decoloración de Rojo de Alizarina S (RAS, Figura 9.1) en sistemas catalíticos Fenton han sido publicados por Devi y colaboradores. Los mismos, incluyen la aplicación de métodos de regresión no lineal a los fines de determinar una constante cinética observada que les permita modelar el comportamiento cinético del sistema (Devi et al., 2009). Sin embargo, Rojo de Alizarina S no es un compuesto modelo en estudios de esta naturaleza.

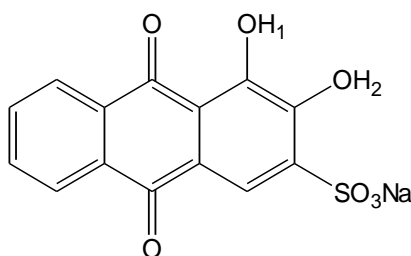
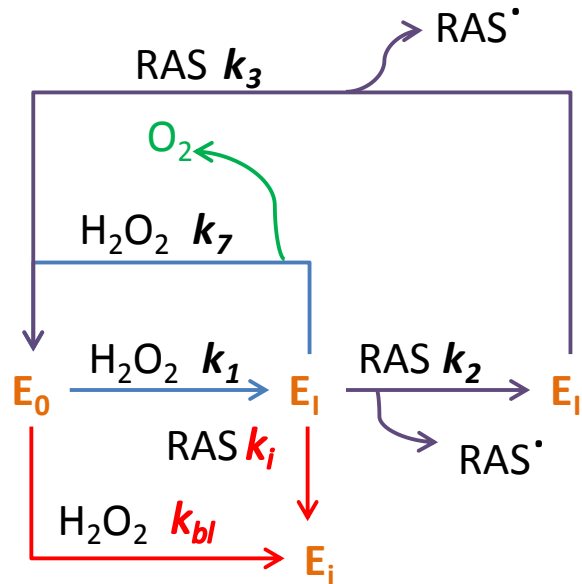


Figura 9.1. Estructura química de Rojo de Alizarina S (C.I. 58005).

Este es el tercer capítulo de esta tesis destinado al modelado cinético de reacciones de oxidación con H_2O_2 catalizadas por hematin. En el Capítulo 8 se presentan resultados de modelado cinético de la decoloración de Naranja II, los cuales permitieron concluir: (1) existe una vía de inactivación por sustrato fenólico, la cual es consistente con la producción de interacciones no productivas de NaII con E_1 ; (2) existen vías de inactivación por H_2O_2 , consistentes con reacciones de blanqueamiento a partir de E_0 ; (3) es posible que la vía catalítica de producción de oxígeno propuesta se inhiba en presencia de sustrato fenólico, como ocurre con HRP (Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001). En base a los resultados obtenidos en los capítulos anteriores se plantea el modelo de reacciones del Esquema 9.1, el cual es análogo al propuesto para el sistema con NaII. El estudio experimental de las reacciones de decoloración de Rojo de Alizarina S, para sistemas tanto homogéneos como heterogéneos, tiene como principales objetivos:

- (1) Determinar los efectos asociados a la naturaleza estructural del sustrato.
- (2) Avanzar en el conocimiento de los productos de reacción.

- (3) Analizar efectos cualitativos de inactivación del catalizador.
- (4) Determinar los efectos de la inmovilización de hematin en las velocidades de decoloración de soluciones de RAS.



Esquema 9.1. Mecanismo de reacción propuesto para sistemas H_2O_2 /RAS catalizados por hematin.

Por otro lado, el modelado cinético de estos sistemas cuantifica los efectos antes mencionados de afinidad al sustrato fenólicos e inactivación por sustrato, en función de los valores netos de las constantes cinéticas. A su vez, permite consolidar un modelo de reacciones del catalizador fundamental para el diseño de un sistema de decoloración de efluentes reales.

9.2. Metodología

9.2.1. Etapa experimental

9.2.1.1. Sistemas homogéneos de decoloración de Rojo de Alizarina S

Las condiciones de los experimentos para los cuales se determinaron los perfiles de RAS se detallan en la Tabla 9.1. Se llevaron a cabo 14 experimentos en los que se varió la concentración de RAS y la de H_2O_2 . El experimento N° 8 se repitió tres veces. El medio de

reacción en todos los casos se compuso por buffer Tris 0.1 M, pH 9.4. Las reacciones se condujeron en cubetas plásticas a temperatura ambiente, y se determinó el avance de reacción en línea por espectrofotometría UV-Visible, mediante la obtención de los espectros en el tiempo. La concentración de catalizador fue 2 mg/l. El medio de reacción contenía las alícuotas correspondientes de soluciones madre de RAS y hematin, mas el volumen necesario de buffer hasta completar el volumen total de reacción, 3 ml. El H₂O₂ se añadió en un solo paso a t=0 para dar inicio a la reacción. El tiempo durante el cual se monitoreó la reacción fue de 15 minutos.

Cada perfil concentración-tiempo obtenido se ajustó a una función exponencial de tres parámetros:

$$y = ae^{-bx} + c \tag{9.1}$$

Luego, a los fines de determinar la velocidad inicial para cada experimento se calculó la derivada a tiempo cero de cada curva.

$$-\left(\frac{dy}{dx}\right)_{t=0} = -r_0 = ab \tag{9.2}$$

Tabla 9.1. Condiciones de reacción empleadas.

Exp N°	[RAS] (mg/l)	[RAS] (mM)	[H ₂ O ₂] (mM)
1	33	0.096	0.5
2	33*	0.096	1.0
3	33*	0.096	1.5
4	33*	0.096	1.7
5	33*	0.096	2.0
6	60	0.175	0.5
7	60*	0.175	1.0
8	60*	0.175	1.5
9	60*	0.175	1.7
10	60*	0.175	2.0
11	80	0.234	0.5
12	80	0.234	1.0
13	80	0.234	1.5
14	80	0.234	1.7

*Experimentos empleados para la parametrización

9.2.1.2. Sistemas heterogéneos de decoloración de RAS

Los experimentos que se presentan en esta sección fueron realizados por Belen Andali y Esteban Ottonello en el marco del desarrollo de un Proyecto Integrador, bajo la dirección de la Dra. Ivana Magario y la codirección de Agostina Córdoba. Hematin se inmovilizó sobre quitosano modificado con amino-propil-trietoxi-silano (APTS) y glutaraldehído (GA), siguiendo las condiciones de inmovilización detalladas en el Capítulo 6, incluyendo una posterior etapa de secado de las hojuelas obtenidas a temperatura ambiente, hasta peso constante. Los catalizadores obtenidos presentaron 32.9 mg_{Hematin}/g_{Quitosano seco}. Se llevaron a cabo reacciones de decoloración de RAS en las condiciones que se presentan en la Tabla 9.2. El experimento N° 4 se repitió cuatro veces. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, mientras que el pH del medio se mantuvo en 9.4, mediante el empleo de buffer Tris 0.1 M. El volumen de reacción fue de 25 ml, cada corrida experimental contenía 25 mg de catalizador heterogéneo seco y en todos los casos la reacción se inició con el agregado de la cantidad correspondiente de H₂O₂. Se tomaron muestras de 0.5 ml a distintos tiempos de reacción, las cuales se diluyeron en 0.5 ml de buffer previamente enfriado en baño de hielo y se centrifugaron durante 2 min a 13000 rpm con el objeto de separar el catalizador insoluble y detener la reacción. Finalmente se registró la absorbancia a 511 nm.

Tabla 9.2. Condiciones de reacción empleadas.

Exp N°	[RAS] (mg/l)	[RAS] (mM)	[Hematin] (mg/l)	[H ₂ O ₂] (mM)
1	400*	1.17	32.9	24
2	300*	0.88	32.9	24
3	200*	0.58	32.9	1.36
4	200	0.58	32.9	6
5	200*	0.58	32.9	18
6	200*	0.58	32.9	24
7	100*	0.29	32.9	24
8	50*	0.15	32.9	24

9.2.2. Modelado y parametrización

9.2.2.1. Modelo cinético

El modelo cinético de decoloración de RAS, correspondiente a las reacciones incluidas en el Esquema 9.1, se basa en los resultados obtenidos del modelado de: (1) el sistema hematin/H₂O₂ del Capítulo 7; y (2) el sistema hematin/H₂O₂/NaII del Capítulo 8. La

descripción matemática del mecanismo se presenta a continuación. Se incluye una etapa de inactivación del catalizador por formación de un complejo no productivo entre E_I /RAS y/o agregados de RAS, de manera análoga a la propuesta para Naranja II.

$$\frac{d[E_0]}{dt} = - (k_1 + k_{b1}) [E_0][H_2O_2] + k_7[E_I][H_2O_2] + k_3[E_{II}][RAS] \quad (9.3)$$

$$\frac{d[E_I]}{dt} = k_1 [E_0][H_2O_2] - (k_7[H_2O_2] + k_2[RAS] + k_i[RAS])[E_I] \quad (9.4)$$

$$\frac{d[E_{II}]}{dt} = -k_3 [E_{II}][RAS] + k_2[RAS][E_I] \quad (9.5)$$

$$\frac{d[E_{BI}]}{dt} = k_{BI} [E_0][H_2O_2] + k_i[RAS][E_I] \quad (9.6)$$

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = -k_1 [E_0][H_2O_2] - k_{BI} [E_0][H_2O_2] - k_7[E_I][H_2O_2] \quad (9.7)$$

$$\frac{d[RAS]}{dt} = -(k_2 + k_i) [E_I][RAS] - k_3[RAS][E_{II}] \quad (9.8)$$

9.2.2.2. Estimación de parámetros

La estimación de las constantes de velocidad del modelo en base a los datos experimentales, se realizó con el software comercial gPROMS 3.2 (general PROcess Modeling System, Process System Enterprise Ltd., Londres, Reino Unido), de manera análoga a la descrita en la sección 7.2.2 del Capítulo 7.

Para la parametrización, las concentraciones iniciales de catalizador (E_0), RAS y H_2O_2 se fijaron en base a las condiciones experimentales. Las concentraciones iniciales de RAS^* y O_2 , así como la de los intermediarios catalíticos se valoraron en cero. No se consideró la suposición de estado estacionario de los intermediarios catalíticos. A su vez, se asumió que los radicales RAS^* formados durante el ciclo catalítico participan de reacciones de degradación sucesivas sin afectar la naturaleza del catalizador ni de los sustratos, al igual que durante el modelado cinético de NaII, supuesto que puede depender de las condiciones experimentales e invalidarse a altas concentraciones de colorante.

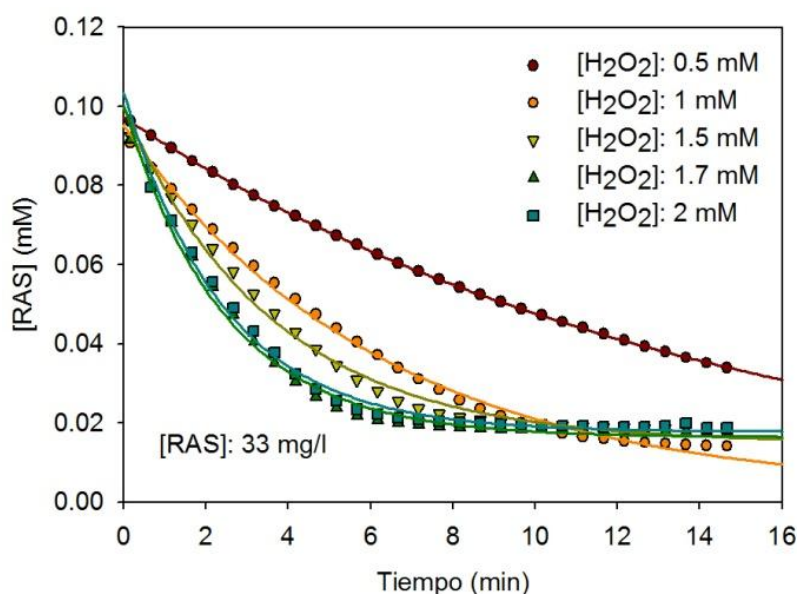
9.3. Resultados y discusión

9.3.1. Cinéticas de decoloración de RAS en sistemas homogéneos

Los perfiles de decoloración de RAS se presentan en la Figura 9.2. Es posible observar que durante el tiempo monitoreado la conversión no fue completa para ninguna de las concentraciones de RAS y oxidante analizadas. El ajuste de los datos experimentales a la

Ecuación 9.1 se grafica como líneas continuas en la Figura 9.2. A bajas concentraciones de colorante (33 mg/l, 0.096 mM), hematin presentó las mayores velocidades de reacción. No obstante, para las concentraciones de H_2O_2 de 1.7 y 2 mM, la reacción se frenó a conversiones menores que las obtenidas para las restantes concentraciones de oxidante. Por su parte, los sistemas que contenían 60 mg/l de RAS (0.175 mM) mostraron también un paulatino aumento de las velocidades de decoloración con el aumento de la concentración de H_2O_2 hasta 1.5 mM, luego del cual la conversión alcanzada se mantuvo sin mayores modificaciones. Este comportamiento puede asociarse a la presencia de una etapa de inactivación por blanqueamiento de hematin, en línea con los resultados que se presentan en los capítulos anteriores (Capítulos 7 y 8). Sin embargo, en los sistemas con mayor concentración de colorante (80 mg/l) en el medio de reacción no se observó esta inactivación.

La Figura 9.3 presenta la dependencia de las velocidades iniciales de decoloración con las concentraciones de RAS y H_2O_2 . Es posible visualizar un claro aumento de las velocidades de decoloración con el aumento de concentración de H_2O_2 , en la región estudiada ($[\text{H}_2\text{O}_2]:[\text{hematin}]$ desde 160 a 630). Además, las velocidades iniciales presentan una clara dependencia lineal respecto a la concentración de oxidante, lo cual es consistente con el mecanismo propuesto, para el cual la etapa controlante de la velocidad es la activación de E_0 . Este aumento de velocidades con el aumento de la concentración de oxidante es mayor para $[\text{RAS}]: 33 \text{ mg/l}$. Sin embargo, para concentraciones de peróxido de hidrógeno mayores a 1.7 mM se observa un amesetamiento de los valores de velocidad medidos.



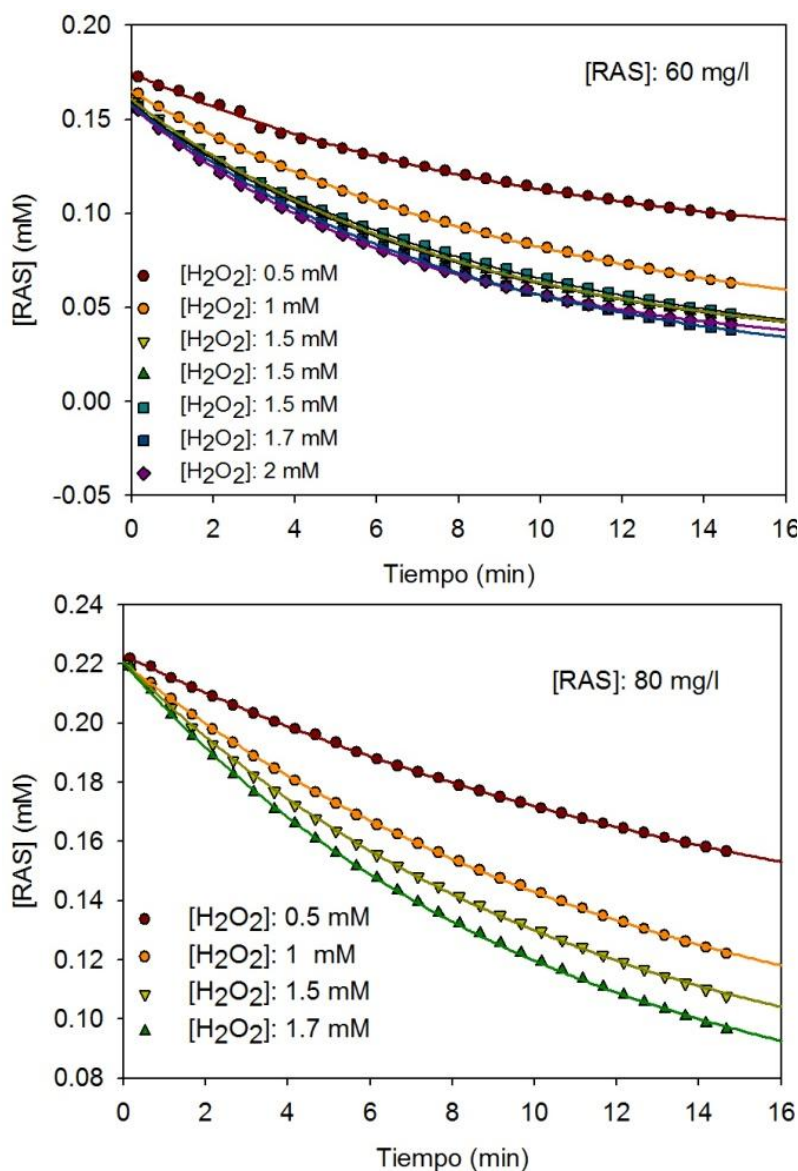


Figura 9.2. Perfiles de consumo de RAS. [Hematin]: 2 mg/l.

En contraposición a lo observado para la variación de oxidante, la velocidad de decoloración se mantiene independiente de la concentración de Rojo de Alizarina S a bajas concentraciones de peróxido. No obstante, a concentraciones de H_2O_2 mayores a 1.5 mM, se observa una marcada disminución de la velocidad inicial de decoloración para altas concentraciones de RAS (60 y 80 mg/l, 0.175 y 0.234 mM). Estos resultados evidencian la existencia de una vía de inactivación del catalizador, la cual puede ser producto de interacciones no productivas con moléculas o agregados del sustrato fenólico; así como también la posible inactivación de la metaloporfirina por ataque de los radicales orgánicos y/o la posibilidad de que productos de la degradación de RAS sean sustrato de hematin.

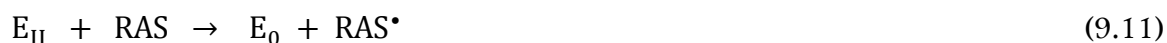
A la luz de los resultados que se presentan en el capítulo anterior (Capítulo 8), es posible advertir como vía principal de inactivación del catalizador la formación de complejos no

productivos con RAS o sus agregados. Sin embargo, no podemos descartar que a bajas concentraciones de colorante y altas concentraciones de peróxido de hidrógeno las elevadas velocidades de reacción medidas se asocien a la producción de especies reactivas de oxígeno que participen en la degradación de RAS.

La Figura 9.4 muestra la dependencia de la velocidad inicial con la relación molar $[H_2O_2]:[RAS]$. Puede observarse que el aumento de relación peróxido:colorante mejora las velocidades iniciales de decoloración. No obstante, para $[RAS]:33$ mg/l, las velocidades medidas fueron relativamente menores a las de los sistemas con mayor concentración de colorante. Esto es consistente con el mecanismo de reacción propuesto, ya que la etapa controlante de la velocidad es la activación de E_0 , mediante la reacción:



Para altas concentraciones de peróxido en el medio, esta reacción puede alcanzar un punto de saturación, que depende tanto de la concentración de hematin; así como también de la recuperación de E_0 por las vías:



Las cuales dependen de la concentración neta del colorante en el medio de reacción.

Igualmente, es necesario considerar que a concentraciones elevadas de RAS (80 mg/l), el colorante en solución puede formar agregados que disminuyan la concentración real de monómeros disponibles para reaccionar con hematin, lo que puede explicar por qué el aumento de concentración de sustrato no se traduce en un aumento de las velocidades de reacción medidas.

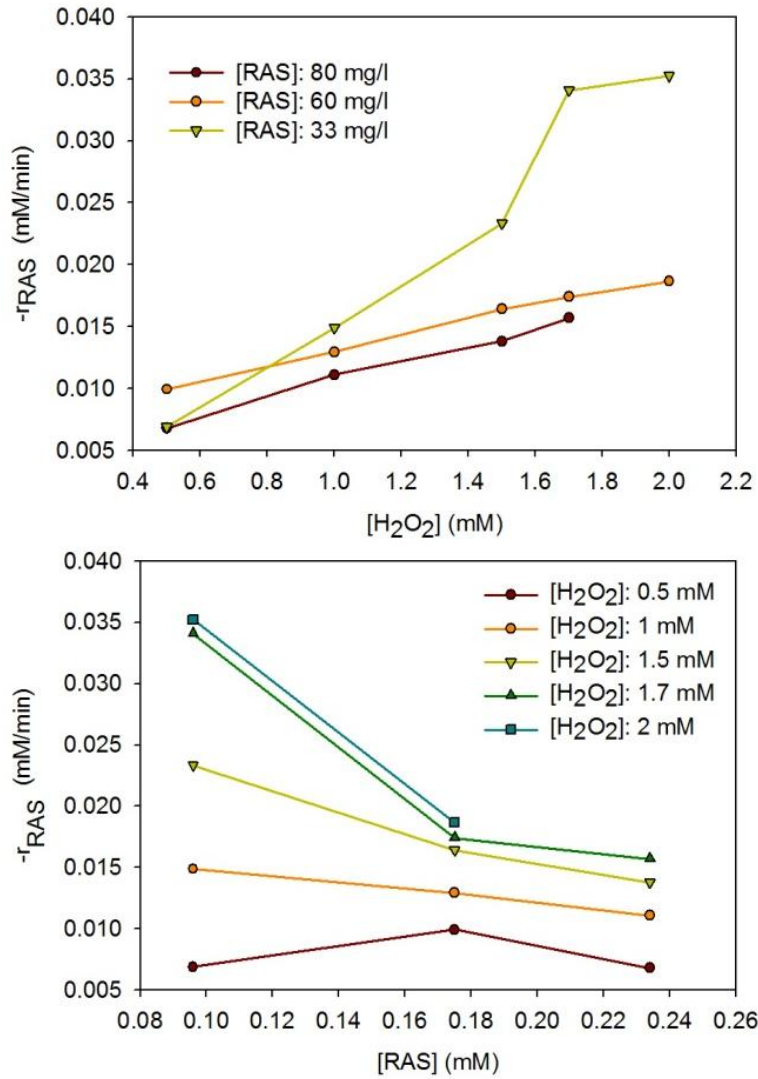


Figura 9.3. Dependencia de la velocidad inicial de decoloración con $[RAS]_0$ y $[H_2O_2]_0$.

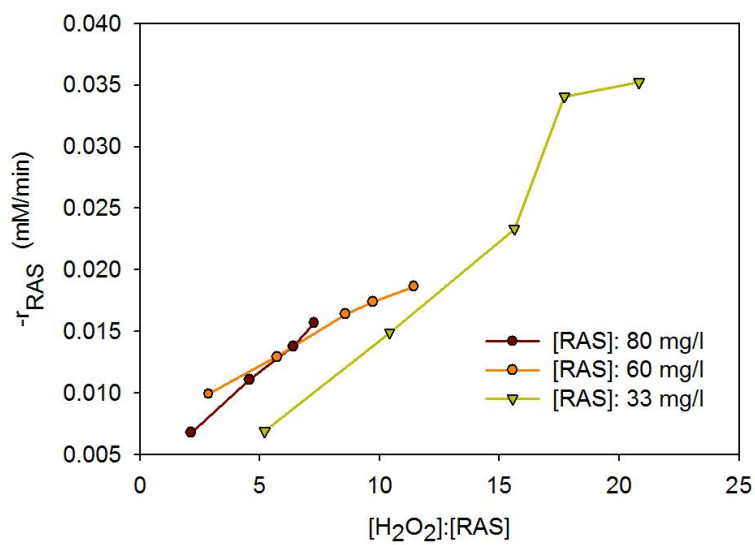
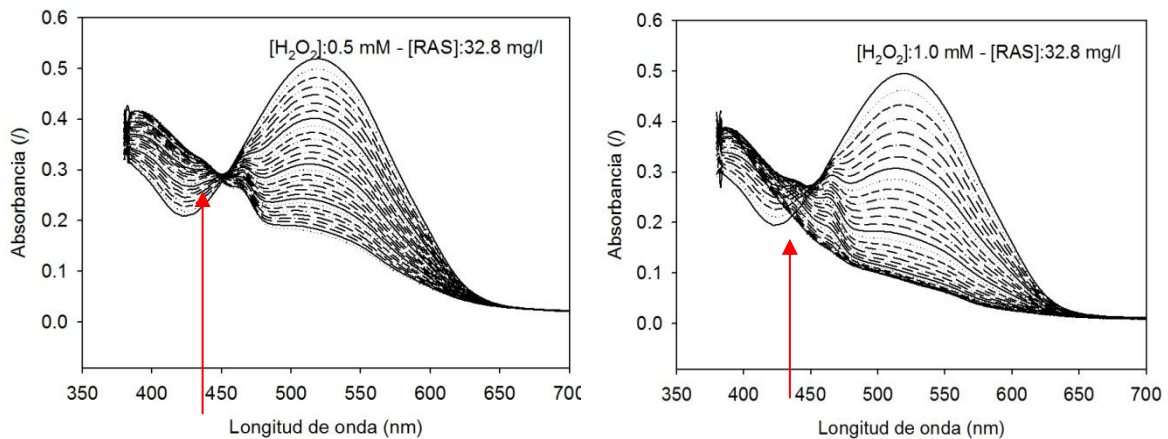


Figura 9.4. Dependencia de la velocidad inicial de decoloración con la relación molar $[H_2O_2]:[RAS]$.

9.3.2. Avance de reacción: Análisis de espectros UV-Visibles

Las Figuras 9.5, 9.6 y 9.7 presentan los cambios espectrales del medio de reacción durante la oxidación de Rojo de Alizarina S para los experimentos de la Tabla 9.1. Como se mencionó en el Capítulo 3, la absorbancia a 511 nm se asocia a la conjugación del enlace $C=O$ perteneciente a $OH-C-C=O$. Es posible observar en todas las figuras, la disminución de la absorbancia a 511 nm, con la consecuente disminución de la coloración de las soluciones, lo cual puede relacionarse directamente a la ruptura de la estructura de RAS. Además, no se observa formación de picos a mayores longitudes de onda, es decir, no se producen reacciones de acoplamiento de radicales durante el periodo de tiempo analizado.

Todas las figuras evidencian la formación de nuevos picos a 470 y 440 nm, los cuales desaparecen con el avance de reacción. Además, también se observa un incremento de la absorbancia a 380 nm. En los sistemas correspondientes a $[H_2O_2]$: 1.5, 1.7 y 2 mM de la Figura 9.5 se observa, a su vez, la desaparición de este pico a 380 nm hacia el final de la reacción (señalado por círculos rojos).



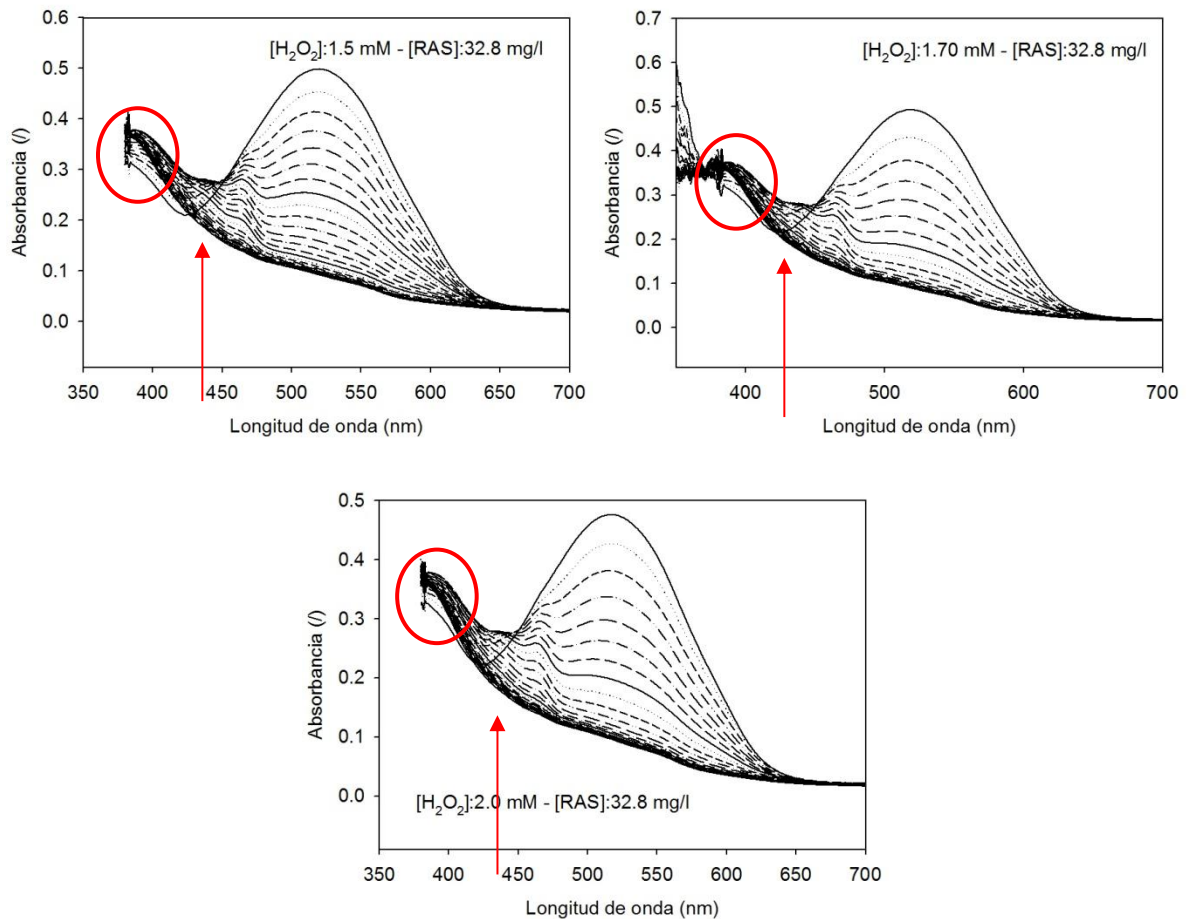


Figura 9.5. Cambios espectrales en el tiempo, durante la oxidación de Rojo de Alizarina S, en sistemas con $[RAS]: 33 \text{ mg/l}$, $[hematin]: 2 \text{ mg/l}$.

Es evidente que el mecanismo de decoloración es degradativo, en línea con las observaciones del Capítulo 4. La formación de nuevos picos a menores longitudes de onda se asocian a la presencia en el medio de reacción de sustancias de menor peso molecular. El pico a 470 nm puede asignarse a la formación de hidroxicumarina en el medio de reacción (Maezono et al., 2011). Mientras que el nuevo pico alrededor de 440 nm (señalado por flechas rojas) se asocia a la presencia de benzoquinonas y radicales benzoquinónicos, los cuales presentan bandas de absorción entre 400 y 500 nm según la naturaleza de sus sustituyentes, producto de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ (Cory, Rose M. and Mcknight, 2005; Görner, 2003; Uyguner & Bekbolet, 2005).

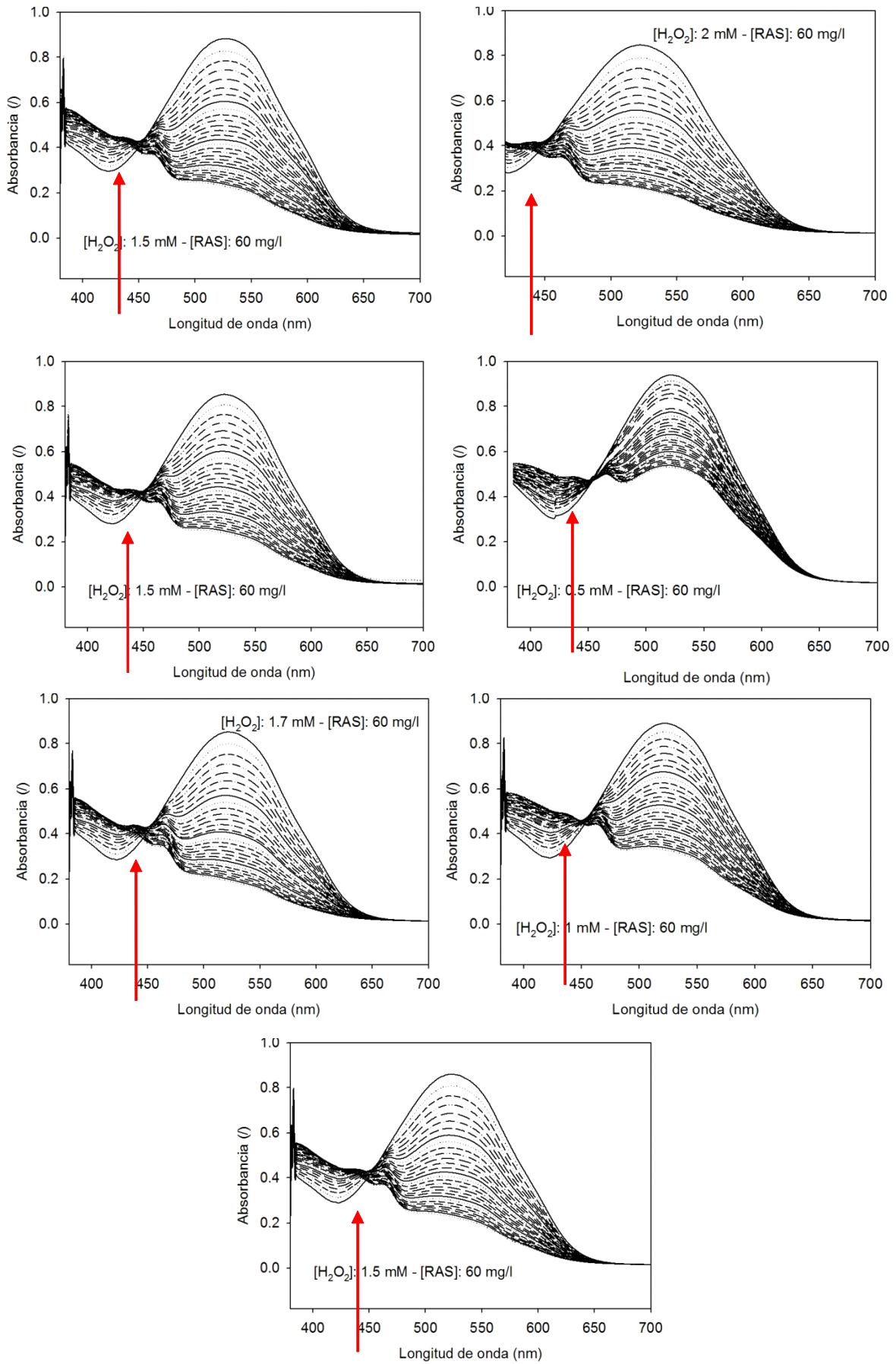


Figura 9.6. Cambios espectrales en el tiempo, durante la oxidación de Rojo de Alizarina S, en sistemas con [RAS]: 60 mg/l, [hematin]: 2 mg/l.

Otros intermediarios de la reacción de oxidación de RAS que pueden ser propuestos en base al análisis de los espectros en el tiempo, son estructuras antracénicas oxidadas como antraquinonas y naftoquinonas, a las cuales es posible atribuir el pico de absorción a 380 nm (Cory, Rose M. and Mcknight, 2005; Pasto & Johnson, 1981).

Hacia el final de la reacción el aumento de absorbancias a longitudes de onda menores a las 360 nm se asocia a la formación de ácidos carboxílicos de menor peso molecular, como ácidos ftálico y ácido bencénico, así como también de aldehídos y cetonas (Pasto & Johnson, 1981).

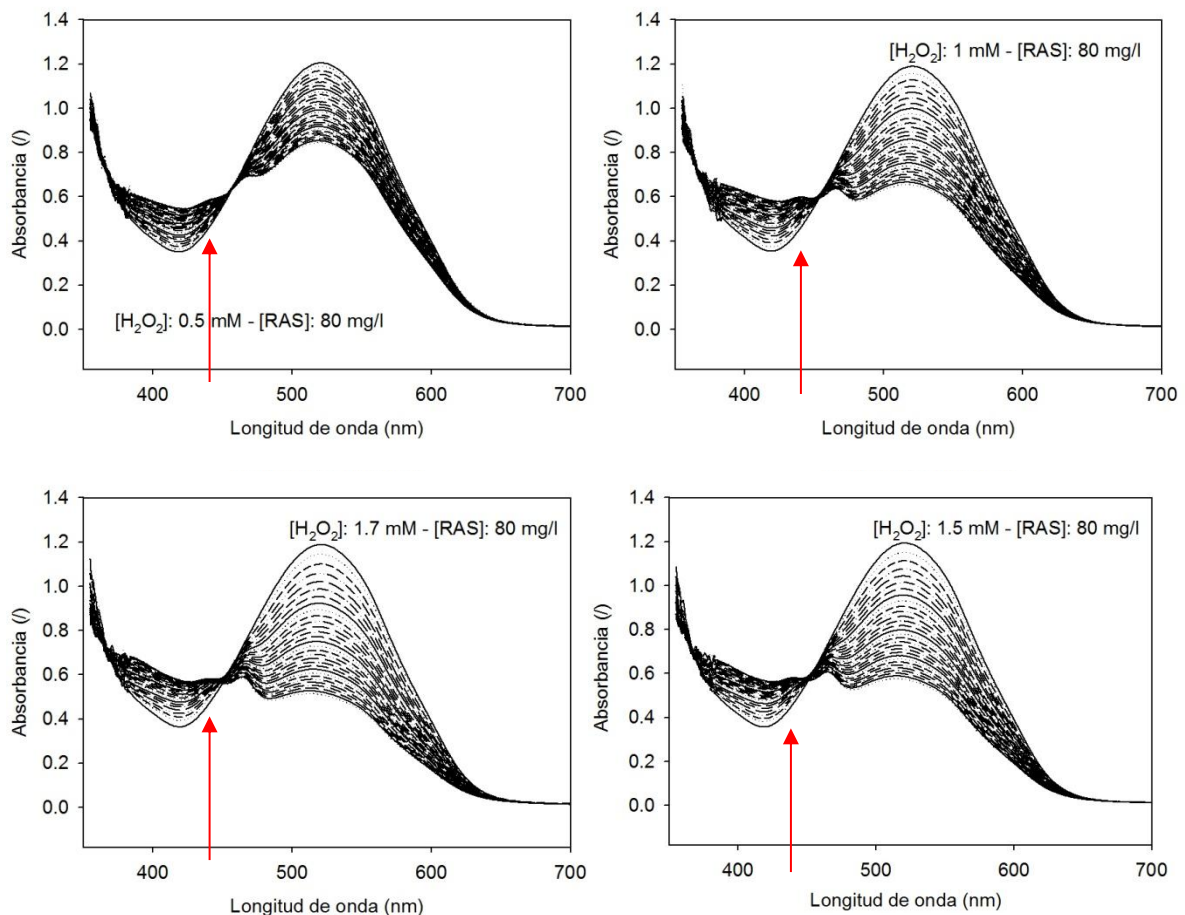


Figura 9.7. Cambios espectrales en el tiempo, durante la oxidación de Rojo de Alizarina S, en sistemas con [RAS]: 80 mg/l, [hematin]: 2 mg/l.

Devi y colaboradores, durante el estudio de la decoloración de soluciones de RAS en sistemas foto-Fenton, proponen como intermediarios oxidados de reacción a ácido ftálico, ácido hidroxibencensulfónico e hidroxibenceno, en base a resultados de espectros UV-Visibles y GC-masa. En una etapa siguiente, proponen la formación de hidroquinona, ácido maléico y ácido benzoico, los cuales luego de etapas sucesivas de oxidación apertura de anillos generan ácidos alifáticos de menor PM, como ácido malónico, oxálico y fórmico (Figura 9.8) (Devi et al., 2009). Por otro lado, se reportaron estudios de la degradación fotoasistida de RAS con TiO_2 , en los cuales se postula la formación de ácido ftálico, el cual deriva en compuestos carboxílicos de menor tamaño, así como aldehídos y cetonas (G. Liu, Wu, Zhao, Hidaka, & Serpone, 1999). Los autores sugieren que los enlaces susceptibles a ser atacados en una primera etapa de la oxidación son aquellos enlaces C-C cercanos a C=O (G. Liu et al., 1999). Esto también es propuesto por Panizza y colaboradores, durante el estudio de la oxidación de RAS con un proceso electro-Fenton (Panizza & Oturan, 2011). No obstante, todos estos sistemas involucran especies reactivas de oxígeno como responsables de los procesos de oxidación (HO^\bullet , HOO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$).

Paolo Zucca y colaboradores publicaron estudios de degradación de RAS por acción de la metalloporfirina 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphine-Mn(III). Basados en los nulos efectos del agregado de manitol como atrapante de radicales inorgánicos al medio de reacción, estos investigadores proponen la formación de radicales de RAS por abstracción de hidrógeno. A su vez, fundados en reportes publicados de estudios con lacasa, proponen como producto de la primera etapa de oxidación la formación de radicales semiquinoides de Rojo de Alizarina S, los cuales evolucionan a 1,2,9,10-antraquinona-3-ácido sulfónico (Figura 9.9), especie altamente reactiva y susceptible a sufrir el ataque nucleofílico de H_2O . Sin embargo, resultados de identificación de productos de reacción por HPLC les permitieron determinar al ácido ftálico como producto final de la degradación oxidativa (P Zucca et al., 2008).

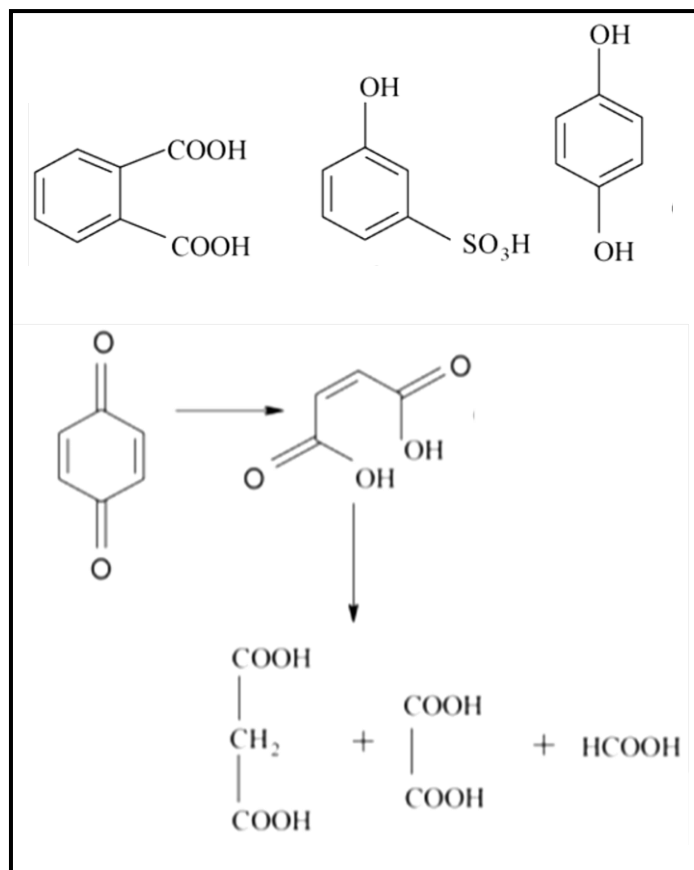


Figura 9.8. Intermediarios de reacción propuestos por Devi y colaboradores (Devi et al., 2009).

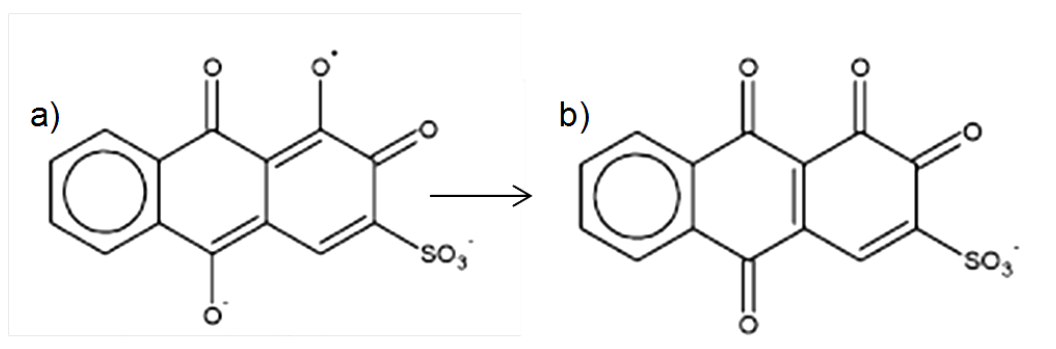


Figura 9.9. a) Radical semiquinoide de RAS. b) 1,2,9,10-antraquinona-3-acido sulfónico. (P Zucca et al., 2008)

A la luz de esta discusión y en base a la evidencia espectroscópica presente en nuestros resultados, se proponen los intermediarios de oxidación que se presentan en la Figura 9.10. A su vez, es posible inferir que productos de bajo peso molecular se forman como productos de la reacción durante la etapa monitoreada, sin embargo no es posible afirmar que se

obtiene la completa mineralización del colorante. Por otro lado, tampoco es posible descartar que los productos de oxidación de RAS puedan ser sustrato del catalizador.

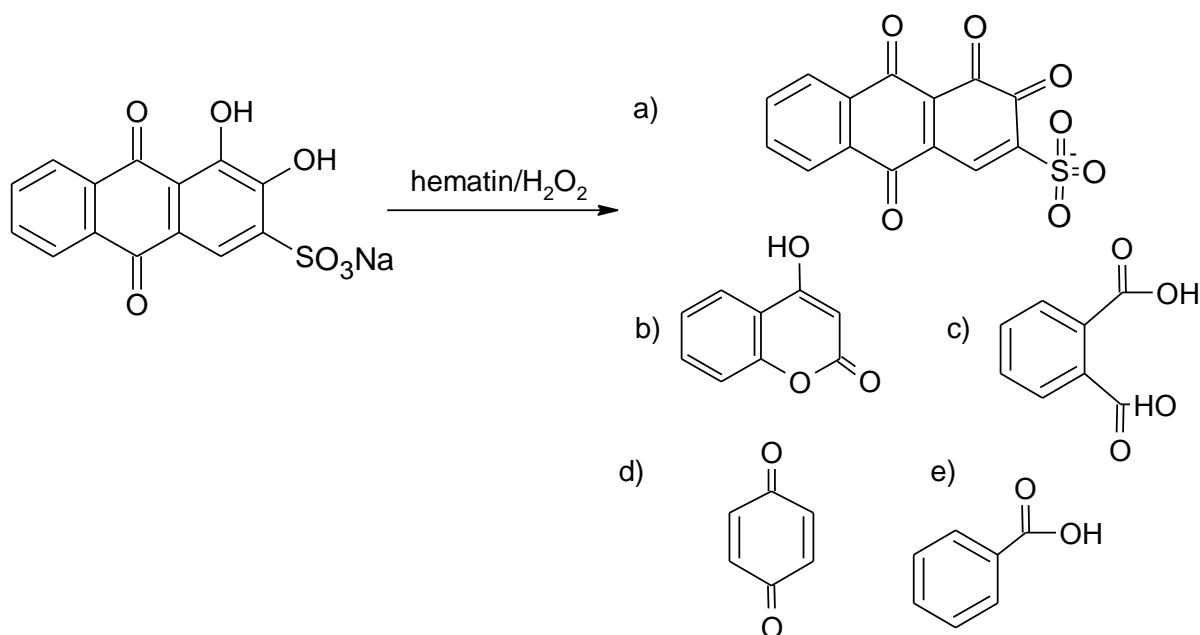


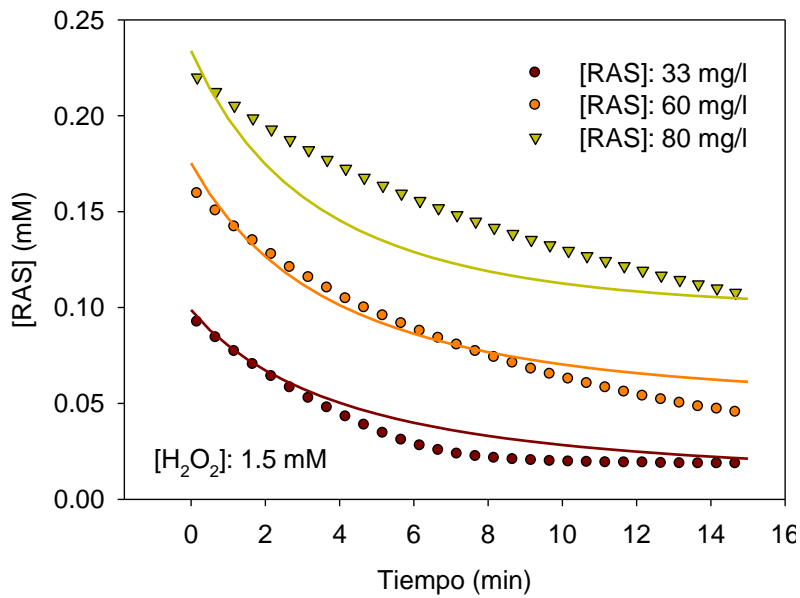
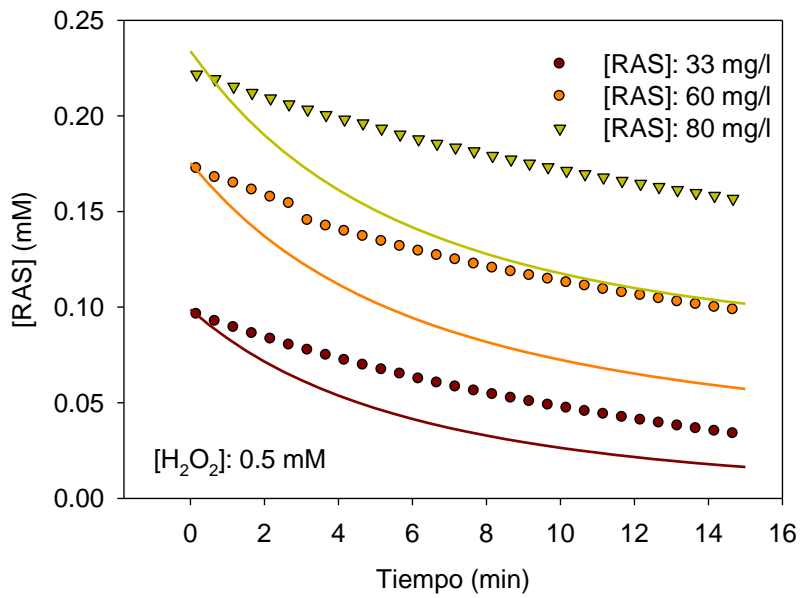
Figura 9.10. Productos intermediarios de la degradación de soluciones de Rojo de Alizarina S tratadas con hematin/H₂O₂. a) Estructuras antraquinoides, b) hidroxí cumarina, c) ácido ftálico, d) benzoquinona, e) ácido benzoico.

9.3.3. Modelado Cinético: Parametrización de sistemas homogéneos

Con objeto de simplificar el modelo, para poder optimizar con éxito las constantes de interés se realizaron simulaciones, con sus constantes valuadas en los valores optimizados para el sistema homogéneo NaII/H₂O₂/hematin, bajo las condiciones experimentales de la Tabla 9.1. Los resultados se presentan a en la Figura 9.11. Es posible observar que a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno el modelo sobrestima el consumo de sustrato. Por otro lado, a concentraciones elevadas de H₂O₂, las predicciones del modelo se alejan de las determinaciones experimentales mientras mayor es la concentración de Rojo de Alizarina S. Ambas observaciones nos permiten postular que la inactivación por reacciones no productivas con RAS es más importante que su análoga con NaII.

Considerando los resultados que se presentan en la Figura 9.11, se llevaron a cabo estimaciones de las constantes cinéticas, para las cuales los valores iniciales empleados para las mismas fueron los optimizados para el sistema homogéneo de decoloración de Naranja

II (Capítulo 8) y se presentan en la Tabla 9.3. Para la parametrización se utilizaron los experimentos correspondientes a concentraciones de RAS de 33 y 60 mg/l. Sin embargo, los experimentos correspondientes a $[H_2O_2]: 0.5 \text{ mM}$ no se incluyeron en el ajuste. El modelo de varianza seleccionado fue de varianza constante relativa y el valor inicial del parámetro del mismo fue $\omega: 0.1$.



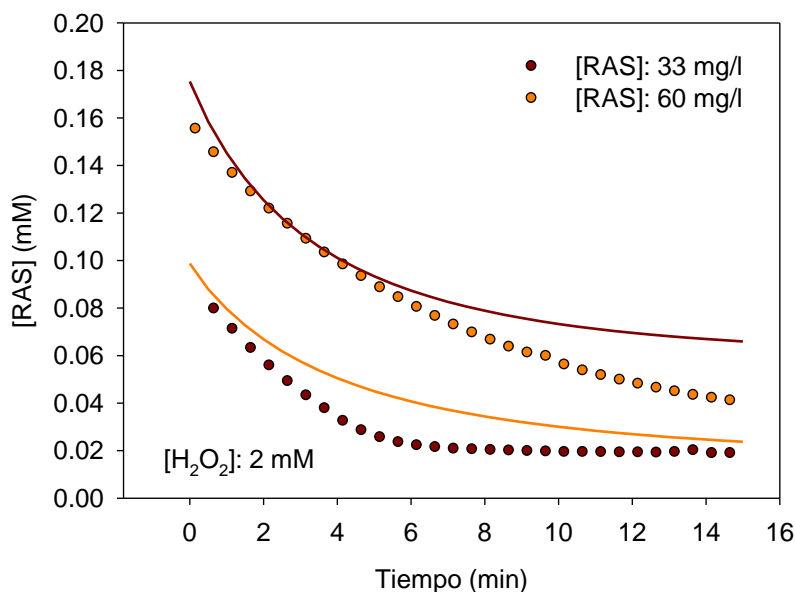


Figura 9.11. Simulaciones del modelo (líneas) empleando los valores de las constantes optimizadas para el sistema con NaII vs. resultados experimentales (puntos).

Tabla 9.3. Valores iniciales de las constantes de velocidad del modelo.

Constante cinética ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Valores Iniciales ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Valores Optimizados ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
k_1	16.416	$3.516_{\pm 0.5}$
k_2	448.93	$1.0021 \cdot 10^5_{\pm 6215}$
k_3	51.87	9400.7^*
k_7	20.9	$3201.8_{\pm 817.6}$
k_{BI}	0.328	$0.109_{\pm 0.02}$
k_i	8.339	3.6353^*
Valor inicial del modelo de varianza		$\omega: 0.1$
Modelo de varianza optimizado		$\omega: 0.125_{\pm 0.007}$
Residuos ponderados		298
χ^2 (95%)		336

*Valores NO optimizados durante la parametrización.

Este modelo otorgó un buen ajuste a los datos experimentales, como puede observarse en los valores de χ^2 (95%) vs. residuos ponderados que se presentan en la Tabla 9.3. En una primera estimación pudieron optimizarse los valores de k_1 , k_{BI} y k_7 con confianza. Por este motivo se realizó una estimación posterior con los valores de estas constantes fijos, que permitió estimar k_2 , aunque no fue posible optimizar los valores de k_3 y k_i . Sin embargo, el

análisis de los resultados obtenidos puso en evidencia la existencia de alguna vía de inactivación por sustrato. A los fines de cuantificarla se lleva a cabo una última estimación empleando los experimentos correspondientes a [RAS]: 80 mg/l. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 9.4.

Tabla 9.4. Valor estimado de k_i y estadísticos de la estimación.

Constante cinética ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Valores Iniciales ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Valores Optimizados ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
k_3	9400.7	6117
k_i	3.6353	1069.6 \pm 258
Valor inicial del modelo de varianza		ω : 0.125
Residuos ponderados		25
χ^2 (95%)		144

*El valor de ω se fijó durante la estimación.

Los valores optimizados de k_1 y k_{BI} ponen en evidencia una clara disminución de la actividad del catalizador producto de la disminución del pH del medio (9.4 frente a 10.6 para NaII). Sin embargo, k_7 no mostró el mismo comportamiento. Por otro lado, la mayor afinidad de hematin hacia Rojo de Alizarina S se pone de manifiesto en el elevado valor que alcanza k_2 . A su vez, se registró también un importante aumento de la constante cinética de inactivación por sustrato (k_i), respecto a la obtenida con NaII.

Las Figuras 9.12, 9.13 y 9.14 presentan los perfiles de consumo de RAS experimentales vs. predichos por el modelo optimizado a diferentes condiciones de reacción.

La Figura 9.12 presenta los resultados para una concentración inicial de colorante de 33 mg/l. Es posible observar un muy buen ajuste a los resultados experimentales de las velocidades iniciales de reacción, así como también de la conversión final medida para los experimentos con $[\text{H}_2\text{O}_2] > 1 \text{ mM}$. Mientras que el experimento correspondiente a 0.5 mM (el cual no fue considerado para el ajuste de datos) no presenta una buena estimación del perfil experimental.

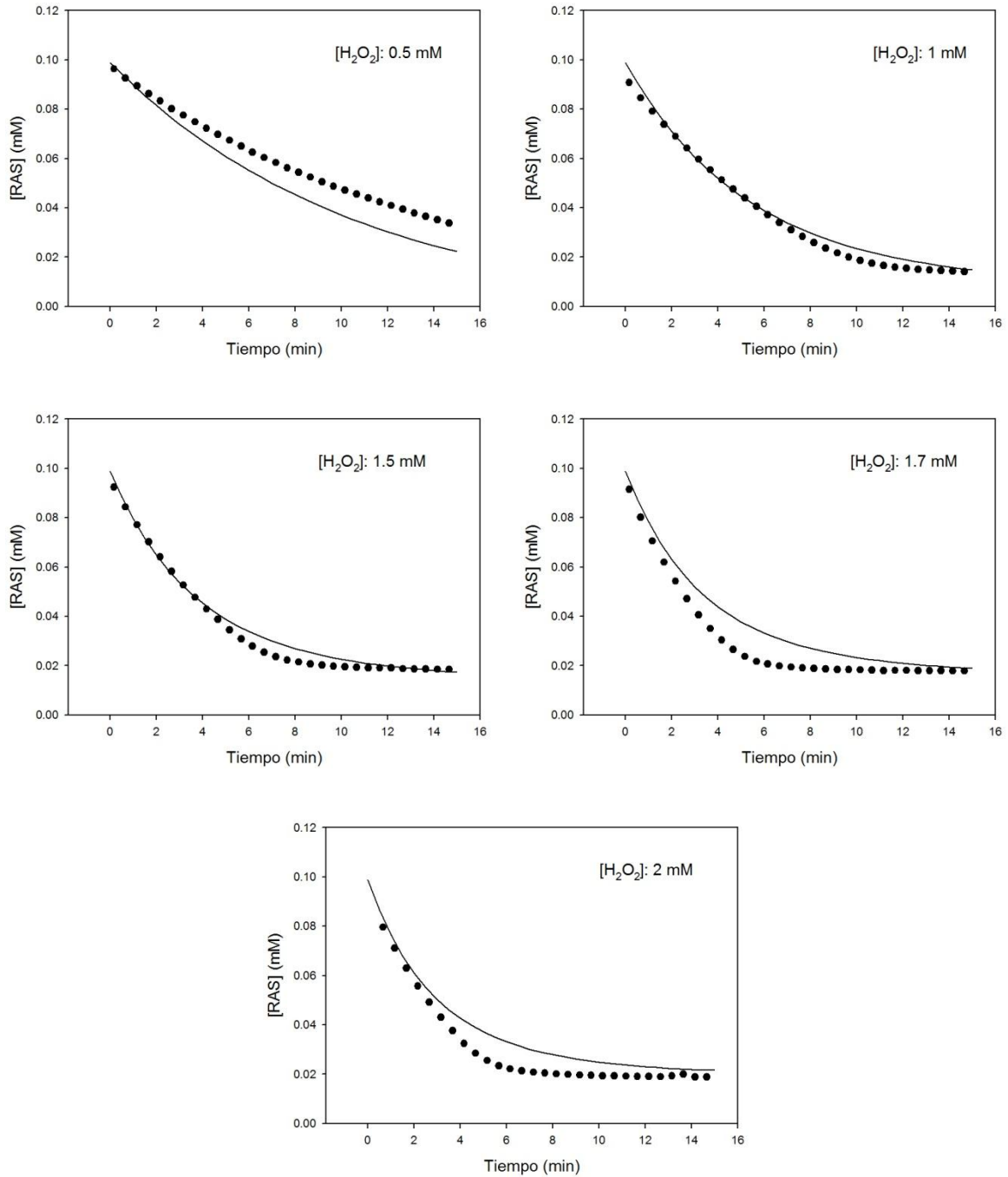


Figura 9.12. Perfiles experimentales (puntos) y predichos (líneas) de decoloración de RAS.
 $[RAS]_0: 33 \text{ mg/l}$.

Los resultados obtenidos para una concentración de RAS de 60 mg/l se presentan en la Figura 9.13. En todos los casos se observa una excelente predicción de las velocidades iniciales de decoloración. No obstante, con el avance de la reacción, el modelo subestima el consumo de Rojo de Alizarina S, hecho que puede asociarse a una sobre-estimación de las constantes de inactivación del catalizador, k_{BI} y k_i . A su vez, es posible asignar este

comportamiento a una preferencia del catalizador hacia los productos de oxidación de RAS como sustratos reductores, ya que los mismos presentan estructuras susceptibles de ser atacadas por E_I y E_{II} de hematin.

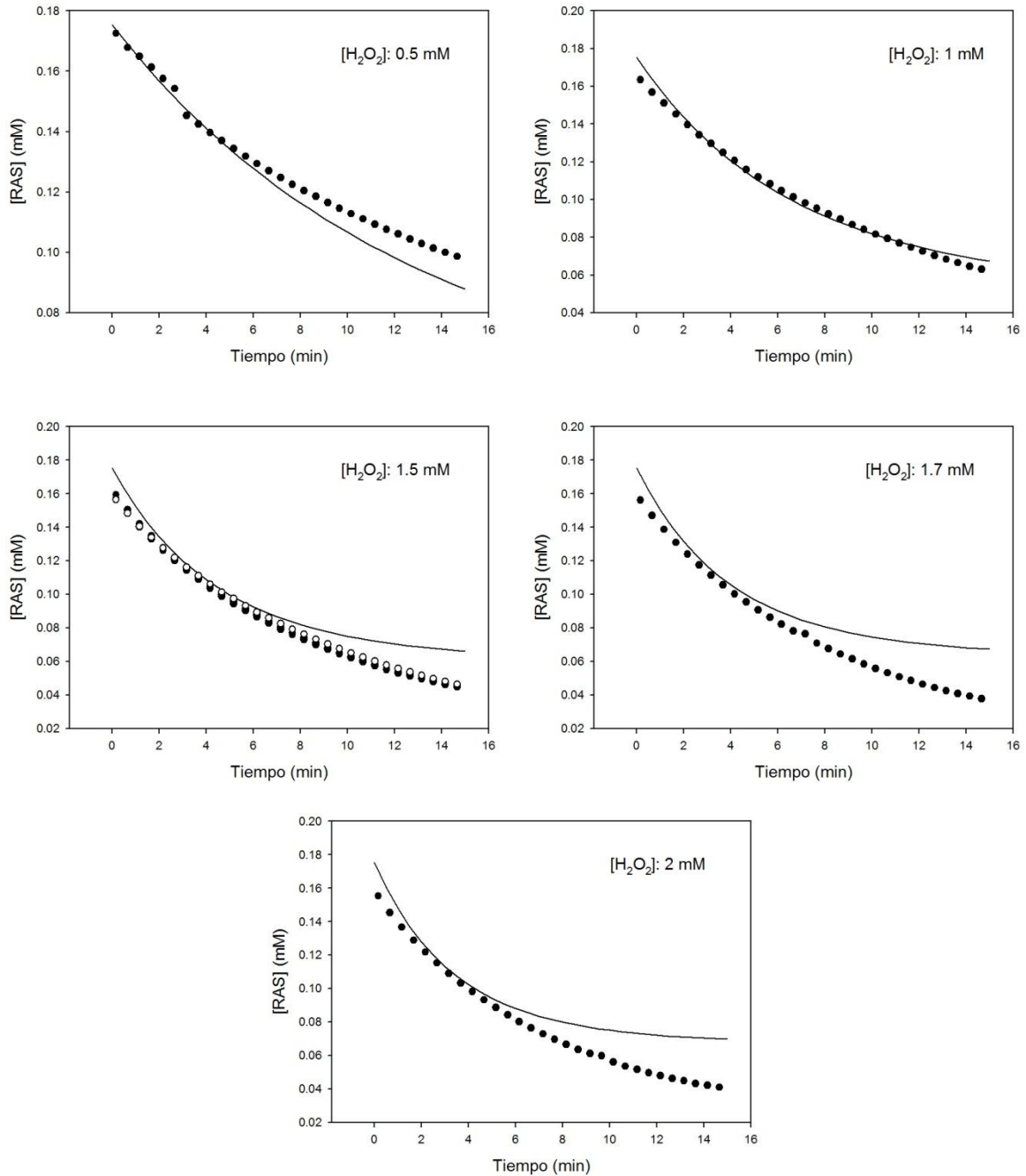
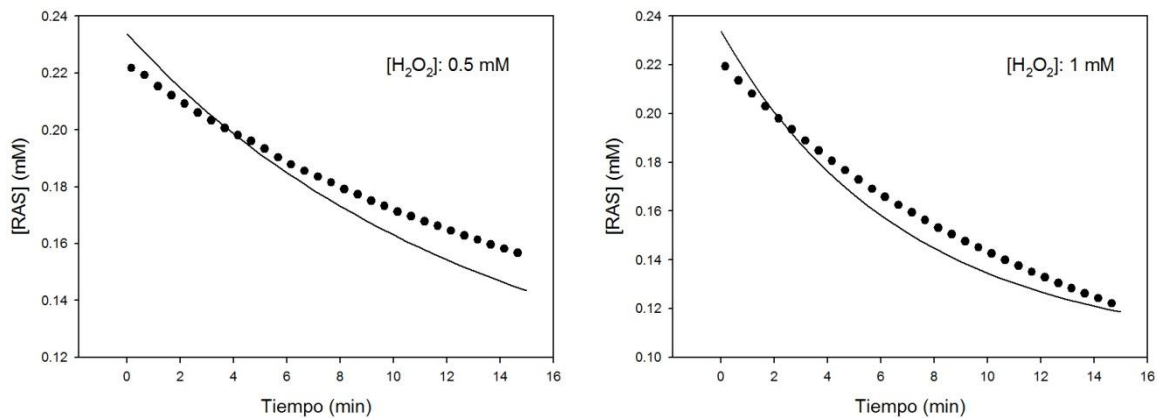


Figura 9.13. Perfiles experimentales (puntos) y predichos (líneas) de decoloración de RAS.
[RAS]₀: 60 mg/l.

Finalmente, la Figura 9.14 presenta los resultados para [RAS]: 80 mg/l, los cuales mostraron inconsistencias entre los perfiles de consumo de RAS predichos y medidos. El

modelo sobre-estima la velocidad inicial para todas las concentraciones ensayadas de H_2O_2 . La menor concentración de monómeros de RAS en solución, producto de un aumento de la formación de agregados del colorante, como los que se mencionan en el Capítulo 3, puede ser una de las razones de estos resultados. A su vez, no es posible descartar la inactivación por acción de los radicales orgánicos o productos de oxidación de RAS.

A su vez, hacia finales de la reacción, el modelo predice un consumo de colorante menor al determinado experimentalmente, lo cual es indicio de una sobre-estimación de los valores de las constantes de inactivación del catalizador. Considerando, a su vez, las correctas predicciones obtenidas para sistemas con 33 mg/l de colorante, podemos afirmar que el valor que se halla sobre-estimado es k_i . No obstante, al igual que en los resultados que se presentaron en el Capítulo 8, esta mayor degradación de colorante medida a altas concentraciones de H_2O_2 es consistente con una sobre-estimación del valor de k_7 , es decir que la vía catalítica (k_7) se inhibe en presencia de sustrato orgánico (Hernández-Ruiz et al., 2001; Hiner et al., 2001), lo que se acompaña de un aumento en el flujo de reacción entre E_1 y RAS. Estas observaciones se encuentran en línea con los resultados obtenidos para el sistema con Naranja II, y nos permiten inferir que la inactivación propuesta a partir de E_0 (k_{BI}) no es la que produce la disociación entre los puntos experimentales y el perfil predicho por el modelo.



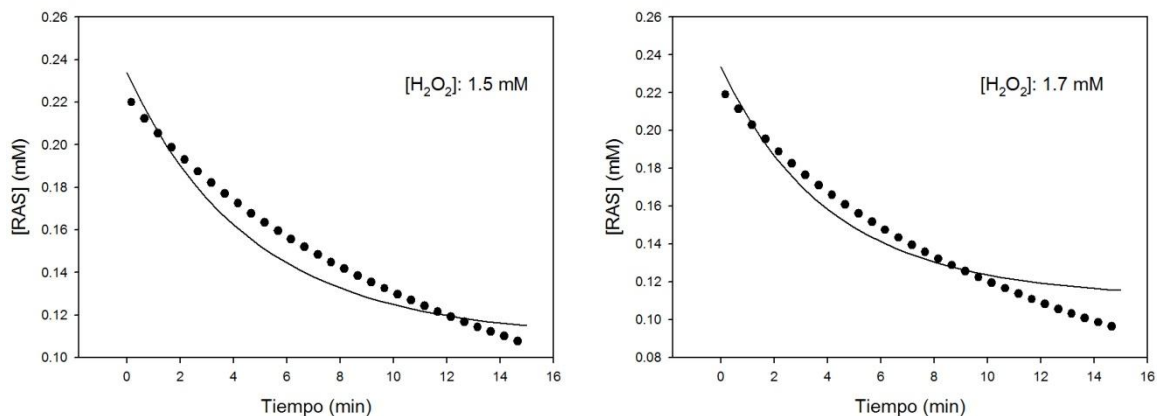


Figura 9.14. Perfiles experimentales (puntos) y predichos (líneas) de decoloración de RAS. $[RAS]_0$: 80 mg/l.

9.3.4. Sistemas heterogéneos de decoloración de Rojo de Alizarina S

La Figura 9.15 presenta los resultados de las decoloraciones obtenidas para los experimentos de la Tabla 9.2. Al igual que en el Capítulo 8, es posible observar una disminución de las velocidades intrínsecas de decoloración respecto de los sistemas homogéneos ($\text{mmol}_{\text{RAS}} \text{min}^{-1} \text{mg}_{\text{Hematin}}^{-1}$). Estos resultados son consistentes con la hipótesis propuesta en el capítulo anterior, que asigna la pérdida de actividad del catalizador inmovilizado, a la presencia de oligómeros de hematin sobre la superficie de quitosano modificado (Dascombe et al., 2005; Trivedi et al., 2005; Yonathan Parra, Rosa E. Ferrer, 2011). Las líneas continuas de la Figura 9.15 representan las regresiones exponenciales de tres parámetros (ecuación 9.1) a las que se ajustaron los datos experimentales con el fin de determinar las velocidades iniciales.

La Figura 9.16 muestra la variación de las velocidades iniciales de decoloración con la concentración de ambos sustratos, donde se observa un aumento de la velocidad con el aumento de concentración de H_2O_2 . No obstante, a pesar de la importante desviación que presentan los datos, la velocidad presenta una marcada tendencia descendente con el aumento de concentración de RAS, a diferencia de lo observado con Naranja II (Capítulo 8).

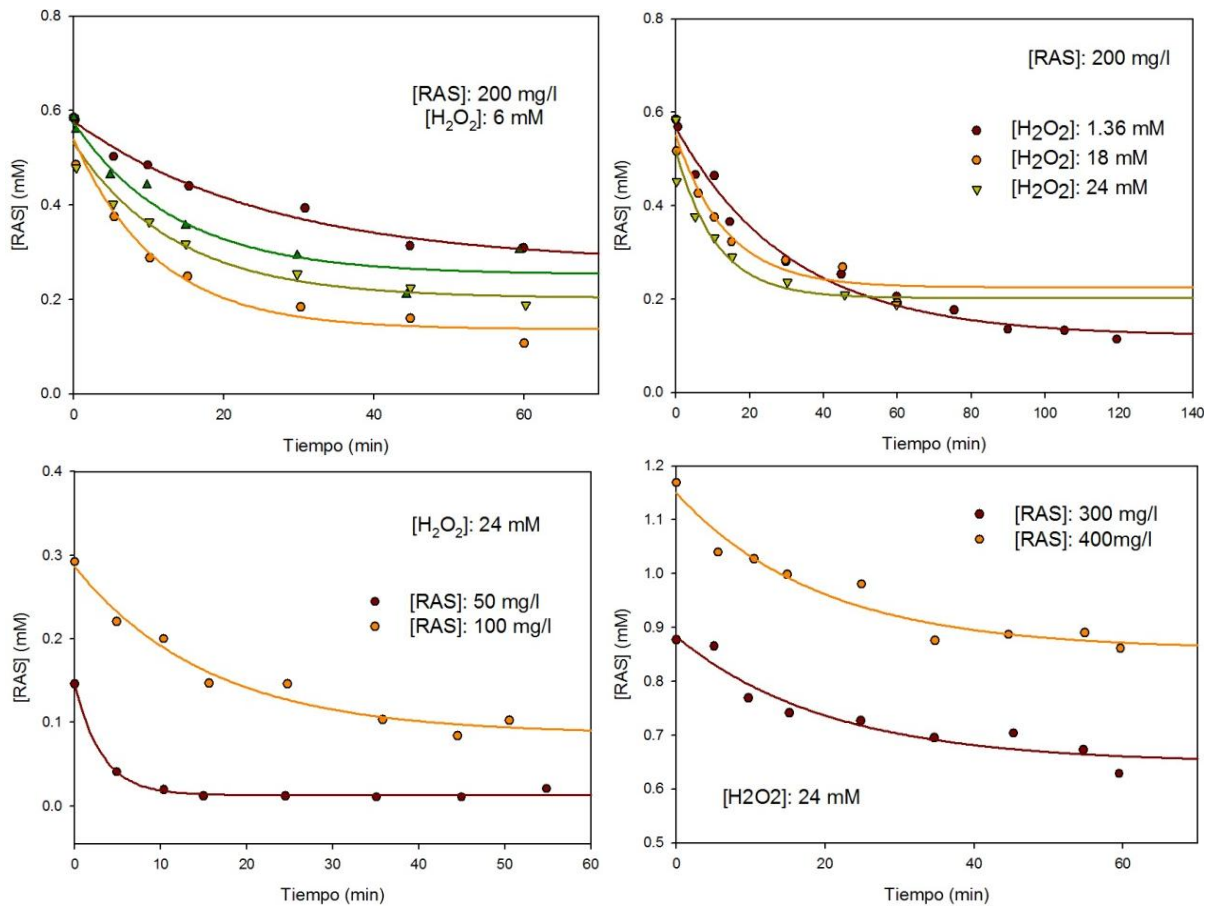


Figura 9.15. Perfiles experimentales de decoloración de Rojo de Alizarina S obtenidos para sistemas heterogéneos, con el catalizador inmovilizado sobre hojuelas de quitosano modificadas con amino-propil-trietoxi-silano y glutaraldehído.

Se llevó a cabo también un ajuste del modelo a los datos cinéticos, con el objeto de determinar las constantes cinéticas involucradas. Los valores iniciales de las constantes se fijaron en los valores arrojados por la parametrización del sistema de decoloración heterogénea de Naranja II. El modelo de varianza utilizado fue heteroscedástico. Los resultados de la parametrización se presentan en la Tabla 9.5.

El ajuste que otorga el modelo a los datos experimentales es bueno (residuos ponderados $< \chi^2$ (95%)). Sin embargo, no fue posible estimar el valor de las constantes cinéticas con confianza, para los datos experimentales disponibles. No obstante, se realizaron simulaciones de la reacción de decoloración de RAS con los valores obtenidos para las constantes que se presentan en la Tabla 9.5. Estas simulaciones se presentan en las Figuras 9.17 y 9.18.

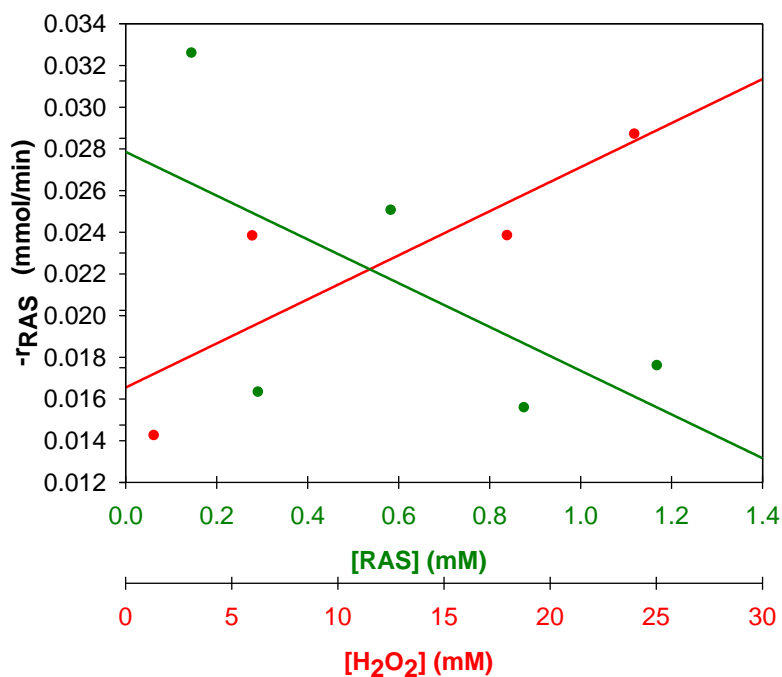


Figura 9.16. Dependencia de la velocidad inicial de decoloración con la concentración de RAS y H₂O₂.

Tabla 9.5. Valores iniciales de las constantes de velocidad del modelo.

Constante cinética (mM ⁻¹ min ⁻¹)	Valores Iniciales (mM ⁻¹ min ⁻¹)	Valores finales (mM ⁻¹ min ⁻¹)
k ₁	0.0172	0.240
k ₂	7.248	25.681
k ₃	0.3025	2.055
k ₇	0.01	0.118
k _{BI}	0.0038	0.063
k _i	0.0173	0.328
Valor inicial del modelo de varianza		ω: 0.1; γ: 0.5
Residuos ponderados		61
χ ² (95%)		71

Las simulaciones obtenidas nos permiten hacer algunas inferencias respecto al sistema heterogéneo de decoloración. La Figura 9.17 presenta las simulaciones obtenidas para experimentos con 200 mg/l de RAS, donde es posible observar una buena predicción del modelo para todas las concentraciones de H₂O₂, a pesar de las importantes desviaciones que presenta el experimento correspondiente a 6 mM de peróxido de hidrógeno. No obstante, a

24 mM de oxidante, el modelo presenta indicios de una sobre-estimación de las constantes de inactivación (k_{BI} y k_i) y/o del valor de k_7 .

La Figura 9.18 presenta las simulaciones obtenidas para los experimentos con concentración variable de colorante. En la misma es posible advertir que el modelo predice velocidades de consumo de colorante mucho más elevadas a las medidas en sistemas con concentraciones de RAS de 300 y 400 mg/l. Este hecho nos permite suponer que el valor de k_i se encuentra sub-estimado.

Finalmente, podemos concluir en que el aumento de los valores de k_2 y k_3 refleja una mayor afinidad de E_I y E_{II} por RAS, frente a Naranja II.

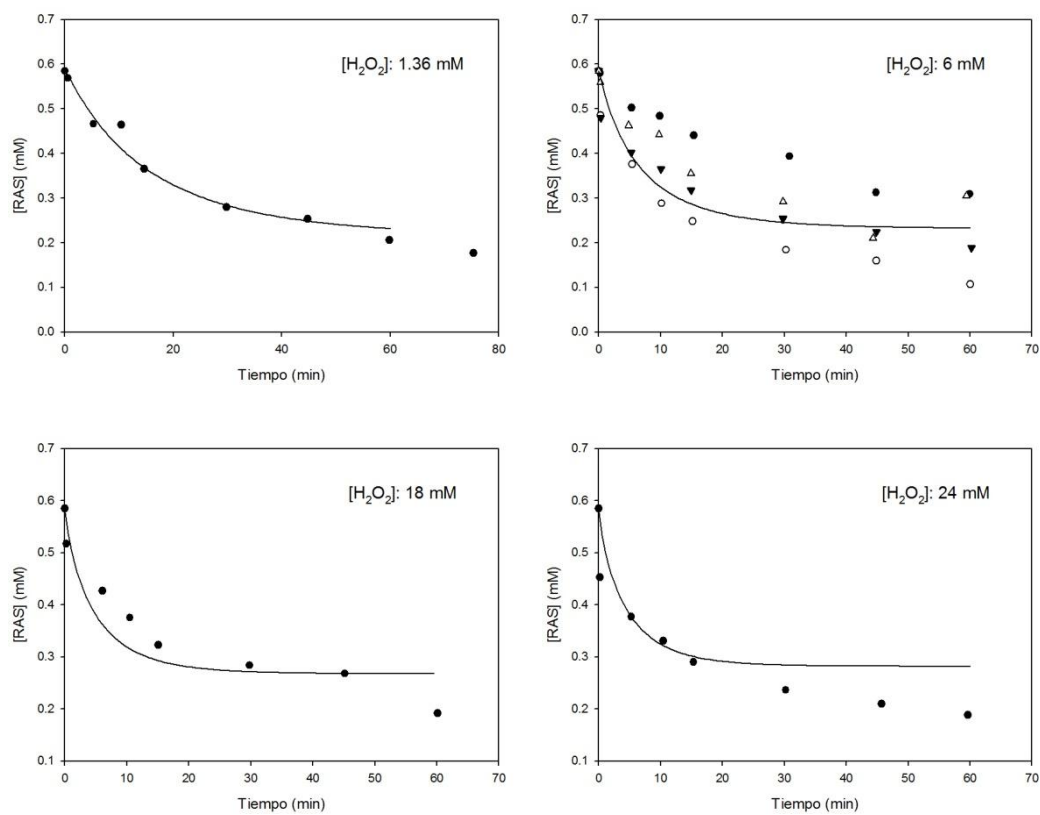


Figura 9.17. Datos experimentales (puntos) vs. simulaciones (líneas) obtenidas con las constantes cinéticas de la Tabla 9.5, para experimentos con [RAS]: 200 mg/l.

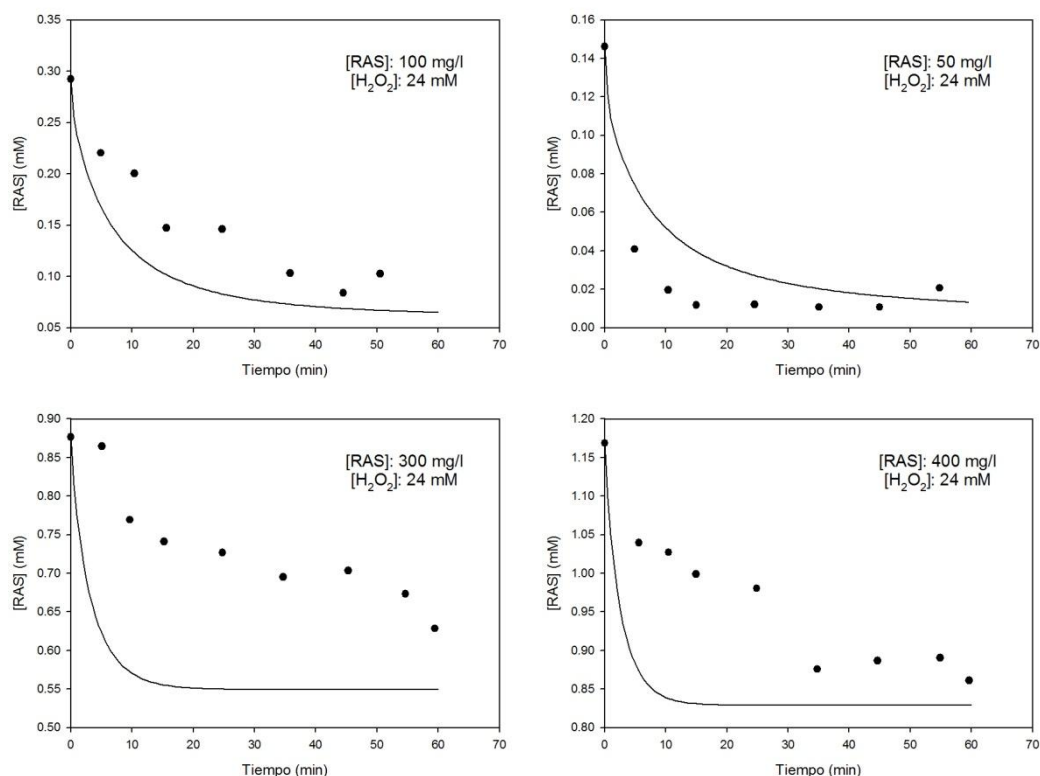


Figura 9.18. Datos experimentales (puntos) vs. simulaciones (líneas) obtenidas con las constantes cinéticas de la Tabla 9.5, para experimentos con [H₂O₂]: 24 mM.

9.4. Conclusiones

Los estudios de decoloración de Rojo de Alizarina S en sistemas homogéneos permitieron determinar la dependencia lineal de la velocidad inicial de reacción con la concentración de oxidante. Sin embargo, el efecto de la concentración de sustrato fenólico fue nulo para bajas concentraciones de H₂O₂. A altas concentraciones de oxidante, se observó un efecto negativo del aumento de la concentración de RAS sobre las velocidades iniciales de decoloración, que puede asociarse a la presencia de una vía de inactivación por sustrato. A su vez, no se descarta la posible formación de agregados del colorante, incapaces de reaccionar con hematin, que tengan como resultado una disminución de la concentración de monómeros en el medio de reacción.

El análisis de los espectros en el tiempo para los diferentes experimentos muestra la formación de picos a menores longitudes de onda, los cuales desaparecen con el avance de reacción. En base a las longitudes de absorción de los nuevos picos y la bibliografía existente es posible proponer como primeros intermediarios de la descomposición a estructuras antraquinoides oxidadas, benzoquinonas y radicales benzoquinónicos e

hidroxicumarinas. Con el avance de la reacción aumenta la absorbancia asociada a ácidos ftálico y bencénico. Del análisis espectral, es esperable la participación de estos productos de oxidación como sustratos de hematin.

El modelado cinético que se realizó en base a los datos obtenidos para hematin soluble permitió optimizar el valor de todas las constantes involucradas en el modelo, a excepción del valor de k_3 . Los valores obtenidos de las constantes k_2 y k_3 demuestran la mayor afinidad que presenta hematin hacia RAS. A su vez, el valor optimizado de la constante de inactivación por interacción no productiva con moléculas o agregados del colorante (k_i) aumenta considerablemente respecto al obtenido para sistemas con Naranja II. Los resultados de las simulaciones permitieron visualizar un buen ajuste de las velocidades iniciales de consumo de colorante, así como también de la conversión final alcanzada para sistemas con 33 mg/l de RAS. Para concentraciones mayores de colorante, el modelo subestima el consumo del mismo hacia finales de la reacción, lo cual se atribuye a una sobre-estimación del valor de las constantes de inactivación, k_{BI} y k_i y/o de k_7 . En los sistemas con elevada concentración de RAS (80 mg/l) las diferencias entre las velocidades iniciales predichas y experimentales se asignan a la presencia de agregados de RAS en solución.

Por su parte, los sistemas heterogéneos de decoloración de RAS presentaron, al igual que con Naranja II: (1) una importante disminución de la actividad intrínseca del catalizador, y (2) una importante desviación de las velocidades de decoloración determinadas experimentalmente. Ambas características se atribuyen a la presencia de oligómeros de hematin sobre la superficie de las hojuelas de quitosano.

Los efectos de las concentraciones de sustratos sobre la velocidad inicial de decoloración son consistentes con la presencia de oligómeros de hematin en el catalizador heterogéneo. Esto permite que el aumento de concentración de H_2O_2 provoque el aumento de las velocidades de degradación de colorante, lo cual se debe a su pequeño tamaño molecular que le permite tener acceso al sitio catalítico de hematin. Sin embargo, Rojo de Alizarina S presenta importantes desviaciones en las velocidades.

La parametrización del modelo para los sistemas heterogéneos de decoloración otorga buenos ajustes a los datos experimentales, sin embargo no permite estimar constantes cinéticas con confianza. No obstante, las predicciones del modelo se ajustan a los resultados experimentales para concentraciones de H_2O_2 iguales o menores a 18 mM, mostrando desviaciones hacia finales de la reacción para el sistema [RAS]: 200 mg/l-[H_2O_2]: 24 mM. A su vez, las predicciones del modelo para los sistemas con elevadas concentraciones de RAS (300 y 400 mg/l) mostraron una importante desviación respecto de los resultados experimentales que puede asociarse a: (1) la subestimación del valor de k_i , y/o (2) la

presencia de agregados de RAS que disminuyan la concentración de monómeros en el medio de reacción.

9.5. Resultados publicados

Parte de los resultados que se presentan en este capítulo fueron publicados en:

- III Jornada de Difusión de Investigación en Ingeniería Química que se realizó en Córdoba en el año 2014, bajo el título: “Estudio cinético de la degradación catalítica de Rojo de Alizarina S”. Autores: Agustina Córdoba, Jeanette Hass, Ivana Magario y María Lujan Ferreira.

CAPÍTULO 10

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

10.1. Conclusiones generales

La presente tesis se planteó como objetivo el estudio de un sistema catalítico de eliminación de colorantes presentes en soluciones acuosas modelo por medio de la aplicación de hematin como biomimético de HRP. Para alcanzar este objetivo el desarrollo de la investigación se dividió en tres secciones: (1) estudio de los sistemas homogéneos; (2) estudio de la inmovilización de los catalizadores; y (3) estudios cinéticos.

Los estudios en sistemas catalíticos homogéneos permitieron, mediante el análisis de la reacción de co-oxidación de AAP/fenol confirmar la capacidad de hematin de mimetizar la acción de HRP en la oxidación de compuestos fenólicos. Sin embargo, hematin no fue capaz de catalizar la formación de polifenoles en las condiciones de reacción estudiadas (tiempo, pH del medio solvente y concentración de reactantes). Además, se evidenció la inhibición de las vías principales de oxidación de fenol para altas relaciones molares $[H_2O_2]:[catalizador]$.

Los estudios de caracterización inicial de las reacciones con Naranja II y Rojo de Alizarina S que constituyen el capítulo 3 demostraron una notable disminución de las velocidades de reacción a pH neutro con el aumento del volumen molecular de los sustratos fenólicos, tanto para HRP como para hematin. A su vez, permitieron determinar la formación de agregados no covalentes de las moléculas de colorante en solución, cuya concentración disminuye con el aumento del pH del medio.

Los resultados del análisis de las reacciones de decoloración de Rojo de Alizarina S evidenciaron la formación de productos de menor peso molecular con ambos catalizadores, lo que permitió postular la existencia de mecanismos degradativos de oxidación de Rojo de Alizarina S. Se logró optimizar las condiciones de reacción para ambos catalizadores, los cuales presentaron máximos de actividad a valores de pH alcalinos del orden de los valores característicos de los efluentes textiles. Hematin mostró una amplia aplicabilidad en la decoloración de diferentes tipos de sustratos antraquinónicos como Alizarina y Rojo de Alizarina S.

Los resultados presentaron evidencia de un efecto inhibitorio de la concentración de oxidante. Sin embargo, a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno se observó un aumento de los rendimientos catalíticos. Los resultados de evolución de oxígeno disuelto durante la reacción, sumados a estudios de modelado molecular de la coordinación $E_I-H_2O_2$ E_I -Rojo de Alizarina S, permitieron postular diferencias entre los mecanismos de hematin y HRP. En el caso de hematin, es posible proponer la presencia de una vía paralela de

reacción por coordinación de H_2O_2 en competencia con el colorante, capaz de producir O_2 (vía catalítica o pseudo-catalítica). Por otro lado, no se evidenció sustento empírico de la ocurrencia de vías catalítica o pseudo-catalítica de reacción con HRP.

El estudio de la reacción de decoloración de Naranja II también demostró la presencia de vías de inactivación por H_2O_2 , las cuales resultaron ser más importantes en el caso de HRP. La eficiencia de HRP fue 2 veces mayor a la del biomimético, sin embargo hematin demostró ser una alternativa efectiva a la enzima, si se consideran los costos de los catalizadores. El análisis de los espectros UV-Visible y FTIR de los productos de reacción permitió confirmar la ruptura del enlace azoico y la formación de estructuras oxigenadas y alifáticas hidrocarbonadas. Los ensayos de DQO de las soluciones tratadas de Naranja II indican la presencia de estructuras más fácilmente degradables por $K_2Cr_2O_7$ con ambos catalizadores.

La segunda parte de esta tesis se enfocó en la obtención de catalizadores heterogéneos activos a partir de la inmovilización de hematin y HRP en soportes económicos. La inmovilización de hematin sobre hojuelas de quitosano modificado permitió la obtención de un catalizador heterogéneo capaz de decolorar soluciones de Naranja II y Rojo de Alizarina S, a pesar de las disminuciones de actividad que sufrió hematin durante la inmovilización. A su vez, los catalizadores demostraron su capacidad para decolorar soluciones de Rojo de Alizarina S durante seis usos consecutivos.

Los estudios de caracterización de catalizadores confirmaron la inmovilización de hematin, y la interacción covalente entre los grupos carboxílicos del anillo porfirínico y aldehídos de glutaraldehído. Además, permitieron descartar alteraciones covalentes del sitio catalítico, así como también la lixiviación de hierro durante el proceso de inmovilización.

A la luz de estos resultados se propuso como causa posible de la pérdida de actividad de hematin inmovilizado a la restricción del acceso de los sustratos fenólicos al sitio catalítico y el resultante aumento de la relación molar H_2O_2 :Colorante. Con objeto de analizar este postulado, se estudió el efecto de APTS como bloque espaciador, el cual puso en evidencia las restricciones de acceso mencionadas debido a que su incorporación se tradujo en un aumento de actividad catalítica.

A su vez, se analizan las diferencias de actividad que presentó hematin en la decoloración de Naranja II y Rojo de Alizarina S, asignándolas a mayores impedimentos estéricos y electrónicos para el caso de Naranja II.

En el intento de mejorar la resistencia mecánica de las hojuelas de quitosano se propuso el empleo de bolillas de vidrio no porosas como soporte. Con el objetivo de aumentar la superficie de estas bolillas de vidrio, se llevó a cabo un pretatamiento de decapado con HF/NH₄F. Fue posible aumentar la rugosidad de las bolillas. No obstante, no fue posible inmovilizar hematin ni quitosano sobre la superficie del vidrio, lo cual derivó en la inactividad que mostraron las bolillas en la decoloración de soluciones de Rojo de Alizarina S.

En la última parte de esta tesis los esfuerzos se enfocaron en el análisis cinético de las reacciones catalizadas por el biomimético. El capítulo 7 presenta estudios de la reacción de interacción de hematin/H₂O₂. Fue posible confirmar la reacción entre hematin/HRP y H₂O₂, con producción de O₂. Sumado a esto, hematin demostró su capacidad de producción de O₂ en presencia de sustratos fenólicos, mientras que estas vías se anularon para HRP en situaciones análogas. Por otro lado, mediciones de oxígeno disuelto para las reacciones 4-aminoantipirina/fenol/H₂O₂/hematin demostraron la existencia de una relación entre la producción de oxígeno y los radicales fenoxi presentes en el medio de reacción a pH neutro.

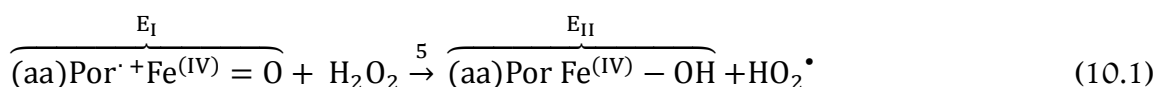
Se presentó evidencia espectroscópica de la formación del intermediario E_I en ambos catalizadores. A su vez, se determinó que la etapa limitante de las velocidades de reacción de hematin es la formación de este intermediario.

Los espectros de reacción de HRP permitieron determinar la presencia de E_{III}, afirmando la vía pseudo-catalítica de consumo de H₂O₂. No obstante, no se observó la formación de E_{II} y E_{III} en sistemas hematin/H₂O₂. Estos resultados fueron soportados por las derivaciones del modelado cinético, las cuales permitieron descartar las vías catalíticas de formación de O₂⁻ (pseudo-catalítica), así como también las vías de inactivación a partir del estado E_I de hematin. Sin embargo, se obtuvieron buenos ajustes al modelo catalítico con una propuesta de inactivación por blanqueamiento a partir de E₀.

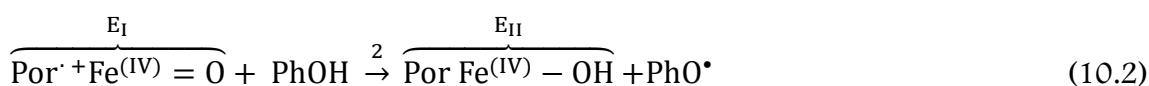
Pese a los buenos ajustes obtenidos durante la parametrización del modelo catalítico de reacciones, a altas concentraciones de oxidante se observó una sub-estimación del consumo de peróxido de hidrógeno. Por esta razón, no es posible descartar la participación de reacciones no consideradas en el modelo que consuman H₂O₂. Se postularon tres posibles causas que explican estos resultados: (1) la formación de un intermediario de reacción de menor actividad que E_I; (2) la liberación de Fe⁺³ al medio de reacción; y (3) la presencia de oligómeros de hematin de baja actividad, los cuales pueden romperse durante

la reacción aumentando el número de sitios catalíticos disponibles, o generar radicales inorgánicos altamente reactivos durante su degradación.

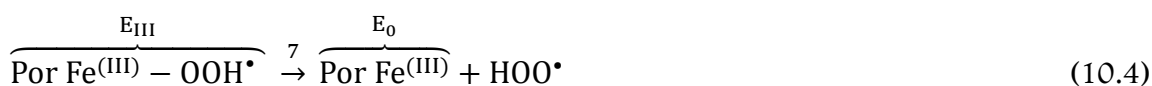
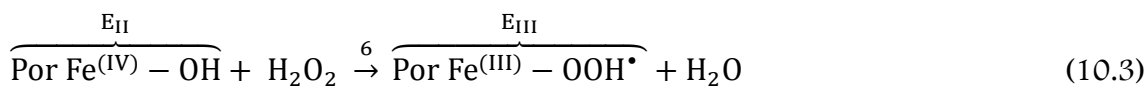
El capítulo 8 recopila resultados del estudio cinético de reacciones de decoloración de Naranja II con hematin, libre e inmovilizado. Fue posible, en base a las observaciones allí presentes, postular una vía de inactivación por formación de un complejo no productivo entre el colorante o agregados moleculares del mismo y hematin. El modelado cinético del sistema catalítico homogéneo que incluye el modelo catalítico parametrizado en el capítulo 7, presentó buenos ajustes a los perfiles experimentales de consumo de colorante. Además, fue posible demostrar la capacidad predictiva del modelo. Sin embargo, el consumo de peróxido de hidrógeno fue considerablemente subestimado por el modelo. Además, el consumo de oxidante en presencia de Naranja II fue mayor al medido para un sistema equivalente, sin sustrato fenólico. Estas observaciones permiten postular reacciones entre distintos productos de degradación de Naranja II con H₂O₂, o bien, que estos productos de degradación pueden ser sustratos de hematin. No obstante, este aumento de consumo de peróxido de hidrógeno es consistente con la presencia de radicales inorgánicos precursores de oxígeno, como O₂^{•-} en el medio reactivo. Resultados del capítulo 7 nos permiten confirmar la inviabilidad de la reacción de formación de E_{II} en sistemas hematin/H₂O₂:



Sin embargo, en presencia de sustrato fenólico, E_{II} existe en el medio de reacción producto de la siguiente reacción:



Esto nos permite postular que la presencia de E_{II} en el medio favorece la producción de radicales superóxido, mediante las reacciones:



Esta hipótesis implica proponer la formación de un intermediario catalítico análogo a E_{III} para hematin.

En base a estas consideraciones, la formación del radical inorgánico $O_2^{\cdot-}$ permite explicar:

- (1) El mayor consumo de peróxido de hidrógeno en sistemas con presencia de sustratos fenólicos.
- (2) La ausencia de formación de productos de polimerización durante las reacciones H_2O_2 /fenol/hematin.
- (3) La inhibición de producción de O_2 causada por AAP (como atrapante de radicales) en el medio de reacción.
- (4) La recuperación del rendimiento catalítico para altas concentraciones de oxidante y catalizador, observada en los capítulos 4 y 5.
- (5) La subestimación del consumo de peróxido de hidrógeno por parte de los modelos catalíticos propuestos en presencia de sustrato fenólico.

El Capítulo 9 presenta el estudio de la cinética de la reacción de decoloración de Rojo de Alizarina S, el cual demostró nuevamente la presencia de una vía de inactivación por sustrato fenólico que se asignó a la interacción no productiva de hematin con moléculas o agregados moleculares del colorante.

En línea con los resultados de análisis de productos de reacción que se presentan en el capítulo 5 para Naranja II, fue posible confirmar un mecanismo degradativo de reacción. En base al análisis de los espectros de reacción en el tiempo, fueron propuestas como primeros intermediarios de la descomposición estructuras antraquinoides oxidadas, benzoquinonas y radicales benzoquinónicos e hidroxicumarinas, las cuales con el avance de la reacción derivaron en ácidos ftálico y bencénico. Sin embargo, al igual que en el sistema con Naranja II, no fue posible descartar la participación de estos productos de oxidación como sustratos de hematin.

La parametrización del modelo propuesto para Rojo de Alizarina S permitió cuantificar la mayor afinidad que presenta hematin hacia este colorante, en función de los valores obtenidos de k_2 y k_3 .

Finalmente, las cinéticas de decoloración de los sistemas con Naranja II y Rojo de Alizarina S para el catalizador heterogéneo, demostraron una importante disminución de las velocidades intrínsecas de decoloración, respecto a las obtenidas para el catalizador soluble. Las elevadas concentraciones de hematin que se emplean durante la etapa de inmovilización del catalizador permitieron considerar a la inmovilización de oligómeros no covalentes de hematin como responsable de la disminución de actividad observada. Sin

embargo, el proceso de secado al que se sometió el catalizador es responsable de esta importante disminución de la actividad catalítica.

10.2. Perspectivas futuras

En base a los resultados y conclusiones que componen esta tesis, se propone avanzar en los diferentes puntos que se detallan a continuación.

Respecto a hematin inmovilizado en hojuelas de quitosano:

- Analizar los efectos de conservación en un medio compuesto por buffer Tris pH 10, del catalizador heterogéneo compuesto por hematin inmovilizado en hojuelas de quitosano, ya que el secado provocó una marcada disminución de la actividad.

Respecto al tratamiento superficial de las bolillas de vidrio es necesario optimizar cada etapa del tratamiento de las partículas de vidrio a los fines de obtener un soporte resistente y económico para pensar el desarrollo de un sistema real de tratamiento de efluentes coloreados. Se propone:

- Extremar las condiciones del decapado ácido de las bolillas aumentando la concentración del buffer HF/NH₄F utilizado, los tiempos de contacto y la temperatura de reacción.
- Incluir un tratamiento con APTS, previo a la inmovilización de quitosano para lograr obtener grupos -NH₂ superficiales que interaccionen con el polímero.
- Inmovilizar hematin sobre quitosano y repetir estudios de actividad de las partículas obtenidas.

Respecto a los estudios de mecanismo de reacción de hematin, modelado cinético y parametrización:

- Analizar la interacción E_{II}-H₂O₂ y E_{II}-Rojo de Alizarina S mediante estudios de modelado molecular, para determinar si es posible la formación de radicales O₂⁻ a través de las reacciones 10.3 y 10.4.

- Sumar a los resultados de modelado molecular, estudios de modelado cinético y parametrización incluyendo las reacciones 10.3 y 10.4 en el modelo cinético propuesto.

Finalmente, se propone aplicar el sistema hematin/H₂O₂ al tratamiento de un efluente coloreado real, haciendo principal hincapié en análisis de toxicidad del efluente tratado.

BIBLIOGRAFÍA

- (CEPIS), C. P. de I. S. y C. del A. (1994). Informe técnico sobre la minimización de residuos textiles. (A. de C. T. (GTZ) de la R. de Alemania, Ed.).
- (CEPIS), C. P. de I. S. y C. del ambiente. (1997). Informe técnico sobre minimización de residuos en la industria textil. . (O. M. de la S. (OMS) Organización Panamericana de la Salud (OPS), Ed.).
- A.F.Roberts, G. (1992). *Chitin Chemistry*. The MacMillan Press LTD.
- Abbott, L. C., Batchelor, S. N., Lindsay Smith, J. R., & Moore, J. N. (2009). Reductive reaction mechanisms of the Azo Dye Orange II in aqueous solution and in cellulose: From radical intermediates to products. *Journal of Physical Chemistry A*, 113(21), 6091–6103. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-66249102987&partnerID=40&md5=4286d1cf833a7d11f0653a4030d1d93d>
- Adams, P. A., Adams, C., Berman, M. C., & Baldwin, D. A. (1982). H₂O₂- and alkyl hydroperoxide-supported para hydroxylation of aniline by alkaline hematin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 17(4), 261–267. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0020390945&partnerID=40&md5=235c1df08c41cb475c0485b6731fce02>
- Adediran, S. A. (1996). Kinetics of the formation of p-670 and of the decay of compound III of horseradish peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 327(2), 279–84. doi:10.1006/abbi.1996.0122
- Akkara, J. A., Wang, J., Yang, D. P., & Gonsalves, K. E. (2000). Hematin-catalyzed polymerization of phenol compounds. *Macromolecules*, 33(7), 2377–2382. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033751956&partnerID=40&md5=6fc0495fb54b525c751c0d4af7262d19>
- Aleboye, A., Kasiri, M. B., Olya, M. E., & Aleboye, H. (2008). Prediction of azo dye decolorization by UV/H₂O₂ using artificial neural networks. *Dyes and Pigments*, 77(2), 288–294. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-35648929256&partnerID=40&md5=6822a1ed3959333acae56f15f9677aa>
- Ali, L., Algaiti, R., Habib, H., Souka, U., Rauf, M., & Ashraf, S. (2013). Soybean peroxidase-mediated degradation of an azo dye- a detailed mechanistic study. *BMC Biochemistry*, 14(35).
- Almarsson, Ö., & Bruice, T. C. (1995). A homolytic mechanism of O-O bond scission prevails in the reactions of alkyl hydroperoxides with an octacationic tetraphenylporphyrin-iron(III) complex in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 117(16), 4533–4544. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0000496049&partnerID=40&md5=e4a31bcbfdab0a2cefc5b4ac4e94f5b3>
- Amaravathi, M., Babu, M. M., & Chandramouli, G. (2007). Synthesis of meso- tetrakis (2-chloroquinolin-3-yl) porphyrins. *Arkivoc*, 2007(1), 148–153. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34248188021&partnerID=40&md5=7fe145c04b776de1678c7313a7a9a5bd>
- Ambrosio, K., Rueda, E., & Ferreira, M. L. (2009). Magnetite-supported hematin as a biomimetic of Horseradish peroxidase in phenol removal by polymerization. Retrieved from <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10242420410001661231>
- Asakura, T., & Ishida, M. (1989). A nuclear magnetic resonance study on aggregation of an azo dye, Orange II, in aqueous solution. *Journal of Colloid And Interface Science*, 130(1), 184–189. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0000787833&partnerID=40&md5=04c4a59b2fafad8bea43d7f831258882>

- Asher, C., de Villiers, K. A., & Egan, T. J. (2009). Speciation of Ferriprotoporphyrin IX in Aqueous and Mixed Aqueous Solution Is Controlled by Solvent Identity, pH, and Salt Concentration. *Inorganic Chemistry*, 48(16), 7994–8003. doi:10.1021/ic900647y
- Azevedo, A. M., Cabral, J. M. S., T.D., G., & Fonseca, L. P. (2004). Operation and performance of analytical packed-bed reactors with an immobilised alcohol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28, 45–53.
- Babuponnusami, A., & Muthukumar, K. (2014). A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 557–572. doi:10.1016/j.jece.2013.10.011
- Badawy, M. I., & Ali, M. E. M. (2006). Fenton's peroxidation and coagulation processes for the treatment of combined industrial and domestic wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 136(3), 961–966. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33746718731&partnerID=40&md5=eca1725af8f6a40538494aea0fa1e4ff>
- Bagal, M. V., & Gogate, P. R. (2014). Wastewater treatment using hybrid treatment schemes based on cavitation and Fenton chemistry: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 1–14. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.07.009
- Bandala, E. R. (2002). TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA TEXTIL MEDIANTE FOTOCATÁLISIS SOLAR. In *XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. Cancún, México.
- Bandara, J., & Kiwi, J. (1999). Fast kinetic spectroscopy, decoloration and production of H₂O₂ induced by visible light in oxygenated solutions of the azo dye Orange II. *New Journal of Chemistry*, 23(7), 717–724. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032795467&partnerID=40&md5=dbc4e94205b7c0b5f78e5e59033f15e4>
- Bandara, J., Morrison, C., Kiwi, J., Pulgarin, C., & Peringer, P. (1996). Degradation/decoloration of concentrated solutions of Orange II. Kinetics and quantum yield for sunlight induced reactions via Fenton type reagents. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 99(1), 57–66. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030582289&partnerID=40&md5=d74300a499075651f0529cd22c441756>
- Bandara, J., Nadtochenko, V., Kiwi, J., & Pulgarin, C. (1997). No Title. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031043185&partnerID=40&md5=198d8becebe4a31dfbef6a5fe7ab855f9>
- Bartkowiak Roberts, G. A. F., A. W. (2007). Investigation of sorbates for the determination of the Fa values of chitin and chitosan by an adsorption technique. *Polish Chitin Society, Monograph XIII*.
- Baynton, K., Bewtra, J., Biswas, N., & Taylor, K. (1994). Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochimica et Biophysica ...*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167483894902186>
- Bell, S. E. J., Cooke, P. R., Inchley, P., Leanord, D. R., Lindsay Smith, J. R., & Robbins, A. (1991). Oxoiron(IV) porphyrins derived from charged iron(III) tetraarylporphyrins and chemical oxidants in aqueous and methanolic solutions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (4), 549–559. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-37049081326&partnerID=40&md5=6b4fa35b9e199acda727f1df2a896806>
- Bellanti, F., Castrucci, M., Ruiu, D., Visco, G., & Campanella, L. (2010). Comparison of catalytic efficiency of some industrial nanosized titanium dioxides in heterogeneous photodegradation by chemometric analysis. *Current Analytical Chemistry*, 6(1), 100–110. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77950171955&partnerID=40&md5=eb59396fffe9b26d31342ad69fc5080f>
- Benoit-Marquié, F., Puech-Costes, E., Braun, A. M., Oliveros, E., & Maurette, M. T. (1997). Photocatalytic degradation of 2,4-dihydroxybenzoic acid in water: Efficiency optimization and mechanistic

- investigations. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 108(1), 65–71. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031592713&partnerID=40&md5=28e612c73f302da782e7934de90f3a03>
- Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., & Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 417(6887), 463–468. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037161809&partnerID=40&md5=5881f830015d3c1161cab6549a5e6f35>
- Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szoke., A. Henriksen, J. H. (2002). PDB ID:1H5A: G. I. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1h5a>.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-50149117177&partnerID=40&md5=01c9f47bc24ef56cee8c9734766f4a19>
- Bhunja, A., Durani, S., & Wangikar, P. P. (2001). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(5), 562–567. doi:10.1002/1097-0290(20010305)72:5<562::aid-bit1020>3.0.co;2-s
- Biava, H., & Signorella, S. (2010). Peroxidase activity of dimanganese(III) complexes with the [Mn₂(μ-OAc)(μ-OR)₂]³⁺ core. *Polyhedron*, 29(3), 1001–1006. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-75149188830&partnerID=40&md5=f1a14d165c97aba097b839a0b4ceebe4>
- Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Bastida, J., & Máximo, M. F. (2006). Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. *Chemosphere*, 63(4), 626–632. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33645735766&partnerID=40&md5=381ccf8cf7266cfe93e77caf89b9b4f2>
- Bollag, J., & Myers, C. (1992). Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances. *Science of the Total Environment*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004896979290102X>
- Bray, W. C., & Gorin, M. H. (1932). Ferryl ion, a compound of tetravalent iron [5]. *Journal of the American Chemical Society*, 54(5), 2124–2125. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33947348085&partnerID=40&md5=1e319d20663ce5464678bbd1a9fa9363>
- Bruce, I. J., & Sen, T. (2005). Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy silanes and their application in magnetic bioseparations. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 21(15), 7029–35. doi:10.1021/la050553t
- Bruice, T. C. (1991). Reactions of hydroperoxides with metalotetraphenylporphyrins in aqueous solutions. *Accounts of Chemical Research*, 24(8), 243–249. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0000305799&partnerID=40&md5=5899cfb2c4b473cbb12ac68585e2f519>
- Bruice, T. C., Balasubramanian, P. N., Lee, R. W., & Smith, J. R. L. (1988). The mechanism of hydroperoxide O-O bond scission on reaction of hydroperoxides with iron(III) porphyrins. *Journal of the American Chemical Society*, 110(23), 7890–7892. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0000839992&partnerID=40&md5=e7daba328fe5e85145f455febb685112>
- Buchanan, I. D., & Nicell, J. A. (1997). Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(3), 251–261. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970505)54:3<251::AID-BIT6>3.0.CO;2-E

- Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C., & Arrighi, L. (2008). Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments. *Journal of Hazardous Materials*, *160*(2-3), 265–88. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.03.045
- Cabrera, C., & Cornaglia, A. (2011). *Degradación catalítica de compuestos coloreados: cinética de reacción y diseño de un proceso de decoloración*. Universidad Nacional de Córdoba.
- Cai Xialing, M. L. (2009). Horseradish peroxidase catalyzed free radical cannot free move in reaction solution. *Journal of Biochemical Technology*, *4*, 92–95.
- Canada, G. of. (1999). Canadian Environmental Protection Act.
- Cardona, M., Osorio, J., & Quintero, J. (2009). Degradation of industrial dyes with white rot fungi. *Degradación de Colorantes Industriales Con Hongos Ligninolíticos*, (48), 27–37. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-69649086235&partnerID=40&md5=c8dc6e69c193b8ba0228e5292ab93aee>
- Carvalho, R. H., Lemos, F., Lemos, M. A. N. D. A., Vojinović, V., Fonseca, L. P., & Cabral, J. M. S. (2006). Kinetic modelling of phenol co-oxidation using horseradish peroxidase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *29*(2), 99–108. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33745698116&partnerID=40&md5=54008dce1d53a690eb696058d7ba09ad>
- Celebi Arif Kaya, M., Altikatoglu, M., Yildirim, H., M. (2013). Enzymatic Decolorization of Anthraquinone and Diazo Dyes Using Horseradish Peroxidase Enzyme Immobilized onto Various Polysulfone Supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *171*(3), 716–730.
- Chaplin, M., & Bucke, C. (1990). *Enzyme Technology*. (C. U. Press, Ed.). Retrieved from <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/>
- Chen, J. X., & Zhu, L. (2010a). Degradation mechanism of Orange II in UV-Fenton process with hydroxyl-Fe-pillared bentonite as heterogeneous catalyst (pp. 281–284). Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77957992393&partnerID=40&md5=ebc43676d58d81ced26de446055dbb79>
- Chen, J. X., & Zhu, L. (2010b). Degradation mechanism of Orange II in UV-Fenton process with hydroxyl-Fe-pillared bentonite as heterogeneous catalyst. In *2010 International Conference on Advances in Energy Engineering, ICAEE 2010* (pp. 281–284). Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77957992393&partnerID=40&md5=aa4917727e92292225cc3d1a4f9f16e7>
- Chen, J., & Zhu, L. (2006). Catalytic degradation of Orange II by UV-Fenton with hydroxyl-Fe-pillared bentonite in water. *Chemosphere*, *65*(7), 1249–1255. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33748529028&partnerID=40&md5=ce940cb2e87974ae7454860f50c7a0aa>
- Cheng, X., Jia, R., Li, P., Tu, S., Zhu, Q., Tang, W., & Li, X. (2007). Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, *41*(3), 258–264. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.020
- Chivukula, M., & Renganathan, V. (1995). Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(12), 4374–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1388656&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Clark, M. (Ed.). (2011). *Handbook of Textile and Industrial Dyeing: Principles, Processes and Types of Dyes*. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=9iFtAgAAQBAJ&pgis=1>
- Claus, H., Faber, G., & König, H. (2002). Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *59*(6), 672–8. doi:10.1007/s00253-002-1047-z

- Colourist, T. society of D. and (Ed.). (1971). *Colour Index. The society of Dyers and Colourist* (3° ed., Vol. 4). Bradford, UK: The society of Dyers and Colourist.
- COMMISSION, E. (2003). Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) Reference Document on Best Available Techniques for the Textiles Industry. (E. COMMISSION, Ed.).
- Conley, R. T. (1979). *Espectroscopia Infrarroja* (1° edicion). Spain: Ed. Alhambra.
- Córdoba, A., Magario, I., & Ferreira, M. L. (2014). Modified chitosan as an economical support for hematin: application in the decolorization of anthraquinone and azo dyes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, n/a–n/a. doi:10.1002/jctb.4475
- Cory, Rose M. and Mcknight, D. M. (2005). Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter. Retrieved March 27, 2015, from http://mounier.univ-tln.fr/rcmo/php_biblio/PDF/5333.pdf
- Crestini, C., Pastorini, A., & Tagliatesta, P. (2004). Metalloporphyrins immobilized on motmorillonite as biomimetic catalysts in the oxidation of lignin model compounds. *Journal of Molecular Catalysis A: ...* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381116903005120>
- Cunningham, I. D., Danks, T. N., Hay, J. N., Hamerton, I., & Gunathilagan, S. (2001). Evidence for parallel destructive, and competitive epoxidation and dismutation pathways in metalloporphyrin-catalysed alkene oxidation by hydrogen peroxide. *Tetrahedron*, 57(31), 6847–6853. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035974314&partnerID=40&md5=3d4da9b367166c8abb4d9d47aaa72378>
- Curvetto, N. R., Figlas, D., Brandolin, A., Saidman, S. B., Rueda, E. H., & Ferreira, M. L. (2006a). Efficiency of enzymatic and non-enzymatic catalysts in the synthesis of insoluble polyphenol and conductive polyaniline in water. *Biochemical Engineering Journal*, 29(3), 191–203. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33645993566&partnerID=40&md5=d28e775e6ed64f4d580b5fba277ab006>
- Curvetto, N. R., Figlas, D., Brandolin, A., Saidman, S. B., Rueda, E. H., & Ferreira, M. L. (2006b). Efficiency of enzymatic and non-enzymatic catalysts in the synthesis of insoluble polyphenol and conductive polyaniline in water. *Biochemical Engineering Journal*, 29(3), 191–203. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33645993566&partnerID=40&md5=8060178452da6de386e2ef0bc0ad000f>
- Daneshvar, N., Aber, S., & Hosseinzadeh, F. (2008). Study of C.I. Acid Orange 7 removal in contaminated water by photo oxidation processes. *Global Nest Journal*, 10(1), 16–23. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67349097937&partnerID=40&md5=1b155894559719ac1d0ff81838bb0510>
- Daneshvar, N., Rabbani, M., Modirshahla, N., & Behnajady, M. A. (2004). Kinetic modeling of photocatalytic degradation of Acid Red 27 in UV/TiO₂ process. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 168(1-2), 39–45. doi:10.1016/j.jphotochem.2004.05.011
- Dascombe, M. J., Drew, M. G. B., Morris, H., Wilairat, P., Auparakkitanon, S., Moule, W. A., ... Ismail, F. M. D. (2005). Mapping Antimalarial Pharmacophores as a Useful Tool for the Rapid Discovery of Drugs Effective in Vivo: Design, Construction, Characterization, and Pharmacology of Metaquine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(17), 5423–5436. doi:10.1021/jm0408013
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2012). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. doi:10.1007/s13205-012-0071-7
- Datta, S. G., Dou, X., Shibley, A., & Datta, B. (2012). DNA template-assisted modulation of horseradish peroxidase activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 552–7. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.01.028
- De Souza, M. L., & Corio, P. (2013). Effect of silver nanoparticles on TiO₂-mediated photodegradation of Alizarin Red S. *Applied Catalysis B: Environmental*, 136-137, 325–333. Retrieved from

- <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84874772664&partnerID=40&md5=bdba3260bfb71010203fefe4ce5c791f>
- De Souza, S. M. D. A. G. U., Bonilla, K. A. S., & de Souza, A. A. U. (2010). Removal of COD and color from hydrolyzed textile azo dye by combined ozonation and biological treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1-3), 35–42. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77952890233&partnerID=40&md5=e27d4454fcaff23f91478e8c2b198094>
- De Villiers, K. A., Kaschula, C. H., Egan, T. J., & Marques, H. M. (2007). Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: Spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not μ -oxo dimer formation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(1), 101–117. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33845363586&partnerID=40&md5=c7a1708dc9c9cf8d39505ccef9ebf7e8>
- Derat, E., Cohen, S., Shaik, S., Altun, A., & Thiel, W. (2005). Principal active species of horseradish peroxidase, compound I: A hybrid quantum mechanical/molecular mechanical study. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(39), 13611–13621. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-25844512706&partnerID=40&md5=147ae8e6f0426bd959a2f5963ed890bc>
- Derat, E., & Shaik, S. (2006). The Poulos-Kraut mechanism of Compound I formation in horseradish peroxidase: A QM/MM Study. *J. Phys. Chem. B*, 110(21), 10526–10533. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33745461413&partnerID=40&md5=c30331db2fbdeac43396ad23d4d88a0e>
- Devi, L. G., Rajashekhar, K. E., Raju, K. S. A., & Kumar, S. G. (2009). Kinetic modeling based on the non-linear regression analysis for the degradation of Alizarin Red S by advanced photo Fenton process using zero valent metallic iron as the catalyst. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 314(1-2), 88–94. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-71749111089&partnerID=40&md5=6178ae67a87335aca8200483c4a7b122>
- Dhillon, G. S., Kaur, S., & Brar, S. K. (2012). In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 72(0), 67–75. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.012>
- Doehlert, D. (1970). Uniform shell design. *Applied Statistics*, 19(3), 231–239.
- Dos Santos, A. B., Cervantes, F. J., & van Lier, J. B. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technology*, 98(12), 2369–2385. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33947276702&partnerID=40&md5=7e571fa7f57ca026b0e4275bed391f6a>
- Duarte, F., & Madeira, L. M. (2010). Fenton- and photo-Fenton-like degradation of a textile dye by heterogeneous processes with Fe/ZSM-5 zeolite. *Separation Science and Technology*, 45(11), 1512–1520. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77954732146&partnerID=40&md5=41efbdf6d71ef403d40c8d06aecdd714>
- Dunford, H. B. (1999). *Heme Peroxidases*. VCH, USA: John Wiley.
- Dunford, H. B. (2002). Oxidations of iron(II)/(III) by hydrogen peroxide: From aquo to enzyme. *Coordination Chemistry Reviews*, 233-234, 311–318. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036839395&partnerID=40&md5=459817cee34bba1e23ed32769d78bb99>
- Durán, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28(2), 83–99. doi:10.1016/S0926-3373(00)00168-5
- Elkaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., Domínguez, M., & Hidalgo-Hidalgo-De-Cisneros, J. L. (2011). Bio-functionalization of electro-synthesized polypyrrole surface by heme enzyme using a mixture of Nafion and glutaraldehyde as synergetic immobilization matrix: Conformational characterization and

- electrocatalytic studies. *Applied Surface Science*, 257(24), 10926–10935. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80052934843&partnerID=40&md5=3397e470f44ef54291a662c8576e1854>
- Emelianenko, M., Torrejon, D., DeNardo, M. A., Socolofsky, A. K., Ryabov, A. D., & Collins, T. J. (2014). Estimation of rate constants in nonlinear reactions involving chemical inactivation of oxidation catalysts. *Journal of Mathematical Chemistry*, 52(5), 1460–1476. doi:10.1007/s10910-014-0322-4
- Emerson, E. (1943). The condensation of aminoantipyrine. II. New color test for phenolic compounds. *Contribution from the Chemical Laboratory of Trinity College*.
- Emmert Iii Thomas, J., Hon, B., Gengenbach, A. J., F. L. (2008). Metalloporphyrin catalyzed oxidation of methyl yellow and related azo compounds. *Inorg. Chim. Acta*, 361(8), 2243–2251. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-43949144587&partnerID=40&md5=7752b94d1e94269d1794d668e0c3e4d4>
- Englezos, P., & Kalogerakis, N. (2000). Applied Parameter Estimation for Chemical Engineers. doi:10.1201/9780203904695
- Etcheverry, M. (2010). *Compatibilización Química de Interfaces Polímero-Vidrio*.
- Everse, J. (1997). The structure of heme proteins compounds I and II: some microconceptions. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1338–1346.
- Fang, H., Wenrong, H., & Yuezhong, L. (2004). Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4BS. *Water Research*, 38(16), 3596–3604. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-8444230804&partnerID=40&md5=ba22cab270786f0d2c15d28c903f5c71>
- Faouzi, A. M., Nasr, B., & Abdellatif, G. (2007). Electrochemical degradation of anthraquinone dye Alizarin Red S by anodic oxidation on boron-doped diamond. *Dyes Pigm.*, 73(1), 86–89. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33745489235&partnerID=40&md5=fac19f8750fd3f4c863737a550fdeff4>
- Feng, J., Hu, X., & Yue, P. L. (2006). Effect of initial solution pH on the degradation of Orange II using clay-based Fe nanocomposites as heterogeneous photo-Fenton catalyst. *Water Research*, 40(4), 641–646. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-32544434798&partnerID=40&md5=31673c49832140bd1ea11a67d732a944>
- Feng, J., Hu, X., Yue, P. L., Zhu, H. Y., & Lu, G. Q. (2003a). A novel laponite clay-based Fe nanocomposite and its photo-catalytic activity in photo-assisted degradation of Orange II. *Chemical Engineering Science*, 58(3-6), 679–685. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037295065&partnerID=40&md5=c3f813d4f92113ebaa3c089e88ecbf0a>
- Feng, J., Hu, X., Yue, P. L., Zhu, H. Y., & Lu, G. Q. (2003b). Degradation of azo-dye orange II by a photoassisted Fenton reaction using a novel composite of iron oxide and silicate nanoparticles as a catalyst. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 42(10), 2058–2066. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037738504&partnerID=40&md5=d96c6a5b7cbb4cc13114dada92cfcfd76>
- Feng, W., Nansheng, D., & Helin, H. (2000). Degradation mechanism of azo dye C. I. reactive red 2 by iron powder reduction and photooxidation in aqueous solutions. *Chemosphere*, 41(8), 1233–1238. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033918991&partnerID=40&md5=6b39dfd076478b16d7cfcde41f1fcd>
- Fernandez, J., Bandara, J., Lopez, A., Buffat, P., & Kiwi, J. (1999). Photoassisted Fenton degradation of nonbiodegradable azo dye (Orange II) in Fe-free solutions mediated by cation transfer membranes. *Langmuir*, 15(1), 185–192. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033524297&partnerID=40&md5=a82a5dd6887fbe6b532efb371e3c3743>

- Fiamegos, Y., Stalikas, C., & Pilidis, G. (2002). 4-Aminoantipyrine spectrophotometric method of phenol analysis: Study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 467(1-2), 105–114. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037015122&partnerID=40&md5=5d07537cb56779a09a6cd2e55eac6ace>
- Florence, T. M. (1985). The degradation of cytochrome c by hydrogen peroxide. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 23(2), 131–141. doi:10.1016/0162-0134(85)83017-8
- Foresti, M. L. (2006). *Estudio De La Actividad Catalítica De Lipasas Inmovilizadas En Reacciones De Esterificación*. Universidad Nacional del Sur.
- Foresti, M. L., & Ferreira, M. L. (2005). Frequent analytical/experimental problems in lipase-mediated synthesis in solvent-free systems and how to avoid them. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381(7), 1408–1425. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-17444428041&partnerID=40&md5=3670ceb0fec8917d9ca26ed1fe22213c>
- Forss, J., & Welander, U. (2011). Biodegradation of azo and anthraquinone dyes in continuous systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830510001988>
- Fu, Z., Hao, C., Fei, X., & Ju, H. (2006). Flow-injection chemiluminescent immunoassay for α -fetoprotein based on epoxysilane modified glass microbeads. *Journal of Immunological Methods*, 312, 61–67.
- Galindo, C., Jacques, P., & Kalt, A. (2000). Photodegradation of the aminoazobenzene acid orange 52 by three advanced oxidation processes: UV/H₂O₂, UV/TiO₂ and VIS/TiO₂. Comparative mechanistic and kinetic investigations. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 130(1), 35–47. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0347367129&partnerID=40&md5=22a6738000b5145609f9171f1a22f056>
- Gao, J., Yu, J., Lu, Q., He, X., Yang, W., Li, Y., ... Yang, Z. (2008). Decoloration of alizarin red S in aqueous solution by glow discharge electrolysis. *Dyes Pigm.*, 76(1), 47–52. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34447128322&partnerID=40&md5=de25e1d885e814d64f0352c59010d5ec>
- Gavril, M., & Hodson, P. V. (2007). Chemical evidence for the mechanism of the biodecoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 103–124. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33846235581&partnerID=40&md5=48781a8367907c31dda90b85ba203058>
- Ghasemi, J., Lotfi, S., Safaeian, M., Niazi, A., Ardakani, M. M., & Noroozi, M. (2006). Spectrophotometric determination of acidity constants of alizarine red S in mixed aqueous-organic solvents. *J. Chem. Eng. Data*, 51(5), 1530–1535. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33749869576&partnerID=40&md5=6181957809ec9d3ecffb2faf7c20ead4>
- Ghosh, A., Mitchell, D. A., Chanda, A., Ryabov, A. D., Popescu, D. L., Upham, E. C., ... Collins, T. J. (2008). Catalase-peroxidase activity of iron(III)-TAML activators of hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society*, 130(45), 15116–15126. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-57349098320&partnerID=40&md5=9ab75510bd4d2f3d5450789bfd1172c>
- Gianfreda, L., Iamarino, G., Scelza, R., & Rao, M. A. (2006). Oxidative catalysts for the transformation of phenolic pollutants: A brief review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24(3), 177–187. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33748336473&partnerID=40&md5=5a76c85ce14d86f053bd0e791396ec5e>
- Gokhale, M. Y. (2006). *Kinetic and Mechanistic Studies of the Reactions of Weakly Basic Aromatic Amines and Reducing Monosaccharides in Aqueous Solutions*. ProQuest. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=xtOUAG2vRVAC&pgis=1>

- Gómez, J. L., Bódalo, A., Gómez, E., Bastida, J., Hidalgo, A. M., & Gómez, M. (2006). Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1016–1022. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.02.008
- Gómez, J. L., Bódalo, A., Gómez, E., Hidalgo, A. M., Gómez, M., & Murcia, M. D. (2007). Experimental behaviour and design model of a fluidized bed reactor with immobilized peroxidase for phenol removal. *Chemical Engineering Journal*, 127(1-3), 47–57. doi:10.1016/j.cej.2006.09.021
- Görner, H. (2003). Photoprocesses of p -Benzoquinones in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry A*, 107(51), 11587–11595. doi:10.1021/jp030789a
- Granados-Oliveros, G., Ortega, F. M., Páez-Mozo, E., Ferronato, C., & Chovelon, J. M. (2010). Photoactivity of metal-phenylporphyrins adsorbed on TiO₂ under visible light radiation: Influence of central metal. *Open Mater. Sci. J.*, 4, 15–22. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77957753739&partnerID=40&md5=8f30b4e84a6931f62a3f823d79d001f1>
- Granados-Oliveros, G., Páez-Mozo, E. A., Martínez Ortega, F., Piccinato, M., Silva, F. N., Guedes, C. L. B., ... Ota, A. T. (2011). Visible light production of superoxide anion with MCarboxyphenylporphyrins (M = H, Fe, Co, Ni, Cu, and Zn) free and anchored on TiO₂: EPR characterization. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 339(1-2), 79–85. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79954574101&partnerID=40&md5=32e74f213cd625826bbb4bc698d8edd2>
- Granados-Oliveros, G., Páez-Mozo, E. A., Ortega, F. M., Ferronato, C., & Chovelon, J. M. (2009). Degradation of atrazine using metalloporphyrins supported on TiO₂ under visible light irradiation. *Appl. Catal., B*, 89(3-4), 448–454. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-65649134341&partnerID=40&md5=e07f40e6c4ab7dcf87bf0dc11bc0c934>
- Gu, T., Wang, J., Xia, H., Wang, S., & Yu, X. (2014). Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized in a DNA/chitosan-Fe₃O₄ magnetic nanoparticle bio-complex film. *Materials*, 7(2), 1069–1083. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84894823440&partnerID=40&md5=f5d0872d7988777997a8baf139266f15>
- Guauque Torres, M. d. P. (2013). *Preparación y caracterización fisicoquímica de lipasas autosoportadas a partir de agregados de enzimas (CLEAs) con actividad catalítica en reacciones de esterificación, hidrólisis y acidólisis*. Universidad Nacional del Sur.
- Gutierrez Pulido, H., De la Vara Salazar, R., & Interamericana, M.-H. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (2th ed.). D.F., Mexico.
- Haber, F., & Willstätter, R. (1931). No Title. *Chem Ber.*, (64), 2844–2856.
- Hai, F. I., Yamamoto, K., Nakajima, F., & Fukushi, K. (2009). Factors governing performance of continuous fungal reactor during non-sterile operation - The case of a membrane bioreactor treating textile wastewater. *Chemosphere*, 74(6), 810–817. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-58549083118&partnerID=40&md5=48cbd7f53e52cd84d3f9555f1f7ec3e6>
- Hailei, W., Ping, L., Min, P., Zhijun, Z., Guangli, Y., Guosheng, L., & Jianming, Y. (2009). Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: Phanerochaete sp. HSD. *Biochemical Engineering Journal*, 46(3), 327–333. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.06.008>
- Hamid, M., & Khalil ur, R. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115(4), 1177–1186. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-63049107078&partnerID=40&md5=05115ad72b5992b14ac6c8df3c21cbbd>
- Hammami, S., Bellakhal, N., Oturan, N., Oturan, M. A., & Dachraoui, M. (2008). Degradation of Acid Orange 7 by electrochemically generated •OH radicals in acidic aqueous medium using a boron-doped diamond or platinum anode: A mechanistic study. *Chemosphere*, 73(5), 678–684. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-51349162462&partnerID=40&md5=e3a3c0c975aff3e58a9b4de6b1ac442b>

- Hartmann, M., Kullmann, S., & Keller, H. (2010). Wastewater treatment with heterogeneous Fenton-type catalysts based on porous materials. *Journal of Materials Chemistry*, 20(41), 9002–9017. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77957897465&partnerID=40&md5=af24c23c1426e2e5753b9e4e02f08a77>
- Hashimoto, K., Masada, Y., Sumida, Y., Tashima, T., & Satoh, N. (1983). Studies of aqueous solution of glutaraldehyde by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 48, 125–128. doi:10.1016/0020-7381(83)87044-2
- Hemmert, C., Renz, M., & Meunier, B. (1999). Oxidative degradation of chlorinated phenols catalyzed by a non-heme iron (III) complex. *Journal of Molecular Catalysis A:* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381116998001319>
- Hernández Cocoltzi Aguila Almanza, E., Flores Agustin O., Viveros Nava, E.L., Ramos Cassellis, E., H. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies Y Vacío, Sociedad Mexicana de Ciencia Y Tecnología de Superficies Y Materiales*, 22(3), 57–60.
- Hernández-Ruiz, J., Arnao, M. B., Hiner, A. N. P., García-Cánovas, F., & Acosta, M. (2001). Catalase-like activity of horseradish peroxidase: Relationship to enzyme inactivation by H₂O₂. *Biochemical Journal*, 354(1), 107–114. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035865698&partnerID=40&md5=a26696f5909e1bffa27ffbed995b3d49>
- Herney-Ramirez, J., Lampinen, M., Vicente, M. A., Costa, C. A., & Madeira, L. M. (2008). Experimental design to optimize the oxidation of orange II dye solution using a clay-based fenton-like catalyst. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47(2), 284–294. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-38849106201&partnerID=40&md5=0737eb8c9ceeed7fd157819cdf46c53>
- Hiner, A. N. P., Hernández-Ruiz, J., Williams, G. A., Arnao, M. B., García-Cánovas, F., & Acosta, M. (2001). Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalyzed reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392(2), 295–302. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035881922&partnerID=40&md5=114d62757b855f41d3fb0c0125ed392e>
- Hodges, G., Lindsay Smith, J. R., & Oakes, J. (1997). Metalloporphyrin-catalysed oxidation of azonaphthol dyes: The mechanism of oxidative bleaching by oxoiron(IV) porphyrins in aqueous solution. *Studies in Surface Science and Catalysis*. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33750869551&partnerID=40&md5=bdfd9f9627bb1121edf1b5b7fda272d0>
- Hoshino, T. (1999). Adsorption of atomic and molecular oxygen and desorption of silicon monoxide on Si(111) surfaces. *Physical Review B*, 59(3), 2332–2340. doi:10.1103/PhysRevB.59.2332
- Hou, M., Li, F., Liu, X., Wang, X., & Wan, H. (2007). The effect of substituent groups on the reductive degradation of azo dyes by zerovalent iron. *Journal of Hazardous Materials*, 145(1-2), 305–314. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34249818481&partnerID=40&md5=3585b2199429ef7a58f4a8291cb7d4cb>
- Huang, G., Luo, Z.-C., Hu, Y.-D., Guo, Y.-A., Jiang, Y.-X., & Wei, S.-J. (2012). Preparation and characterization of iron tetra (pentafluorophenyl)-porphyrin (TPFPF Fe) supported on boehmite (BM). *Chemical Engineering Journal*, 195–196(0), 165–172. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.04.079>
- Huang, J., Wang, H., Li, D., Zhao, W., Ding, L., & Han, Y. (2011). A new immobilized glucose oxidase using SiO₂ nanoparticles as carrier. *Materials Science and Engineering: C*, 31(7), 1374–1378. doi:10.1016/j.msec.2011.05.003
- Huang, Q., Tang, J., & Weber Jr, W. J. (2005). Precipitation of enzyme-catalyzed phenol oxidative coupling products: Background ion and pH effects. *Water Research*, 39(13), 3021–3027. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-22944462709&partnerID=40&md5=caf55be88c645388e79d91c9134979f8>

- Hublik, G., & Schinner, F. (2000). Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014102290002209>
- Hunger, K. (2003). *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*. . (Wiley-VCH., Ed.). Weinheim.
- Husain, Q., Husain, M., & Kulshreshtha, Y. (2009). Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. Retrieved from <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/07388550802685306>
- I. M. Kolthoff E. J. Meehan, Stanley Bruckenstein, E. B. S. (1972). *Análisis Químico Cuantitativo* (6° ed.). Buenos Aires: Librería y Editorial Nigar S.R.L .
- Ikedobi, C. O., Stevens, M., & Latinwo, L. (1998). Immobilization of linamarase on non-porous glass beads. *Process Biochemistry*, 33(5), 491–494. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00093-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00093-9)
- Ily Maza Mejía, C. J. H. (2007). Caracterización físico-química de quitosano para su aplicación como biosorbente de metales. *Revista Dela Facultad de Ciencias de La UNI*, 11(1), 1–5.
- Iwahara, K., & Honda, Y. (2000). Polymerization of guaiacol by lignin-degrading manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* in aqueous organic solvents. *Applied Microbiology and* Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s002530000340>
- Jafari, N. (2012). Degradation of a textile reactive azo dye by a combined biological-photocatalytic process: *Candida tropicalis* Jks2-TiO₂/Uv. *Iran J Environ Health* Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1735-2746-9-33.pdf>
- James J. P. Stewart, S. (2009). *MOPAC Computational Chemistry*. Colorado Springs, USA.
- Jian, Y., Taylor, K. E., Huixian, Z., Biswas, N., & Bewtra, J. K. (1994). Phenol conversion and dimeric intermediates in horseradish peroxidase-catalyzed phenol removal from water. *Environmental Science & Technology*, 28(12), 2154–2160. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028006782&partnerID=40&md5=a89a0d1f7f164459df5e8afd8cdf3eba>
- Jiang, Y., Tang, W., Gao, J., Zhou, L., & He, Y. (2014). Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its applications in phenolic compounds and dye removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 55(0), 1–6. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.11.005>
- Jradi, K., Daneault, C., & Chabot, B. (2011). Chemical surface modification of glass beads for the treatment of paper machine process waters. *Thin Solid Films*, 519(13), 4239–4245. doi:10.1016/j.tsf.2011.02.080
- Kadla, J. F., & Chang, H. M. (2001). The reactions of peroxides with lignin and lignin model compounds. *ACS Symposium Series*. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0041903618&partnerID=40&md5=7d4651693ab76e68b65a40e6a5b5fb09>
- Kadokawa, J. I., Kokubo, A., & Tagaya, H. (2002). Free-radical polymerization of vinyl monomers using hematin as a biomimetic catalyst in place of enzyme. *Macromolecular Bioscience*, 2(6), 257–260. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33751202439&partnerID=40&md5=f01747a223ce9280163fa0a37bfe1b70>
- Kalyanaraman, B., Mottley, C., & Mason, R. P. (1983). A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin/hydroperoxide systems. *Journal of Biological Chemistry*, 258(6), 3855–3858. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0020524329&partnerID=40&md5=484af44520e9ca2cebbb4dbe23edb320>
- Kamal, J., & Behere, D. (2008). Kinetic stabilities of soybean and horseradish peroxidases. *Biochemical Engineering Journal*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07002689>

- Kansal, S. K., Lamba, R., Mehta, S. K., & Umar, A. (2013). Photocatalytic degradation of Alizarin Red S using simply synthesized ZnO nanoparticles. *Materials Letters*, *106*, 385–389. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84879077928&partnerID=40&md5=c36939b2e4670c412a23c0a8810d15a0>
- Kapeluich, Y. L., Rubtsova, M. Y., & Egorov, A. M. (1997). Enhanced Chemiluminescence Reaction Applied to the Study of Horseradish Peroxidase Stability in the Course of p-Iodophenol Oxidation. *Luminescence*, *12*(6), 299–308. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031261720&partnerID=40&md5=1b4e9d474bab167ac25098feed536f58>
- Karim, Z., Adnan, R., & Husain, Q. (2012). A β -cyclodextrin-chitosan complex as the immobilization matrix for horseradish peroxidase and its application for the removal of azo dyes from textile effluent. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *72*, 10–17. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861333551&partnerID=40&md5=7c8cf5e4851ddb189035b2d65b884aa0>
- Khelifi, E., Ayed, L., Bouallagui, H., Touhami, Y., & Hamdi, M. (2009). Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. *Journal of Hazardous Materials*, *163*(2–3), 1056–1062. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.060>
- Kim, G. Y., Lee, K. B., Cho, S. H., Shim, J., & Moon, S. H. (2005). Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. *Journal of Hazardous Materials*, *126*(1–3), 183–188. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-26244436343&partnerID=40&md5=1c620a45edd4e683a59e7a13f4ba88f5>
- Klibanov, A. M., & Morris, E. D. (1981). Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enzyme and Microbial Technology*, *3*(2), 119–122. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0019556059&partnerID=40&md5=0ec6461b6e37ddc0fe3564459cd07ddf>
- Klibanov, A. M., Tu, T. M., & Scott, K. F. (1983). Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. *Science*, *221*(4607), 259–261. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0020620307&partnerID=40&md5=34d591f54abd38039e7ead998ef4f8f2>
- Kobayashi, S., & Higashimura, H. (2003). Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *28*(6), 1015–1048. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0038218137&partnerID=40&md5=770e3292536f330f80e572be2d5b7c89>
- Koleva, B. B., Stoyanov, S., Kolev, T., Petkov, I., & Spitteller, M. (2008). Spectroscopic and structural elucidation of merocyanine dye 2,5-[1-methyl-4-[2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]pyridinium]-hexane tetraphenylborate. Aggregation processes. *Spectrochim. Acta, Part A*, *71*(3), 847–853. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-54049099183&partnerID=40&md5=59c025b1aefdf223ebd3d8594bd64d66>
- Kudanga, T., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., & Burton, S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, *48*(3), 195–208. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.007>
- Kulys, J., & Ziemys, A. (2001). A role of proton transfer in peroxidase-catalyzed process elucidated by substrates docking calculations. *BMC Struct. Biol. [electron. Res.]*, *1*(1), 3. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0642336980&partnerID=40&md5=a00801c0c65815627244b1948e011639>
- Lachheb, H., Puzenat, E., Houas, A., Ksibi, M., Elaloui, E., Guillard, C., & Herrmann, J. M. (2002). Photocatalytic degradation of various types of dyes (Alizarin S, Crocein Orange G, Methyl Red, Congo Red, Methylene Blue) in water by UV-irradiated titania. *Appl. Catal., B*, *39*(1), 75–90. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037044671&partnerID=40&md5=580e1597bf93d5c0bed950aa6a48cc2f>

- Lai, B., Zhou, Y., Wang, J., Yang, Z., & Chen, Z. (2013). Application of excitation and emission matrix fluorescence (EEM) and UV-vis absorption to monitor the characteristics of Alizarin Red S (ARS) during electro-Fenton degradation process. *Chemosphere*, *93*(11), 2805–2813. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84887402715&partnerID=40&md5=efc5c8cbd5b64e20b712c49a705833b3>
- Lam, F. L. Y., & Hu, X. (2007). A high performance bimetallic catalyst for photo-Fenton oxidation of Orange II over a wide pH range. *Catalysis Communications*, *8*(12), 2125–2129. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-35448960824&partnerID=40&md5=74fa540368f2cad3d2ab193a6711e83b>
- Lazman, M. ., & Yablonsky, G. (2008). *Advances in chemical engineering mathematics and chemical engineering and kinetics. Vol. 34*. Elsevier Science.
- Li, G., Qu, J., Zhang, X., & Liu, H. (2006). Electrochemically assisted photocatalytic degradation of Orange II: Influence of initial pH values. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *259*(1-2), 238–244. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33750016504&partnerID=40&md5=eeca233f265d703daab38c7c17b19f09>
- Liang, X., Zhong, Y., Zhu, S., Zhu, J., Yuan, P., He, H., & Zhang, J. (2010). The decolorization of Acid Orange II in non-homogeneous Fenton reaction catalyzed by natural vanadium-titanium magnetite. *Journal of Hazardous Materials*, *181*(1-3), 112–120. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77954535790&partnerID=40&md5=eaa9e83a1bdda92ae45a6224a5fb4f55>
- Lindsay Smith, J. R., & Lower, R. J. (1991). The mechanism of the reaction between t-butyl hydroperoxide and 5,10,15,20-tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphyrinatoiron(III) pentachloride in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1), 31–39. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-37049071214&partnerID=40&md5=10ce956131b28e48e4629f1fa35f2fa5>
- Liotta, L. F., Gruttadauria, M., Di Carlo, G., Ferrini, G., & Librando, V. (2009). Heterogeneous catalytic degradation of phenolic substrates: Catalysts activity. *Journal of Hazardous Materials*, *162*(2–3), 588–606. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.115>
- Liu, G., Wu, T., Zhao, J., Hidaka, H., & Serpone, N. (1999). Photoassisted degradation of dye pollutants. 8. Irreversible degradation of alizarin red under visible light radiation in air-equilibrated aqueous TiO₂ dispersions. *Environmental Science and Technology*, *33*(12), 2081–2087. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033564927&partnerID=40&md5=b0b74c128863a5eac1121ae70715684d>
- Liu, X. D., Tokura, S., Haruki, M., Nishi, N., & Sakairi, N. (2002). Surface modification of nonporous glass beads with chitosan and their adsorption property for transition metal ions. *Carbohydrate Polymers*, *49*(2), 103–108. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00308-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00308-3)
- Liu, X. D., Tokura, S., Nishi, N., & Sakairi, N. (2003). A novel method for immobilization of chitosan onto nonporous glass beads through a 1,3-thiazolidine linker. *Polymer*, *44*(4), 1021–1026. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0347295936&partnerID=40&md5=4d3c74ac4b5308ef54139b463ad0c9e7>
- Lodha, B., & Chaudhari, S. (2007). Optimization of Fenton-biological treatment scheme for the treatment of aqueous dye solutions. *Journal of Hazardous Materials*, *148*(1-2), 459–466. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34547651218&partnerID=40&md5=134fd5627c5b9e652c574dea53af4a80>
- Loew, G. H., Harris, D. L., & Dupuis, M. (1997). Calculations of the structure and spectra of the putative transient peroxide intermediates of peroxidases. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, *398-399*, 497–505. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0003312253&partnerID=40&md5=9a348cb457a454b7fc134ee9f2c5c9c7>
- López, C., Moreira, M. T., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2004). Dye Decolorization by Manganese Peroxidase in an Enzymatic Membrane Bioreactor. *Biotechnology Progress*, *20*(1), 74–81. Retrieved from

- <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-10744229489&partnerID=40&md5=9b3617ad3ab16ea10e6f56460ccb3ee2>
- López, C., Valade, A. G., Combourieu, B., Mielgo, I., Bouchon, B., & Lema, J. M. (2004). Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ ¹H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, *335*(1), 135–149. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-7444243745&partnerID=40&md5=1300e17bd590f5e47f5917e3b028e82d>
- Maezono, T., Tokumura, M., Sekine, M., & Kawase, Y. (2011). Hydroxyl radical concentration profile in photo-Fenton oxidation process: Generation and consumption of hydroxyl radicals during the discoloration of azo-dye Orange II. *Chemosphere*, *82*(10), 1422–1430. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79551683942&partnerID=40&md5=1bc8cee0bce71fe57cc37f782dd708f1>
- Magario, I. (2009). *Enzyme reaction engineering for the conversion of emulsified di-rhamnolipid by free and immobilized Naringinase*. Universität Karlsruhe.
- Magario, I., García Einschlag, F. S., Rueda, E. H., Zygadlo, J., & Ferreira, M. L. (2012). Mechanisms of radical generation in the removal of phenol derivatives and pigments using different Fe-based catalytic systems. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *352*, 1–20. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-82955233832&partnerID=40&md5=6c16241a7b0f749effcfeae8955f15d1>
- Maghami, G. G., & Roberts, G. A. F. (1988). Studies on the adsorption of anionic dyes on chitosan. *Die Makromolekulare Chemie*, *189*(10), 2239–2243. doi:10.1002/macp.1988.021891003
- Maitra, D., Byun, J., Andreana, P. R., Abdulhamid, I., Diamond, M. P., Saed, G. M., ... Abu-Soud, H. M. (2011). Reaction of hemoglobin with HOCl: Mechanism of heme destruction and free iron release. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(2), 374–386. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79959340510&partnerID=40&md5=4c985c38b246f8d4b6371b1261f64d64>
- Manzano, M. A., Riaza, A., Quiroga, J. M., & Kiwi, J. (2009). Optimization of the solution parameters during the degradation of Orange II in a photo-reactor mediated by Fe-Nafion membranes. *Water Science and Technology*, *60*(4), 833–840. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70349899143&partnerID=40&md5=30d6377b1cd3c7e05dac90084a3f3f71>
- Méndez-Paz, D., Omil, F., & Lema, J. (2005). Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022904002868>
- Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations.* (1994). Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=q8XUa3pcWYoC&pgis=1>
- Metelitsa, D. I., Arapova, G. S., Vidzhinaite, R. A., Demcheva, M. V., Litvinchuk, A. V., & Razumas, V. I. (1994). Co-oxidation of phenols and 4-aminoantipyrene catalyzed by microperoxidase and their complexes with proteins. *Sopriazhennoe Okislenie Fenolov I 4-Aminoantipirina, Kataliziruemoie Mikroperoksidazami I Ikh Kompleksami S Belkami.*, *59*(9), 1285–1298. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028510299&partnerID=40&md5=d4480103a90cef7240e045b5a7f14abe>
- Metelitsa, D. I., Litvinchuk, A. V., & Savenkova, M. I. (1991). Peroxidase-catalyzed co-oxidation of halogen-substituted phenols and 4-aminoantipyrene. *Journal of Molecular Catalysis*, *67*(3), 401–411. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0026203946&partnerID=40&md5=107b97e40a186bad45afb8c5db73a9e7>
- Mifune, M., Sugimoto, K., Iwado, A., Akizawa, H., Motohashi, N., & Saito, Y. (2003). Flow injection analysis of hydrogen peroxide using glass-beads modified with manganese(III)-tetra(4-carboxyphenyl)porphine derivative and its analytical application to the determination of serum glucose. *Analytical Sciences*, *19*(4), 569–573. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0038218189&partnerID=40&md5=39300424f209377cd48ceb538b158b0d>

- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, *37*(5), 790–802. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-8444230519&partnerID=40&md5=32b01846fde53fe378bccf450b4b2eff>
- Modirshahla, N., & Behnajady, M. A. (2006). Photooxidative degradation of Malachite Green (MG) by UV/H₂O₂: Influence of operational parameters and kinetic modeling. *Dyes and Pigments*, *70*(1), 54–59. doi:10.1016/j.dyepig.2005.04.012
- Mohamed, S. A., Al-Malki, A. L., Kumosani, T. A., & El-Shishtawy, R. M. (2013). Horseradish peroxidase and chitosan: Activation, immobilization and comparative results. *International Journal of Biological Macromolecules*, *60*, 295–300. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84880007549&partnerID=40&md5=89b337244796f063bfea7509e0d07edd>
- Mohorčič, M., Teodorovič, S., Golob, V., & Friedrich, J. (2006). Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. *Chemosphere*, *63*(10), 1709–1717. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33646512616&partnerID=40&md5=91cd0a1132c75532d217ce35e4c7bd89>
- Moncayo-Lasso, A., Torres-Palma, R. A., Kiwi, J., Benítez, N., & Pulgarin, C. (2008). Bacterial inactivation and organic oxidation via immobilized photo-Fenton reagent on structured silica surfaces. *Applied Catalysis B: Environmental*, *84*(3-4), 577–583. doi:10.1016/j.apcatb.2008.05.022
- Monier, M., Ayad, D. M., Wei, Y., & Sarhan, A. A. (2010). Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, *46*(3), 324–330. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77549088939&partnerID=40&md5=454a37ffed3325e8493c3e81a07de82c>
- Monteagudo, J. M., Durán, A., & López-Almodovar, C. (2008). Homogeneous ferrioxalate-assisted solar photo-Fenton degradation of Orange II aqueous solutions. *Applied Catalysis B: Environmental*, *83*(1-2), 46–55. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-48649096053&partnerID=40&md5=ea8f467b76fa2c84d810633271e1a083>
- Montgomery, D. C. (2001). *Design and analysis of experiments* (5th ed.). New York: John Wiley and Sons.
- Moosavi-Movahedi, A. A., Semsarha, F., Heli, H., Nazari, K., Ghourchian, H., Hong, J., ... Sefidbakht, Y. (2008). Micellar histidinate hematin complex as an artificial peroxidase enzyme model: Voltammetric and spectroscopic investigations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *320*(1-3), 213–221. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-43649083736&partnerID=40&md5=b2bcc5fe2091767f1d7f2229c79a9903>
- Muhd Julkapli, N., Bagheri, S., & Bee Abd Hamid, S. (2014). Recent advances in heterogeneous photocatalytic decolorization of synthetic dyes. *Scientific World Journal*, *2014*. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84904111075&partnerID=40&md5=31d2a3047065279bbbc085c9a4b3280c>
- Murphy, T. E., Tsui, K. L., & Allen, J. K. (2005). A review of robust design methods for multiple responses. *Research in Engineering Design*, *16*(3), 118–132. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-29244482018&partnerID=40&md5=781c4c453634db5c8c726ed06116bd83>
- Mutambanengwe, C. C. Z., Togo, C. A., & Whiteley, C. G. (2007). Decolorization and degradation of textile dyes with biosulfidogenic hydrogenases. *Biotechnology Progress*, *23*(5), 1095–1100. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-35348856250&partnerID=40&md5=64bd88af0a3639616b66994161f5469d>
- Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2000). Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: Superoxide production and heme degradation. *Biochemistry*, *39*(40), 12503–12511. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034633998&partnerID=40&md5=56af476236f7296c3f5930bb2ecf1516>

- Nagiev, T. M., Abbasova, M. T., Baba-Zade, S. M., Kuliev, S. A., Stepanova, E. B., & Agamamedova, L. M. (2000). An attempt to create stable biomimetic sensors for express analysis of hydrogen peroxide in water solutions. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 88(1-3), 275–284. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033783412&partnerID=40&md5=22a2c1d5f4c045f462727ef4a4439d2c>
- Nam, S., Renganathan, V., & Tratnyek, P. G. (2001). Substituent effects on azo dye oxidation by the Fe(III)-EDTA-H₂O₂ system. *Chemosphere*, 45(1), 59–65. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034849339&partnerID=40&md5=7d3bd6c2be6cc114bc4ecfcff97dbaec>
- Nam, W., Han, H. J., Oh, S. Y., Lee, Y. J., Choi, M. H., Han, S. Y., ... Shin, W. (2000). New insights into the mechanisms of O-O bond cleavage of hydrogen peroxide and tert-alkyl hydroperoxides by iron(III) porphyrin complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 122(36), 8677–8684. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034644399&partnerID=40&md5=a08ddcc01f4c6d952dce0c5341b488b3>
- Nam, W., Lim, M., & Oh, S. Y. (2000). Effect of Anionic Axial Ligands on the Formation of Oxoiron(IV) Porphyrin Intermediates. *Inorganic Chemistry*, 39, 5572–5575.
- Nam, W., Mi Hee, L., Sun Kyung, M., & Kim, C. (2000). Participation of two distinct hydroxylating intermediates in iron(III) porphyrin complex-catalyzed hydroxylation of Alkanes. *Journal of the American Chemical Society*, 122(44), 10805–10809. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034623555&partnerID=40&md5=5eb34aeebdf9d26033bc9f18bad23d99>
- Nazar, M. F., Khan, A. M., & Shah, S. S. (2010). Association behavior of 3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonic acid sodium salt in cationic surfactant medium under different pH conditions. *J. Dispersion Sci. Technol.*, 31(5), 596–605. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77951659257&partnerID=40&md5=8a011639e1a836d3ec5fd9f74374ef81>
- Nazari, K., Esmaili, N., Mahmoudi, A., Rahimi, H., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2007). Peroxidative phenol removal from aqueous solutions using activated peroxidase biocatalyst. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 226–233. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34248590006&partnerID=40&md5=698f362bb588dfd9a38cb60e7f429f6d>
- Nicell, J. A. (1994). Kinetics of horseradish peroxidase-catalysed polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol. *Journal of Chemical Technology AND Biotechnology*, 60(2), 203–215. doi:10.1002/jctb.280600214
- Nicell, J. A., Saadi, K. W., & Buchanan, I. D. (1995). Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. *Bioresour. Technol.*, 54(1), 5–16. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029565308&partnerID=40&md5=6be8425b1ff066d769d79e5ace920cab>
- Nicell, J. A., & Wright, H. (1997). A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(4), 302–310. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031239477&partnerID=40&md5=853d29242b0f41dc831563e903411fd4>
- Nisha, S., Karthick, A., & Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Che. Sci. Rev. Lett.* Retrieved from <http://www.chesci.com/articles/csr1/v1i3/CS17204211.pdf>
- Odo, J., Sumihiro, M., Okadome, T., Inoguchi, M., Akashi, H., & Nakagoe, K. (2009). Peroxidase-like catalytic activity of water-insoluble complex linked Fe(III)-thiacalix[4]arenetetrasulfonate with tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl) porphine via ionic interaction. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(12), 1400–1404. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-71649115684&partnerID=40&md5=1e784046afef79310e5e5ccc061bf144>

- Okuda, K., Urabe, I., Yamada, Y., & Okada, H. (1991). Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *71*(2), 100–105. doi:10.1016/0922-338X(91)90231-5
- Olya, M. E., Kasiri, M. B., Aleboyeh, H., & Aleboyeh, A. (2008). Application of response surface methodology to optimise C.I. acid orange 7 azo dye mineralization by UV/H₂O₂ process. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, *11*(3), 561–567. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70449379029&partnerID=40&md5=9e5670a40bd90fb3432ac1d3b73aa217>
- Omuro Lupetti, K., Rocha, F. R. P., & Fatibello-Filho, O. (2004). An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry. *Talanta*, *62*(3), 463–467. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-1042287351&partnerID=40&md5=4bb09ee10b8e32b4de0d855b8a34de09>
- Ozmen, M., Can, K., Akin, I., Arslan, G., Tor, A., Cengeloglu, Y., & Ersoz, M. (2009). Surface modification of glass beads with glutaraldehyde: Characterization and their adsorption property for metal ions. *Journal of Hazardous Materials*, *171*(1–3), 594–600. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.045
- Pal, J., Deb, M. K., & Sircar, J. K. (2013). Green synthesis of Au/AgNPs and their photodegradation of organic dyes in aqueous solution. *Journal of the Indian Chemical Society*, *90*(11), 2115–2120. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84893117674&partnerID=40&md5=5f87d6f6c946764d968c86b727b2671e>
- Panizza, M., & Oturan, M. A. (2011). Degradation of Alizarin Red by electro-Fenton process using a graphite-felt cathode. *Electrochim. Acta*, *56*(20), 7084–7087. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468611008498>
- Parker, F. S. (1983). *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*. (P. Press, Ed.). New York.
- Pasto, D. J., & Johnson, C. R. (1981). *Determinación de estructuras orgánicas*. Reverte. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=uHNdH8JXFIC&pgis=1>
- Peralta-Hernández, J. M., Meas-Vong, Y., Rodríguez, F. J., Chapman, T. W., Maldonado, M. I., & Godínez, L. A. (2008). Comparison of hydrogen peroxide-based processes for treating dye-containing wastewater: Decolorization and destruction of Orange II azo dye in dilute solution. *Dyes and Pigments*, *76*(3), 656–662. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34548705464&partnerID=40&md5=4bf235076fdf33c30c1ca643785c5c77>
- Pijanowska, D. G., & Torbicz, W. (2008). Functionalisation of chemically sensitive surfaces for biosensors and microreactors fabrication Fonctionnalisation des surfaces chimiquement sensibles pour la fabrication des biocapteurs et des microréacteurs. *IRBM*, *29*(2-3), 128–132.
- Pilipenko, A. T., Safronova, V. G., & Trachevsky, V. V. (1993). Solvation of alizarin red S in water - organic media. *Ukr. Khim. Zh.*, *59*(4), 399–404.
- Pirillo, S., Einschlag, F. S. G., Ferreira, M. L., & Rueda, E. H. (2010a). Eriochrome Blue Black R and Fluorescein degradation by hydrogen peroxide oxidation with horseradish peroxidase and hematin as biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *66*(1-2), 63–71. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77957847362&partnerID=40&md5=92cf8533010b35fdff6ebce67aba410a>
- Pirillo, S., Einschlag, F. S. G., Ferreira, M. L., & Rueda, E. H. (2010b). Eriochrome Blue Black R and Fluorescein degradation by hydrogen peroxide oxidation with horseradish peroxidase and hematin as biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *66*(1-2), 63–71. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77957847362&partnerID=40&md5=7c5890e82bf80ec484eecab5acce6491>
- Pirillo, S., García Einschlag, F. S., Rueda, E. H., & Ferreira, M. L. (2010a). Horseradish peroxidase and hematin as biocatalysts for alizarin degradation using hydrogen peroxide. *Industrial and Engineering Chemistry*

- Research*, 49(15), 6745–6752. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77955044548&partnerID=40&md5=73dd299ee168ce0b313d0c7b81848bcc>
- Pirillo, S., García Einschlag, F. S., Rueda, E. H., & Ferreira, M. L. (2010b). Horseradish peroxidase and hematin as biocatalysts for alizarin degradation using hydrogen peroxide. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(15), 6745–6752. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77955044548&partnerID=40&md5=b2f4d7d184f72abe05dd9a7996dd372f>
- Pirillo, S., Pedroni, V., Rueda, E., & Ferreira, M. L. (2009). Elimination of dyes from aqueous solutions using iron oxides and chitosan as adsorbents. a comparative study. *Química Nova*, 32(5), 1239–1244. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-69249187475&partnerID=40&md5=9a2d46b09fa3f312201bd1d5394ad4a8>
- Pirillo, S., Rueda, E. H., & Ferreira, M. L. (2012). Supported biocatalysts for Alizarin and Eriochrome Blue Black R degradation using hydrogen peroxide. *Chemical Engineering Journal*, 204-205, 65–71. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84865304548&partnerID=40&md5=d5bb47e7bb6354d792349600f27fbd14e>
- Pointing, S. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 20–33. doi:10.1007/s002530100745
- Porphyrin Handbook*. (2000). *Theoretical and Physical Characterization*. K.M. Kadish, K.M. Smith. R. Guilard Eds. (Academic Press).
- Poulos, J. J. K. T. L. (1980). No Title. *Biol. Chem.*, 255, 8199–8205.
- Process Systems Enterprise . (2004). *Advanced Guide Gproms*. Process Systems Enterprise. Retrieved from <http://es.scribd.com/doc/138784014/Advanced-Guide-Gproms#scribd>
- Rafiquzzaman, M., Komagoe, K., & Tamagake, K. (1995). Comparative catalytic activity of hemin and hematin in the breakdown of methyl linoleate hydroperoxide and peroxidation of methyl linoleate in methanol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43(6), 905–909. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029021104&partnerID=40&md5=af82fb27df362200968dcf47b0881a58>
- Rahim Pouran, S., Abdul Aziz, A. R., & Wan Daud, W. M. A. (2015). Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 53–69. doi:10.1016/j.jiec.2014.05.005
- Rajendiran, N., & Santhanalakshmi, J. (2006). Metal tetrasulfophthalocyanines catalysed co-oxidation of phenol with 4-aminoantipyrine using hydrogen peroxide as oxidant in aqueous microheterogeneous system. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 245(1-2), 185–191. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TGM-4HHP5CM-4/2/efc39df87b2b8ed65dea1f1594d79510>
- Ramalho, R. S. (1990). *Tratamiento de aguas residuales*. Reverte. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=30etGjzPXyWC&pgis=1>
- Ramírez, J., Godínez, L. A., Méndez, M., Meas, Y., & Rodríguez, F. J. (2010). Heterogeneous photo-electro-Fenton process using different iron supporting materials. *Journal of Applied Electrochemistry*, 40(10), 1729–1736. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78649917575&partnerID=40&md5=1f0e6dd6e90ad568a12e0bca133bd4e0>
- Ramirez, J. H., Costa, C. A., & Madeira, L. M. (2005). Experimental design to optimize the degradation of the synthetic dye Orange II using Fenton's reagent. *Catalysis Today*, 107-108, 68–76. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-26844535467&partnerID=40&md5=a99232329cb7ef6af604d930bb749245>
- Rappoport, Z. (Ed.). (2009). *PATAI'S Chemistry of Functional Groups*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9780470682531

- REBELO, S., PEREIRA, M., SIMOES, M., NEVES, M., & CAVALEIRO, J. (2005). Mechanistic studies on metalloporphyrin epoxidation reactions with hydrogen peroxide: evidence for two active oxidative species. *Journal of Catalysis*, 234(1), 76–87. doi:10.1016/j.jcat.2005.05.026
- Reeves, R. L., Maggio, M. S., & Harkaway, S. A. (1979). A critical spectrophotometric analysis of the dimerization of some ionic azo dyes in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 83(18), 2359–2368. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0000325405&partnerID=40&md5=322f25d10f3ef8097ddd2bc2a3c1a2a4>
- Reihmann, M., & Ritter, H. (2006). No Title. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33947539544&partnerID=40&md5=d8ccbc80b8fc322de9b5813c585bba2e>
- Ribeiro, J. P. N., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2009). Spectrophotometric FIA methods for determination of hydrogen peroxide: Application to evaluation of scavenging capacity. *Talanta*, 79(4), 1169–1176. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67650128442&partnerID=40&md5=3dc852be4b4e0c2963c510a4fdc89c0c>
- Rich, P. R., & Iwaki, M. (2007). A comparison of catalytic site intermediates of cytochrome c oxidase and peroxidases. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), 1047–1055. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-35648942074&partnerID=40&md5=17362af5631eeaf90d28fe4b60be0dd4>
- Richardson, W., Volk, L., Lau, K. H., Lin, S. H., & Eyring, H. (1973). Application of the Singular Perturbation Method to Reaction Kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(5), 1588–1592. doi:10.1073/pnas.70.5.1588
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77(3), 247–255. doi:10.1016/S0960-8524(00)00080-8
- Rodríguez, A., Ovejero, G., Sotelo, J. L., Mestanza, M., & García, J. (2010). Heterogeneous fenton catalyst supports screening for mono azo dye degradation in contaminated wastewaters. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(2), 498–505. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-75249095951&partnerID=40&md5=b3d7242947f5594a0074df73bc95f789>
- Rodríguez Fernández- Alba A., L. G. P., Rosal García, R., Dorado Valiño, M., Villar Fernández, S., & Sanz García, J. M. (2001). Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales - Satellite. Retrieved April 7, 2015, from <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition&blobheadervalue1=filename%3DBVCM001696.pdf&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1352861361304&ssbinary=true>
- Russo, M., & Giardina, P. (2008). Assessment of anthraquinone-dye conversion by free and immobilized crude laccase mixtures. *Enzyme and Microbial ...* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022908000306>
- Ryan, B., Carolan, N., & Ó'Fágáin, C. (2006). Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches? *Trends in Biotechnology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779906001557>
- Saha, T., Frauendorf, H., & John, M. (2013). Efficient Oxidative Degradation of Azo Dyes by a Water-Soluble Manganese Porphyrin Catalyst. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cctc.201200475/full>
- Saidman, S., Rueda, E. H., & Ferreira, M. L. (2006). Activity of free peroxidases, hematin, magnetite-supported peroxidases and magnetite-supported hematin in the aniline elimination from water-UV-vis analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 28(2), 177–186. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-31944443721&partnerID=40&md5=c47260274937fbc6f48872f0feb640d1>

- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138–157. doi:10.1016/j.jtice.2010.06.006
- Sautter, A., Thalacker, C., Heise, B., & Wurthner, F. (2002). Hydrogen bond-directed aggregation of diazadibenzoperylene dyes in low-polarity solvents and the solid state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 4993–6. doi:10.1073/pnas.062606099
- SCHEELE, C. W. (1777). *Chemische Abhandlung von der Luft und der Feuer (Tratado químico del aire y del fuego)*.
- Scheeren, C. W., Paniz, J. N. G., & Martins, A. F. (2002). Comparison of advanced processes on the oxidation of acid orange 7 dye. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 37(7), 1253–1261. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036329087&partnerID=40&md5=e8469f6b478462789587875981db8028>
- Schünemann, V., & Winkler, H. (2000). Structure and dynamics of biomolecules studied by Mossbauer spectroscopy. *Rep. Prog. Phys.*, 63(3), 263–353. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033910009&partnerID=40&md5=fd0e0546ee4bced2fffa243a44aff69d>
- Selvam, K., Swaminathan, K., & Chae, K.-S. (2003). Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technology*, 88(2), 115–119. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00280-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00280-8)
- Senthilkumar, S., Perumalsamy, M., & Janardhana Prabhu, H. (2014). Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing Amido black 10B. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(6), 845–853. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2011.10.010>
- Shakeri, M., & Shoda, M. (2010). Efficient decolorization of an anthraquinone dye by recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) immobilized in silica-based mesocellular foam. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(3–4), 277–281. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.007>
- Shelnutt, J. A. (2000). Molecular simulations of porphyrins and heme proteins. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 4(4), 386–389. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033662718&partnerID=40&md5=4de0f621ca7cec705583e217802ae663>
- Shi, P., Dai, X., Zheng, H., Li, D., Yao, W., & Hu, C. (2014). Synergistic catalysis of Co₃O₄ and graphene oxide on Co₃O₄/GO catalysts for degradation of Orange II in water by advanced oxidation technology based on sulfate radicals. *Chemical Engineering Journal*, 240, 264–270.
- Shlomo Margel, A. R. (1980). Synthesis and Characterization of Poly(glutaraldehyde). A Potential Reagent for Protein Immobilization and Cell Separation. *Macromolecules*, 13, 19–24.
- Simoncic, B. (1995). Influence of mono-azo dyes structure on their aggregation in aqueous solution. *Tekstilec*, 38(3-4), 53–59. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029138608&partnerID=40&md5=638421e2b46f83f341d944bf98f9bfeb>
- Singh, A., Roy, S., Samuelson, L., Bruno, F., Nagarajan, R., Kumar, J., ... Kaplan, D. L. (2001). Peroxidase, hematin, and pegylated-hematin catalyzed vinyl polymerizations in water. *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry*, 38 A(12), 1219–1230. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035683331&partnerID=40&md5=8844f5b41126ad89d8807d4dbefd8518>
- Sleiman, M., Vildozo, D., Ferronato, C., & Chovelon, J.-M. (2007). Photocatalytic degradation of azo dye Metanil Yellow: Optimization and kinetic modeling using a chemometric approach. *Applied Catalysis B: Environmental*, 77(1-2), 1–11. doi:10.1016/j.apcatb.2007.06.015
- Sood, S., Mehta, S. K., Umar, A., & Kansal, S. K. (2014). The visible light-driven photocatalytic degradation of Alizarin red S using Bi-doped TiO₂ nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 38(7), 3127–3136.

- Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84902659355&partnerID=40&md5=c01457d344efa7c00fbf7f25f110e664>
- Stephenson Bell, A.T. , N. A. (2005). A study of the mechanism and kinetics of cyclooctene epoxidation catalyzed by iron(III) tetrakis(pentafluorophenyl) porphyrin. . *Journal of the American Chemical Society*, *127*, 8635–8643.
- Stephenson, N. A., & Bell, A. T. (2007a). Mechanistic insights into iron porphyrin-catalyzed olefin epoxidation by hydrogen peroxide: Factors controlling activity and selectivity. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *275*(1-2), 54–62. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34548223665&partnerID=40&md5=b481f208bf702158424265ca50d513c3>
- Stephenson, N. A., & Bell, A. T. (2007b). Mechanistic study of iron(III) tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin triflate (F2OTPP)Fe(OTf) catalyzed cyclooctene epoxidation by hydrogen peroxide. *Inorganic Chemistry*, *46*(6), 2278–2285. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34047169775&partnerID=40&md5=c61386e20859f431c1978d9d7ac190c7>
- Stewart, J. J. P. (2007). No Title. *J. Mol. Mod.*, *13*, 1173–1213.
- Stuart, B. H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. . (L. John Wiley & Sons, Ed.).
- Sun, W., & Payne, G. (1996). Tyrosinase-containing chitosan gels: A combined catalyst and sorbent for selective phenol removal. *Biotechnology and Bioengineering*. Retrieved from [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960705\)51:1%3C79::AID-BIT9%3E3.O.CO;2-Y/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0290(19960705)51:1%3C79::AID-BIT9%3E3.O.CO;2-Y/abstract)
- Sun, W., Payne, G., & Moas, M. (1992). Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. *Biotechnology* Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1021/bp00015a002/abstract>
- Szymańska, K., Bryjak, J., Mrowiec-Białoń, J., & Jarzębski, A. B. (2007). Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain efficient biocatalysts. *Microporous and Mesoporous Materials*, *99*(1-2), 167–175. doi:10.1016/j.micromeso.2006.08.035
- Takahashi, H., Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T., & Inagaki, S. (2000). Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes Depend on the Pore Size and Surface Characteristics of Mesoporous Silica. *Chemistry of Materials*, *12*(11), 3301–3305. doi:10.1021/cm000487a
- Tang, B., Zhang, G. Y., Liu, Y., & Han, F. (2002). Studies on catalytic spectrophotometry using β -cyclodextrin polymer - Schiff base metal complex as mimetic enzyme. *Analytica Chimica Acta*, *459*(1), 83–91. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037123693&partnerID=40&md5=f71783c4fb5ebfe0e975436544f96a9d>
- Tantak, N. P., & Chaudhari, S. (2006). Degradation of azo dyes by sequential Fenton's oxidation and aerobic biological treatment. *Journal of Hazardous Materials*, *136*(3), 698–705. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33746767591&partnerID=40&md5=6e0426bcad47205d0a214af15fa9115e>
- Tatoli, S., Zazza, C., Sanna, N., Palma, A., & Aschi, M. (2009). The role of Arginine 38 in horseradish peroxidase enzyme revisited: A computational investigation. *Biophys. Chem.*, *141*(1), 87–93. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-60549091531&partnerID=40&md5=a95e428cca826082045dc33360c5af9e>
- Thomas, D. W., & Martell, A. E. (1958). Visible and ultraviolet absorption spectra of metal chelates of para-substituted tetraphenylporphines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *76*(2), 286–294. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90154-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(58)90154-1)
- Tian, S. H., Tu, Y. T., Chen, D. S., Chen, X., & Xiong, Y. (2011). Degradation of Acid Orange II at neutral pH using Fe₂(MoO₄)₃ as a heterogeneous Fenton-like catalyst. *Chemical Engineering Journal*, *169*(1-3), 31–37. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79955032181&partnerID=40&md5=0ea708d3bd3e1d93b7e137393e9bc120>

- Tizaoui, C., & Grima, N. (2011). Kinetics of the ozone oxidation of Reactive Orange 16 azo-dye in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 173(2), 463–473. doi:10.1016/j.cej.2011.08.014
- Traylor, T. G., & Xu, F. (1987). A biomimetic model for catalase: The mechanisms of reaction of hydrogen peroxide and hydroperoxides with iron(III) porphyrins. *Journal of the American Chemical Society*, 109(20), 6201–6202. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023262327&partnerID=40&md5=1a67224cd53147434874428df54d4783>
- Traylor, T. G., & Xu, F. (1990). Mechanisms of reactions of iron(III) porphyrins with hydrogen peroxide and hydroperoxides: Solvent and solvent isotope effects. *Journal of the American Chemical Society*, 112(1), 178–186. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025268246&partnerID=40&md5=e9f76e0fa6ffb66506cca6c501cb5b2e>
- Trivedi, V., Chand, P., Maulik, P. R., & Bandyopadhyay, U. (2005, August 27). Mechanism of horseradish peroxidase-catalyzed heme oxidation and polymerization (β -hematin formation). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Elsevier Science. Retrieved from <http://repository.ias.ac.in/98516/>
- Ulson de Souza, S. M. A. G., Forgiarini, E., & Ulson de Souza, A. A. (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, 147(3), 1073–1078. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.003>
- Uyguner, C. S., & Bekbolet, M. (2005). Evaluation of humic acid photocatalytic degradation by UV-vis and fluorescence spectroscopy. *Catalysis Today*, 101(3–4), 267–274. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2005.03.011>
- Van Der Zee, F. P., Bisschops, I. A. E., Blanchard, V. G., Bouwman, R. H. M., Lettinga, G., & Field, J. A. (2003). The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge. *Water Research*, 37(13), 3098–3109. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0038656660&partnerID=40&md5=4fae1a25b24ac706ff067354ed30071f>
- Van Der Zee, J., Barr, D. P., & Mason, R. P. (1996). ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-butyl hydroperoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(2), 199–206. doi:10.1016/0891-5849(95)02031-4
- Vasileva, N., Godjevargova, T., Ivanova, D., & Gabrovska, K. (2009). Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer membrane in removing of phenol from water. *Int. J. Biol. Macromol.*, 44(2), 190–194. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-58849122804&partnerID=40&md5=a4b742931685a111865742ecc84b2eda>
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0742324902&partnerID=40&md5=21c74101cfa25e108909b0617c6fc31a>
- Vidossich, P., Fiorin, G., Alfonso-Prieto, M., Derat, E., Shaik, S., & Rovira, C. (2010). On the role of water in peroxidase catalysis: A theoretical investigation of HRP compound i formation. *J. Phys. Chem. B*, 114(15), 5161–5169. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77951112324&partnerID=40&md5=1d4337f92e34f8a9747e1f5b5e9d2dc3>
- Vinod Kumar, T. (2000). Molecular complexes of phenols with DDQ. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences: Chemical Sciences*, 112(2), 119–125. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-1842821910&partnerID=40&md5=30c73c4f0f04293f18aef59ee2a2b361>
- Vlasits, J., Jakopitsch, C., Bernroither, M., Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2010). Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 74–81. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77954313317&partnerID=40&md5=e49d940901ed7bbb24be5740f5ad9423>
- Vojinovic, V., Azevedo, A. M., Martins, V. C. B., Cabral, J. M. S., Gibson, T. D., & Fonseca, L. P. (2004). Assay of H₂O₂ by HRP catalysed co-oxidation of phenol-4-sulphonic acid and 4-aminoantipyrene:

- characterisation and optimisation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28(2-3), 129–135. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TGN-4C40Y8X-1/2/bae57e642f06f34052dfe27d1b1833a8>
- Wada, S., Ichikawa, H., & Tatsumi, K. (1993). Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *Biotechnology and ...* Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260420710/full>
- Wagner, M., & Nicell, J. A. (2002). Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.*, 36(16), 4041–4052. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036750893&partnerID=40&md5=50667d120d473ce076ef0e9f839e0f0b>
- Waring, D. R., & Hallas, G. (Eds.). (1990). *The Chemistry and Application of Dyes*. Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4684-7715-3
- Weisburger, J. H. (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 506-507, 9–20. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037201650&partnerID=40&md5=60b65bf3c8f24058d5a4480c49c054ff>
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22(1–2), 161–187. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.011>
- Wilfred Vermerris, R. N. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. (Springer, Ed.).
- Willy Herbst, K. H. (2003). *Industrial Organic Pigments, Production, Properties, Applications* (Third, Com). Frankfurt: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Wu, Y., Taylor, K. E., Biswas, N., & Bewtra, J. K. (1997). Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. *Water Research*, 31(11), 2699–2704. doi:10.1016/S0043-1354(97)00119-X
- Xu, Q., Mao, C., Liu, N. N., Zhu, J. J., & Sheng, J. (2006). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5), 768–773. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33750299566&partnerID=40&md5=875c8f44f10f013116b700eb90819086>
- Xu, R., Zhou, Q., Li, F., & Zhang, B. (2013). Laccase immobilization on chitosan/poly (vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2, 4-dichlorophenol removal. *Chemical Engineering Journal*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894713002404>
- Yao, Y., Mao, Y., Huang, Q., Wang, L., Huang, Z., Lu, W., & Chen, W. (2014). Enhanced decomposition of dyes by hemin-ACF with significant improvement in pH tolerance and stability. *Journal of Hazardous Materials*, 264(0), 323–331. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.063>
- Yonathan Parra, Rosa E. Ferrer, K. M. y M. M. (2011). ESPECTROSCOPIA DE LAS INTERACCIONES DE DROGAS QUINOLINICAS ANTIMALARICAS CON Fe(III)PIX SPECTROSCOPY OF QUINOLINE ANTIMALARIALS DRUGS INTERACTIONS WITH Fe(III)PIX. *Quimica Viva*, 10(3). Retrieved from <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v10n3/parra.html>
- Yousefi, V., & Kariminia, H. R. (2010). Statistical analysis for enzymatic decolorization of acid orange 7 by *Coprinus cinereus* peroxidase. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(3), 245–252. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77950299933&partnerID=40&md5=39a1a74da885c2aa4d7996a3679b0039>
- Yu, G., Wen, X., & Qian, Y. (2005). Production of the ligninolytic enzymes by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in an air atmosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 323–327. doi:10.1007/s11274-004-3571-8

- Zazza, C., Aschi, M., & Palma, A. (2006). On the formation of Horseradish Peroxidase Compound I at high pH: New insights from ab initio molecular dynamics. *Chem. Phys. Lett.*, *428*(1-3), 152–156. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33747806611&partnerID=40&md5=db848d6c5e2f25d50ea7859c29639fca>
- Zhai, R., Zhang, B., Wan, Y., Li, C., Wang, J., & Liu, J. (2013). Chitosan-halloysite hybrid-nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal. *Chemical Engineering Journal*, *214*, 304–309. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84870229208&partnerID=40&md5=d5927592ded64051ac80c264d368d126>
- Zhan, Y., Tan, X., Lai, G., Yu, A., Han, D., & Zhang, H. (2013). Porous-magnetic chitosan microsphere/horseradish peroxidase modified electrode for the selective determination of hydrogen peroxide. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, *5*(6), 684–689. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84880843009&partnerID=40&md5=ed0b143edac86f7bf993efdbe664705a>
- Zhang, A., Fang, L., Wang, J., & Liu, W. (2013). Enzymatic decolorization of Orange II: optimization by response surface methodology and pathway. *Environmental Progress & ...* Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ep.11628/full>
- Zhang, H., Li, Y., Zhong, X., & Ran, X. (2011). Application of experimental design methodology to the decolorization of Orange II using low iron concentration of photoelectro-Fenton process. *Water Science and Technology*, *63*(7), 1373–1380. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79955584303&partnerID=40&md5=c5cbb0ff8a9c801b0baa23cf132d1355>
- Zhang, J., Feng, M., Jiang, Y., Hu, M., Li, S., & Zhai, Q. (2012). Efficient decolorization/degradation of aqueous azo dyes using buffered H₂O₂ oxidation catalyzed by a dosage below ppm level of chloroperoxidase. *Chemical Engineering Journal*, *191*, 236–242. doi:10.1016/j.cej.2012.03.009
- Zhou, S., Tan, J., Chen, Q., Lin, X., Lü, H., & Xie, Z. (2010). Carboxymethylchitosan covalently modified capillary column for open tubular capillary electrochromatography of basic proteins and opium alkaloids. *Journal of Chromatography A*, *1217*(52), 8346–8351. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.001>
- Ziemys, A., & Kulys, J. (2005). Inhibition of heme peroxidase during phenol derivatives oxidation. Possible molecular cloaking of the active center. *Int. J. Mol. Sci.*, *6*(9-10), 245–256. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34248228747&partnerID=40&md5=c81ff9b13b24b4be65949abf75bf9d5d>
- ZIMMERMANN, T. (1982). Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of ...* Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1982.tb07040.x/full>
- Zimmermann, T., Gasser, F., Kulla, H. G., & Leisinger, T. (1984). Comparison of two bacterial azoreductases acquired during adaptation to growth on azo dyes. *Archives of Microbiology*, *138*(1), 37–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6742955>
- Zucca, P., Rescigno, A., Rinaldi, A. C., & Sanjust, E. (2014). Biomimetic metalloporphines and metalloporphyrins as potential tools for delignification: Molecular mechanisms and application perspectives. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *388-389*, 2–34. doi:10.1016/j.molcata.2013.09.010
- Zucca, P., Vinci, C., Sollai, F., Rescigno, A., & Sanjust, E. (2008). Degradation of Alizarin Red S under mild experimental conditions by immobilized 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphine-Mn(III) as a biomimetic peroxidase-like catalyst. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, *288*(1-2), 97–102. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-44449151995&partnerID=40&md5=78940c21b3a42846bba6210b267b22d4>

ANEXO A

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES TAMPÓN

Solución Buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.1 M

Para 250 ml de solución:

Se pesaron 3.4 g de KH_2PO_4 , los cuales se disolvieron en aproximadamente 150 ml de H_2O destilada con agitación magnética. El pH se ajustó al valor deseado (entre 7 y 8 según el caso) con solución de NaOH 1 M. Finalmente, se completó el volumen a 250 ml con agua destilada en matraz aforado.

Solución Buffer Acetato 0.1 M

Para 250 ml de solución:

Se disolvieron 1.5 g de ácido acético en aproximadamente 150 ml de H_2O destilada con agitación magnética. El pH se ajustó al valor deseado (5) con solución de NaOH 1 M. Finalmente, se completó el volumen a 250 ml con agua destilada en matraz aforado.

Solución Buffer Tris 0.1 M

Para 250 ml de solución:

Se disolvieron 3.03 g de base Tris en aproximadamente 150 ml de H_2O destilada con agitación magnética. El pH se ajustó al valor deseado (entre 9 y 10) con solución de HCl 1 M. Finalmente, se completó el volumen a 250 ml con agua destilada en matraz aforado.

Solución Buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0.1 M

Para 500 ml de solución:

Se preparan dos soluciones, A y B de la siguiente manera:

Solución A, NaHCO_3 1M: Se pesaron 0.84 g de carbonato de sodio y se disolvieron en aproximadamente 8 ml de H_2O destilada con agitación magnética. Se llevaron a volumen final de 10 ml en matraz aforado.

Solución B, Na_2CO_3 1M: Se pesaron 2.65 g de carbonato ácido de sodio y se disolvieron en aproximadamente 20 ml de H_2O destilada con agitación magnética. Se llevaron a volumen final de 25 ml en matraz aforado.

Finalmente, se añadieron 3.55 ml de solución A y 15.4 ml de solución B a un volumen aproximado de 400 ml de H₂O destilada, se ajustó el pH con solución de NaOH 1 M/HCl 1 M según corresponda, hasta el valor deseado (entre 10 y 11) y se completó el volumen a 250 ml con agua destilada en matraz aforado.

ANEXO B

MODELADO MOLECULAR EMPLEANDO MM2 Y PM6

Metodología

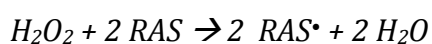
Los cálculos fueron desarrollados con un método de mecánica molecular, MM2 (Molecular Mechanics Allinger program version 2) incluido en Chem 3D Pro 5.0 de Cambridge Soft 1999, y con un método semiempírico que considera la configuración electrónica, PM6 (Parameterized Model 6), incluido en el software MOPAC.

El modelo de HRP se basa en la estructura PDB 1H5A, desde AP (Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szoke., A. Henriksen, 2002). Se incluyen todos los principales residuos aminoacídicos participantes en el mecanismo catalítico y el sitio de unión al sustrato aromático (Reihmann & Ritter, 2006; Veitch, 2004):

- Enlace a hierro en la proteína: His170, Asp247.
- Dos átomos de Ca⁺², uno distal y otro proximal, modelados como átomos ficticios.
- Donores de O distales: Asp43, Asp50, Ser52, Asp43, Val46, Gly48.
- Donores de O proximales: Th171, Asp222, Thr225, Asp230, Ile228.
- Residuos clave para la función catalítica: His42, Arg38, Phe41, Asn70, Pro139.
- Sitio de unión del sustrato aromático: Phe68, Gly69, Pro139, Ala140, Phe142, Phe179.

La vía mecanicista del HRP ha sido objeto de innumerables estudios experimentales y teóricos. El mecanismo general simplificado de interacción con H₂O₂ y sustrato fenólico se presenta en tres pasos. (1) La generación de una molécula de agua y E_I por reacción de HRP con H₂O₂; (2) la interacción de E_I con un sustrato aromático (PhOH) con la consecuente generación de E_{II} y un radical PhO[•]; y (3) la regeneración del estado nativo de la enzima por la interacción de E_{II} con otra molécula de PhOH y la generación de un segundo radical PhO[•] y H₂O. Detalles del mecanismo se pueden encontrar en el libro Dunford y otras obras (H B Dunford, 1999; Reihmann & Ritter, 2006; Veitch, 2004).

Se propone que la reacción global de peróxido de hidrógeno y Rojo de Alizarina S (RAS) es:



La etapa de formación del E_I en HRP se ha estudiado teóricamente con diferentes enfoques por varios autores. Un mecanismo comúnmente aceptado para peroxidasas es el mecanismo Poulos-Kraut (Poulos, 1980) que implica la catálisis ácido-base, a través del par de aminoácidos His-Arg del lado distal, lo que resulta en una escisión heterolítica del enlace O–O de peróxido de hidrógeno. En un artículo reciente, Derat et al. (Derat, Cohen, Shaik, Altun, & Thiel, 2005) utilizaron cálculos QM/Mecánica molecular (MM) para describir la estructura y la espectroscopia de las especies activas E_I de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Una de las conclusiones del estudio es que los restos distales, His42 y Arg38 son esenciales y deben ser incluidos en el subsistema de Mecánica Cuántica (MC) para reproducir las características espectroscópicas estructurales y Mössbauer para esta especie. Un punto clave fue que para los parámetros Mössbauer a reproducirse, debe incluirse una molécula de agua cristalina (W427) y la His42– H^+ doblemente protonada a la red de enlaces de hidrógeno del grupo oxo de E_I (Berglund et al., 2002; Schünemann & Winkler, 2000). En un manuscrito posterior Derat y colaboradores (Derat & Shaik, 2006) estudiaron a través de QM/MM la activación del enlace O–O en la enzima HRP, en pH neutro a básico. Se analizaron dos mecanismos diferentes como alternativas para la formación de E_I . Uno de ellos implica la formación de un intermediario férrico–peróxido de hidrógeno y el otro desde un intermediario hidroperóxido-férrico (PorFe-OOH) conocido como el Compuesto 0. El complejo peróxido de hidrógeno-férrico puede someterse a un cambio de 1,2-protón y escisión heterolítica para formar E_I . Este mecanismo ha sido descartado debido a su alta barrera energética. Un mecanismo de baja energía puede ser iniciado por la desprotonación de peróxido de hidrógeno y la posterior heterólisis del enlace O–O de la especie conocida como Compuesto 0. His42- H^+ retransmite el protón al oxígeno distal del Compuesto 0 y conduce a la escisión heterolítica simultánea del enlace O–O, resultando en la formación de E_I y agua, identificada como W427. La carga positiva de Arg38 facilita la heterólisis del enlace O–O.

Una de las controversias relacionadas a la formación de E_I y su interacción con H_2O_2 es lo que sucede con el agua formada. Las preguntas que nosotros y otros autores han puesto en cuestión son:

1- ¿Esta molécula de agua permanecerá coordinado a la Fe=O de E_I o se coordina con His42-Arg38?

2- ¿Cuál es el papel de esta molécula de agua, si se coordinan en las cercanías del enlace Fe=O, en la coordinación del sustrato aromático fenólico y la abstracción de hidrógeno posterior de ella?

3- ¿Cuál es el papel de esta molécula de agua en la formación de E_{II} en el caso de HRP? La polémica lleva a Vidossich y colaboradores (Vidossich et al., 2010) a proponer dos mecanismos diferentes para la formación de E_I a través del Compuesto 0:

1- El mecanismo "seco", sin agua coordinada a cualquiera de los residuos de aminoácidos cercanos a Fe, o al enlace Fe=O, o al H₂O₂.

2- El mecanismo "húmedo", con agua coordinada a Fe=O, a His42 y H₂O₂.

Los autores concluyeron que en la formación de Compuesto 0 (PorFe-OOH), HRP sigue el mecanismo de "húmedo" y la desprotonación del peróxido de oxígeno distal por His42 con la rotura concomitante del enlace O–O es el paso limitante de la velocidad del proceso. Por otra parte, hay una estrecha interacción entre moléculas de agua y peróxido, tanto en el Fe(III)-H₂O₂ y Compuesto 0.

Un estudio reciente con marcadores isotópicos mostró que el ciclo de HRP, a partir de peróxido de hidrógeno no marcado isotópicamente y agua marcada isotópicamente da como resultado el enriquecimiento isotópico del peróxido de hidrógeno. Este hallazgo es difícil de explicar y tal vez la formación de E_I no está involucrada en el enriquecimiento isotópico (Kulys & Ziemys, 2001; Vidossich et al., 2010). Con estos antecedentes se seleccionó un modelo de HRP-E_I con una molécula de agua coordinada al O de Fe=O para realizar nuestros cálculos MM2-PM6 de la energía de adsorción de dos sustratos diferentes: (a) una segunda molécula de peróxido de hidrógeno y, (b) la molécula de Rojo de Alizarina S.

Todos los residuos clave involucrados en la función catalítica y el sitio de unión del sustrato aromático se consideraron en el caso de HRP. Fueron utilizados dos modelos de la enzima: el Modelo Ampliado (LM) y el Modelo Reducido (RM). La estructura completa de los sitios proximales y distales fue incluida para el cálculo MM2, al igual que todos los residuos clave para la actividad catalítica. Para los cálculos PM6 (MOPAC 2009) se mantuvieron sólo Arg38, His42, His170 y los residuos clave del sitio de unión al sustrato aromático. Los resultados de los cálculos MM2 para la LM y RM están incluidos, pero que sólo se utilizan en forma comparativa con los resultados semiempíricos.

En el caso de hematin, se incluyeron seis moléculas de agua alrededor del enlace Fe=O. Una de estas moléculas de agua se sustituye por el H₂O₂ o Rojo de Alizarina S. En el caso de Rojo de Alizarina S se analizaron dos orientaciones diferentes: a través del grupo hidroxilo llamado 1 y a través del grupo hidroxilo llamado 2 (Figura 1,a). La Figura 1,b muestra los diferentes modelos utilizados en el MM2 y los cálculos PM6 para hematin y para HRP y el tamaño relativo de los sustratos y los modelos de catalizador.

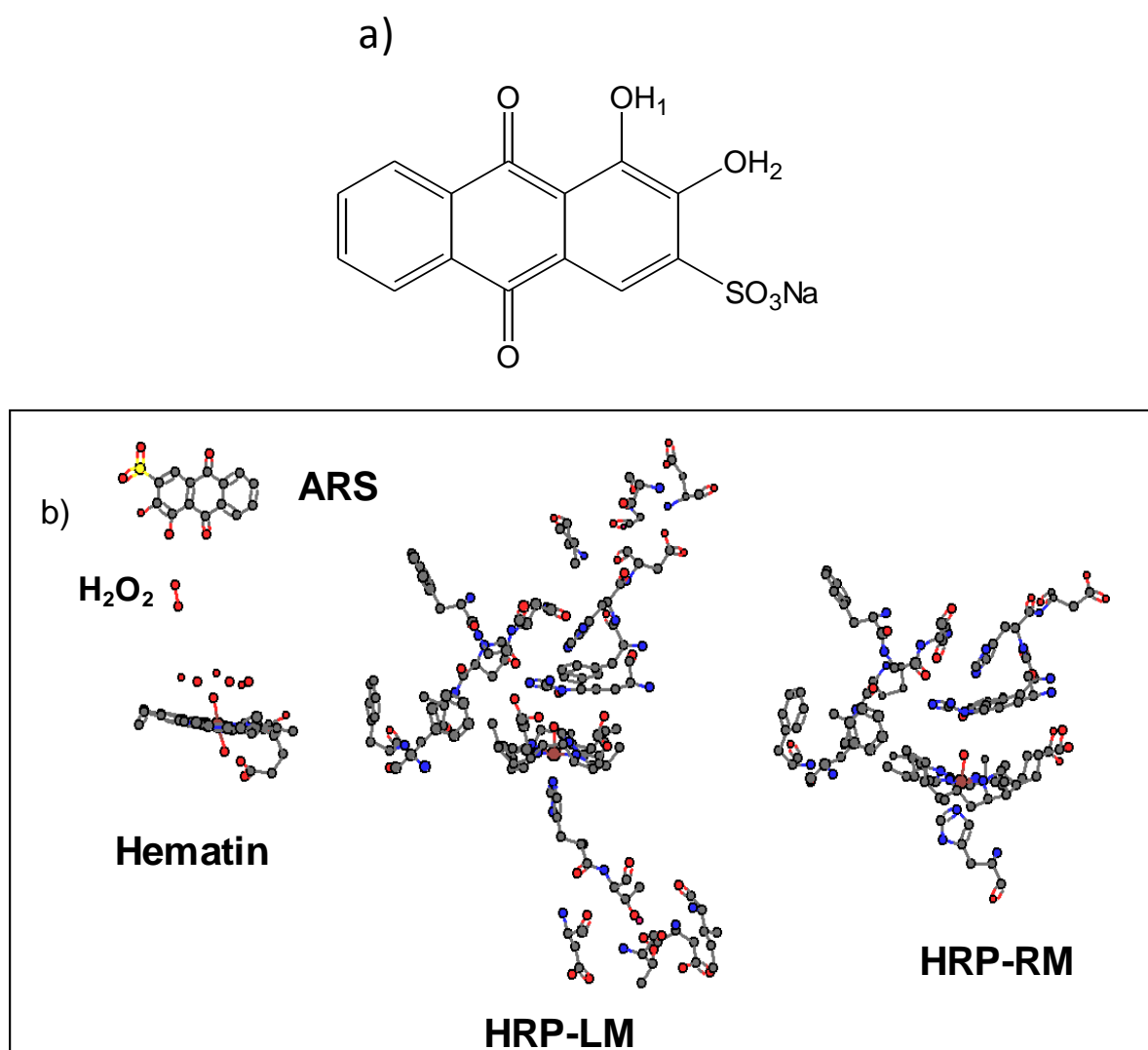
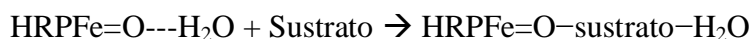
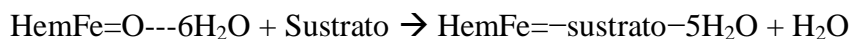


Figura 1. a) Estructura de Rojo de Alizarina S, notar denominación de los –OH (1 y 2). b) Modelos empleados para cálculos MM2 y PM6, los átomos de hidrógeno no se muestran en las figuras. LM: Modelo Ampliado, *en inglés: Large Model*. RM: Modelo Reducido, *en inglés: Reduced Model*.

El MOPAC 2009 fue seleccionado como el software para realizar el cálculo PM6 (James J. P. Stewart, 2009; Stewart, 2007). Los parámetros de Fe están incluidos en el software. Los resultados se obtienen en el modo UHF (sin restricciones Hartree Fock), que permite la presencia de electrones no apareados.

En primer lugar, se realizó un cálculo MM2 para obtener un mínimo de energía estérica usando Chem 3D 5.0 Ultra de Cambridge Soft, para el LM y para el RM. Posteriormente, un cálculo de punto único se realizó utilizando la metodología PM6 en el mínimo obtenido para el RM por el MM2. Los resultados MM2 se emplearon para mostrar la tendencia, mientras que el software PM6 proporciona el ΔH_f para la reacción de adsorción como una diferencia entre los ΔH_f del estado final e inicial. Los resultados del modelo reducido están relacionados con las mismas estructuras cuyo ΔH_f se obtuvo utilizando PM6.

Las reacciones de adsorción de sustrato generales consideradas en el modelado MM2-PM6 para hematin y HRP son:



El sustrato 1 es H_2O_2 y el sustrato 2 es Rojo de Alizarina S. Los resultados se presentan en el Capítulo 4.

Referencias

- Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., & Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, *417*(6887), 463–468. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037161809&partnerID=40&md5=5881f830015d3c1161cab6549a5e6f35>
- Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szoke., A. Henriksen, J. H. (2002). PDB ID:1H5A: G. I. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1h5a>.
- Derat, E., Cohen, S., Shaik, S., Altun, A., & Thiel, W. (2005). Principal active species of horseradish peroxidase, compound I: A hybrid quantum mechanical/molecular mechanical study. *J. Am. Chem. Soc.*, *127*(39), 13611–13621. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-25844512706&partnerID=40&md5=147ae8e6f0426bd959a2f5963ed890bc>
- Derat, E., & Shaik, S. (2006). The Poulos-Kraut mechanism of Compound I formation in horseradish peroxidase: A QM/MM Study. *J. Phys. Chem. B*, *110*(21), 10526–10533. Retrieved from

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33745461413&partnerID=40&md5=c30331db2fbdeac43396ad23d4d88a0e>

Dunford, H. B. (1999). *Heme Peroxidases*. VCH, USA: John Wiley.

James J. P. Stewart, S. (2009). *MOPAC Computational Chemistry*. Colorado Springs, USA.

Kulys, J., & Ziemys, A. (2001). A role of proton transfer in peroxidase-catalyzed process elucidated by substrates docking calculations. *BMC Struct. Biol. [electron. Res.]*, 1(1), 3. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0642336980&partnerID=40&md5=a00801c0c65815627244b1948e011639>

Poulos, J. J. K. T. L. (1980). No Title. *Biol. Chem.*, 255, 8199–8205.

Reihmann, M., & Ritter, H. (2006). No Title. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33947539544&partnerID=40&md5=d8ccbc80b8fc322de9b5813c585bba2e>

Schünemann, V., & Winkler, H. (2000). Structure and dynamics of biomolecules studied by Mossbauer spectroscopy. *Rep. Prog. Phys.*, 63(3), 263–353. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033910009&partnerID=40&md5=fd0e0546ee4bced2fffa243a44aff69d>

Stewart, J. J. P. (2007). No Title. *J. Mol. Mod.*, 13, 1173–1213.

Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0742324902&partnerID=40&md5=21c74101cfa25e108909b0617c6fc31a>

Vidossich, P., Fiorin, G., Alfonso-Prieto, M., Derat, E., Shaik, S., & Rovira, C. (2010). On the role of water in peroxidase catalysis: A theoretical investigation of HRP compound i formation. *J. Phys. Chem. B*, 114(15), 5161–5169. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77951112324&partnerID=40&md5=1d4337f92e34f8a9747e1f5b5e9d2dc3>

ANEXO C

DETERMINACIÓN DE GRUPOS AMINO SUPERFICIALES

Fundamento del método

Un tratamiento del quitosano con una solución ácida provoca la protonación de los grupos $-\text{NH}_2$ superficiales, lo que da lugar a la formación de $-\text{NH}_3^+$ capaces de actuar como sitios específicos de adsorción de colorantes aniónicos. La solución ácida debe contener una elevada concentración de colorante aniónico para evitar la disolución de las hojuelas de quitosano (Maghami & Roberts, 1988).

Metodología (Bartkowiak Roberts, G. A. F., 2007)

1. Se prepara una solución de Naranja II 5mM en ácido acético 0.1 M. El coeficiente de extinción de Naranja II en solución de ácido acético 0.1 M es $\epsilon=22500 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.
2. Se pesa aproximadamente 0.1 g de muestra de quitosano en un erlenmeyer de 250 ml.
3. Se añaden 200 ml de solución ácida de Naranja II a la muestra, y se emplean 100 ml de la misma solución como un ensayo de control (sin quitosano).
4. Se colocan los erlenmeyers en un baño termostático a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, una vez que las soluciones alcanzaron la temperatura del medio, se cierran los erlenmeyers y se mantienen en el baño termostático durante 16 hs.
5. Luego de completado este período, se filtran las soluciones en caliente.
6. Se determinan los valores de absorbancia a 484 nm de las muestras diluídas comúnmente en un factor de 100, empleando ácido acético 0.1 M como referencia.
7. El grado de N-acetilación se calcula empleando la siguiente ecuación:

$$EW = (w \times 22500) / (\Delta A \times f \times v)$$

Donde:

EW: equivalente en peso de grupos $-\text{NH}_2$;

w: peso seco del quitosano, en gramos;

ΔA : diferencia entre los valores de absorbancia del control y de la solución de la muestra, mediadas con igual dilución a 484 nm;

f: factor de dilución (debe ser el mismo para el blanco y la muestra);

v: volumen de la solución de Naranja II empleada en la muestra, en litros (0.2 l).

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = [(EW - 161) \times 100] / (EW + 42)$$

Referencias

Bartkowiak Roberts, G. A. F., A W. 2007. "Investigation of Sorbates for the Determination of the Fa Values of Chitin and Chitosan by an Adsorption Technique." *Polish Chitin Society, Monograph XII*.

Maghami, Ghobad G., and George A. F. Roberts. 1988. "Studies on the Adsorption of Anionic Dyes on Chitosan." *Die Makromolekulare Chemie* 189(10): 2239-43.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/macp.1988.021891003/abstract> (April 22, 2015).