



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Eficiencia de la tecnología Fenton en la
oxidación de estructuras orgánicas simples y
complejas. Evaluación comparativa en azul de
metileno y *E. coli* K12**

Autor:

Frontela Álvarez, José Luis

García Encina, Pedro A.

Universidad de Concepción

Valladolid, Junio 2019.

TFG REALIZADO EN PROGRAMA DE INTERCAMBIO

TÍTULO: Eficiencia de la tecnología Fenton en la oxidación de estructuras orgánicas simples y complejas. Evaluación comparativa en azul de metileno y *E. coli* K12

ALUMNO: José Luis Frontela Álvarez

FECHA: 19 de Junio del 2019

CENTRO: Centro EULA-Chile, Facultad de Ciencias Ambientales (Universidad de Concepción)

TUTOR: Dra. Gladys Vidal Sáez

NOMENCLATURA

PTAS	Planta de tratamiento de aguas servidas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
UV	Ultravioleta
US	Ultrasonido
THM	Trihalometanos
HAA	Ácidos acéticos halogenados
POA	Procesos de oxidación avanzada
uLog	Unidad logarítmica
AM	Azul de metileno
k	Constante de velocidad
ANOVA	Análisis de Varianza
ODS	Objetivos para el desarrollo sostenible
LB	Luria Bertani
UFC	Unidad formadora de colonias
NMP	Número mas probable

ÍNDICE GENERAL

NOMENCLATURA	I
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problemática y Situación de las Aguas Servidas	1
1.1.1. El Cambio Climático	1
1.1.2. Tratamiento de las aguas Servidas	2
1.2. Definición y caracterización de las aguas servidas	4
1.2.1. Definición de las aguas servidas	4
1.2.2. Caracterización de las aguas servidas	5
1.2.3. Definición y tipos de patógenos.....	6
1.2.4. Definición y tipos de contaminantes químicos orgánicos.....	9
1.3. Formas de eliminación de microorganismos patógenos y contaminantes orgánicos	9
1.3.1. Agentes Físicos	10
1.3.2. Agentes Químicos	11
Procesos de oxidación avanzada (POA).....	12
1.4. Estudios a nivel de laboratorio	19
1.4.1. Modelo de microorganismo (bacteria) patógeno.....	19
1.4.2. Modelo de contaminante químico orgánico	20
1.5. Optimización de parámetros en la reacción de Fenton	22
1.6. Objetivos de Desarrollo Sostenible	23
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVOS	24
3.1. General	24
3.2. Específicos.....	24

4. METODOLOGÍA	25
4.1. Reactivos	25
4.2. Equipos	25
4.3. Reactor a escala de laboratorio	28
4.4. Condiciones de operación	28
4.5. Procedimiento experimental con <i>E. coli</i> K12	29
4.6. Estrategia de optimización	30
4.7. Comparación entre la oxidación de azul de metileno y la inactivación de <i>E. coli</i> K12	32
4.8. Análisis estadístico	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1. Optimización de la eficiencia de la decoloración de Azul de Metileno.....	33
5.1.1. Análisis de varianza y coeficientes de regresión	33
5.1.2. Efecto de las 3 variables en la eficiencia de decoloración de azul de metileno y análisis de superficie de respuesta.....	36
5.1.3. Condiciones óptimas y modelo de verificación	41
5.2. Optimización de la constante de velocidad de reacción de azul de metileno	43
5.2.1. Análisis de varianza y coeficientes de regresión	44
5.2.2. Efectos de las 3 variables en la constante de velocidad de reacción y análisis de superficie de respuesta	47
5.2.3. Condiciones óptimas y modelo de verificación	53
5.3. Optimización de la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12	55
5.3.1. Análisis de varianza y coeficientes de regresión	56
5.3.2. Efectos de las 3 variables en la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12 y análisis de superficie de respuesta.....	58
5.3.3. Condiciones óptimas y modelo de verificación	64
5.4. Comparación de las condiciones óptimas a través de la tecnología Fenton.....	66
6. CONCLUSIONES	69
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8. ANEXOS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de un tratamiento de aguas servidas.....	4
Figura 2. Objetivos de Desarrollo Sostenible.....	23
Figura 3. Estructura del Azul de Metileno.....	25
Figura 4. Autoclave de vapor SHP Steriltechnik LABOKLAV (25 MV).....	25
Figura 5. Thermoshake Gerhardt (THO500).....	26
Figura 6. Centrífuga SIGMA (2-16P).....	26
Figura 7. Incubadora aeróbica Heraeus (B6).....	27
Figura 8. Espectrofotómetro del ultravioleta visible Shimadzu (UV-1800).....	27
Figura 9. Multi-paramétrico HANNA (HI 255).....	28
Figura 10. Inoculación de la cepa modelo <i>E. coli</i> K12 al medio nutritivo LB Miller.....	29
Figura 11. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para la concentración de $[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de decoloración de AM para: a) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 1:1$; b) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 2:1$; y c) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 3:1$	38
Figura 12. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de decoloración de AM para: a) $[Fe^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; b) $[Fe^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; y c) $[Fe^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L.....	39
Figura 13. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y la concentración de $[Fe^{2+}]$ en la eficiencia de decoloración de AM para: a) pH = 3; b) pH = 4; y c) pH = 5.....	40
Figura 14. Valores predichos por la ecuación cuadrática frente a los valores experimentales en la eficiencia de decoloración de AM.....	42
Figura 15. Cinética de decoloración del AM para: a) (*) $k_{app} = 1,964 \text{ min}^{-1}$ siendo $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 2:1$, $[Fe^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L, pH = 4; y b) (■) $k_{app} = 1,020 \text{ min}^{-1}$ siendo $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 1:1$, $[Fe^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L, pH = 4.....	44
Figura 16. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para la concentración de $[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la constante de velocidad de reacción de AM para: a) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 1:1$; b) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 2:1$; y c) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 3:1$	50
Figura 17. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la constante de velocidad de reacción de AM para: a) $[Fe^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; b) $[Fe^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; y c) $[Fe^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L.....	51
Figura 18. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y la concentración de $[Fe^{2+}]$ en la constante de velocidad de reacción de AM para: a) pH = 3; b) pH = 4; y c) pH = 5.....	52
Figura 19. Valores predichos por la ecuación cuadrática frente a los valores experimentales en la constante de velocidad de reacción del AM.....	54
Figura 20. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para la concentración de $[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12 para: a) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 1:1$; b) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 2:1$; y c) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 3:1$	61
Figura 21. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12 para: a) $[Fe^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; b) $[Fe^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; y c) $[Fe^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L.....	62
Figura 22. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y la concentración de $[Fe^{2+}]$ en la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12 para: a) pH = 3; b) pH = 4; y c) pH = 5.....	63
Figura 23. Valores predichos por la ecuación cuadrática frente a los valores experimentales en la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros típicos encontrados en aguas servidas.....	6
Tabla 2. Tipos de microorganismos presentes en aguas servidas.	7
Tabla 3. Enfermedades transmitidas por microorganismos patógenos.	8
Tabla 4. Potenciales redox de algunos agentes oxidantes.	13
Tabla 5. Valores de pH empleados en estudios de eliminación de contaminantes por la reacción Fenton.....	16
Tabla 6. Potenciales redox a diferentes pH de las especies oxidantes obtenidos en otros estudios.	17
Tabla 7. Ratios molares empleados en distintos estudios de oxidación de contaminantes.	19
Tabla 8. Variables independientes y sus niveles utilizados en el diseño de la superficie de respuesta para la tecnología Fenton.....	31
Tabla 9. Experimentos para el diseño de la superficie de respuesta.....	31
Tabla 10. Diseño Box-Behnken y respuesta para la optimización de la eficiencia de decoloración de AM (%).	33
Tabla 11. Resultados ANOVA para la ecuación cuadrática de la eficiencia de decoloración de AM (%) obtenida de <i>Design Expert 10</i>	34
Tabla 12. Coeficientes de regresión obtenidos del análisis estadístico para la eficiencia de decoloración de AM (%).	35
Tabla 13. Comparación de los valores obtenidos experimentalmente y los predichos teóricamente para la eficiencia de decoloración de AM (%).	42
Tabla 14. Error del punto óptimo de la decoloración de AM.	43
Tabla 15. Diseño Box-Behnken y respuesta para la optimización de la constante de velocidad de reacción de AM (min^{-1}).	43
Tabla 16. Resultados ANOVA para la ecuación cuadrática de la constante de velocidad de reacción de AM (min^{-1}) obtenida de <i>Design Expert 10</i>	45
Tabla 17. Coeficientes de regresión obtenidos del análisis estadístico para la constante de velocidad de reacción de AM (min^{-1}).	46
Tabla 18. Comparación de los valores obtenidos experimentalmente y los predichos teóricamente para la constante de velocidad de AM.	54
Tabla 19. Error del punto óptimo de la constante de velocidad de AM.	55
Tabla 20. Diseño Box-Behnken y respuesta para la optimización de la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12 (uLog).	55
Tabla 21. Resultados ANOVA para la ecuación cuadrática de la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12 (uLog) obtenida de <i>Design Expert 10</i>	56
Tabla 22. Coeficientes de regresión obtenidos del análisis estadístico para la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12 (uLog).	57
Tabla 23. Comparación de los valores obtenidos experimentalmente y los predichos teóricamente para la eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12.	65
Tabla 24. Error del punto óptimo de la inactivación de <i>E. coli</i> K12.	66

AGRADECIMIENTOS

A mi co-guía Dr. Pablo Salgado, por su gran apoyo, simpatía, paciencia, motivación, por su alegría y por su disposición en todo momento que lo he necesitado. A mi profesora guía Dra. Gladys Vidal, por sus consejos, preocupación por mí durante mi estadía y por la confianza puesta en mí para trabajar y aprender con ella y su equipo.

A todos los que componen el Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental, por su ayuda tanto en la oficina como en el laboratorio, porque he aprendido mucho de cada uno de ellos y porque me he sentido tan bien acogido desde el primer día.

A los profesores Dr. Raúl Muñoz y Dr. Pedro García del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid, por sus recomendaciones acerca de la realización de mi TFG en el Centro EULA-Chile de la Universidad de Concepción así como a la Universidad de Valladolid por el financiamiento de la Beca Erasmus Mundus.

Al Centro de Recursos Hídricos para la Agricultura y la Minería (CRHIAM), por el soporte técnico a través del proyecto CONICYT/FONDAP/15130015 para que este trabajo pudiera ser realizado.

A mi familia, por su cariño y amor incondicional, en especial a mis padres Luis Mariano y Ángela y a mi hermano Pablo, a los cuales he extrañado mucho durante mi año en Chile y les debo todo lo que soy a día de hoy.

A todos mis amigos (Máximo Exponente, La Soga, Lagos Azules, Universidad...) pero sobre todo a los que he conocido en Concepción durante mi intercambio (Family Concepción, Calma y los Chiquillos GIBA) pues para mí han sido mi familia aquí a lo largo de este año increíble.

RESUMEN

La tecnología Fenton es uno de los procesos de oxidación avanzada más empleados para el tratamiento terciario de aguas servidas, ya que tiene la capacidad de oxidar compuestos orgánicos simples, como colorantes, o compuestos orgánicos complejos, como bacterias. Debido a esta oxidación, sufren un cambio en su estructura provocando una decoloración y una inactivación, respectivamente. El objetivo que plantea este trabajo es evaluar la eficiencia de la tecnología Fenton en la oxidación de estructuras orgánicas simples, tales como AM y complejas como la *E. coli* K12. Para ello, se realizaron optimizaciones a la eficiencia de decoloración y a la constante de velocidad para el AM y a la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12. La técnica de análisis de superficie de respuesta Box-Behnken con 3 variables (ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$, concentración de Fe^{2+} y pH) fue empleada en este trabajo para obtener la combinación más eficiente de estas variables en cada caso.

Palabras Clave: Oxidación, Fenton, colorante, bacteria, eficiencia.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática y Situación de las Aguas Servidas

1.1.1. El Cambio Climático

Gore (2016) planteó 3 preguntas acerca del cambio climático que existe a día de hoy en nuestro planeta. ¿Tenemos que cambiar? Sin duda alguna, la crisis climática que se está afrontando en las últimas décadas tiene que ver en gran medida con la contaminación atmosférica que provoca nuestra civilización cada vez más industrializada.

Las cifras de emisión de contaminación son demasiado altas, y esto es debido a varias fuentes tales como la agricultura, el transporte, la población, entre otras. Pero el corazón del problema se encuentra en la dependencia de hidrocarburos usados como combustibles para la generación de energía. Toda la energía calorífica liberada está calentando la atmósfera y todo el sistema terrestre. Entre las consecuencias que está provocando la crisis climática, cabe destacar unas tormentas más fuertes y con mayor temperatura (como el temporal del Norte de Chile del año 2015), sequías más duraderas debido a la liberación de humedad del suelo terrestre, extinción de animales y plantas o el deshielo del Polo Norte provocando la elevación del nivel del mar. ¿Podemos cambiar? La dependencia de hidrocarburos ha provocado que se busque obtener energía a partir de recursos renovables, principalmente solares y eólicos. ¿Vamos a cambiar? Según Olabe *et al.* (2016) tras el Acuerdo de París del 2015, prácticamente todas las naciones del mundo acordaron trabajar para eliminar todas las emisiones de gases de efecto invernadero y se puede confirmar que las naciones están avanzando por hacer frente a la crisis climática.

Según la CEPAL y la OCDE (2016), las emisiones de gases de efecto invernadero registradas en Chile han ido aumentando desde el año 2000 debido al crecimiento

económico, en especial el sector de la energía y del transporte. Chile es vulnerable a los impactos del cambio climático. Las proyecciones de futuro son un agravamiento del riesgo de inundaciones, además de episodios de calor extremo y una tendencia a la disminución de la disponibilidad de agua. Por ello el Acuerdo de París del 2015 puede suponer un punto de inflexión para combatir con el cambio climático.

1.1.2. Tratamiento de las aguas Servidas

Es debido a esta escasez de recursos hídricos que se hace de vital necesidad el reúso del agua servida y por ende su tratamiento para que sea devuelta en las mejores condiciones.

No obstante, según Baraño (2004), el hecho de que en Chile exista una diversidad de climas, así como diferentes características de las localidades, hace que se produzcan diferencias entre las técnicas y características de tratamiento. Massoud *et al.* (2009) afirman que el tratamiento de aguas servidas puede dividirse en función de la población en zonas urbanas o concentradas y en zonas rurales o de baja población, entendiendo baja población a aquellas zonas con un número de habitantes inferior a 2500 (Carrasco, 2011). Los sistemas de tratamiento de aguas servidas centralizadas son costosos en cuanto a su construcción y la manera de operar, en especial en aquellas áreas con baja densidad de población y hogares dispersos. Los países en desarrollo carecen de financiación alguna necesaria para construir las instalaciones centralizadas así como los conocimientos técnicos necesarios para gestionarlos y operarlos. Debido a esto, se piensa en un enfoque descentralizado para el tratamiento de sus aguas servidas en el que se emplea una combinación de sistemas en el sitio y que permite una mayor flexibilidad en las gestiones haciendo uso de tecnologías sencillas así como complejas. Por lo tanto, el sistema descentralizado no es solo una solución a largo plazo para pequeñas poblaciones, sino que también es fiable y rentable.

Tras un estudio de las diferentes etapas existentes en el tratamiento de aguas servidas en Chile, Barañao (2004) hace la siguiente clasificación: en primer lugar se realiza un pretratamiento o tratamiento preliminar cuyo objetivo es eliminar aquellos elementos como sólidos gruesos, arena, aceite o grasa que puedan entorpecer las siguientes etapas del tratamiento. Para ello se hace uso de barras, rejillas, desarenadores y desengrasadores. A continuación, continuaría el tratamiento primario cuyo objetivo es eliminar materia orgánica sólida en suspensión mediante sedimentación y/o flotación. El siguiente tratamiento realizado es el secundario por el cual se elimina materia orgánica disuelta de manera biológica mediante sistemas de lodos activados y lagunas, entre otros. El tratamiento terciario tiene como objetivo la remoción de nutrientes (en especial nitrógeno y fósforo). Por último, se encuentra la desinfección (o tratamiento avanzado) que se encarga de la eliminación de organismos patógenos para el ser humano. Según Reynolds (2002), este último tratamiento es en el que más se debe centrar en los últimos años debido a que existe una gran carencia en torno a su estudio y supone un problema debido a posibles enfermedades de transmisión hídrica tales como cólera, hepatitis o gastroenteritis, entre otras.

La Figura 1 muestra un esquema resumen de los diferentes tratamientos explicados anteriormente.

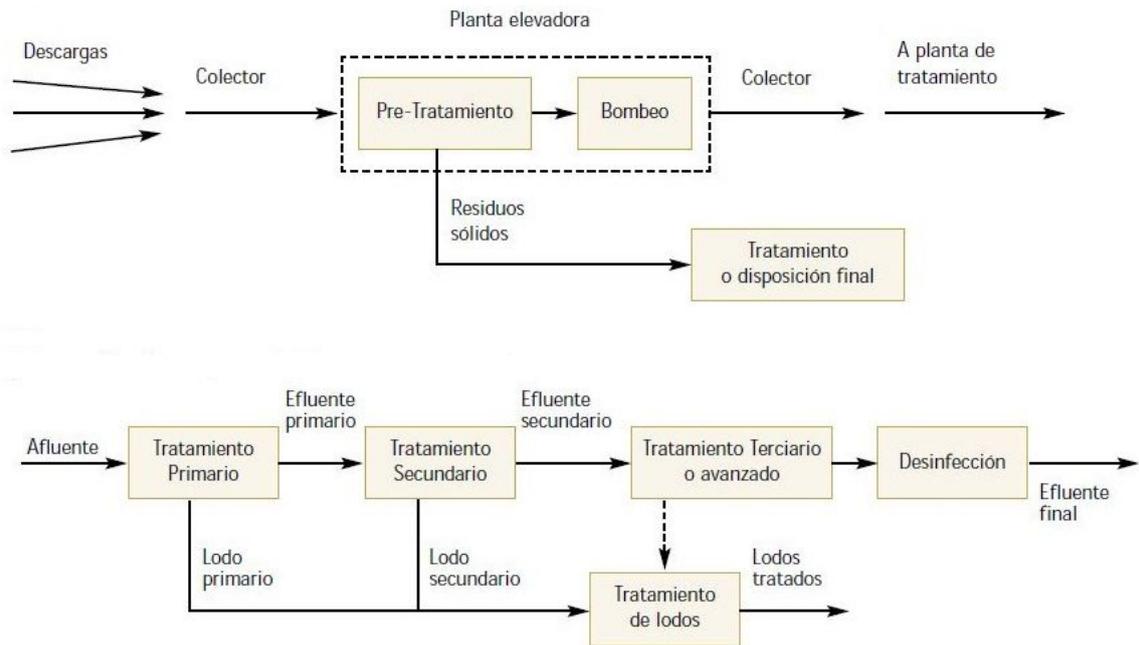


Figura 1. Etapas de un tratamiento de aguas servidas.

Fuente: Barañao, 2004.

1.2. Definición y caracterización de las aguas servidas

En el apartado anterior se expuso la necesidad de un tratamiento a las aguas servidas para su reúso debido a la escasez del recurso hídrico que es consecuencia del cambio climático presente en la actualidad. A continuación, se explica el concepto de aguas servidas así como su caracterización.

1.2.1. Definición de las aguas servidas

Según Urban Waste Water Treatment Directive 91/271/EEC, (1991) el agua servida se puede definir como una mezcla de las aguas que se producen a nivel doméstico en asentamientos y servicios residenciales originadas por el metabolismo humano o por actividades domésticas, las aguas industriales originadas en las instalaciones comerciales e industriales y no se consideren domésticas, así como las aguas de lluvia. Estas aguas servidas se recogen en la

red de alcantarillado y son enviadas a las PTAS para su tratamiento y posterior reúso.

1.2.2. Caracterización de las aguas servidas

Según Vidal *et al.* (2014) las características de las aguas servidas pueden ser físicas, químicas o biológicas y es posible, mediante esta clasificación, una cuantificación de los contaminantes presentes en ellas. Atendiendo a las características físicas, se encuentran diferentes tipos de sólidos (sedimentables, suspendidos, disueltos y totales) así como distintos factores como la temperatura, factor importante para la solubilidad de gases o las reacciones químicas y biológicas; la turbiedad y el color, debido a materia en suspensión que dificulte el traspaso de luz; y el olor debido a la liberación de gases. Por otro lado, en cuanto a las características químicas se agrupan en constituyentes inorgánicos en los que se encuentran el pH, que mide una tendencia de acidez, los nutrientes que pueden ser nitrógeno (Nitrógeno Total, Amonio, Nitrógeno Total Kjeldahl, Nitrito y Nitrato) o fósforo (Fósforo Total o Fosfatos), y los metales pesados (As, Cd, Cr, Pb, Hg, Ag, entre otros); y constituyentes orgánicos (materia orgánica) que abarcan proteínas, carbohidratos, aceites y grasas. Por último, las características biológicas hacen referencia a la presencia de microorganismos (Bacterias, protozoos, virus, helmintos, rotíferos y algas) que pueden causar enfermedades a humanos y animales.

La Tabla 1 muestra los parámetros típicos encontrados en las aguas servidas en zonas urbanas y rurales:

Tabla 1. Parámetros típicos encontrados en aguas servidas.

Parámetro	Unidades	Tipo de asentamiento	
		Urbano	Rural
DBO ₅	mg/L	110 - 800	200 - 500
DQO	mg/L	210 - 1600	200 - 1600
NT	mg/L	20 - 85	35 - 100
NH ₄ ⁺	mg/L	12 - 50	6 - 60
NO ₃ ⁻	mg/L	<1	<1
PT	mg/L	2 - 23	6 - 30
PO ₄ ³⁻	mg/L	3 - 14	6 - 25
SST	mg/L	120 - 450	100 - 500
SSV	mg/L	95 - 315	-
Coliformes Fecales	NMP/100 mL	1,0·10 ³ - 1,8·10 ⁸	1,0·10 ⁶ -1,0·10 ¹⁰

Fuente: Vidal *et al.*, 2014.

1.2.3. Definición y tipos de patógenos

Según Vargas (1998), los microorganismos (o agentes) patógenos son organismos que causan enfermedades que varían de gravedad y van desde ligeras gastroenteritis a severas, e incluso a fatales enfermedades de tipo epidémico.

La Tabla 2 refleja los diferentes tipos de microorganismos así como su correspondiente descripción.

Tabla 2. Tipos de microorganismos presentes en aguas servidas.

Microorganismos	Descripción
Bacterias	<ul style="list-style-type: none">• Organismos unicelulares• Presente en varias formas y tamaños• Principales organismos responsables de la estabilización de la materia orgánica• Algunas bacterias son patógenas, causando principalmente enfermedades intestinales
Arqueas	<ul style="list-style-type: none">• Similar a bacterias en tamaño y componentes celulares básicos• Diferente de las bacterias en su pared celular, material celular y composición del ARN• Importante en procesos anaeróbicos
Algas	<ul style="list-style-type: none">• Organismos fotosintéticos autótrofos que contienen clorofila• Importante en la producción de oxígeno en cuerpos de agua y en algunos procesos de tratamiento de aguas servidas• En lagos y embalses pueden proliferar en exceso, deteriorando la calidad del agua
Hongos	<ul style="list-style-type: none">• aeróbicos, pluricelulares, no fotosintéticos, heterotróficos• También de importancia en la descomposición de la materia orgánica• Puede crecer bajo condiciones de pH bajo
Protozoos	<ul style="list-style-type: none">• Usualmente organismos unicelulares sin pared celular• La mayoría son aeróbicos o facultativos• Se alimentan de bacterias, algas y otros microorganismos• Algunos son patógenos
Virus	<ul style="list-style-type: none">• Organismos parásitos, formados por la asociación de material genético (ADN o ARN) y una estructura proteica• Patogénicos y frecuentemente difícil de eliminar en agua o aguas servidas de tratamiento
Helmintos	<ul style="list-style-type: none">• Animales de orden superior• Los huevos de helmintos presentes en las aguas servidas pueden causar enfermedades

Fuente: von Sperling *et al.*, 2005.

La Tabla 3 muestra las diferentes enfermedades transmitidas por algunos de estos microorganismos patógenos, además de los efectos que causan en la salud humana:

Tabla 3. Enfermedades transmitidas por microorganismos patógenos.

Microorganismos	Enfermedad	Agente causal	Síntomas
Bacterias	Disentería bacilar (Shigelosis)	<i>Shigella dysenteriae</i>	Diarrea severa
	Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	Diarrea extremadamente pesada, deshidratación, alta tasa de mortalidad
	Gastroenteritis	<i>Escherichia coli enteropathogenic</i>	Diarrea
	Leptospirosis	<i>Leptospira</i>	Ictericia, fiebre
	Salmonela	<i>Salmonella</i>	Fiebre náuseas, diarrea
Protozoos	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre alta, diarrea, ulceración del intestino delgado
	Disentería amebiana	<i>Entamoeba histolytica</i>	Diarrea prolongada con sangrado, abscesos del hígado e intestino delgado
	Criptosporidiosis	<i>Cryptosporidium</i>	Diarrea
Virus	Balantidiasis	<i>Balantidium coli</i>	Diarrea, disentería
	Hepatitis infecciosa	<i>Hepatitis A virus</i>	Ictericia, fiebre
	Enfermedades respiratorias	<i>Adenovirus</i>	Enfermedades respiratorias
Helmintos	Meningitis	<i>Enterovirus</i>	Fiebre, vómitos, rigidez del cuello
	Ascariasis	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Manifestaciones pulmonares, deficiencia nutricional, obstrucción del intestino u otro órgano
	Trichuriasis	<i>Trichuris trichiura</i>	Diarrea, heces mucoide sanguinolentas, prolapso rectal

Fuente: von Sperling *et al.*, 2005.

Según Vidal *et al.* (2014) para disminuir la transmisión de estas enfermedades por vía hídrica, es necesario mejorar la calidad del agua y su disponibilidad a través de los tratamientos avanzados de desinfección.

1.2.4. Definición y tipos de contaminantes químicos orgánicos

Las aguas servidas pueden contener una gran cantidad de contaminantes inorgánicos y orgánicos. Entre los más importantes contaminantes inorgánicos destacan los metales pesados (Pb, Cu, Cd, Zn, Ni, Mn, Cr, entre otros) y algunos nutrientes (NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-}). En cuanto a los principales contaminantes químicos orgánicos, los más importantes son los colorantes, sustancias húmicas, compuestos fenólicos, combustibles, surfactantes, pesticidas y fármacos (Chowdhury *et al.*, 2016). A diferencia de los contaminantes inorgánicos que pueden ser retirados en su totalidad por los procesos de tratamientos convencionales de aguas contaminadas, muchos de los contaminantes químicos orgánicos persisten y no pueden ser retirados provocando graves problemas de salud (Salazar *et al.*, 2011).

1.3. Formas de eliminación de microorganismos patógenos y contaminantes orgánicos

Jaramillo (2010) realiza una división de los modos de desinfección de las aguas servidas en natural, por la cual se produce una muerte progresiva de las bacterias mediante la luz solar, la sedimentación o la filtración sin manipulación alguna del hombre; y artificial, en la que se hace uso de agentes físicos (calor) o químicos (halógenos, ozono, entre otros) para su inactivación o muerte. En los últimos años, se han empleado también agentes físicos o químicos para la eliminación de contaminantes orgánicos de aguas servidas provenientes mayormente de industrias textil, cosmética y farmacéutica (Basturk *et al.*, 2014).

1.3.1. Agentes Físicos

Márquez-Bravo (1998) engloba las aplicaciones de la energía solar en dos tipos de procesos: Por un lado, los procesos fototérmicos que emplean la radiación infrarroja del espectro electromagnético. Cabe destacar la ebullición, en la cual se lleva el agua hasta el punto de ebullición mediante la energía radiante; la pasteurización, mediante la cual se trabaja con la relación temperatura-tiempo; y los destiladores solares que evaporan el agua para después condensarlo. Por otro lado, los procesos fotoquímicos, que emplean la radiación UV del espectro. Wright *et al.* (1996) explican el mecanismo de desinfección UV como una dimerización del DNA, es decir, los microorganismos son inactivados por la luz UV debido al daño fotoquímico a sus ácidos nucleicos. El UV absorbido promueve formación de uniones diméricas entre nucleótidos impidiendo de esta manera que el microbio duplique su DNA y RNA, haciendo inviable su reproducción.

Ginés (2014) plantea los ultrasonidos como otra alternativa de agente físico. Los ultrasonidos se definen como ondas de presión con una frecuencia comprendida en un rango entre 20kHz (KiloHertzios) y 10 MHz (MegaHertzios). La sonicación es el proceso mediante el cual se producen ondas longitudinales que pasan a través del agua y crea alternativamente regiones de cambio de presión (compresión y expansión) en las que se produce la cavitación. Según Doosti *et al.* (2012) la cavitación es el fenómeno de formación, crecimiento y colapso de microburbujas o cavidades que ocurren en un periodo de tiempo pequeño en un líquido. Tras el colapso de las cavidades se genera gran cantidad de energía que provoca un aumento de la presión y de la temperatura.

Entre las ventajas que presentan los agentes físicos se pueden nombrar la ausencia de carácter residual o la reducción en los tiempos de proceso. No obstante presentan inconvenientes tales como bajas eficiencias de eliminación de contaminante frente a la turbidez del agua, efectos contraproducentes para la

salud, alto costo y un mantenimiento de los equipos (Romero, 2008; Trapote *et al.*, 2012; Escalante-Pozos *et al.*, 2014).

1.3.2. Agentes Químicos

Según Guimaraes *et al.* (2001) entre los agentes químicos de desinfección más empleados se pueden destacar el cloro gaseoso (Cl_2), el hipoclorito (ClO^-), las cloraminas ($\text{Cl}_2 / \text{NH}_3$), el dióxido de cloro (ClO_2), el ozono (O_3) y el permanganato de potasio (KMnO_4), entre otros. Ramírez (2005) explica que el cloro presente en el agua tratada (denominado cloro residual) puede diferenciarse en dos tipos: el cloro residual libre (ión hipoclorito) y el cloro residual combinado formado por reacción del cloro con amoníaco (Cloraminas). Guimaraes *et al.* (2001) confirman que la inactivación de una gran gama de patógenos es efectiva mediante la cloración a un costo relativamente bajo, pero existe un problema a tener en cuenta y es la formación de compuestos orgánicos clorados. Olmedo (2008) afirma que el cloro presenta una alta reactividad que repercute en la formación de estos subproductos (compuestos orgánicos clorados) que se caracterizan por tener capacidad tóxica y/o mutagénica para el medio ambiente. Tan solo se forman si precursores orgánicos presentes en el agua servida y el cloro residual libre se encuentran presentes conjuntamente durante un tiempo suficiente. Estos subproductos se dividen en dos compuestos: Por un lado, los THM's (Trihalometanos) que se forman en una mayor concentración; y los HAA (Ácidos Acéticos Halogenados), conjunto de 9 compuestos y los segundos subproductos más abundantes a través de la cloración. Estos subproductos provocan daños en funciones reproductoras (fertilidad, riesgo de aborto, entre otros), daños en el desarrollo fetal y son inductores del cáncer (en especial el de vejiga urinaria). Por ello, Ramírez (2005) propone el uso de las cloraminas como desinfección secundaria después de la cloración libre para que no se produzca la formación de estos subproductos.

Según Berdonces (2008) el tratamiento con ozono parece más adecuado que el tratamiento con cloro, no obstante, el proceso es más caro y puede producir algún tipo de sustancia con efectos secundarios indeseables. Por otro lado, según Galvis *et al.* (2005) la utilización de ozono como desinfectante primario es una alternativa para la mejora de la calidad del agua ya que minimiza los riesgos generados en la desinfección con cloro. Los precursores orgánicos en este caso no se degradan sino que sufren una oxidación por la cual se generan menos residuos orgánicos en el agua. Un hecho comprobado es que si un agua previamente tratada con cloro se trata con ozono posteriormente, provoca una mayor formación de subproductos no deseables.

Según Sarria (2005) existen nuevos sistemas de desinfección de las aguas servidas en lo que respecta a los agentes químicos. Estos son los denominados procesos de oxidación avanzada.

Procesos de oxidación avanzada (POA)

Los POA consisten en un conjunto de procesos químicos que se utilizan para desinfectar o eliminar contaminantes ambientales de los medios acuáticos mediante la generación de especies altamente reactivas (Gautam *et al.*, 2016). Entre las especies reactivas que se forman en los POA es posible encontrar radicales perhidroxilo/superoxido ($\text{HO}_2\cdot/\text{O}_2\cdot^-$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Yang *et al.*, 2019). Domènech *et al.* (2001) destacan la reactividad de los $\cdot\text{OH}$, ya que esta especie presenta propiedades adecuadas para atacar a todos los compuestos orgánicos, además de reaccionar 10^6 - 10^{12} veces más rápido que otros oxidantes (Andreozzi *et al.*, 1999). La Tabla 4 muestra los potenciales de oxidación de diferentes especies, siendo el $\cdot\text{OH}$ el segundo más oxidante después del flúor.

Tabla 4. Potenciales redox de algunos agentes oxidantes.

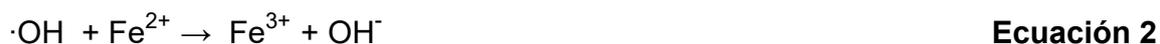
Semirreacción	E⁰ (V, 25°C)
F ₂ /F ⁻	3,03
·OH/H ₂ O	2,80
O ₂ /H ₂ O	2,42
O ₃ /O ₂	2,07
H ₂ O ₂ /H ₂ O	1,78
HO ₂ ·/H ₂ O ₂	1,70
MnO ₄ ⁻ /Mn ²⁺	1,68
ClO ₂ /Cl ⁻	1,57
ClO ⁻ /Cl ₂	1,49
Cl ₂ /Cl ⁻	1,36
Br ₂ /Br ⁻	1,09
I ₂ /I ⁻	0,54

Fuente: Domènech *et al.*, 2001.

Existen varias clasificaciones de los procesos de oxidación avanzada. Por un lado, pueden ser procesos con radiación, que a su vez pueden dividirse en dos tipos: La Fotocatálisis heterogénea, la cual emplea un material semiconductor como catalizador para que se produzcan reacciones redox en presencia de radiación; y la fotocatálisis homogénea, que emplea radiación y la reacción Fenton para la oxidación de los compuestos orgánicos simples o inactivación de microorganismos (compuestos orgánicos complejos) (Jaramillo *et al.*, 2006). Por otro lado, pueden ser procesos de oxidación sin radiación. Según Haber y Weiss (1934), la generación de ·OH se produce mediante la adición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que actúa como agente oxidante, a sales metálicas de hierro (Fe²⁺) en disolución. La reacción Fenton se representa en la Ecuación 1:



Los ·OH son formados por descomposición del H₂O₂ por acción del Fe²⁺ como catalizador. Estos radicales siguen reaccionando con el Fe²⁺ para convertirlo en Fe³⁺ (Ecuación 2), además de oxidar materia orgánica para obtener productos de reacción (Ecuación 3).



Según Bagal *et al.* (2014), el Fe^{3+} a su vez puede formar un complejo ferroso intermediario por reacción con el H_2O_2 (Ecuación 4).



Posteriormente, el complejo $\text{Fe}(\text{OOH})^{2+}$ puede descomponerse para producir Fe^{2+} y $\text{HO}_2\cdot$ en un proceso que se conoce como regeneración de Fe^{2+} o reacción “tipo Fenton” (Ecuación 5).



Se ha propuesto, además, que por reacciones paralelas entre las especies reactivas formadas en los sistemas antes descritos se puede formar $^1\text{O}_2$ (Ecuaciones 6-8) (Ivanova *et al.*, 2012).



El daño celular producido por el $\cdot\text{OH}$ tiene lugar sobre distintas macromoléculas como lípidos. Los radicales formados oxidan componentes fosfolípidos polinsaturados de su membrana además de la coenzima A reductasa que conducen a la pérdida de respiración y muerte celular (Gao *et al.*, 2012). Además, los $\cdot\text{OH}$ provocan estrés oxidativo directo a componentes de la bacteria, comenzando por el ataque a los ácidos grasos insaturados que componen la

membrana celular, considerada una estructura orgánica compleja (Abelló 2014). Según Venereo (2002), el daño puede ocurrir debido a fenómenos de mutaciones y carcinogénesis en el ADN, provocando pérdida de expresión o síntesis de proteínas por daño a un gen específico o modificaciones de las bases, entre otros.

Una de las ventajas a considerar en la reacción de Fenton es que no se necesita energía externa para descomponer el H_2O_2 en $\cdot\text{OH}$. Entre las desventajas de esta tecnología cabe destacar que pueden producirse reacciones de complejación con el hierro si se encuentran en disolución otros aniones (fosfatos, cloruros, nitratos, entre otros) o materia orgánica, disminuyendo la capacidad del Fe^{2+} de descomponer el H_2O_2 (Pignatello *et al.*, 2006).

Parámetros que afectan a la reacción Fenton

Muchos de los parámetros que pueden afectar cualquier tipo de reacción química podrían afectar a la reacción de Fenton, entre los que destacan el efecto del pH y la concentración de reactivos.

-Efecto del pH. El pH es uno de los parámetros más importantes en la reacción de Fenton. Sin embargo, es posible encontrar que el pH óptimo varía dependiendo del tipo de contaminante que se desea eliminar. La Tabla 5 refleja ejemplos de estudios en los que se han encontrado distintos valores de pH óptimo en la eliminación de contaminantes por la reacción de Fenton.

Tabla 5. Valores de pH empleados en estudios de eliminación de contaminantes por la reacción Fenton.

Valor de pH	Contaminante	Referencia
3,0	Lixiviados de relleno municipal	Mohajeri <i>et al.</i> , 2010
3,0	Colorantes	Gulkaya <i>et al.</i> , 2006
5,0	Lixiviados de relleno municipal	Kumar <i>et al.</i> , 2016
3,0-5,0	Ácido benzoico, fenol	Lee <i>et al.</i> , 2013
6,0-7,0	Reactive black 5, As(III)	
1,0-5,0	Naranja de metilo, Rodamina B	Salgado <i>et al.</i> , 2018
1,0-7,0	Reactive black 5	
3,0-5,0	Metil terbutileter	Burbano <i>et al.</i> , 2005
2,8	Naranja de metilo	Youssef <i>et al.</i> , 2016
3,5	Amido black 10B	Sun <i>et al.</i> , 2007
4,0	Disperse Red 343	Fernandes <i>et al.</i> , 2018

Una de las razones por las cuales es posible encontrar esta variedad en el pH óptimo de la reacción de Fenton puede estar asociada a la especiación del Fe^{2+} y Fe^{3+} , a los cambios en los potenciales redox de las principales especies oxidantes producidas, o a los cambios en el tipo de especie oxidante producidas

dependiendo del pH. En cuanto a la especiación de Fe^{2+} y Fe^{3+} se ha logrado establecer que aun cuando la especie $\text{Fe}(\text{OH})^+$ es la más reactiva de los acuocomplejos de Fe^{2+} , esta se forma a concentraciones altas entre pH 8,0 – 12,0, por lo que la alta reactividad de la reacción de Fenton a pH ácidos dependería fuertemente de la especiación del Fe^{3+} (Salgado *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha podido determinar que las principales especies oxidantes producidas en los sistemas Fenton ($\cdot\text{OH}$ y $\text{HO}_2\cdot$) se ven altamente afectadas por los cambios de pH.

Estos cambios en los potenciales redox en las especies oxidantes dependiendo del pH afectarían directamente en la capacidad de la reacción de Fenton para oxidar algún contaminante. La Tabla 6 muestra cómo se ve afectado el potencial redox de $\cdot\text{OH}$ y $\text{HO}_2\cdot$ por el pH del medio.

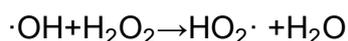
Tabla 6. Potenciales redox a diferentes pH de las especies oxidantes obtenidos en otros estudios.

	$E^\circ_{\text{pH} = 0}$ (V/SHE)	$E^\circ_{\text{pH} = 7,0}$ (V/SHE)	$E^\circ_{\text{pH} = 14,0}$ (V/SHE)	Referencia
$\cdot\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$	2,59	2,18	1,77	Koppenol <i>et al.</i> , 1984
$\text{HO}_2\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$	-	-	-	
$\cdot\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$	2,72	2,31	1,77	Sawyer, 1988
$\text{HO}_2\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$	1,44	0,89	0,20	
$\cdot\text{OH}/\text{OH}^-$	2,38	-	1,59	Nosaka <i>et al.</i> , 2013
$\text{HO}_2\cdot/\text{HO}_2^-$	1,44	-	0,18	

Por último, distintos autores han encontrado que dependiendo del pH de la reacción de Fenton se pueden producir distintas especies oxidantes. Lee *et al.* (2013), Bataineh *et al.* (2012) y Salgado *et al.* (2018) sostienen que a pH ácido la principal especie oxidante producida son los $\cdot\text{OH}$, mientras que a pH neutro y básico se formarían especies de alta valencia de hierro conocidos como iones ferrilo ($\text{Fe}(\text{IV})$). Con respecto a otras especies oxidantes como $\text{HO}_2\cdot$ y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), Salgado (2017) detectó la formación de $^1\text{O}_2$ en la reacción de Fenton a pH ácido, pero no encontró presencia de $\text{HO}_2\cdot$.

-Efecto de la concentración de Fe²⁺. Sin la presencia de Fe²⁺ en el sistema Fenton no hay formación de ·OH, por lo que la presencia de Fe²⁺ es esencial. En términos generales se puede estimar que a mayor concentración de Fe²⁺ es mayor la formación de ·OH, y por ende es mayor el poder oxidante de la reacción de Fenton. Sin embargo, se ha estudiado que a concentraciones demasiado altas de Fe²⁺ se pueden generar principalmente dos fenómenos: i) en concentraciones altas de Fe²⁺ y con concentraciones adecuadas de H₂O₂ se podría favorecer la reacción tipo Fenton, formando más HO₂· que ·OH, provocando que disminuya la capacidad oxidante de la reacción de Fenton (Mansoorian *et al.*, 2014) ; y ii) una alta concentración de Fe²⁺ favorecería a que estos iones reaccionen con los ·OH, disminuyendo de igual forma la capacidad oxidante de la reacción de Fenton (Mansoorian *et al.*, 2014) de acuerdo a la Ecuación 2.

-Efecto del ratio de concentraciones de H₂O₂/Fe²⁺. La concentración de H₂O₂ al igual que la de Fe²⁺, también es esencial en los sistemas Fenton (Mohajeri *et al.*, 2010). En general, un aumento en la concentración de H₂O₂ provoca un aumento en la velocidad de la reacción de Fenton (Mansoorian *et al.*, 2014), pero un exceso en la concentración de H₂O₂ podría actuar como scavenger de ·OH (Mansoorian *et al.*, 2014; Mohajeri *et al.*, 2010) según la Ecuación 9.



Ecuación 9

Por lo tanto, para minimizar que el Fe²⁺ y H₂O₂ actúen como scavengers, pero maximizar la producción de especies oxidantes a partir de estos reactivos, es muy importante conocer el ratio óptimo entre la concentración de H₂O₂ y la concentración de Fe²⁺, conocido como ratio molar (H₂O₂/Fe²⁺) (Gulkaya *et al.*, 2006). La Tabla 7 presenta algunos ejemplos de distintos ratios molares dependiendo del compuesto a oxidar y del pH del medio.

Tabla 7. Ratios molares empleados en distintos estudios de oxidación de contaminantes.

Ratio [H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	[Fe ²⁺] (mol/L)	pH	Compuesto	Referencia
1000	1,5	3,0	Aguas residuales	Maamir <i>et al.</i> , 2017
3	10	3,0	Lixiviados de relleno municipal	Mohajeri <i>et al.</i> , 2010
4	20	5,0	Lixiviados de relleno municipal	Kumar <i>et al.</i> , 2016
35	0,06	3,0	Violeta de metilo 6B	Bouasla <i>et al.</i> , 2010
2	2,81	3,0	Lixiviados de relleno municipal	Roudi <i>et al.</i> , 2018
4	2,0	3,0	Azul de metileno	Melgoza <i>et al.</i> , 2009

Por lo tanto, de la Tabla 7 se puede inferir que el ratio molar [H₂O₂]/[Fe²⁺] es un factor importante, pero que también su valor óptimo puede variar dependiendo de las condiciones de reacción.

1.4. Estudios a nivel de laboratorio

Previo a la aplicación de la reacción de Fenton o de cualquier otro POA a aguas contaminadas, es necesario realizar estudios a nivel de laboratorio utilizando modelos que permitan evaluar por separado el efecto de la reacción de Fenton, por ejemplo, sobre algunos compuestos orgánicos complejos (tales como bacterias) o sobre compuestos orgánicos simples (tales como colorantes).

1.4.1. Modelo de compuesto orgánico complejo

Tal como se comentó anteriormente, las bacterias pueden ser consideradas un compuesto orgánico complejo presente en las aguas servidas. Según Figueroa (2011), debido a la alta peligrosidad de los microorganismos patógenos presentes

en las aguas servidas, con frecuencia se utilizan cepas de microorganismos similares a los encontrados en las aguas servidas, pero que no poseen sus características patogénicas. *E. coli* se emplea con frecuencia como organismo modelo en estudios de microbiología (Keane *et al.*, 2014; Marugán *et al.*, 2010). Celeste *et al.* (2003) afirman que las cepas modelo de *E. coli* K12 son muy empleadas en la investigación biotecnológica, por lo que comúnmente son utilizadas en institutos y centros dedicados a la investigación molecular. Las cepas cultivadas, en especial la K12 con la que se trabajó en la presente tesis, se encuentran bien adaptadas al entorno del laboratorio, presentan una facilidad de cultivo y una rápida duplicación.

Existen variadas formas de evaluar la eliminación de bacterias por la reacción de Fenton. Por ejemplo, se puede medir la concentración bacteriana a través del tiempo por un método cinético, o simplemente medir al final de la reacción después de un tiempo determinado la variación en la concentración de bacterias ya sea determinando un porcentaje de eliminación o la reducción de unidades logarítmicas (uLog).

1.4.2. Modelo de compuesto orgánico simple

Es conocido que aun cuando existen muchos compuestos químicos orgánicos que son eliminados por los sistemas de tratamientos de aguas servidas convencionales, la eliminación de colorantes por estos sistemas es muy eficiente (Ferraz *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2010; Vacchi *et al.*, 2013; Vacchi *et al.*, 2016). A nivel mundial se estima que cerca de 10.000 tipos de colorantes son utilizados para distintos fines, traducido en una producción de aproximadamente $7 \cdot 10^5$ toneladas de estos compuestos (Vikrant *et al.*, 2018). Además, estamentos como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) ha declarado que es de vital importancia dirigir esfuerzos a la disminución en el consumo de colorantes, o a la eliminación de estos que ya están presentes en las aguas, debido a su alta toxicidad y peligrosidad (Vikrant *et al.*, 2018).

Entre la gran variedad de colorantes existentes, se ha considerado al azul de metileno (AM) como un modelo para evaluar la capacidad de los POA de eliminar colorantes, debido a que posee una alta solubilidad en agua y por ser muy fácil de medir por espectrofotometría UV-visible (Keane *et al.*, 2014; Marugán *et al.*, 2010). En general, la oxidación de colorantes por POA puede estudiarse midiendo el cambio en su concentración en función del tiempo de reacción determinando su velocidad o constante de velocidad (k) utilizando conceptos de cinética química (Weng *et al.*, 2015), o determinando la cantidad de colorante total eliminado en una cierta cantidad de tiempo determinando el porcentaje de degradación (Cohen *et al.*, 2019).

En condiciones determinadas las sustancias pueden transformarse en otras para formar diferentes especies químicas. Según Levenspiel (1974), las reacciones químicas han de estudiarse teniendo en cuenta el modo y mecanismo, los cambios físicos y energéticos así como la velocidad con que se forman o eliminan los productos. El efecto de la reacción de Fenton sobre un colorante, como cualquier otra reacción, se puede representar por la Ecuación 10.

$$\frac{dC}{dt} = -k \cdot C^n \quad \text{Ecuación 10}$$

Siendo C la concentración del colorante, n el orden de reacción, k la constante de velocidad de la reacción y t el tiempo. Al integrar la ecuación anterior para una reacción de primer orden, se obtiene la Ecuación 11.

$$C = C_0 \cdot \exp(-k \cdot t) \quad \text{Ecuación 11}$$

Siendo C_0 la concentración inicial de colorante.

La cinética de la reacción Fenton para la oxidación de colorantes es posible seguirla mediante la técnica de espectrofotometría UV-Vis midiendo la absorbancia A en el tiempo y a ciertos valores de longitud de onda λ . La tasa de

decoloración (% de oxidación) se determina mediante la Ecuación 12 (Cohen *et al.*, 2019).

$$\%_{\text{decoloración}} = 100 \cdot A/A_0$$

Ecuación 12

siendo A_0 la absorbancia medida a $t = 0$.

Al estudiar el efecto de la reacción de Fenton sobre la eliminación de modelos bacterianos, modelos de contaminantes químicos orgánicos o de aguas reales es preciso optimizar ciertos parámetros.

1.5. Optimización de parámetros en la reacción de Fenton

Tal como ya se ha comentado, existen parámetros que son necesarios optimizar en la reacción de Fenton, tales como el pH, concentración de Fe^{2+} o el ratio molar $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$. Una manera de evaluar cómo afectan estos parámetros en la reacción de Fenton, es manteniendo constante algunos de los parámetros en un determinado número de experimentos, pero cambiando uno de ellos, de tal manera que permitan evaluar el cambio de ese parámetro. Esta evaluación unidimensional de los parámetros involucra mucho tiempo, y no es posible evaluar la interacción entre dos o más variables. Una forma de evitar estos problemas es utilizar un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas para establecer diseños experimentales, técnica conocida como métodos de superficie de respuesta. Esta metodología permite investigar las consecuencias de variar distintos parámetros sobre una respuesta, permitiendo conocer cómo estos interactúan y localizando las condiciones óptimas con un número reducido de experimentos. Las pruebas de verificación del modelo se hacen mediante análisis de varianza (ANOVA) evaluando la idoneidad del modelo propuesto (Tayeb *et al.*, 2018).

Entre los métodos de superficie de respuesta que se han utilizado para evaluar el efecto de algunos parámetros sobre la reacción de Fenton, destaca el diseño de experimentos Box-Behnken mucho más económico y eficiente que otros diseños de experimentos (Almeida *et al.*, 2008).

1.6. Objetivos de Desarrollo Sostenible

Según la Organización de las Naciones Unidas (2015), la Agenda 2030 sobre el Desarrollo Sostenible cuenta con 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (Figura 2) para mejorar la calidad de vida de todos al igual que del medio ambiente. El presente trabajo de tesis se centra en los siguientes ODS: El objetivo 6 “Agua limpia y saneamiento”, el cual busca obtener agua libre de impurezas y accesible para todos; el objetivo 13 “Acción por el clima”, el cambio climático afecta a todos los países y se prevé que para el futuro las consecuencias serán peores; El objetivo 14 “Vida submarina”, administrando de manera efectiva dichas áreas para reducir su contaminación y acidificación; y el objetivo 15 “Vida de ecosistemas terrestres”, ya que, protegiendo los bosques, también se puede fortalecer la gestión de los recursos naturales y aumentar la productividad de la Tierra.



Figura 2. Objetivos de Desarrollo Sostenible.

Fuente: Organización de las Naciones Unidas, 2015.

2. HIPÓTESIS

El empleo de la tecnología Fenton tendrá una eficiencia en la oxidación de estructuras orgánicas simples un 15% mayor respecto a estructuras orgánicas complejas.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar la eficiencia de la tecnología Fenton en la oxidación de estructuras orgánicas simples, tales como el azul de metileno y complejas como la cepa *E. coli* K12.

3.2. Específicos

- 3.2.1. Optimizar la eficiencia de la decoloración de azul de metileno y la constante de velocidad a través de la oxidación mediante la tecnología Fenton evaluando el efecto de las variables pH, $[\text{Fe}^{2+}]$ y el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$.
- 3.2.2. Optimizar la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 a través de la oxidación mediante la tecnología Fenton evaluando el efecto de las variables pH, $[\text{Fe}^{2+}]$ y el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$.
- 3.2.3. Comparar la eficiencia de oxidación bajo las condiciones óptimas de decoloración del azul de metileno con las de inactivación de *E. coli* K12.

4. METODOLOGÍA

4.1. Reactivos

Los reactivos Fenton utilizados se trataron del sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30%). Para la optimización de la tecnología Fenton en la oxidación de compuestos orgánicos simples se empleó el colorante azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{S}\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Figura 3) con una concentración de 270 mg/L. Además, para ajustar el pH del agua destilada al requerido en cada ensayo se usó HCl (0,1M) y NaOH (0,25M).

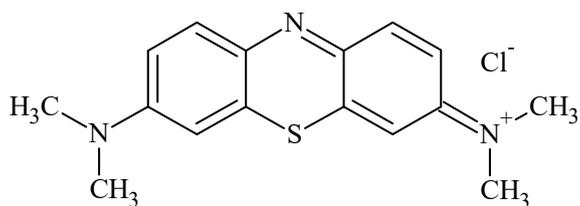


Figura 3. Estructura del Azul de Metileno.

Fuente: Nordén *et al.*, 1982.

4.2. Equipos

Para esterilizar el material se usó un autoclave de vapor SHP Steriltechnik LABOKLAV (25 MV) (Figura 4).



Figura 4. Autoclave de vapor SHP Steriltechnik LABOKLAV (25 MV).

El equipo que se usó para incubar la cepa *E. coli* K12 se trata de una Thermoshake Gerhardt (THO500) (Figura 5).



Figura 5. Thermoshake Gerhardt (THO500).

La centrifugación de los pellets formados tras la incubación se realizó en una centrífuga SIGMA (2-16P) (Figura 6).



Figura 6. Centrífuga SIGMA (2-16P).

Para mantener tanto los cultivos como los medios nutritivos o las placas Petri a una temperatura de 37°C se usó una incubadora aeróbica Heraeus (B6) (Figura 7).



Figura 7. Incubadora aeróbica Heraeus (B6).

La densidad óptica de la resuspensión de bacterias o la absorbancia del azul de metileno se midió mediante el espectrofotómetro del ultravioleta visible Shimadzu (UV-1800) (Figura 8).



Figura 8. Espectrofotómetro del ultravioleta visible Shimadzu (UV-1800).

Para medir el pH del agua destilada utilizada en cada ensayo se hizo uso del multi-paramétrico HANNA (HI 255) (Figura 9).



Figura 9. Multi-paramétrico HANNA (HI 255).

4.3. Reactor a escala de laboratorio

La tecnología Fenton se realizó tanto para el azul de metileno como para la cepa *E. coli* K12 en un reactor de vidrio de 20 mL en sistema batch mediante la adición de los reactivos Fenton ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y H_2O_2) así como el azul de metileno a una concentración inicial de 270 mg/L o la cepa modelo a la densidad óptica de 0,5 y agua destilada al pH requerido en cada ensayo. El tratamiento además se realizó con agitación mecánica para favorecer la homogeneidad.

4.4. Condiciones de operación

Las condiciones de operación para la tecnología empleada fueron las condiciones de temperatura y presión ambiente. A pesar de que un aumento de temperatura puede acelerar la velocidad de la reacción Fenton (Rubio-Clemente *et al.*, 2014), a nivel industrial sería realmente costoso un control de la temperatura, por lo que ésta no se corresponde con una variable a tratar y se tomará el valor del ambiente.

4.5. Procedimiento experimental con *E. coli* K12

La cepa modelo que se empleó se trata del inóculo de *Escherichia coli* K12 que se encuentra congelada a -20°C en el laboratorio del centro EULA. Para realizar un cultivo de ella previamente se preparaba el medio nutritivo Luria Bertani (LB).



Figura 10. Inoculación de la cepa modelo *E. coli* K12 al medio nutritivo LB Miller.

Una vez preparado, se realizaba un asado de la cepa modelo al caldo (Figura 10) y a través de una Termoshake se sometía a una agitación constante de 150 rpm a 37°C durante 24 horas. Tras este tiempo, se realizaba una centrifugación a 3900 rpm durante 10 minutos para la formación de pellets que se resuspendían seguidamente con agua destilada al pH requerido de cada ensayo hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 600nm en espectrofotómetro (es decir, 10^5 - 10^6 UFC/mL). Con esta concentración inicial de partida se le aplicaba la tecnología Fenton por un período de tiempo de 15 minutos bajo agitación mecánica.

Transcurridos los 15 minutos se tomaban 0,2 mL de dicha mezcla para diluir con medio nutritivo LB en tubos Eppendorf de 2 mL hasta la dilución necesaria para que se pudieran observar colonias mediante el método de recuento en placa Petri. El medio nutritivo fue Agar LB preparado previamente. Finalmente se extendieron sobre las placas 100 μL de la dilución obtenida y se dejaron en incubación por 24 horas a 37°C para el recuento de las colonias.

Cabe destacar, que para conocer la concentración inicial de *E. coli* K12 se realiza un control, extendiendo en placa 100 µL de una mezcla de resuspensión de bacterias con agua destilada (relación 1:1).

4.6. Estrategia de optimización

Puesto que la tecnología Fenton se basa en una reacción química, se empleó azul de metileno como modelo de compuesto orgánico simple, siendo importante optimizar la eficiencia de decoloración de dicho colorante así como la constante de velocidad de la reacción.

Por otro lado, se realizó una optimización a la tasa de inactivación de la cepa modelo *E. coli* K12 con el objetivo de encontrar la máxima eliminación de patógenos posible. Para ello, se hace uso de la metodología de superficie de respuesta Box-Behnken, técnica empleada en el estudio de la relación entre una o más respuestas y un conjunto de factores o variables independientes para optimizar dicha respuesta o respuestas (Figuroa, 2003). Se consideró como variables de entrada el pH, la concentración de Fe^{2+} y el ratio de las concentraciones, $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$. Las variables de salida (o variables a optimizar) se trataron de la tasa de decoloración y la constante de velocidad en la oxidación de azul de metileno y la tasa de inactivación para la cepa modelo *E. coli* K12.

La Tabla 8 muestra las variables utilizadas junto con los niveles empleados en el diseño de la superficie de respuesta en la tecnología Fenton.

Tabla 8. Variables independientes y sus niveles utilizados en el diseño de la superficie de respuesta para la tecnología Fenton.

Variable	Rango y nivel de valores reales y codificados			
	Coded	-1	0	1
[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	X ₁	1:1	2:1	3:1
[Fe ²⁺] (mol/L)	X ₂	6,0·10 ⁻⁴	8,0·10 ⁻⁴	1,0·10 ⁻³
Valor del pH	X ₃	3,0	4,0	5,0

Fuente: Gao *et al.*, 2016.

La Tabla 9 muestra los 15 experimentos planificados, incluidos los 3 puntos centrales para la obtención de una optimización mediante un diseño Box-Behnken.

Tabla 9. Experimentos para el diseño de la superficie de respuesta.

#	Variable 1	Variable 2	Variable 3
	[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	[Fe ²⁺] (mol/L)	pH
1	1:1	6,0·10 ⁻⁴	4,0
2	3:1	6,0·10 ⁻⁴	4,0
3	1:1	1,0·10 ⁻³	4,0
4	3:1	1,0·10 ⁻³	4,0
5	1:1	8,0·10 ⁻⁴	3,0
6	1:1	8,0·10 ⁻⁴	5,0
7	3:1	8,0·10 ⁻⁴	3,0
8	3:1	8,0·10 ⁻⁴	5,0
9	2:1	6,0·10 ⁻⁴	3,0
10	2:1	1,0·10 ⁻³	3,0
11	2:1	6,0·10 ⁻⁴	5,0
12	2:1	1,0·10 ⁻³	5,0
13	2:1	8,0·10 ⁻⁴	4,0
14	2:1	8,0·10 ⁻⁴	4,0
15	2:1	8,0·10 ⁻⁴	4,0

Una vez realizados los experimentos, se definió la curva de contorno y se encontraron las condiciones óptimas (máximo de la curva) de decoloración y constante de velocidad de reacción para el azul de metileno y de máxima inactivación de microorganismos para la cepa *E. coli* K12.

Además, cabe destacar que para obtener el valor de respuesta predicho por el modelo en cada caso, la técnica se basa en correlaciones e interacciones entre las variables independientes y la respuesta (Roudi *et al.*, 2018) obteniendo el modelo polinómico de segundo orden representado en la Ecuación 13.

$$\eta = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2$$

Ecuación 13

donde η es la respuesta obtenida en función del valor que toma cada variable, B_0 es una intercepción; B_1 , B_2 y B_3 son los coeficientes de regresión lineal; B_{12} , B_{13} y B_{23} son los coeficientes de interacción; y B_{11} , B_{22} y B_{33} son los coeficientes cuadráticos.

4.7. Comparación entre la oxidación de compuestos orgánicos simples y compuestos orgánicos complejos

Tras la obtención de las condiciones óptimas para la eficiencia de decoloración y constante de velocidad de reacción del azul de metileno y la eficiencia de inactivación de la cepa modelo *E. coli* K12 se realizó una comparación cualitativa observándose de este modo las semejanzas y diferencias entre ambos modelos, dando una idea de esta manera de cómo las aguas servidas pueden verse afectadas por la tecnología Fenton.

4.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa *Design Expert 10* con un nivel de significancia $p = 0,05$. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para la obtención del F-valor y el p-valor de cada factor; y análisis de los coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática que permitan obtener cada valor predicho de respuesta.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Optimización de la eficiencia de la decoloración de Azul de Metileno

El diseño Box-Behnken formado por los 15 experimentos y las respuestas de los mismos para la optimización de la eficiencia de decoloración del azul de metileno mediante la tecnología Fenton se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Diseño Box-Behnken y respuesta para la optimización de la eficiencia de decoloración de AM (%).

#	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Respuesta: Eficiencia de decoloración de AM (%)
	[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	[Fe ²⁺] (mol/L)	pH	
1	1:1	6,0·10 ⁻⁴	4,0	69,77
2	3:1	6,0·10 ⁻⁴	4,0	87,31
3	1:1	1,0·10 ⁻³	4,0	83,55
4	3:1	1,0·10 ⁻³	4,0	92,94
5	1:1	8,0·10 ⁻⁴	3,0	82,37
6	1:1	8,0·10 ⁻⁴	5,0	96,13
7	3:1	8,0·10 ⁻⁴	3,0	75,77
8	3:1	8,0·10 ⁻⁴	5,0	90,47
9	2:1	6,0·10 ⁻⁴	3,0	89,06
10	2:1	1,0·10 ⁻³	3,0	94,75
11	2:1	6,0·10 ⁻⁴	5,0	85,24
12	2:1	1,0·10 ⁻³	5,0	89,18
13	2:1	8,0·10 ⁻⁴	4,0	88,52
14	2:1	8,0·10 ⁻⁴	4,0	87,97
15	2:1	8,0·10 ⁻⁴	4,0	88,29

5.1.1. Análisis de varianza y coeficientes de regresión

La aplicación de la tecnología Fenton para la oxidación de azul de metileno en los distintos experimentos permitió obtener los resultados de análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 11) así como los coeficientes de regresión estimados e intervalos de confianza (Tabla 12).

Tabla 11. Resultados ANOVA para la ecuación cuadrática de la eficiencia de decoloración de AM (%) obtenida de *Design Expert 10*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F-valor	p-valor
Modelo	649,71	9	72,19	26,83	0,0010
A-[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	383,44	1	383,44	142,52	<0,0001
B-[Fe ²⁺]	105,33	1	105,33	39,15	0,0015
C-pH	58,58	1	58,58	21,77	0,0055
AB	16,62	1	16,62	6,18	0,0555
AC	0,22	1	0,22	0,083	0,7843
BC	0,77	1	0,77	0,29	0,6163
A ²	62,68	1	62,68	23,30	0,0048
B ²	2,06	1	2,06	0,76	0,4218
C ²	15,45	1	15,45	5,74	0,0619
Residual	13,45	5	2,69		
Lack of Fit	13,30	3	4,43	59,11	0,0167
Pure Error	0,15	2	0,075		
Cor Total	663,16	14			

R² = 0,9797 ; R²_{adj} = 0,9432 ; C.V. = 1,89 %

La Tabla 11 muestra un F-valor del modelo de 26,83 lo que implicó que el modelo es estadísticamente significativo debido a que el p-valor del modelo tomó un valor inferior a 0,0500. El p-valor del modelo fue 0,0010 lo cual indica que existe un 0,1% de posibilidad de que valores altos de F-valor sean debidos al ruido. El modelo además reveló que la falta de ajuste es estadísticamente significativa ya que presenta F-valor alto (59,11) y p-valor bajo (0,0167), lo que indica que el error estándar de cada experimento es significativo y no puede ser ignorado. Existe un 1,67% de probabilidad de que un F-valor de falta de ajuste sea tan grande debido al ruido. Que la falta de ajuste sea estadísticamente significativa no es bueno ya que lo que se pretende es que el modelo se ajuste.

En este caso, 4 de los 9 factores, A, B, C y A² se encontraron que eran significativos para la tecnología Fenton ($p < 0,0500$, Tabla 11). Entre las variables y sus valores que fueron investigados, el ratio [H₂O₂]/[Fe²⁺] presentó un efecto

más fuerte en la eficiencia de decoloración de AM mediante la tecnología Fenton, seguido de la concentración de Fe²⁺ y el valor del pH.

Tabla 12. Coeficientes de regresión obtenidos del análisis estadístico para la eficiencia de decoloración de AM (%).

Factor	Coeficiente estimado	Grados de libertad	Error Standard	95% CI	
				Low	High
Intercept	88,26	1	0,95	85,83	90,69
A-[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	6,92	1	0,58	5,43	8,41
B-[Fe ²⁺]	3,63	1	0,58	2,14	5,12
C-pH	-2,71	1	0,58	-4,2	-1,22
AB	-2,04	1	0,82	-4,15	0,07
AC	0,24	1	0,82	-1,87	2,35
BC	-0,44	1	0,82	-2,55	1,67
A ²	-4,12	1	0,85	-6,31	-1,93
B ²	-0,75	1	0,85	-2,94	1,45
C ²	2,05	1	0,85	-0,15	4,24

Mediante la realización de múltiples análisis de regresión en los datos obtenidos experimentalmente, la variable de respuesta y los factores se relacionaron con la ecuación polinómica de segundo orden (Ecuación 13).

Eficiencia de decoloración de AM:

$$\eta = 88,26 + 6,92A + 3,63B - 2,71C - 2,04AB + 0,24AC - 0,44BC - 4,12A^2 - 0,75B^2 + 2,04C^2$$

siendo η la eficiencia de decoloración de AM predicha por el modelo y A, B y C los valores de las variables empleadas en la optimización.

5.1.2. Efecto de las 3 variables en la eficiencia de decoloración de azul de metileno y análisis de superficie de respuesta

Mediante el análisis de superficie de respuesta Box-Behnken fue posible conocer el efecto de las 3 variables ($[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$, $[\text{Fe}^{2+}]$ y pH) el cual es difícil de verse observado mediante otras técnicas convencionales. La influencia de estas variables en la decoloración de AM a través de la tecnología Fenton puede verse reflejada en los diagramas de superficie de contorno y de respuesta obtenidos con *Design Expert 10* (Figuras 11, 12 y 13).

La Figura 11 muestra los diagramas de superficie de contorno y de respuesta (3D) de correlaciones entre la concentración de Fe^{2+} y el valor del pH, ambos variables, en la eficiencia de decoloración de AM a los 3 valores del ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ empleados en la experimentación (1:1, 2:1 y 3:1). Se puede ver cómo al aumentar el ratio de las concentraciones, la eficiencia de decoloración de AM aumenta apreciándose una influencia significativa de los valores que toma el ratio en dicha eficiencia de decoloración. Esto concuerda con los resultados obtenidos del análisis de varianza y coeficientes de regresión (Tablas 11 y 12). La eficiencia de decoloración de AM superó el 90% para el valor de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 3:1$ al tomar valores de pH inferiores a 3,57 y de concentración de Fe^{2+} superiores a $7,6 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Saleh *et al.* (2019) observaron también un aumento en la eficiencia de decoloración de AM al aumentar el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$, tratándose ese caso de estudio de un proceso Fenton heterogéneo empleando 4 mL de H_2O_2 para degradar un 79% de una concentración inicial de AM de 40 mg/L.

La Figura 12 muestra los diagramas de superficie de contorno y de respuesta de correlaciones entre el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de decoloración de AM a los 3 valores de concentración de Fe^{2+} empleados ($6,0 \cdot 10^{-4}$, $8,0 \cdot 10^{-4}$ y $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Se observa un aumento de la eficiencia de decoloración de AM al aumentar la concentración de Fe^{2+} . Se aprecia, por tanto, una influencia significativa de la concentración de Fe^{2+} , al igual que se vio reflejado con los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Tabla 11). La eficiencia de

decoloración de AM superó el 95% para el valor de $[Fe^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L al tomar valores de pH inferiores a 3,63 y de ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ superiores a 1,62:1. Liu *et al.* (2013) confirman que el aumento de la eficiencia de decoloración de AM al aumentar la concentración de Fe^{2+} es debido a que éste actúa como catalizador en la descomposición del H_2O_2 en $\cdot OH$ que oxidan el AM. De su estudio se obtuvo una eficiencia de decoloración de AM del 92% siendo su concentración inicial de 50 mg/L, un tiempo de reacción de 65 min y unas concentraciones de 20 mg/L y 200 mg/L para el Fe^{2+} y el H_2O_2 , respectivamente.

La Figura 13 muestra los diagramas de superficie de contorno y de respuesta de correlaciones entre el ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y la concentración de Fe^{2+} en la eficiencia de decoloración de AM a los 3 valores de pH empleados (3,0, 4,0 y 5,0). Se puede observar cómo al disminuir el valor del pH a valores más ácidos la eficiencia de decoloración de AM aumenta. Esto concuerda con el estudio de Weng *et al.* (2015), en el que se explica que a mayor valor del pH la eficiencia de decoloración de AM disminuye debido a la formación de complejos del hierro que precipitan. Aunque existe influencia de esta variable en la eficiencia de decoloración de AM, no es tan significativa como lo es el ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$. La eficiencia de decoloración de AM superó el 95% para el valor de pH de 3,0 al tomar valores de ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ superiores a 1,63:1 y de concentración de Fe^{2+} superiores a $6,74 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

Por tanto, se puede confirmar que el ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ mostró un fuerte efecto positivo en la eficiencia de decoloración de AM, lo que es consistente con los resultados del análisis de varianza y regresión.

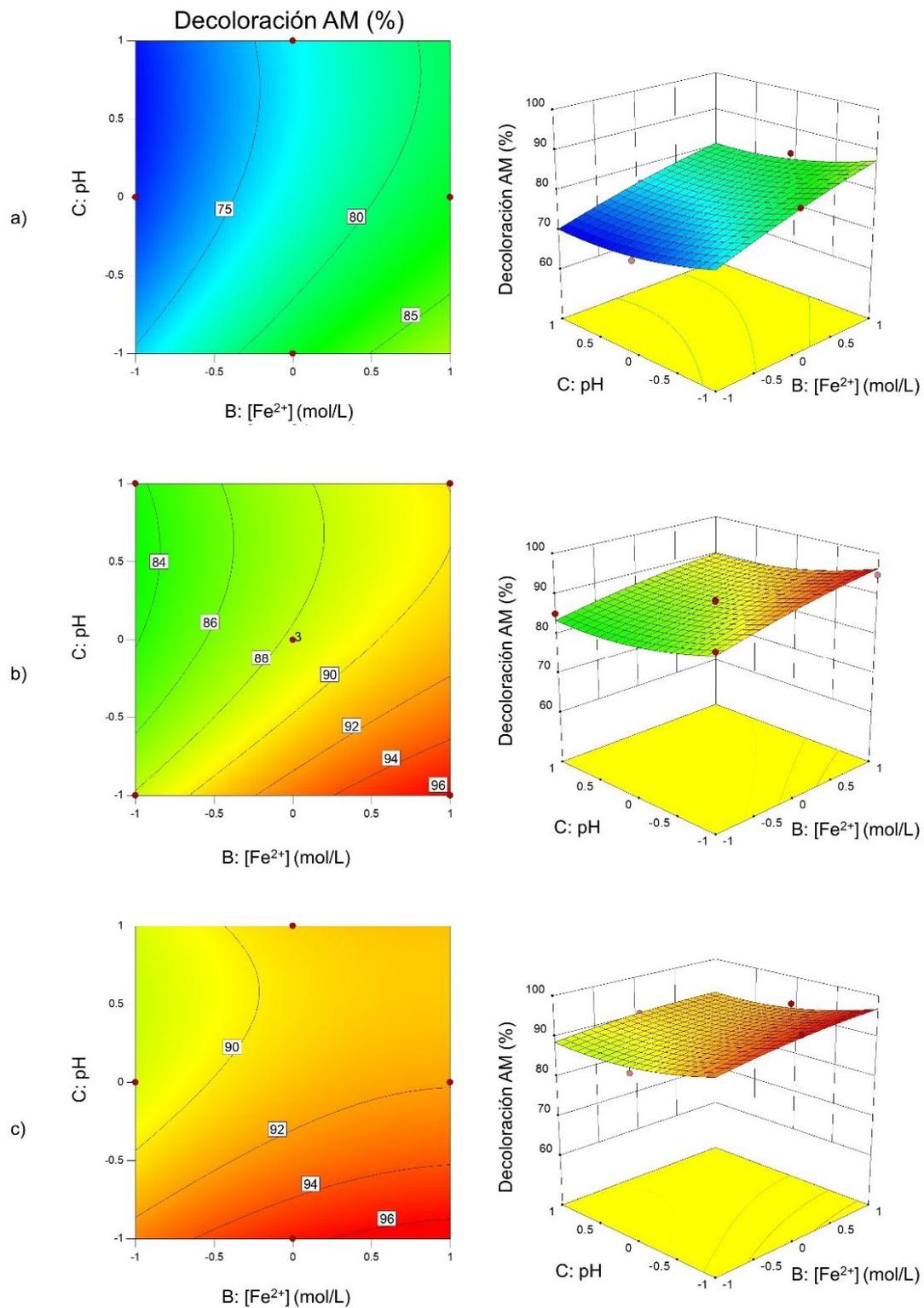


Figura 11. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para la concentración de $[\text{Fe}^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de decoloración de AM para: a) $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 1:1$; b) $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 2:1$; y c) $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 3:1$.

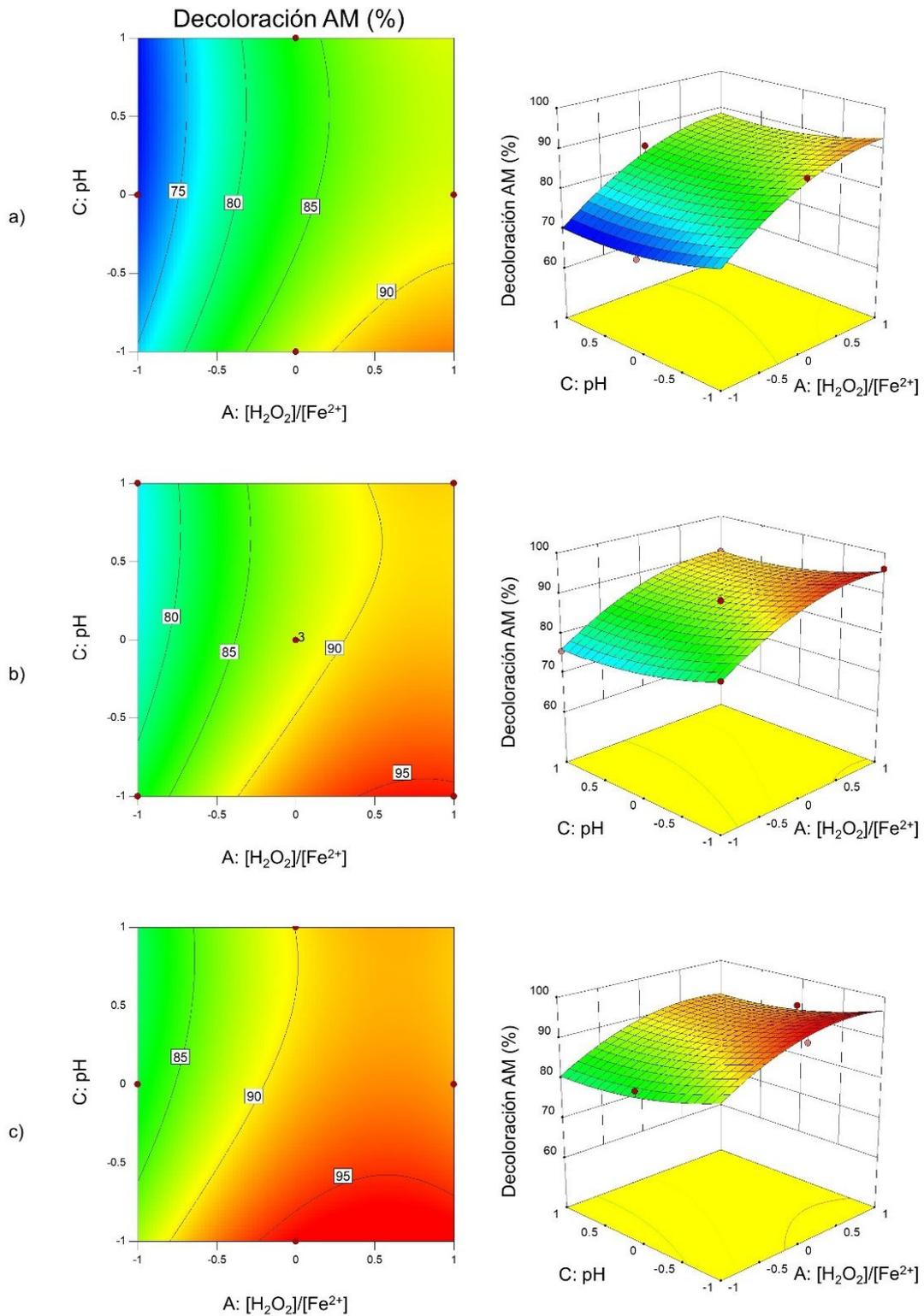


Figura 12. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de decoloración de AM para: a) $[Fe^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; b) $[Fe^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; y c) $[Fe^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L.

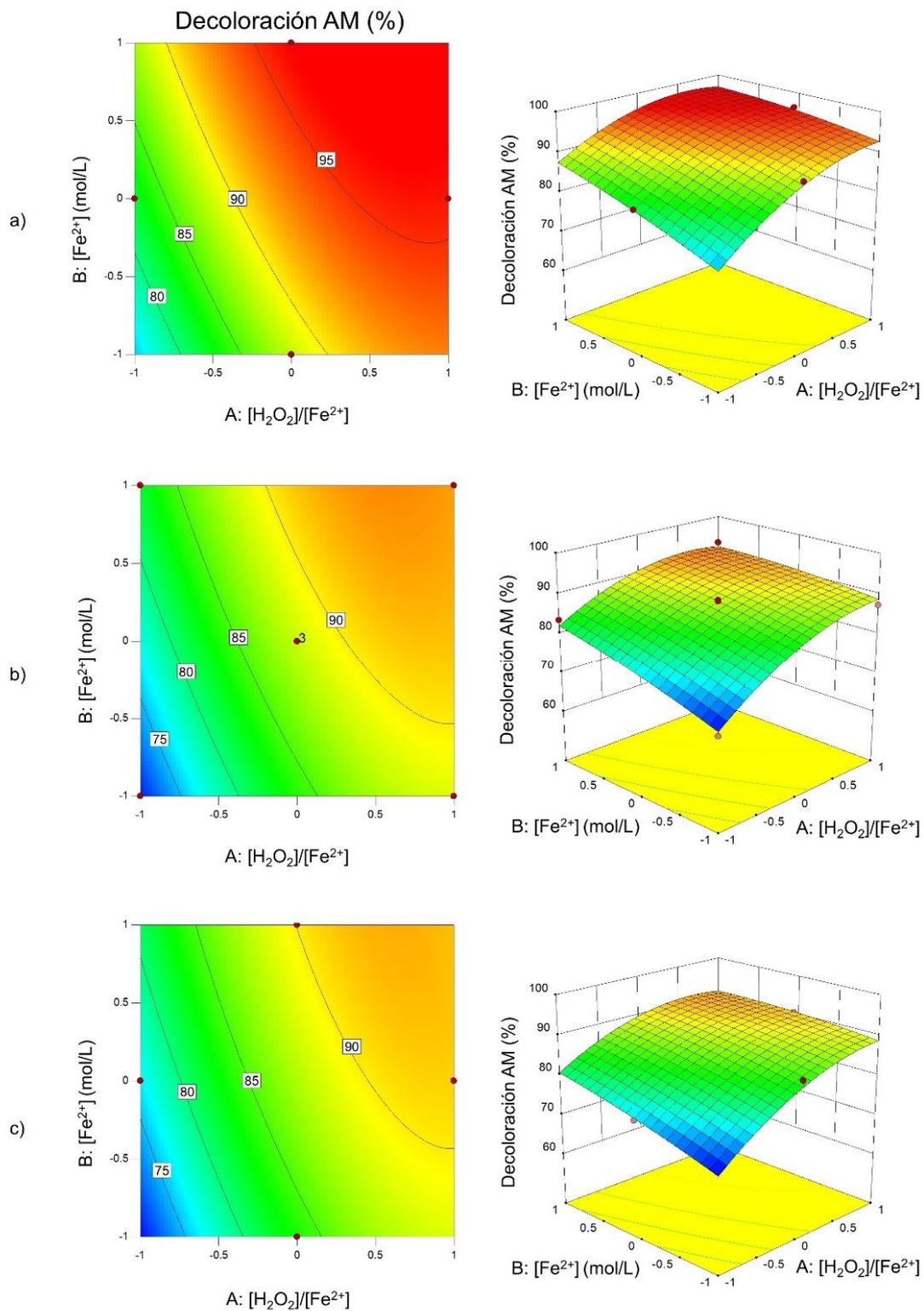


Figura 13. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y la concentración de $[Fe^{2+}]$ en la eficiencia de decoloración de AM para: a) pH = 3,0; b) pH = 4,0; y c) pH = 5,0.

5.1.3. Condiciones óptimas y modelo de verificación

Tras la obtención de las respuestas experimentales de eficiencia de decoloración de AM, se obtuvieron las condiciones óptimas para la máxima decoloración de AM utilizando la tecnología Fenton. Para ello, se analizó el punto estacionario en la superficie de respuesta. Las condiciones óptimas de ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$, concentración de Fe^{2+} y el valor del pH fueron de 3:1, $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L y 3,0, respectivamente, y en conjunto lograron una eficiencia máxima de decoloración de AM de 96,86% según el valor predicho por el modelo.

Para predecir la eficiencia de decoloración de AM y poder verificar el modelo, se empleó la ecuación cuadrática (Ecuación 13) utilizando las condiciones de cada experimento de modo que se pudieron comparar los valores obtenidos experimentalmente con los predichos teóricamente (Tabla 13). A pesar de que el residuo tomó valores de diferente magnitud en cada ensayo, estos fueron bajos lo cual se puede traducir en una buena precisión del modelo, tal y como se puede observar en la Figura 14 que representa los valores predichos frente a los obtenidos experimentalmente. Se aplicó la tecnología Fenton a la condición óptima para poder observar la exactitud del modelo. La Tabla 13 muestra una eficiencia de decoloración de AM de 94,57% obtenida experimentalmente, resultando cercana al valor predicho (96,86%), presentando un error del 2,37% (Tabla 14) lo que indica un buen acuerdo entre los datos del modelo y los datos experimentales. Dutta *et al.* (2001) obtuvieron unas condiciones óptimas de concentración de $3,58 \cdot 10^{-5}$ mol/L y $4,41 \cdot 10^{-4}$ mol/L para el Fe^{2+} y el H_2O_2 , respectivamente, mediante las cuales se consiguió degradar en 10 min un 90% de AM con concentración inicial de $3,13 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

Se observó una mayor eficiencia de decoloración en el presente trabajo empleando mayor tiempo de reacción y mayores concentraciones de H_2O_2 , Fe^{2+} y de AM inicial con respecto a otros autores.

Tabla 13. Comparación de los valores obtenidos experimentalmente y los predichos teóricamente para la eficiencia de decoloración de AM (%).

#	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Respuesta: Eficiencia de decoloración de AM (%)		Residuo
				Valor	Valor	
				experimental	predicho	
1	1:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	69,77	70,80	-1,030
2	3:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	87,31	88,72	-1,410
3	1:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,0	83,55	82,14	1,410
4	3:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,0	92,94	91,9	1,040
5	1:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	82,37	82,22	0,150
6	1:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	96,13	95,58	0,550
7	3:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	75,77	76,32	-0,550
8	3:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	90,47	90,64	-0,170
9	2:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	89,06	88,20	0,860
10	2:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	3,0	94,75	96,34	-1,590
11	2:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	85,24	83,66	1,580
12	2:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	5,0	89,18	90,04	-0,860
13	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	88,52	88,26	0,260
14	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	87,97	88,26	-0,290
15	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	88,29	88,26	0,030
Condición óptima	3:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	3,0	94,57	96,86	-2,290

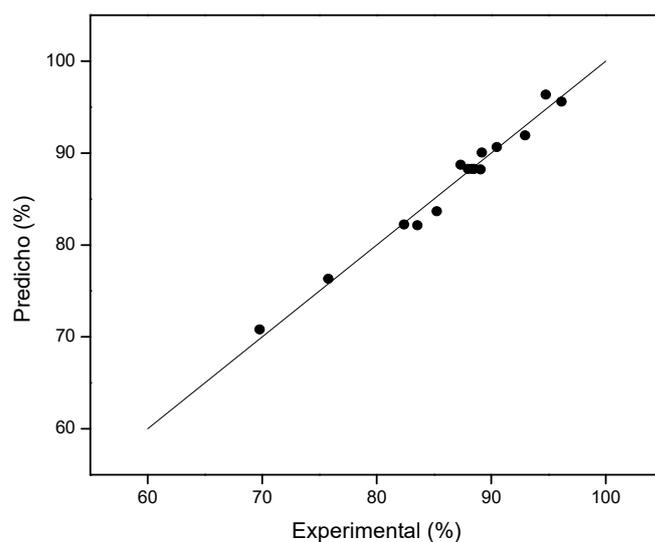


Figura 14. Valores predichos por la ecuación cuadrática frente a los valores experimentales en la eficiencia de decoloración de AM.

Tabla 14. Error del punto óptimo de la decoloración de AM.

Decoloración predicha (%)	96,860
Decoloración experimental (%)	94,565
Error (%)	2,369

5.2. Optimización de la constante de velocidad de reacción de azul de metileno

Tras la optimización de la eficiencia de decoloración de AM mediante el diseño Box-Behnken, se realizó una optimización a la constante de velocidad de reacción del AM de igual manera a través de los 15 experimentos y las respuestas de los mismos (Tabla 15).

Tabla 15. Diseño Box-Behnken y respuesta para la optimización de la constante de velocidad de reacción de AM (min^{-1}).

#	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Respuesta: Constante de velocidad de AM (min^{-1})
	$[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$	$[\text{Fe}^{2+}]$ (mol/L)	pH	
1	1:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,020
2	3:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,410
3	1:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,0	1,938
4	3:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,0	1,429
5	1:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	1,221
6	1:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	1,628
7	3:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	1,316
8	3:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	1,416
9	2:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	1,197
10	2:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	3,0	1,891
11	2:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	1,688
12	2:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	5,0	1,785
13	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,792
14	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,964
15	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,821

La Figura 15 representa la cinética que sigue el AM para dos casos: a) el de mayor constante de velocidad de reacción ($k_{app} = 1,964 \text{ min}^{-1}$); y b) el de menor constante de velocidad de reacción ($k_{app} = 1,020 \text{ min}^{-1}$). Se observó cómo en ambos casos se sigue una cinética de primer orden (Ecuación 11).

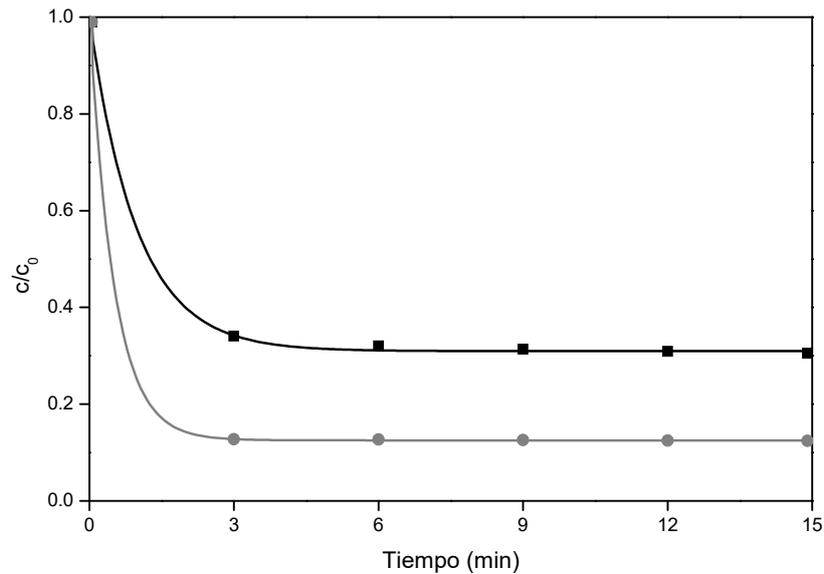


Figura 15. Cinética de decoloración del AM para: a) (*) $k_{app} = 1,964 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 2:1$, $[\text{Fe}^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 4,0$; y b) (■) $k_{app} = 1,020 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 1:1$, $[\text{Fe}^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 4,0$.

5.2.1. Análisis de varianza y coeficientes de regresión

La aplicación de la tecnología Fenton para la oxidación de azul de metileno en los distintos experimentos también sirvió para conocer la cinética que sigue la reacción Fenton y permitió obtener los resultados de análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 16) así como los coeficientes de regresión estimados e intervalos de confianza (Tabla 17).

Tabla 16. Resultados ANOVA para la ecuación cuadrática de la constante de velocidad de reacción de AM (min^{-1}) obtenida de *Design Expert 10*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F-valor	p-valor
Modelo	1,17	9	0,13	6,47	0,0267
A- $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$	0,019	1	0,019	0,94	0,3768
B- $[\text{Fe}^{2+}]$	0,37	1	0,37	18,64	0,0076
C-pH	$8,98 \cdot 10^{-3}$	1	$8,98 \cdot 10^{-3}$	0,45	0,5328
AB	0,20	1	0,20	10,09	0,0246
AC	0,024	1	0,024	1,18	0,3275
BC	0,089	1	0,089	4,45	0,0887
A ²	0,40	1	0,40	19,76	0,0067
B ²	0,025	1	0,025	1,25	0,3141
C ²	0,069	1	0,069	3,43	0,1232
Residual	0,10	5	0,02		
Lack of Fit	0,083	3	0,028	3,27	0,243
Pure Error	0,017	2	$8,48 \cdot 10^{-3}$		
Cor Total	1,27	14			

$R^2 = 0,9210$; $R^2_{\text{adj}} = 0,7787$; C.V. = 9,03 %

La Tabla 16 muestra un F-valor del modelo de 6,47 lo que implicó que el modelo es estadísticamente significativo debido a que el p-valor del modelo tomó un valor inferior a 0,0500. El p-valor del modelo fue 0,0267 lo cual indica que existe un 2,67% de posibilidad de que valores altos de F-valor sean debidos al ruido. El modelo además reveló que la falta de ajuste no es estadísticamente significativa ya que presenta F-valor bajo (3,27) y p-valor alto (0,2430), lo que indica que el error estándar de cada experimento no es significativo. Existe un 24,30% de probabilidad de que un F-valor de falta de ajuste sea tan grande debido al ruido. Que la falta de ajuste no sea estadísticamente significativa es bueno ya que lo que se pretende es que el modelo se ajuste.

En este caso, 3 de los 9 factores, B, AB y A² se encontraron que eran significativos para la tecnología Fenton ($p < 0,0500$, Tabla 16). Entre las variables y sus valores que fueron investigados, la concentración de Fe^{2+} presentó un efecto

más fuerte en la constante de velocidad de reacción de AM mediante la tecnología Fenton, seguido del ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y el valor del pH.

Tabla 17. Coeficientes de regresión obtenidos del análisis estadístico para la constante de velocidad de reacción de AM (min^{-1}).

Factor	Coeficiente estimado	Grados de libertad	Error Standard	95% CI	
				Low	High
Intercept	1,86	1	0,082	1,65	2,07
A- $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$	0,048	1	0,05	-0,08	0,18
B- $[Fe^{2+}]$	0,22	1	0,05	0,087	0,34
C-pH	0,034	1	0,05	-0,095	0,16
AB	-0,22	1	0,071	-0,41	-0,043
AC	-0,077	1	0,071	-0,26	0,11
BC	-0,15	1	0,071	-0,33	0,033
A ²	-0,33	1	0,074	-0,52	-0,14
B ²	-0,082	1	0,074	-0,27	0,11
C ²	-0,14	1	0,074	-0,33	0,053

Tras un análisis de regresión de los datos obtenidos experimentalmente, la variable de respuesta y los factores se relacionaron con la ecuación polinómica de segundo orden (Ecuación 13).

Constante de velocidad de reacción de AM:

$$\eta = 1,86 + 0,048A + 0,22B + 0,034C - 0,22AB - 0,077AC - 0,15BC - 0,33A^2 - 0,082B^2 - 0,14C^2$$

siendo η la constante de velocidad de reacción de AM predicha por el modelo y A, B y C los valores de las variables empleadas en la optimización.

5.2.2. Efectos de las 3 variables en la constante de velocidad de reacción y análisis de superficie de respuesta

La influencia de las 3 variables ($[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$, $[\text{Fe}^{2+}]$ y pH) empleadas en la optimización de la constante de velocidad de reacción de AM puede verse reflejada en los diagramas de superficie de contorno y de respuesta obtenidos (Figuras 16, 17 y 18).

La Figura 16 muestra los diagramas de superficie de contorno y de respuesta formados mediante correlaciones entre la concentración de Fe^{2+} y el valor del pH, para la obtención de la constante de velocidad de reacción de AM a los 3 valores del ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ empleados en la experimentación (1:1, 2:1 y 3:1). Se observa cómo la constante de velocidad de reacción toma valores altos a un valor intermedio del ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ (2:1) y que, al aumentar o disminuir este ratio la constante de velocidad disminuye de modo que no se aprecia influencia significativa de esta variable en la constante de velocidad de reacción. Esto concuerda con los resultados obtenidos del análisis de varianza y coeficientes de regresión (Tablas 16 y 17). La constante de velocidad de reacción del AM superó los $1,8 \text{ min}^{-1}$ para el valor de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 2:1$ al tomar valores de pH inferiores a 4,89 y de concentración de Fe^{2+} superiores a $7,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. Del mismo modo, Weng *et al.* (2013) observaron que un aumento del ratio por encima de una concentración crítica repercute en un agotamiento de los $\cdot\text{OH}$ debido a su recombinación para formación de H_2O_2 . Por ello, un aumento del ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ disminuirá la constante de velocidad de reacción. En sus estudios emplearon unas condiciones óptimas de valor de pH = 3,0, concentración de hierro cero valente de 1,0 g/L y concentración de H_2O_2 de $5,15 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ para obtener una constante de velocidad de reacción de $0,527 \text{ min}^{-1}$ al oxidar $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ de Direct Blue 15.

La Figura 17 muestra los diagramas de superficie de contorno y de respuesta obtenidos mediante correlaciones entre el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ y el valor del pH para la obtención de la constante de velocidad de reacción del AM a los 3 valores de concentración de Fe^{2+} empleados ($6,0 \cdot 10^{-4}$, $8,0 \cdot 10^{-4}$ y $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$). Se puede

ver un aumento de la constante de velocidad al aumentar la concentración de Fe^{2+} . Existe, por tanto, una influencia significativa de la concentración de Fe^{2+} , al igual que se vio reflejado con los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Tabla 16). La constante de velocidad superó los $2,0 \text{ min}^{-1}$ para el valor de $[\text{Fe}^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ al tomar valores de pH en un rango entre 3,14 – 4,14 y de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ entre 1,45:1 – 2,1:1. Villanueva *et al.* (2010) vieron reflejado también este aumento en la velocidad de reacción al aumentar la concentración de Fe^{2+} , obteniendo una constante de velocidad de reacción de $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, empleando un tiempo de reacción de 19,8 min y unas concentraciones de AM, Fe^{2+} y H_2O_2 de 50 mg/L, $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ y $8,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$, respectivamente. Altas concentraciones de Fe^{2+} aceleran la velocidad de descomposición del H_2O_2 generando $\text{HO}_2\cdot$, el cual es considerado como limitante en la velocidad, mientras que bajas concentraciones de Fe^{2+} favorecen la reacción de generación de $\cdot\text{OH}$ que es más reactivo que $\text{HO}_2\cdot$ produciéndose la reacción de la Ecuación 2, la cual se produce más rápido que la formación de $\cdot\text{OH}$ de la Ecuación 1 (Mansoorian *et al.*, 2013).

La Figura 18 muestra los diagramas de superficie de contorno y de respuesta de correlaciones entre el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ y la concentración de Fe^{2+} y la constante de velocidad de reacción a los 3 valores de pH empleados (3,0, 4,0 y 5,0). Se puede observar cómo al aumentar el valor del pH la constante de velocidad tiende a aumentar y a continuación disminuir, por lo que el valor del pH no presenta una influencia significativa sobre la constante de velocidad, al igual que lo reflejaban los análisis de varianza (Tabla 16). La constante de velocidad de reacción superó los $1,8 \text{ min}^{-1}$ para el valor de pH de 4,0 al tomar valores de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ inferiores a 2,58:1 y de concentración de Fe^{2+} superiores a $7,44 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.

Por ello, se puede confirmar que la concentración de Fe^{2+} mostró un fuerte efecto positivo en la constante de velocidad de reacción del AM, a diferencia de las otras dos variables, lo que es consistente con los resultados del análisis de varianza y regresión. Un aumento en el pH provoca la formación y precipitación de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ que impide la regeneración del Fe^{2+} (Reacción Tipo Fenton). Por otro lado, a

valores de pH ácidos se forma $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ que reacciona lentamente con el H_2O_2 , disminuyendo de este modo la velocidad de formación de $\cdot\text{OH}$ (Rubio-Clemente *et al.*, 2014).

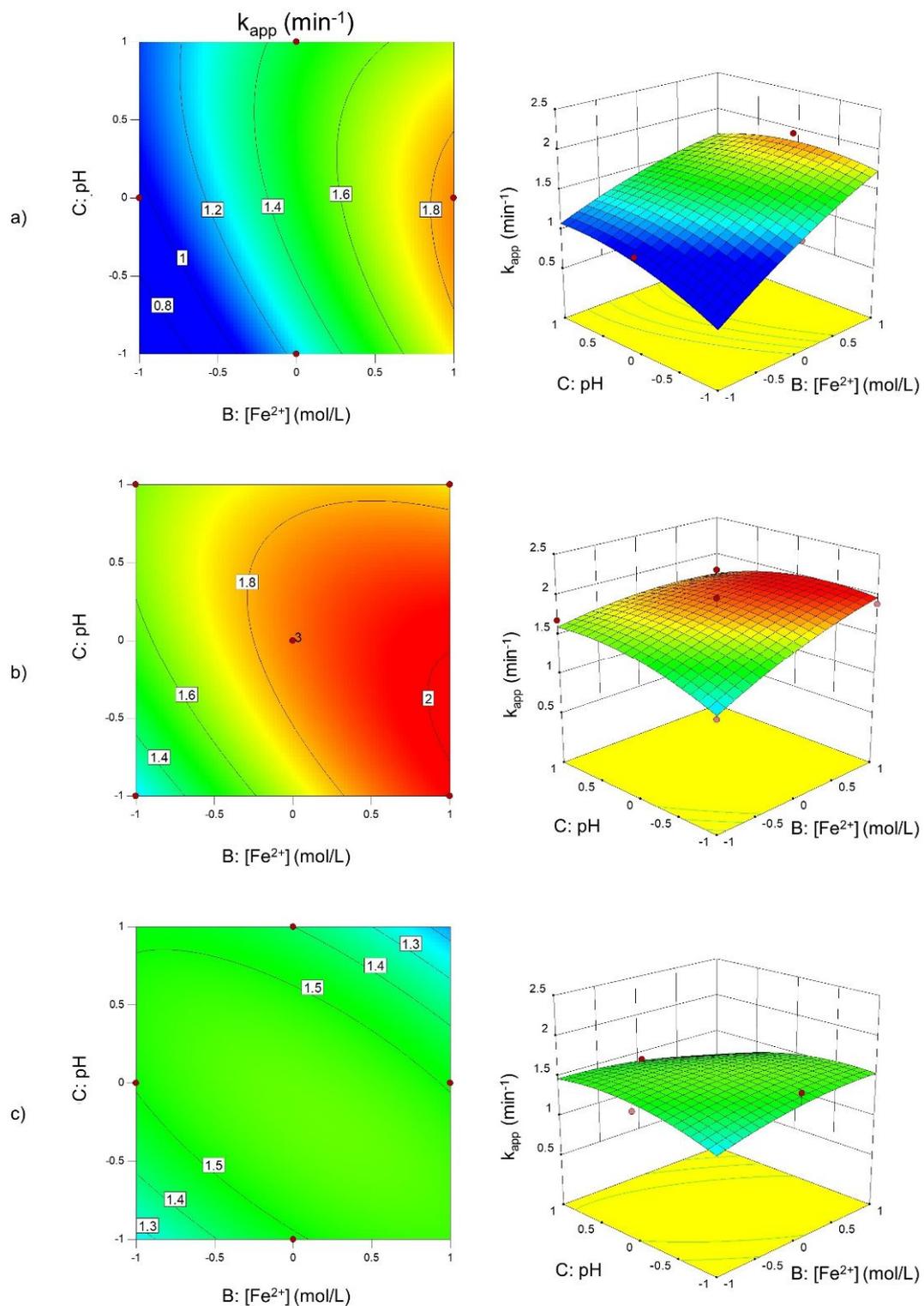


Figura 16. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para la concentración de $[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la constante de velocidad de reacción de AM para: a) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 1:1$; b) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 2:1$; y c) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 3:1$.

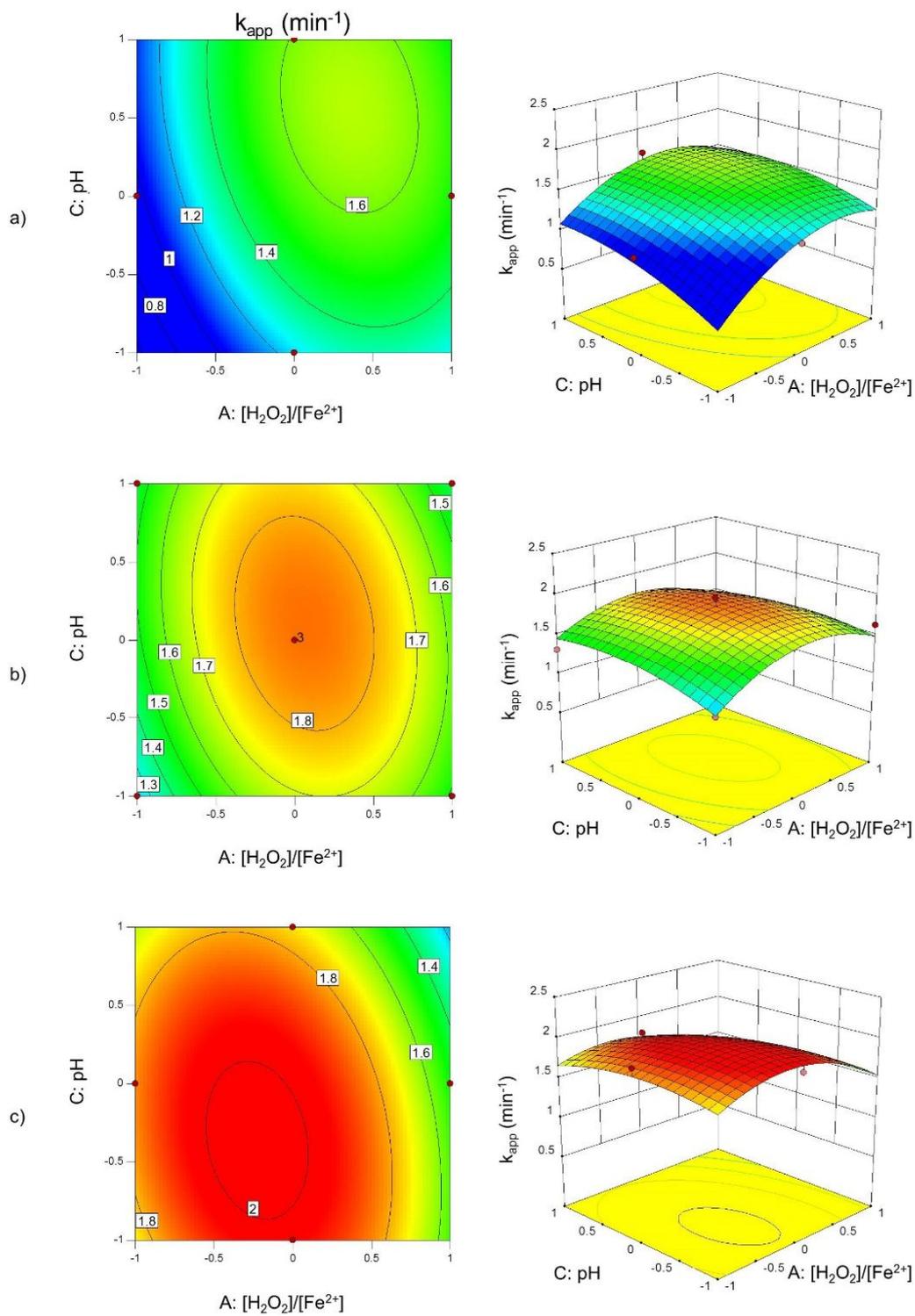


Figura 17. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la constante de velocidad de reacción de AM para: a) $[Fe^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; b) $[Fe^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; y c) $[Fe^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L.

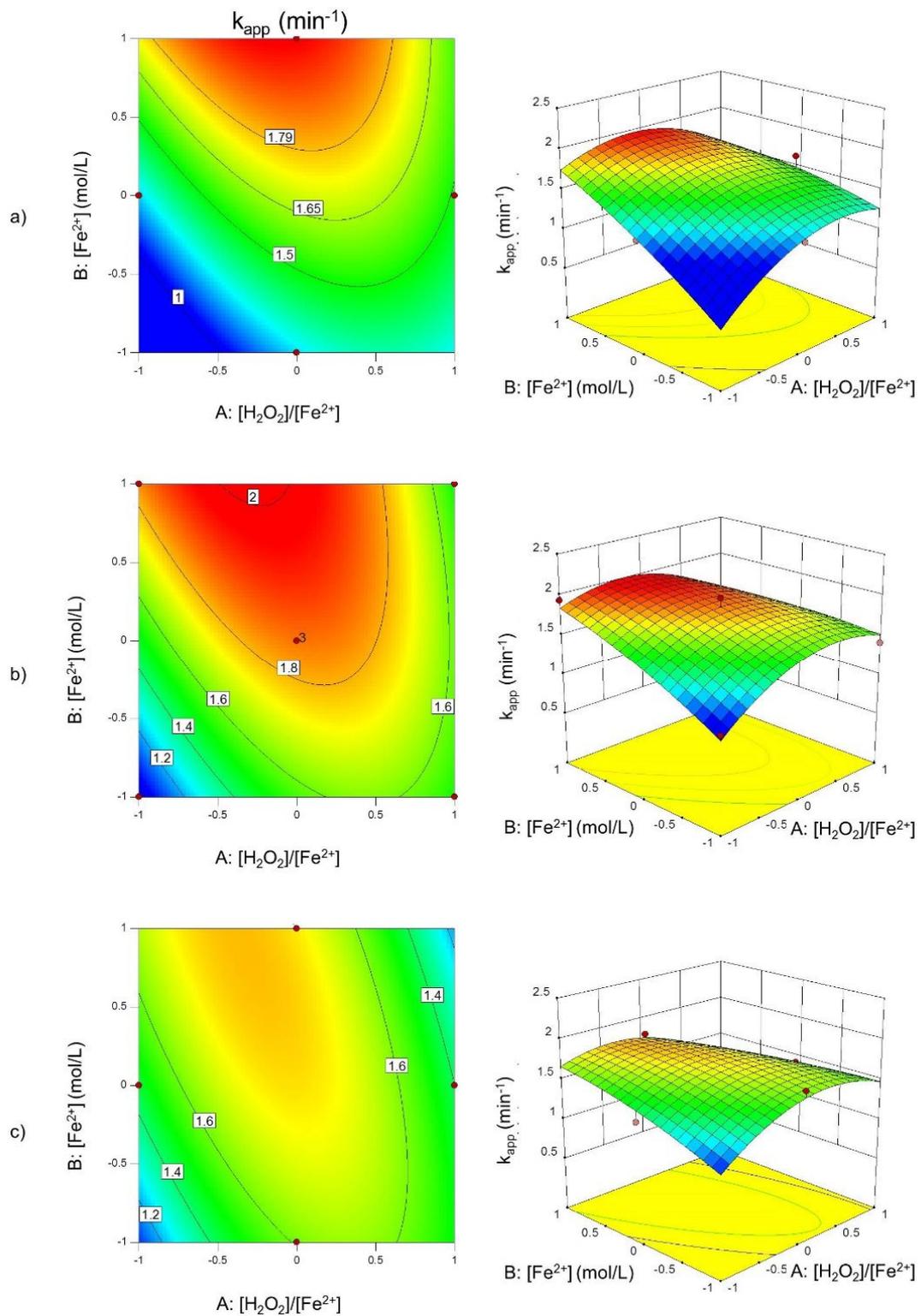


Figura 18. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y la concentración de $[Fe^{2+}]$ en la constante de velocidad de reacción de AM para: a) pH = 3,0; b) pH = 4,0; y c) pH = 5,0.

5.2.3. Condiciones óptimas y modelo de verificación

Con la recopilación de las respuestas experimentales de constante de velocidad de reacción del AM, se obtuvieron las condiciones óptimas para la máxima constante de velocidad. Para ello, se analizó el punto estacionario en la superficie de respuesta. Las condiciones óptimas de ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$, concentración de Fe^{2+} y el valor del pH fueron de 1,78:1, $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L y 3,65, respectivamente, y en conjunto lograron una constante de velocidad máxima de 2,033 según lo predicho por el modelo.

Al igual que para la eficiencia de decoloración de AM, para predecir la constante de velocidad de reacción del AM y poder verificar el modelo, se empleó la ecuación cuadrática de segundo grado (Ecuación 13) utilizando las condiciones dadas en cada experimento de modo que se pudieron comparar los valores obtenidos experimentalmente con los predichos teóricamente (Tabla 18). Los valores que tomó el residuo en cada experimento fueron bajos, lo cual quiere decir que existe una buena precisión del modelo, tal y como se puede observar en la Figura 19 que representa los valores predichos frente a los obtenidos experimentalmente. Se aplicó de nuevo la tecnología Fenton a la condición óptima para poder observar la exactitud del modelo. La Tabla 18 refleja una constante de velocidad de reacción del AM de $2,081 \text{ min}^{-1}$ obtenida experimentalmente, resultando cercana al valor predicho ($2,033 \text{ min}^{-1}$), presentando un error del 2,36% (Tabla 19) lo que indica un buen acuerdo entre los datos del modelo y los datos experimentales. Melgoza *et al.* (2009) tras sus estudios lograron degradar 50 mg/L de AM en 60 min empleando concentraciones de Fe^{2+} y H_2O_2 de $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L y $8,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L, respectivamente, siendo la constante de velocidad de reacción de $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

Por tanto, se observó una mayor constante de velocidad de reacción en el presente trabajo empleando menor tiempo de reacción y menores concentraciones de H_2O_2 , Fe^{2+} y de AM inicial con respecto a otros autores.

Tabla 18. Comparación de los valores obtenidos experimentalmente y los predichos teóricamente para la constante de velocidad de AM.

#	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Respuesta: Constante de velocidad de AM (min^{-1})		Residuo
				Valor	Valor	
				experimental	predicho	
	$[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$	$[\text{Fe}^{2+}]$ (mol/L)	pH			
1	1:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,020	0,960	0,060
2	3:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,410	1,507	-0,097
3	1:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,0	1,938	1,842	0,096
4	3:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,0	1,429	1,489	-0,060
5	1:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	1,221	1,237	-0,016
6	1:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	1,628	1,487	0,141
7	3:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	1,316	1,457	-0,141
8	3:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	1,416	1,401	0,015
9	2:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	1,197	1,241	-0,044
10	2:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	3,0	1,891	1,972	-0,081
11	2:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	1,688	1,607	0,081
12	2:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	5,0	1,785	1,740	0,045
13	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,792	1,859	-0,067
14	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,964	1,859	0,105
15	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	1,821	1,859	-0,038
Condición óptima	1,78:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	3,65	2,081	2,033	0,048

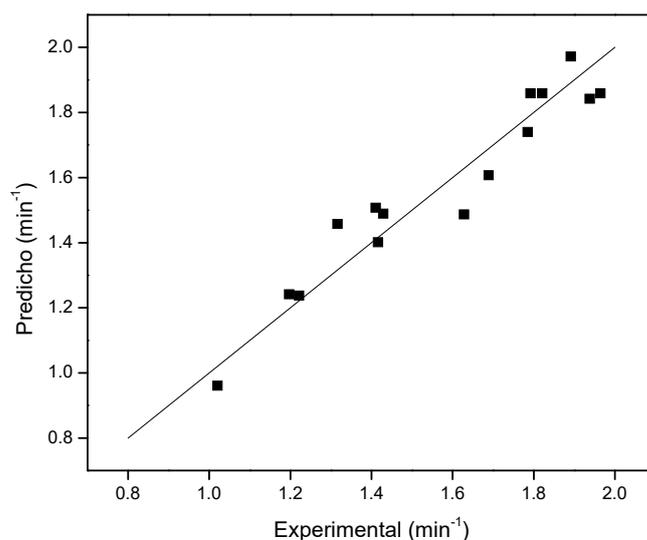


Figura 19. Valores predichos por la ecuación cuadrática frente a los valores experimentales en la constante de velocidad de reacción del AM.

Tabla 19. Error del punto óptimo de la constante de velocidad de AM.

k_{app} predicha (min^{-1})	2,033
k_{app} experimental (min^{-1})	2,081
Error (%)	2,361

5.3. Optimización de la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12

El diseño Box-Behnken realizado mediante los 15 experimentos y las respuestas de los mismos para la optimización de la eficiencia de inactivación de la cepa *E. coli* K12 por la tecnología Fenton se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20. Diseño Box-Behnken y respuesta para la optimización de la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 (uLog).

#	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Respuesta: Eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12 (uLog)
	$[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$	$[\text{Fe}^{2+}]$ (mol/L)	pH	
1	1:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	0,230
2	3:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	0,778
3	1:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,0	0,614
4	3:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,0	0,079
5	1:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	0,412
6	1:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	0,698
7	3:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	0,071
8	3:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	0,149
9	2:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	3,0	0,841
10	2:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	3,0	0,207
11	2:1	$6,0 \cdot 10^{-4}$	5,0	0,339
12	2:1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	5,0	0,329
13	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	0,150
14	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	0,157
15	2:1	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,0	0,176

5.3.1. Análisis de varianza y coeficientes de regresión

Así mismo, la oxidación a través de la tecnología Fenton para la inactivación de *E. coli* K12 en los distintos experimentos permitió obtener los resultados de análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 21) al igual que los coeficientes de regresión estimados e intervalos de confianza (Tabla 22).

Tabla 21. Resultados ANOVA para la ecuación cuadrática de la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 (uLog) obtenida de *Design Expert 10*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F-valor	p-valor
Modelo	0,89	9	0.099	8.02	0.0169
A-[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	0,018	1	0,018	1,44	0,2839
B-[Fe ²⁺]	0,12	1	0,12	9,32	0,0283
C-pH	0,20	1	0,20	16,31	0,0099
AB	0,29	1	0,29	23,69	0,0046
AC	0,011	1	0,011	0,89	0,3892
BC	0,098	1	0,098	7,89	0,0376
A ²	0,026	1	0,026	2,11	0,2064
B ²	0,12	1	0,12	9,71	0,0263
C ²	0,028	1	0,028	2,29	0,1909
Residual	0,062	5	0,012		
Lack of Fit	0,061	3	0,02	113,68	0,0087
Pure Error	3,60·10 ⁻⁴	2	1,80·10 ⁻⁴		
Cor Total	0,95	14			

R² = 0,9352 ; R²_{adj} = 0,8185 ; C.V. = 31,88 %

El modelo presentó un F-valor de 8,02 (Tabla 21) e implicó que es estadísticamente significativo debido a que el p-valor resultó ser inferior a 0,0500. El p-valor del modelo fue 0,0169 lo cual indica que existe un 1,69% de posibilidad de que valores altos de F-valor sean debidos al ruido. El modelo además reveló que la falta de ajuste es estadísticamente significativa ya que presenta F-valor alto (113,68) y p-valor bajo (0,0087), lo que indica que el error estándar de cada experimento es significativo y no puede ser ignorado. Existe únicamente un 0,87% de probabilidad de que un F-valor de falta de ajuste sea tan grande debido al

ruido. Que la falta de ajuste sea estadísticamente significativa no es bueno ya que lo que se pretende es que el modelo se ajuste.

En este caso, 5 de los 9 factores, B, C, AB, BC y B² se encontraron que eran significativos para la Tecnología Fenton (p < 0,0500, Tabla 21). Entre las variables que fueron estudiadas, el valor del pH presentó un efecto más fuerte en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 mediante la tecnología Fenton, seguido de la concentración de Fe²⁺.

Tabla 22. Coeficientes de regresión obtenidos del análisis estadístico para la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 (uLog).

Factor	Coeficiente estimado	Grados de libertad	Error Standard	95% CI	
				Low	High
Intercept	0,16	1	0,064	-3,95 · 10 ⁻³	0,33
A-[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	0,047	1	0,039	-0,054	0,15
B-[Fe ²⁺]	-0,12	1	0,039	-0,22	-0,019
C-pH	-0,16	1	0,039	-0,26	-0,058
AB	-0,27	1	0,056	-0,41	-0,13
AC	-0,052	1	0,056	-0,20	0,091
BC	0,16	1	0,056	0,013	0,30
A ²	0,084	1	0,058	-0,065	0,23
B ²	0,18	1	0,058	0,032	0,33
C ²	0,087	1	0,058	-0,061	0,24

Mediante la realización de múltiples análisis de regresión de los datos obtenidos experimentalmente, la variable de respuesta y los factores se relacionaron con la ecuación polinómica de segundo orden (Ecuación 13).

Eficiencia de inactivación de *E. coli* K12:

$$\eta = 0,16 + 0,047A - 0,12B - 0,16C - 0,27AB - 0,052AC + 0,16BC + 0,084A^2 + 0,18B^2 + 0,087C^2$$

siendo η la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 predicha por el modelo y A, B y C los valores de las variables empleadas en la optimización.

5.3.2. Efectos de las 3 variables en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 y análisis de superficie de respuesta

Tras realizar un análisis de superficie de respuesta Box-Behnken fue posible conocer el efecto de las 3 variables ($[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$, $[\text{Fe}^{2+}]$ y pH) en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12. La influencia de estas variables en dicha eficiencia a través de la tecnología Fenton puede verse reflejada en los diagramas de superficie de contorno y de respuesta obtenidos con *Design Expert 10* (Figuras 20, 21 y 22).

La Figura 20 muestra los diagramas de superficie de contorno y de respuesta de correlaciones entre la concentración de Fe^{2+} y el valor del pH, en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 a los 3 valores del ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ empleados en la experimentación (1:1, 2:1 y 3:1). Se puede ver cómo al aumentar el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$, aumenta la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 a valores bajos tanto de pH como de concentración de Fe^{2+} . No obstante, esto no ocurre para valores altos de pH o de concentración de Fe^{2+} donde la eficiencia disminuye. Esto concuerda con los resultados obtenidos del análisis de varianza y coeficientes de regresión (Tablas 21 y 22) donde se observa que el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ no es un factor estadísticamente significativo. La eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 superó las 0,80 uLog para el valor de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 3:1$ al tomar valores de pH inferiores a 4,18 y de concentración de Fe^{2+} inferiores a $7,3 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Rodríguez-Chueca *et al.* (2012) observaron una ligera disminución en la eficiencia de inactivación de *E. coli* (de 0,35 a 0,25 uLog) al aumentar el ratio de $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 4:1$ a $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{3+}] = 10:1$ para una concentración de Fe^{3+} alta ($[\text{Fe}^{3+}] = 5$ mg/L), teniendo similitud con lo obtenido en el presente trabajo. Cengiz *et al.* (2010), estudiaron la influencia de la concentración de H_2O_2 en la eficiencia de inactivación de *E. coli* HB101 manteniendo el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 10:1$, siendo la eficiencia de inactivación mayor a mayores concentraciones de H_2O_2 .

Obtuvieron una eficiencia de inactivación de 0,36 uLog para unas concentraciones de H_2O_2 y Fe^{2+} de $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol/L y $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L, respectivamente.

La Figura 21 muestra los diagramas de superficie de contorno y de respuesta de correlaciones entre el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 a los 3 valores de concentración de Fe^{2+} empleados ($6,0 \cdot 10^{-4}$, $8,0 \cdot 10^{-4}$ y $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Se observa una disminución de la eficiencia al aumentar la concentración de Fe^{2+} . Se aprecia una influencia significativa de la concentración de Fe^{2+} , como se vio reflejado con los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Tabla 21). La eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 superó las 0,80 uLog para el valor de $[\text{Fe}^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L al tomar valores de pH inferiores a 4,18 y de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ superiores a 1,82:1. Liu *et al.* (2018) emplearon MoS_2 como co-catalizador para acelerar la reacción de Fenton y aumentar así su eficiencia en la inactivación de *E. coli*. Estos autores encontraron una disminución en la eficiencia de inactivación de *E. coli* al aumentar la concentración de Fe^{2+} debido a que Fe^{2+} en exceso puede consumir el $\cdot\text{OH}$ (Ecuación 2). Estos resultados reportados alojan similitudes con lo obtenido en el presente trabajo.

La Figura 22 muestra los diagramas de superficie de contorno y de respuesta de correlaciones entre el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ y la concentración de Fe^{2+} en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 a los 3 valores de pH empleados (3,0 4,0 y 5,0). Se puede observar cómo al disminuir el valor del pH la eficiencia aumenta. Existe, por tanto, una influencia significativa del valor del pH, al igual que se vio reflejado con los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Tabla 21). La eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 superó las 0,80 uLog para el valor de pH de 3,0 al tomar valores de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ superiores a 1,81:1 y de concentración de Fe^{2+} inferiores a $7,32 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Kim *et al.* (2010) observaron esta influencia significativa del pH en la inactivación del colífago MS2 siendo éste más susceptible a la reacción Fenton a bajos valores de pH, con aproximadamente

0,70, 1,20 y 5,80 uLog de eficiencia de inactivación observada a pH 8,0, 7,0 y 6,0 en un tiempo de reacción de 10 min, respectivamente.

Por tanto, se puede confirmar que el valor del pH mostró un fuerte efecto positivo en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12, seguido de la concentración de Fe^{2+} , lo que es consistente con los resultados del análisis de varianza y regresión.

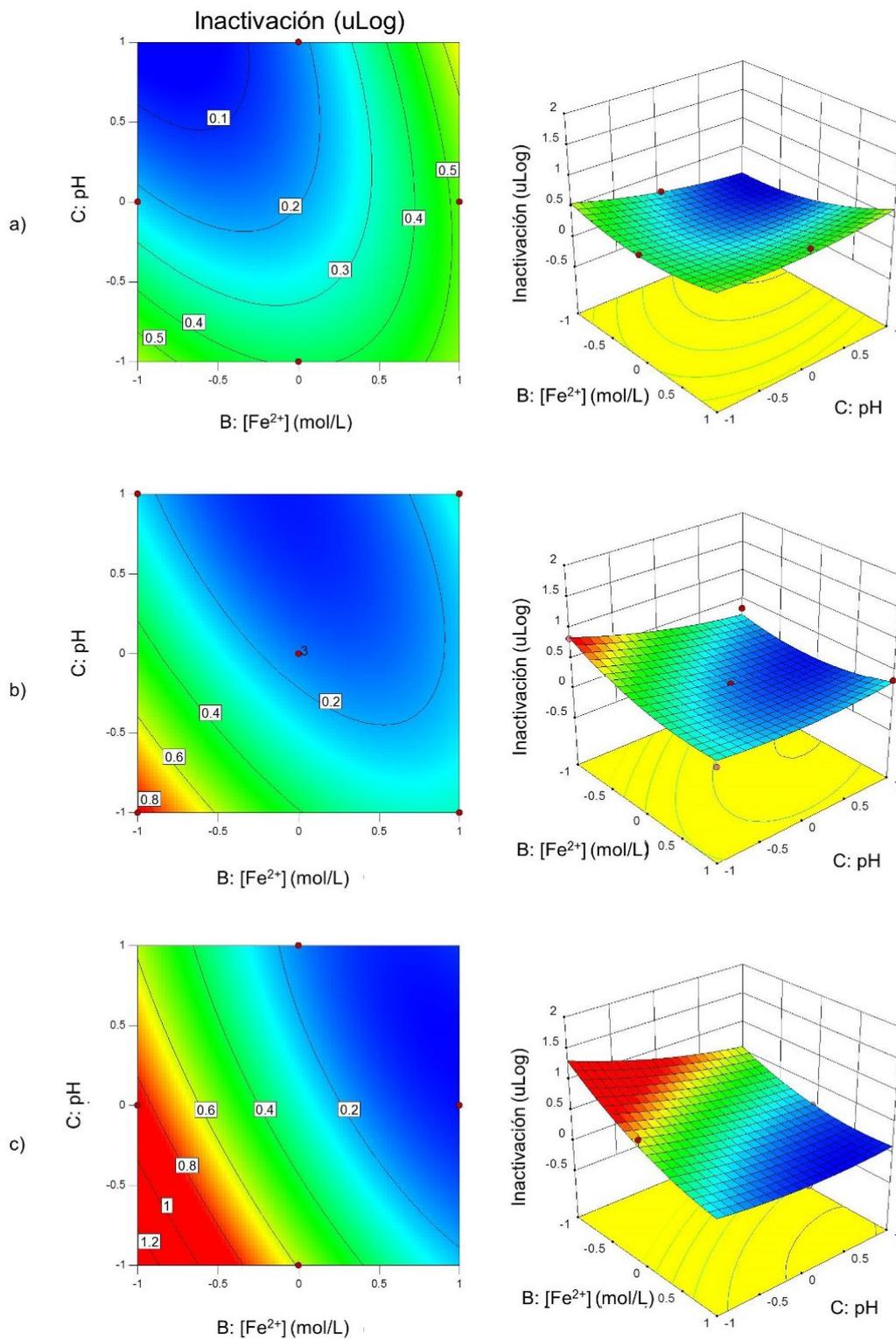


Figura 20. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para la concentración de $[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 para: a) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 1:1$; b) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 2:1$; y c) $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 3:1$.

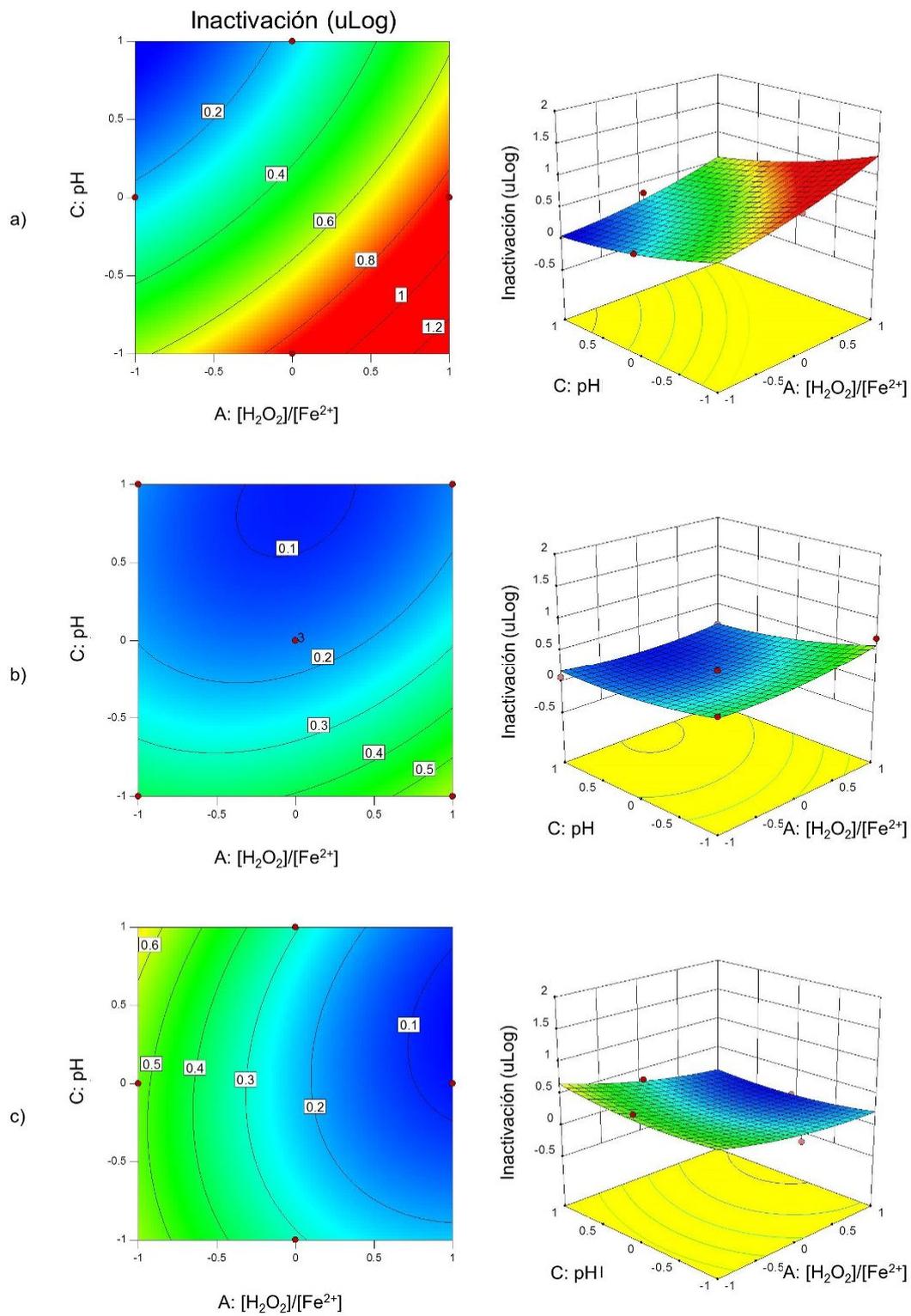


Figura 21. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ y el valor del pH en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 para: a) $[Fe^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; b) $[Fe^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L; y c) $[Fe^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L.

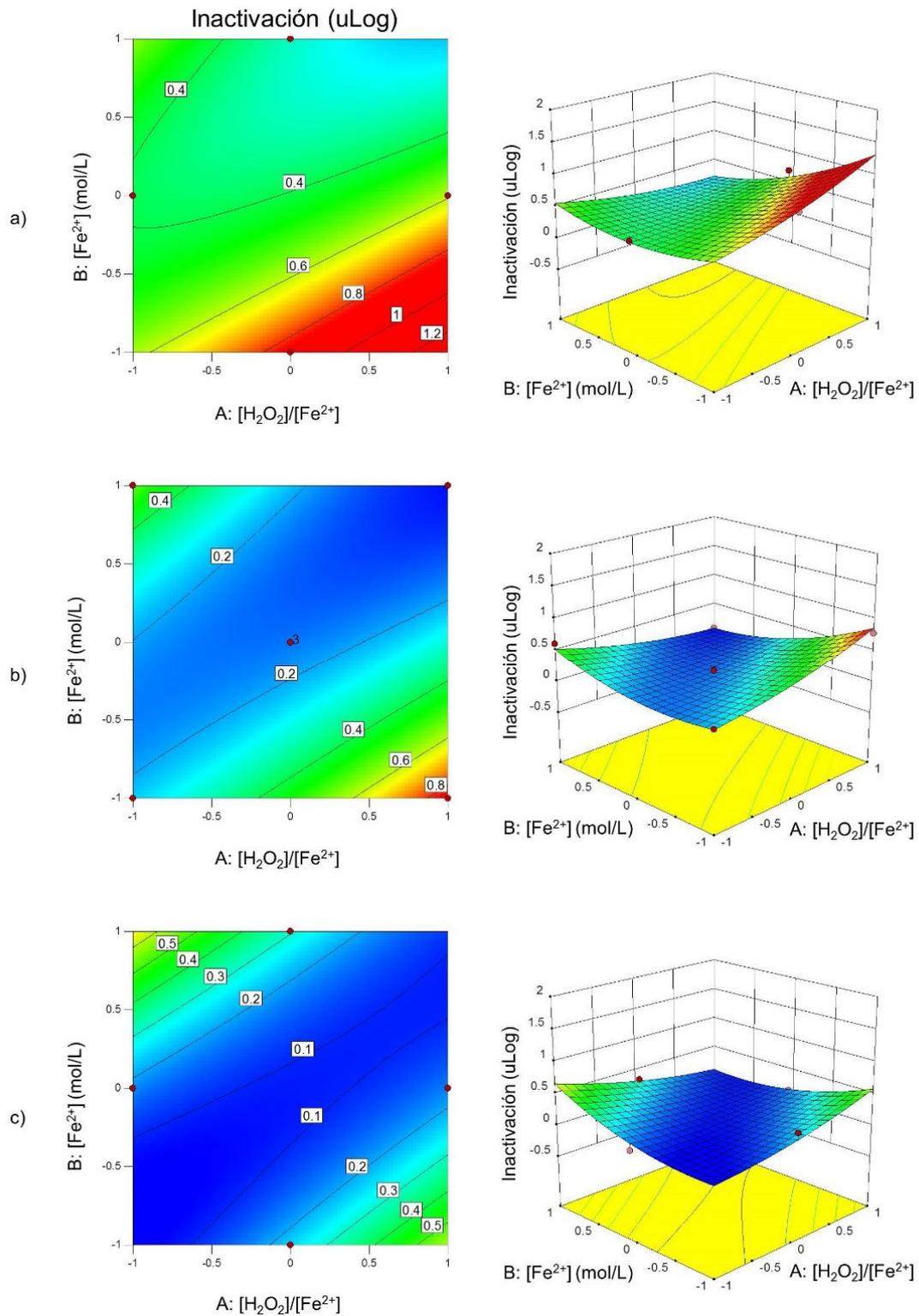


Figura 22. Diagramas de superficie de contorno y de respuesta para el ratio molar $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ y la concentración de $[\text{Fe}^{2+}]$ en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 para: a) pH = 3,0; b) pH = 4,0; y c) pH = 5,0.

5.3.3. Condiciones óptimas y modelo de verificación

Tras el conteo en placa Petri de las colonias formadas en cada experimento y con las respuestas experimentales de eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 en uLog, se obtuvieron las condiciones óptimas para la máxima inactivación de *E. coli* K12 empleando la tecnología Fenton. Para ello, se analizó el punto estacionario en la superficie de respuesta. Las condiciones óptimas de ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$, concentración de Fe^{2+} y el valor del pH fueron de 3:1, $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L y 3,0, respectivamente, y en conjunto lograron una eficiencia máxima de inactivación de 1,318 uLog según el valor predicho por el modelo.

Para predecir la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 y poder verificar el modelo, se empleó la ecuación cuadrática (Ecuación 13) utilizando las condiciones de cada experimento de modo que se pudieron comparar los valores obtenidos experimentalmente con los predichos teóricamente (Tabla 23). El valor que tomó el residuo de cada experimento fue de diferente magnitud y símbolo lo cual se puede traducir en una mala precisión del modelo, tal y como se puede observar en la Figura 23 que representa los valores predichos frente a los obtenidos experimentalmente. Se aplicó la tecnología Fenton a la condición óptima para poder observar la exactitud del modelo. La Tabla 23 muestra una eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 de 0,892 uLog obtenida experimentalmente, resultando alejada del valor predicho (1,318 uLog), presentando un error del 32,32% (Tabla 24) lo que indica un mal acuerdo entre los datos del modelo y los datos experimentales. Diao *et al.* (2004) lograron una eficiencia de inactivación de *E. coli* del 99,4% empleando bajas concentraciones de los reactivos (8,5 mg/L de H_2O_2 y 0,85 mg/L de Fe^{2+}) para un pH ajustado a un valor de 4,0 y un tiempo de reacción de 10 min. Esta eficiencia de inactivación fue alta frente a las 0,892 uLog (87,18%) alcanzadas en el presente trabajo. Una posible explicación para el alto valor del error y la baja eficiencia de inactivación puede ser la influencia de otro tipo de variables que no se consideraron en el presente trabajo y que pudieron afectar a las condiciones de reacción.

Tabla 23. Comparación de los valores obtenidos experimentalmente y los predichos teóricamente para la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12.

#	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Respuesta: Eficiencia de inactivación de <i>E. coli</i> K12 (uLog)		Residuo
				Valor experimental	Valor predicho	
				[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	[Fe ²⁺] (mol/L)	
1	1:1	6,0·10 ⁻⁴	4,0	0,230	0,228	0,002
2	3:1	6,0·10 ⁻⁴	4,0	0,778	0,863	-0,085
3	1:1	1,0·10 ⁻³	4,0	0,614	0,529	0,085
4	3:1	1,0·10 ⁻³	4,0	0,079	0,082	-0,003
5	1:1	8,0·10 ⁻⁴	3,0	0,412	0,392	0,020
6	1:1	8,0·10 ⁻⁴	5,0	0,698	0,591	0,107
7	3:1	8,0·10 ⁻⁴	3,0	0,071	0,179	-0,108
8	3:1	8,0·10 ⁻⁴	5,0	0,149	0,168	-0,019
9	2:1	6,0·10 ⁻⁴	3,0	0,841	0,864	-0,023
10	2:1	1,0·10 ⁻³	3,0	0,207	0,312	-0,105
11	2:1	6,0·10 ⁻⁴	5,0	0,339	0,234	0,105
12	2:1	1,0·10 ⁻³	5,0	0,329	0,306	0,023
13	2:1	8,0·10 ⁻⁴	4,0	0,150	0,161	-0,011
14	2:1	8,0·10 ⁻⁴	4,0	0,157	0,161	-0,004
15	2:1	8,0·10 ⁻⁴	4,0	0,176	0,161	0,015
Condición óptima	3:1	6,0·10 ⁻⁴	3,0	0,892	1,318	-0,426

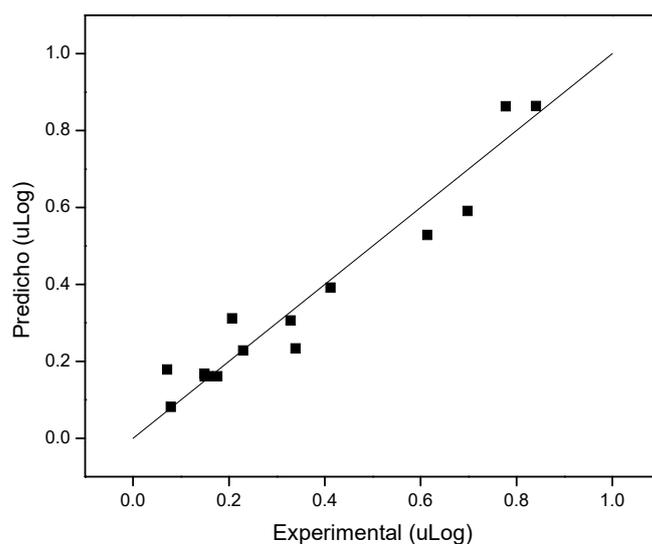


Figura 23. Valores predichos por la ecuación cuadrática frente a los valores experimentales en la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12.

Tabla 24. Error en el punto óptimo de la inactivación de *E. coli* K12.

Inactivación predicha (uLog)	1,318
Inactivación Experimental (uLog)	0,892
Error (%)	32,322

5.4. Comparación de las condiciones óptimas a través de la tecnología Fenton

Finalmente, una vez obtenidas las condiciones óptimas de la eficiencia de decoloración (ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 3:1$, $[Fe^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L y pH = 3,0) y constante de velocidad de reacción (ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 1,78:1$, $[Fe^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L y pH = 3,65) del azul de metileno como compuesto orgánico simple y la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 como compuesto orgánico complejo (ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 3:1$, $[Fe^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L y pH = 3,0) a través de la oxidación mediante la tecnología Fenton, se dispuso a realizar una comparación cualitativa de ellas.

En lo que a eficiencia de decoloración de azul de metileno e inactivación de *E. coli* K12 se refiere, se observó una semejanza en el valor que tomó el pH (3,0) y el ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ (3:1). No obstante, la concentración de Fe^{2+} varió de una optimización a otra, siendo de $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L para la decoloración del AM y de $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L para la inactivación de *E. coli* K12. A la vista de los resultados obtenidos mediante análisis estadístico y lo observado en los análisis de contorno y superficie de respuesta, para ambas optimizaciones la concentración Fe^{2+} tiene una influencia significativa, aumentando la eficiencia de decoloración de AM con un aumento de dicha concentración, a diferencia de la eficiencia de inactivación de *E. coli* K12 que disminuye al aumentar el valor de dicha variable. La variable que tuvo más efecto en la decoloración del AM fue el ratio $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$, mientras que el valor del pH mostró un mayor efecto en la inactivación de *E. coli* K12, siendo el menos influenciado en la eficiencia de decoloración de AM.

El Fe^{2+} en ambos casos actúa como catalizador de la reacción Fenton, no obstante, su concentración óptima es la mínima impuesta en el diseño Box-Benhken para la inactivación de *E. coli* K12 y la máxima para la decoloración de AM. En la Ecuación 1 se observaba la formación de $\cdot\text{OH}$ debida a la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y, por tanto, a mayor concentración de Fe^{2+} , mayor es la formación de $\cdot\text{OH}$. Un solo ataque de $\cdot\text{OH}$ a la estructura del AM conduce a su decoloración, mientras que la inactivación de un microorganismo necesita una cantidad de daño acumulativo, es decir, el número de $\cdot\text{OH}$ necesarios para la inactivación de una bacteria es mucho mayor que el necesario para la decoloración de AM (Marugán *et al.*, 2010). Según Fisher *et al.* (2013), confirman que mientras los $\cdot\text{OH}$ producidos oxidan la mayoría de compuestos orgánicos simples hasta lograr una completa decoloración, la inactivación de *E. coli* (compuesto orgánico complejo) no se vio implicada por la producción de ellos. La formación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), con menor poder oxidativo, fue reportada como la responsable en la inactivación de bacterias. (Keane *et al.*, 2014). La eficiencia de inactivación de *E. coli* K12, por tanto, disminuye al aumentar la concentración de Fe^{2+} , debido a que el Fe^{2+} podría reaccionar con los $\cdot\text{OH}$ formados (Ecuación 2), disminuyendo la posibilidad de que los $\cdot\text{OH}$ reaccionen para formar $^1\text{O}_2$ (Ecuaciones 6, 7 y 8).

El otro aspecto a comparar se trató de la influencia del valor del pH, el cual tiene una influencia significativa para la inactivación de *E. coli* K12 debido a que la reacción Fenton transcurre de manera óptima a valores ácidos de un rango entre 2,8 y 3,0 (Rozas *et al.*, 2010). El pH juega un papel importante en la tecnología Fenton debido a que las especies de hierro y sus actividades catalíticas se ven afectadas por el valor del pH (Bagal *et al.*, 2014). A diferencia de lo ocurrido en la inactivación de *E. coli* K12, el valor del pH no es tan influenciado en la decoloración de AM como consecuencia de la gran influencia que toma el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ o la concentración de Fe^{2+} .

Se observó, tras las respectivas optimizaciones, cómo los modelos no siguen un comportamiento igual con las variables empleadas en cuanto a eficiencias de

eliminación. La decoloración de AM mediante oxidación a través de la tecnología Fenton consiguió una alta eficiencia, mientras que la inactivación consiguió una baja eficiencia que se puede traducir en que la tecnología Fenton no es viable para la inactivación de *E. coli* K12 aunque se puede pensar en otra serie de tecnologías que vayan acopladas a ella para aumentar su eficiencia de inactivación (Foto-Fenton, Sono-Fenton, Electro-Fenton, entre otras) (Babuponnusami *et al.*, 2014).

6. CONCLUSIONES

- La eficiencia óptima de decoloración de AM mediante oxidación a través de la tecnología Fenton fue del 94,57% para unas condiciones de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$, $[\text{Fe}^{2+}]$ y pH de 3:1, $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L y 3,0, respectivamente. Las variables que tuvieron mayor influencia sobre el modelo fueron el ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ seguido de la concentración de Fe^{2+} y el valor del pH. La constante óptima de velocidad de reacción del AM fue de $2,081 \text{ min}^{-1}$ para unas condiciones de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$, $[\text{Fe}^{2+}]$ y pH de 1,78:1, $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L y 3,65, respectivamente. La variable que tuvo mayor influencia sobre el modelo fue la concentración de Fe^{2+} .
- La eficiencia óptima de inactivación de *E. coli* K12 a través de la tecnología Fenton fue de 0,892 uLog para unas condiciones de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$, $[\text{Fe}^{2+}]$ y pH de 3:1, $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L y 3,0, respectivamente. Las variables que tuvieron mayor influencia sobre el modelo fueron el valor del pH seguido de la concentración de Fe^{2+} .
- Tras comparar los modelos se encontraron iguales condiciones óptimas de ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ y pH (3:1 y 3,0) y diferentes valores de concentración de Fe^{2+} , siendo estos la mínima de $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L para la inactivación de *E. coli* K12 y la máxima de $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L para la decoloración de AM. El valor del pH tomó mayor influencia en la inactivación de *E. coli* K12 que en la decoloración de AM debido a: i) El rango de valores ácidos a los que transcurre la reacción Fenton; y ii) Una mayor influencia del ratio $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ en la decoloración de AM.
- De acuerdo a los resultados obtenidos se rechaza la hipótesis planteada en el presente trabajo debido a que se obtuvo una eficiencia de decoloración de AM, como compuesto orgánico simple, del 94,57% frente a las 0,892 uLog (87,18%) de eficiencia de inactivación de *E. coli* K12, como compuesto orgánico complejo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abelló, J. 2014. Estudio piloto de la aplicación de Fenton heterogéneo para la inactivación de *Escherichia coli* en aguas residuales de docencia en la facultad de ciencias. (Trabajo Fin de Grado para optar a título de microbióloga industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.
- Almeida, M., Erthal, R., Padua, E., Silveira, L. and Escaleira, L. 2008. Response Surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76(5): 965-977.
- Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A. and Marotta, R. 1999. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today* 53(1): 51-59.
- Babuponnusami, A. and 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.
- Bagal, M. and Gogate, P. 2014. Wastewater treatment using hybrid treatment schemes based on cavitation and Fenton chemistry: A review. *Sonochemistry* 21(1): 1-14.
- Baraño, P. and Tapia, L. 2004. Domestic wastewater treatment: the Chilean situation. *Ciencia & Trabajo* 6(13): 111-117.
- Basturk, E. and Karatas, M. 2014. Advanced oxidation of Reactive Blue 181 solution: A comparison between Fenton and Sono-Fenton Process. *Ultrasonics SonoChemistry* 21(5): 1881-1885.

- Bataineh, H., Pestovsky, O. and Bakac, A. 2012. pH-induced mechanistic changeover from hydroxyl radicals to iron(IV) in the Fenton reaction. *The Royal Society of Chemistry* 3(5): 1594-1599.
- Belhadj, H. 2016. Sono-Fenton process for metronidazole degradation in aqueous solution: Effect of acoustic cavitation and peroxydisulfate anion. *Ultrasonics SonoChemistry* 33: 164-169.
- Berdonces, J. 2008. La problemática del tratamiento del agua potable. *Medicina Naturista* 2(2): 69-75.
- Bouasla, C., Samar, M. and Ismail, F. 2010. Degradation of methyl violet 6B dye by the Fenton process. *Desalination* 254(1-3): 35-41.
- Burbano, A., Dionysiou, D., Suidan, T. and Richardson, T. 2005. Oxidation kinetics and effect of pH on the degradation of MTBE with Fenton reagent. *Water Research* 39: 107-118.
- Carrasco, W. 2011. Políticas públicas para la prestación de los servicios de agua potable y saneamiento en las áreas rurales. CEPAL Documentos de Proyectos 388.
- Celeste, D., Campos, L., Domínguez, I. and Sosa, A. 2003. Verificación rápida de la pureza microbiológica de bancos de *Escherichia coli* K12. *Biotecnología Aplicada* 20(4): 231-237.
- Cengiz, M., Otker, M. and Balcioglu, I. 2010. Treatment of *E. coli* HB101 and the tetM gene by Fenton's reagent and ozone in cow manure. *Journal of Environmental Management* 91(12): 2590-2593.

- Chowdhury, S., Khan, N., Kim, G.H., Harris, J., Longhurst, P. and Bolan, N.S. 2016. Zeolite for Nutrient Stripping From Farm Effluents. *Environmental Materials and Waste*, 569-589.
- Cohen, M., Ferroudj, N., Combes, A., Pichon, V. y Abramson, S. 2019. Tracking the degradation pathway of three model aqueous pollutants in a heterogeneous Fenton process. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 7(2): 10287.
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) y Organización para la cooperación y el desarrollo Económico (OCDE), 2016. Evaluaciones del desempeño ambiental. Santiago de Chile: CEPAL/OCDE
- Council Directive 91/271/EEC, 1991. Council Directive 91/271/ EEC of 21 May 1991 concerning urban waste-water treatment. *Official Journal of the European Communities*, Belgium.
- Diao, H.F., Li, X.Y., Gu, J.D., Shi, H.C. and Xie, Z.M. 2004. Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. *Process Biochemistry* 39(11): 1421-1426.
- Domenèch, X., Jardim, W.F. and Litter, M.I. 2001. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. In Blesa, M. Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea. CYTED, La Plata, Argentina, pp 1-26.
- Doosti, M.R., Kargar, R. and Sayadi, M.H. 2012. Water treatment using ultrasonic assistance: A review. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 2(2): 96-110.

- Dutta, K., Mukhopadhyay, S., Bhattacharjee, S. and Chaudhuri, B. 2001. Chemical oxidation of methylene blue using a Fenton-like reaction. *Journal of Hazardous Materials* 84(1): 57-71.
- Escalante-Pozos, V. and Bandala, E.R. 2014. Calidad del agua y su relación con alimentos: aplicación de procesos Fenton y tipo Fenton en la eliminación de contaminantes en agua. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 8(1): 34-47.
- Fernandes, N., Barroso, L., Gonçalves, G., Fleury, S., Soares, M.S., Rodrigues, G. and Neves, R. 2018. Removal of azo dy using Fenton and Fenton-like processes: Evaluation of process factors by Box-Behnken designs and ecotoxicity tests. *Chemico-Biological Interactions* 291: 47-54.
- Ferraz, E.R.A., Oliveira, G.A.R., Grando, M.D., Lizier, T.M., Zanoni, M.V.B. y Oliveira, D.P. 2013. Photoelectrocatalysis base don Ti/TiO₂ nanotubes removes toxic properties of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1 from aqueous chloride samples. *Journal of Environmental Management* 124: 108-114.
- Figueroa, G. 2003. Optimización de una superficie de respuesta utilizando JMP IN. *Mosaicos Matemáticos* 11: 17-23.
- Figueroa, P. 2011. Brote epidémico en Europa, por *E. coli* altamente virulenta causante del síndrome urémico hemolítico. *Revista de Evidencia e Investigación Clínica* 4(3): 76-79.
- Fisher, M.B., Keane, D.A., Fernández-Ibáñez, P., Colreavy, J., Hinder, S.J., McGuigan, K.G. and Pillai, S.C. 2013. Nitrogen and copper doped solar light active TiO₂ photocatalysts for water decontamination. *Applied Catalysis B: Environmental* 130-131: 8-13.

- Galvis, A., Aponte, G., Echeverry, D., González, M. and Cardona, D. 2005. Evaluación del Funcionamiento de un Generador de Ozono a escala piloto en la desinfección de agua para consumo de agua. *Ingeniería y competitividad* 7(1): 65-72.
- Gao, A., Gao, H., Zhu, Z. and Jiao, Z. 2016. Application of response methodology to optimize the treatment of cepheims pharmaceutical wastewater by ultrasound/Fenton process. *Desalination and Water Treatment* 57(23): 10866-10877.
- Gao, M., An, T., Li, G., Nie, G., Yip, H., Zhao, H. and Wong, P. 2012. Genetic studies of the role of fatty acid and coenzyme A in photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. *Water Research* 46(13): 3951-3957.
- Gautam, R. and Chattopadhyaya, M. 2016. Remediation Technologies for Water Cleanup: New Trends. *Nanomaterials for Wastewater Remediation* 1: 19-32.
- Ginés, E. 2014. Los ultrasonidos como alternativa a la desinfección con hipoclorito: efectos sobre la vida útil en boniato (*Ipomoea batatas*) mínimamente procesado (Trabajo fin de grado para optar a título de ingeniera alimentaria). Universitat Politècnica de Catalunya.
- Gore, A. [TED]. 2016. The case for optimism on climate change [Archivo de video]. Recuperado de https://www.ted.com/talks/al_gore_the_case_for_optimism_on_climate_change
- Guimarães, J. R., Ibáñez, J., Litter, M. I. and Pizarro, R. 2001. Desinfección de agua. Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, 305-316.

- Gulkaya, Í., Surucu, G. and Dilek, F. 2006. Importance of $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ratio in Fenton's treatment of a carpet dyeing wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 136: 763-769.
- Haber, F., and Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society A* 147: 332-351.
- Ivanova, I., Trofimova, S., Piskarev, I., Aristova, N., Burhina, O. and Soshnikova, O. 2012. Mechanism of chemiluminescence in Fenton reaction. *Journal of Biophysical Chemistry* 3(1): 88-100.
- Jaramillo, C. and Taborda, G. 2006. La fotocatalisis: Aspectos fundamentales para una buena remoción de contaminantes. *Revista Universidad de Caldas* 26(1-2): 71-88.
- Jaramillo, C. 2010. Desinfección del agua para uso humano. (Proyecto para obtener el título de ingeniero civil). Politécnica Nacional, Escuela de Ingeniería Civil y Ambiental, Quito, Ecuador.
- Keane, D.A., McGuigan, K.G., Fernández, P., Polo-López, M.I., Byrne, J.A., Dunlop, P.S.M., O'Shea, K., Dionysiou, D. and Pillai, S.C. 2014. Solar photocatalysis for water disinfection: materials and reactor design. *Catalysis Science & Technology* 4: 1211-1226.
- Kim, J.Y., Lee, C., Sedlak, D.L., Yoon, J. and Nelson, K.L. 2010. Inactivation of MS2 coliphage by Fenton's reagent. *Water Research* 44: 2647-2653.
- Koppenol, W.H. and Libman, J.F. 1984. The Oxidizing Nature of the Hydroxyl Radical. A Comparison with the Ferryl Ion (FeO^{2+}). *The Journal of Physical Chemistry* 88(1): 99-101.

- Kumar, S., Malyan, S.K., Kumar, A. and Bishnoi, N. 2016. Optimization of Fenton's Oxidation by Box-Behnken Design of Response Surface Methodology for Landfill Leachate. *Journal of Materials and Environmental Science* 7(12): 4456-4466.
- Kumar, V., Giri, B., Raza, N., Roy, K., Kim, K., Rai, B. and Singh, R. 2018. Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges. *Bioresource Technology* 253: 355-367.
- Lee, H., Lee, H.J., Sedlak, D. and Lee, C. 2013. pH-Dependent reactivity of oxidants formed by iron and copper-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide. *Chemosphere* 92(6): 652-658.
- Levenspiel, O. 1974. Introducción y Cinética de las Reacciones Homogéneas. In Reverte. *Ingeniería de las Reacciones Químicas*. Barcelona 1-38.
- Liu, J., Dong, C., Deng, Y., Ji, J., Bao, S., Chen, C., Shen, B., Zhang, J. and Xing, M. 2018. Molybdenum sulfide Co-catalytic Fenton reaction for rapid and efficient inactivation of *Escherichia coli*. *Water Research* 146: 312-320.
- Liu, S., Huang, J., Ye, Y., Zhang, A., Pan, L. and Chen, X. 2013. Microwave enhanced Fenton process for the removal of methylene blue from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal* 215-216: 586-590.
- Maamir, W., Ouahabi, Y., Poncin, S., Li, H. and Bensadok, K. 2017. Effect of Fenton pretreatment on anaerobic digestion of olive mill wastewater and olive mill solid waste in mesophilic conditions. *International Journal of Green Energy* 14(6): 555-560.

- Mansoorian, H., Bazrafshan, E., Yari, A. and Alizadeh, M. 2014. Removal of Azo Dyes From Aqueous Solution Using Fenton and Modified Fenton Processes. *Health Scope* 3(2): 1-9.
- Márquez-Bravo, L. 1998. *Desinfección solar*. Instituto mexicano de tecnología del agua.
- Marugán, J., van Grieken, R., Pablos, C. and Sordo, C. 2010. Analogies and differences between photocatalytic oxidation of chemicals and photocatalytic inactivation of microorganisms. *Water Research* 44: 789-796.
- Massoud, M., Tarhini, A. and Nasr, J. 2009. Decentralized approaches to wastewater treatment and management: Applicability in developing countries. *Journal of Environmental Management* 90(1): 652–659.
- Melgoza, D., Hernández-Ramírez, A. and Peralta-Hernández, J.M. 2009. Comparative efficiencies of the decolourization of Methylene Blue using Fenton's and photo-Fenton's reactions. *Photochemical & Photobiological Sciences* 8: 596-599.
- Mohajeri, S., Abdul, H., Hasnain, M., Bashir, M., Mohajeri, L. and Nordin, M. 2010. Influence of Fenton reagent oxidation on mineralization and decolorization of municipal landfill leachate, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineerin*, 45(6): 692-698.
- Nordén, B. and Tjerneld, F. 1982. Structure of Methylene Blue- DNA Complexes Studied by Linear and Circular Dichroism Spectroscopy. *Biopolymers* 21: 1713-1734.

- Nosaka, Y. and Nosaka, A.Y. 2013. Identification and Roles of the Active Species Generated on Various Photocatalysts. In Pichat, P., Photocatalysis and Water Purification 1-24.
- Olabe, A., González-Eguino, M. and Ribera, T. 2016. [Documento de trabajo: 12/2016]. El Acuerdo de París y el fin de la era del carbón. Madrid: Real Instituto Elcano.
- Oliveira, G.A.R., Ferraz, E.R.A., Chequer, F.M.D., Grando, M.D., Angeli, J.P.F., Tsuboy, M.S., Marcarni, J.C., Mantovani, M.S., Osugi, M.E., Lizer, T.M., Zanoni, M.V.B. and Olibeira, D.P. 2010. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 703(2): 200-208.
- Olmedo, M.T. 2008. Subproductos de la desinfección del agua por el empleo de compuestos de cloro. Efectos sobre la salud. Higiene y Sanidad Ambiental 8: 335-342.
- Organización de las Naciones Unidas. 2015. Asamblea General A/Res/70/01: Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. Naciones Unidas.
- Ortega-Gómez, E., Fernández-Ibáñez, P., Ballesteros, M.M., Polo-López, M.I., Esteban, B. and Sánchez, J.A. 2012. Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on *Enterococcus faecalis* survival. Water Research 46: 6154-6162.
- Pignatello, J., Oliveros, E. and MacKay, A. 2006. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton

Reaction and Related Chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 36(1): 1-84.

- Ramírez, F. 2005. Desinfección del agua con cloro y cloraminas. *Técnica Industrial* 260: 55-63.
- Reynolds, K. 2002. Tratamiento de Aguas Residuales en Latinoamérica: Identificación del Problema. *Agua Latinoamérica: De La Llave* 12: 48-49.
- Rodríguez-Chueca, J., Mosteo, R., Ormad, M.P. and Ovelleiro, J.L. 2012. Factorial experimental design applied to *Escherichia coli* disinfection by Fenton and photo-Fenton processes. *Solar Energy* 86: 3260-3267.
- Romero, M. 2008. Tratamientos Utilizados en Potabilización del Agua. Recuperado de http://www.fgsalazar.net/LANDIVAR/ING-PRIMERO/boletin08/URL_08_ING02.pdf
- Roudi, A., Chellipan, S., Wan Mohtar, W.H. and Kamyab, H. 2018. Prediction and Optimization of the Fenton Process for the Treatment of Landfill Leachate Using an Artificial Neural Network. *Water and Wastewater Treatment* 10(5): 595.
- Rozas, O., Contreras, D., Mondaca, M.A., Pérez-Moya, M. and Mansilla, H.D. 2010. Experimental designs of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillins solutions. *Journal of Hazardous Materials* 177(1-3): 1025-1030.
- Rubio-Clemente, A., Chica, E. and Pañuela, G. 2014. Aplicación del proceso Fenton en el tratamiento de aguas residuales de origen petroquímico. *Ingeniería y Competitividad: Ingeniería Ambiental* 16(2): 211-223.

- Salazar, R., García-Segura, S., Ureta-Zañart, M.S. and Brillas, E. 2011. Degradation of disperse azo dyes from waters by solar photoelectro-Fenton. *Electrochimica Acta* 56(18): 6371-6379.
- Saleh, R. and Taufik, A. 2019. Degradation of methylene blue and congo red dyes using Fenton, photo-Fenton, sono-Fenton, and sonophoto-Fenton methods in the presence of iron (II,III) oxide/zinc/ oxide/Graphene (Fe_3O_4 / ZnO /Graphene) composites. *Separation and Purification Technology* 210: 563-573.
- Salgado, P., Melin, V., Contreras, D., Moreno, Y. and Mansilla, H. 2013. Fenton reaction driven by iron ligands. *Journal of de Chilean Chemical Society* 58(4): 2096-2101.
- Salgado, P. 2017. Especies oxidantes producidas por sistemas Fenton y tipo Fenton conducidos por 1,2-dihidroxibencenos. (Tesis para optar a Doctor en Ciencias con mención en Química). Universidad de Concepción.
- Salgado, P., Melin, V., Albornoz, M., Mansilla, H., Vidal, G. and Contreras, D. 2018. Effects of pH and substituted 1,2-dihydroxybenzenes on the reaction pathway of Fenton-like systems. *Applied Catalysis B: Environmental* 226: 93-102.
- Sarria, V., Parra, S., Rincón, A., Torres, R. and Pulgarín, C. 2005. Nuevos sistemas electroquímicos y fotoquímicos para el tratamiento de aguas residuales y de bebida. *Revista colombiana de química* 34(2): 161-173.
- Sawyer, D.T. 1988. The Chemistry and Activation of Dioxygen Species (O_2 , O_2^+ , and H_2O_2) in Biology. *Oxygen Complexes and Oxygen Activation by Transition Metals* 131-148.

- Sun, J., Sun, S., Wang, G. and Qiao, L. 2007. Degradation of azo dye Amido black 10B in aqueous solution by Fenton oxidation process. *Dyes and Pigments* 74: 647-652.
- Tayeb, A., Tony, M. and Mansour, S. 2018. Application of Box-Behnken factorial design for parameters optimization of basic dye removal using nano-hematite photo Fenton tool. *Applied Water Science* 8: 138.
- Trapote, M.C. and Martínez López, B. 2012. Dossier: Regeneración y reutilización de las aguas residuales. *Técnica Industrial* 298: 32-44.
- Vacchi, F., Fernandes, A., Vendemiatti, J., Morales, D., Ormond, A., Freeman, H., Zocolo, G., Boldrin, M.V. and Umbuzeiro, G. 2013. Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. *Science of The Total Environment* 442: 302-309.
- Vacchi, F., von der Ohe, P., Fernandes, A., Vendemiatti, J., Azevedo, C., Gonçalves, J., Ferreira, B., Boldrin, M., Henry, T., Nogueira, A., Aragao, G. 2016. Occurrence and risk assessment of an azo dye – The case of Disperse Red 1. *Chemosphere* 156: 95-100.
- Vargas, C., Rojas, R. and Joseli, J. 1998. Control y vigilancia de la calidad del agua de consumo humano. Lima: CEPIS pp. 65-68, 182-185.
- Venereo, J.R. 2002. Daño oxidativo, Radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar* 31(2): 126-133.
- Vidal, G. and Araya, F. 2014. Las Aguas Servidas y su Depuración en Zonas Rurales: Situación Actual y Desafíos. Concepción: Universidad de Concepción.

- Vikrant, K., Shekhar, B., Raza, N., Roy, K., Kim, K.H., Rai, B. and Sharan, R. 2018. Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges. *Bioresource Technology* 253: 355-367.
- Villanueva, M., Hernández, A. and Peralta J.M. 2010. Generación de especies oxidantes por métodos homogéneos y heterogéneos. *Ciencia UANL XIII(2)*: 161-166.
- von Sperling, M. and Chernicharo, C.A. 2005. *Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions*. London: IWA 1452 p.
- Weng, C., Lin, Y. Chang, C. and Liu, N. 2013. Decolourization of direct blue 15 by Fenton/ultrasonic process using a zero-valent iron aggregate catalyst. *Ultrasonics Sonochemistry* 20(3): 970-977.
- Weng, C. and Huang, V. 2015. Application of Fe⁰ aggregate in ultrasound enhanced advanced Fenton process for decolorization of methylene blue. *Journal of industrial and Engineering Chemistry* 28: 153-160.
- Wright, H.B. and Cairns, W.L. 1996. *Desinfección de agua por medio de luz ultravioleta* Trojan Technologies Inc. Ontario, Canadá.
- Yang, L., Yang, L., Ding, L., Deng, F., Luo, X. and Luo S. 2019. Principles for the Application of Nanomaterials in Environmental Pollution Control and Resource Reutilization. *Nanomaterials for the Removal of Pollutants and Resource Reutilization* 1: 1-23.
- Youssef, N., Shaban, S., Ibrahim, F. and Mahmoud, A. 2016. Degradation of methyl orange using Fenton catalytic reaction. *Egyptian Journal of Petroleum* 25(3): 317-321.

8. ANEXOS

Cinética de decoloración del AM para los distintos experimentos

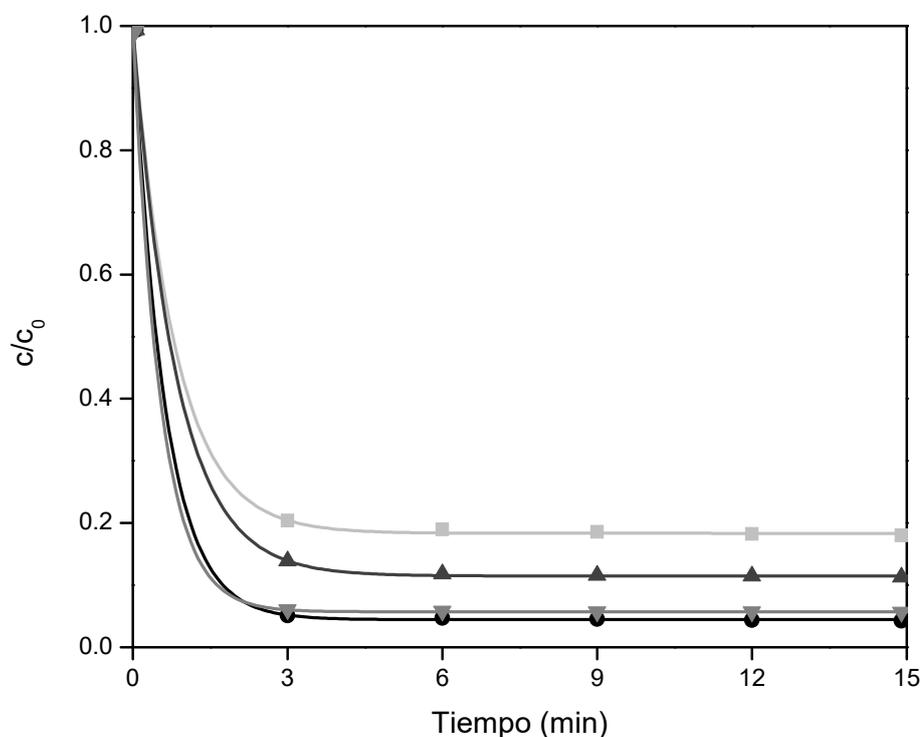


Figura A.1. Cinética de decoloración del AM a un valor de pH = 3,0 para: a) (\square) $k_{app} = 1,221 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 1:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; b) (\blacktriangle) $k_{app} = 1,197 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 2:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; c) (\blacktriangledown) $k_{app} = 1,891 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 2:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ y d) (\bullet) $k_{app} = 1,316 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 3:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.

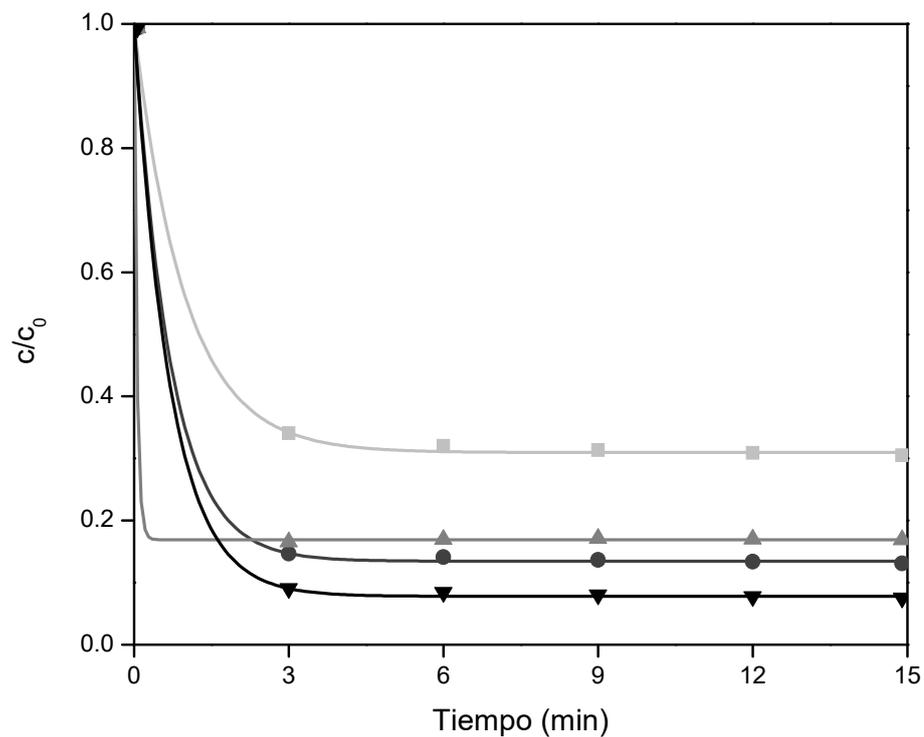


Figura A. 2. Cinética de decoloración del AM a un valor de pH = 4,0 para: a) (■) $k_{app} = 1,020 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 1:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; b) (▲) $k_{app} = 1,938 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 1:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; c) (●) $k_{app} = 1,410 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 3:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ y d) (▼) $k_{app} = 1,429 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 3:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$.

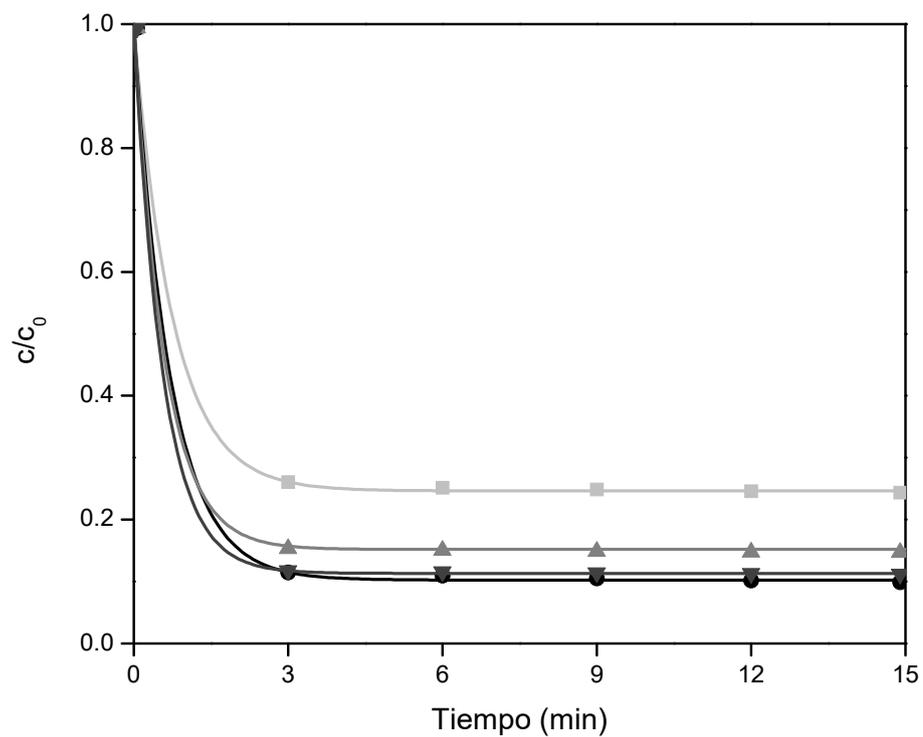


Figura A. 3. Cinética de decoloración del AM a un valor de pH = 5,0 para: a) (■) $k_{app} = 1,628 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 1:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; b) (▲) $k_{app} = 1,688 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 2:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; c) (▼) $k_{app} = 1,785 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 2:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ y d) (●) $k_{app} = 1,416 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 3:1$ y $[\text{Fe}^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.

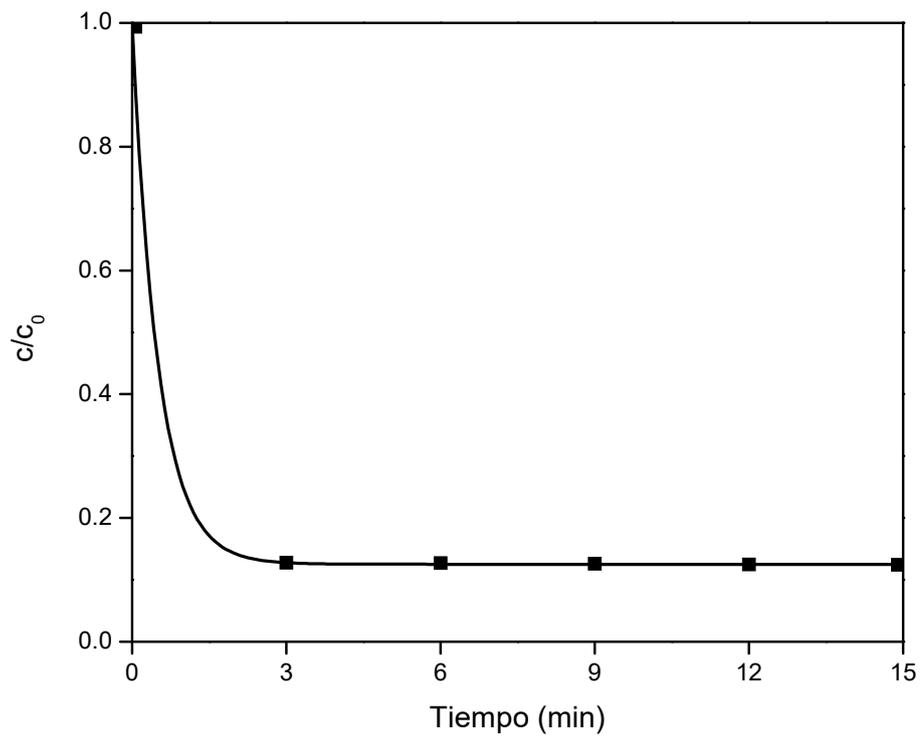


Figura A. 4. Cinética de decoloración del AM para: a) (■) $k_{app} = 1,964 \text{ min}^{-1}$ siendo $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}] = 2:1$, $[\text{Fe}^{2+}] = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ y $\text{pH} = 4,0$.

Ensayos de control de la reacción Fenton para la decoloración de AM e inactivación de *E. coli* K12

Tabla A.1. Influencia del Fe^{2+} en la decoloración de AM.

Tiempo (min)	Absorbancias			Concentración (mol/L)	
	A1	A2	A3	A	c
0	-	-	-	3,503	$5,30 \cdot 10^{-5}$
3	3,521	3,521	3,521	3,521	$5,32 \cdot 10^{-5}$
6	3,521	3,521	3,521	3,521	$5,32 \cdot 10^{-5}$
9	3,521	3,521	3,521	3,521	$5,32 \cdot 10^{-5}$
12	3,521	3,521	3,521	3,521	$5,32 \cdot 10^{-5}$
15	3,521	3,521	3,521	3,521	$5,32 \cdot 10^{-5}$

$[\text{Fe}^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L, pH = 3,0.

Tabla A.2. Influencia del H_2O_2 en la decoloración de AM.

Tiempo (min)	Absorbancias			Concentración (mol/L)	
	A1	A2	A3	A	c
0	-	-	-	3,503	$5,30 \cdot 10^{-5}$
3	3,530	3,530	3,530	3,530	$5,34 \cdot 10^{-5}$
6	3,530	3,530	3,530	3,530	$5,34 \cdot 10^{-5}$
9	3,530	3,530	3,530	3,530	$5,34 \cdot 10^{-5}$
12	3,530	3,530	3,530	3,530	$5,34 \cdot 10^{-5}$
15	3,530	3,530	3,530	3,530	$5,34 \cdot 10^{-5}$

$[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L, pH = 3,0.

Tabla A.3. Influencia de los reactivos Fenton en la inactivación de *E. coli* K12.

#	Media	Control	Inactivación
	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(uLog)
Control al Fe^{2+}	$2,40 \cdot 10^6$	$2,60 \cdot 10^6$	0,035
Control al H_2O_2	$2,30 \cdot 10^6$	$2,60 \cdot 10^6$	0,053

$[\text{Fe}^{2+}] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L, pH = 3,0.

Tabla A.4. Influencia del valor del pH en la inactivación de *E. coli* K12.

#	pH	Control	Inactivación
		(UFC/mL)	(uLog)
1	3,0	$2,60 \cdot 10^6$	0,129
2	4,0	$3,0 \cdot 10^6$	0,067
3	5,0	$3,40 \cdot 10^6$	0,013
4	Agua destilada	$3,50 \cdot 10^6$	0

Cepa modelo *E. coli* K12 vista a microscopio y en placa Petri

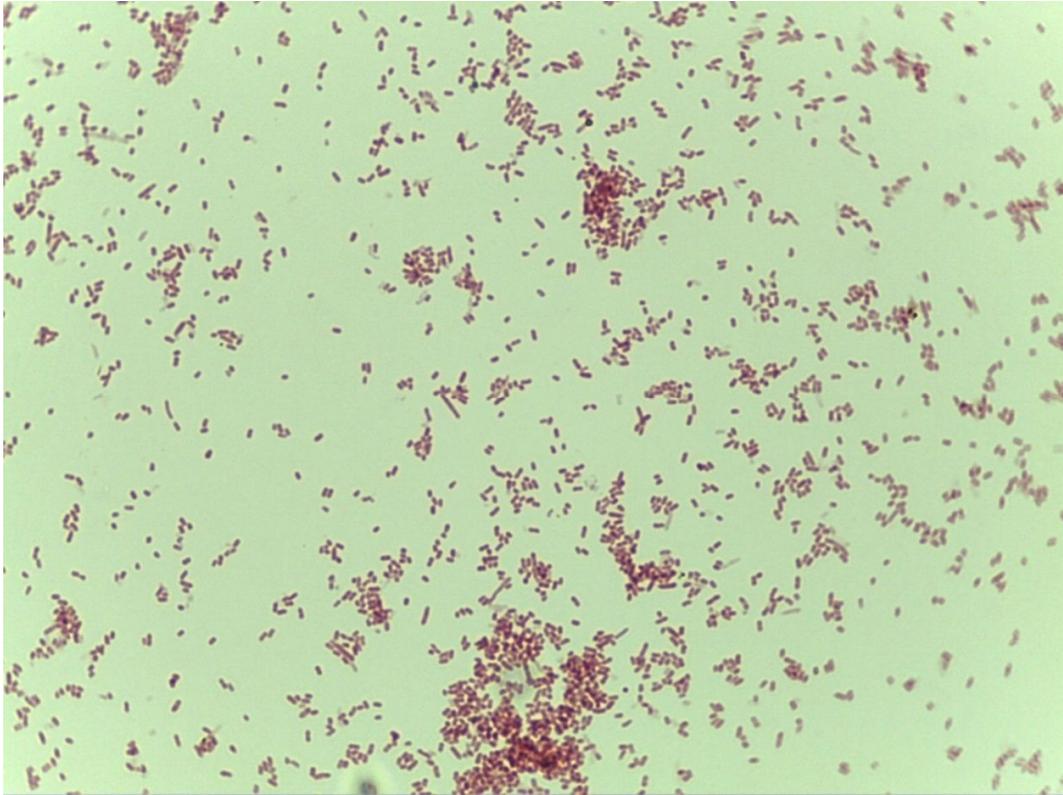


Figura A.5. Cepa modelo *E. coli* K12 observada a microscopio (100x) en el laboratorio del centro EULA.

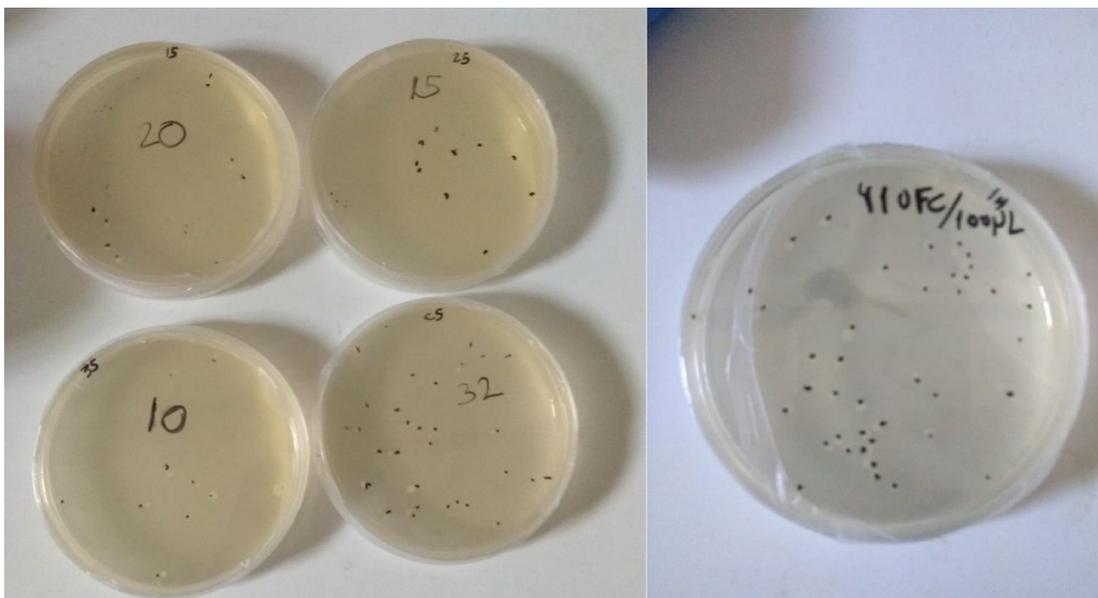


Figura A.6. Colonias de *E. coli* K12 cultivadas con Agar LB en placa Petri.