



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Farmacia-Programa de Doctorado en Ciencias y Tecnología Analítica

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA ANALÍTICA

Desarrollo de un sistema Fenton heterogéneo soportado en tanino insoluble de corteza de *Pinus radiata* y su evaluación como proceso de oxidación avanzada en sistema modelo

ROMINA PATRICIA ROMERO CARRILLO

2016

Profesor Tutor: Dr. David Contreras Pérez

Profesor Co-Tutor: Dra. Cristina Segura Castillo

Departamento de Análisis Instrumental

Facultad de Farmacia

Universidad de Concepción

Desarrollo de un sistema Fenton heterogéneo soportado en tanino insoluble de corteza de *Pinus radiata* y su evaluación como proceso de oxidación avanzada en sistema modelo

Comisión evaluadora

Dr. David Contreras P.  
Profesor tutor  
Universidad de Concepción

\_\_\_\_\_

Dra. Cristina Segura C.  
Profesor Co-tutor  
Universidad de Concepción

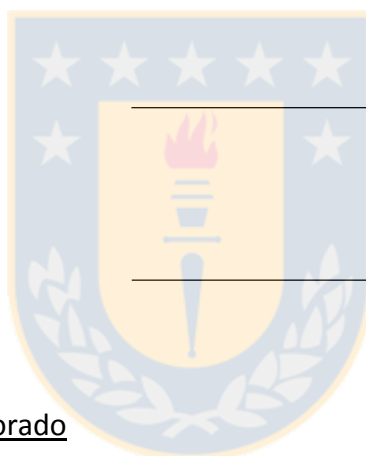
\_\_\_\_\_

Dra. Juanita Freer C.  
Universidad de Concepción

\_\_\_\_\_

Dra. Rosario Castillo F.  
Universidad de Concepción

\_\_\_\_\_



Director de programa de Doctorado

Dra. Claudia Mardones P.  
Universidad de Concepción

\_\_\_\_\_

Decano Facultad de Farmacia

Dr. Ricardo Godoy R.  
Universidad de Concepción

\_\_\_\_\_

## TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xi
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Dihidroxibencenos.....	3
1.2 Reacción de Fenton .....	3
1.3 Dihidroxibencenos en reacción de Fenton.....	5
1.3.1 Capacidad Antioxidante .....	5
1.3.2 Capacidad Prooxidante .....	5
1.4 Reacción de Fenton como proceso de oxidación avanzada (AOP) .....	7
1.5 Tratamiento de aguas residuales con procesos Fenton.....	9
CAPÍTULO 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	11
2.1 Hipótesis general.....	11
2.2 Objetivo principal .....	11
2.3 Objetivos específicos.....	11
CAPÍTULO 3 ESTRATEGIA ANALÍTICA Y MATERIAL DE ESTUDIO .....	12
3.1 Introducción .....	12
3.2 Materia prima.....	12
3.3 Tratamiento de muestra .....	13
3.3.1 Digestión.....	13
3.3.2 Extracción en fase sólida (SPE).....	14
3.4 Derivatización.....	15
3.5 Métodos quimiométricos.....	15
3.6 Propuesta de estrategia analítica.....	15
CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA .....	17
4.1 Caracterización de fracción insoluble de tanino de corteza .....	17
4.1.1 Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).....	17
4.1.2 Análisis elemental .....	18
4.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	18
4.1.4 Análisis termogravimétrico .....	18
4.1.5 Calorimetría diferencial de barrido .....	19

4.1.6 Espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) .....	19
4.1.7 Infrarrojo medio (FT-IR).....	20
4.1.8 RMN <sup>13</sup> C de sólidos .....	20
4.1.9 Desarrollo de metodología para análisis de tanino insoluble por <i>py</i> -GC/MS .....	20
4.2 Determinación de la reactividad del catalizador heterogéneo en la reacción de Fenton. ....	22
4.2.1 Reducción de Fe(III).....	22
4.2.2 Determinación de constantes de velocidad en la degradación de naranja de metilo.....	23
4.2.2.1 Efecto adsorbente .....	24
4.2.3 Determinación de producción de radicales hidroxilo por resonancia paramagnética electrónica (EPR) .....	24
4.2.4 Determinación de producción de radicales hidroxilo por HPLC-fluorescencia.....	26
4.3. Aplicación del sistema Fenton heterogéneo en la degradación de contaminante recalcitrante .....	27
4.3.1 Introducción .....	27
4.3.2 Contaminante modelo: Atrazina .....	27
4.3.3 Degradación de atrazina .....	28
4.3.3.1 Reactor batch .....	28
4.3.4 Diseño Experimental .....	29
4.3.4.1 Barrido (diseño experimental preliminar, screening) .....	29
4.3.4.2 Modelo circunscrito central compuesto (CCC).....	29
4.3.5 Determinación de productos de degradación.....	30
4.3.5.1 Reactor .....	31
4.3.5.2 Extracción SPE .....	31
4.3.5.3 GC-MS.....	32
4.3.6 Carbono Orgánico Total (TOC) .....	32
CAPÍTULO 5 RESULTADOS .....	33
5.1 Caracterización de fracción insoluble de tanino de corteza .....	33
5.1.1 Cromatografía de permeación en gel (GPC).....	33
5.1.2 Análisis elemental .....	34
5.1.3 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)/EDS .....	34
5.1.4 Análisis termogravimétrico .....	37
5.1.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	38
5.1.6 Espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) .....	39
5.1.7 Infrarrojo medio (FT-IR).....	40

5.1.8 RMN <sup>13</sup> C de sólidos.....	41
5.1.9 Desarrollo de metodología para análisis de tanino insoluble por <i>py</i> -GC/MS .....	44
5.1.10 Conclusiones.....	46
5.2 Determinación de la reactividad del catalizador heterogéneo en la reacción de Fenton. ....	48
5.2.1 Reducción de Fe(III).....	48
5.2.1.1 Reducción de Fe(III) con catequina a pH=3.40.....	48
5.2.1.2 Reducción de Fe(III) con tanino a pH=3.40 .....	49
5.2.1.3 Reducción de Fe(III) con catequina a pH=7.00.....	50
5.2.1.4 Reducción de Fe(III) con tanino a pH=7.00 .....	51
5.2.2 Determinación de constantes de velocidad en la degradación de naranja de metilo... 53	
5.2.2.1 Efecto adsorbente .....	55
5.2.3 Determinación de producción de radicales hidroxilo por Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) .....	56
5.2.4 Determinación de producción de radicales hidroxilo por HPLC-fluorescencia.....	59
5.2.5 Conclusiones.....	61
5.3 Aplicaciones sistema Fenton heterogéneo en la degradación de contaminantes recalcitrantes.....	62
5.3.1 Resultados preliminares.....	62
5.3.2 Diseño experimental .....	63
5.3.2.1 Barrido.....	63
5.3.2.2 Optimización .....	64
5.3.3 Degradación atrazina en condiciones óptimas .....	65
5.3.4 Identificación de los productos de degradación .....	66
5.3.5 Carbono orgánico total (TOC).....	68
5.3.6 Conclusiones.....	69
5.4 Productividad científica.....	70
Hydroxyl radical production by a heterogeneous Fenton reaction supported in insoluble tannin from bark of <i>Pinus radiata</i> .....	71
Development of an analytical method for the main organic compounds derived from thermochemical conversion of biomass. ....	79
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES GENERALES .....	85
REFERENCIAS.....	86
ANEXOS .....	97

## ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza
AOP	Advanced oxidation process
ASTM	American Society for Testing Materials
ATD (DTG)	Análisis térmico diferencial
ATG (TGA)	Análisis termogravimétrico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTG	Termogravimetría diferencial
EDS/EDEX	Espectroscopia de energía dispersiva
FT-IR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
GC/MS	Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas
GPC	Cromatografía de permeación por gel
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo
IR	Infrarrojo
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MS	Detector selectivo de masas
Py	Pirolizador
R	Resolución cromatográfica
RMN	Resonancia magnética nuclear
RSD	Desviación típica relativa
SEM	Microscopía electrónica de barrido

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparación de cromatogramas de micropirólisis-GC/MS de taninos insolubles a diferentes temperaturas de pirólisis.....	2
Figura 2: Estructura química propuesta para taninos condensados.....	3
Figura 3 : Estructura química de 1,2-dihidroxibenceno (1,2-DHB) .....	3
Figura 4: Reducción de Fe(III) por 1,2-DHB .....	6
Figura 5: Mecanismo propuesto para la generación del complejo Fe(III)-flavonoide .....	7
Figura 6: Fotografía del tanino insoluble proveniente de corteza de <i>Pinus radiata</i> .....	12
Figura 7: Estructura química de atrazina .....	27
Figura 8: Representación gráfica del modelo utilizado en la optimización. ....	29
Figura 9: Cromatograma GPC obtenido para tanino insoluble. ....	33
Figura 10: (a) SEM de tanino insoluble, (b) SEM tanino insoluble impregnado con Fe ( $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). ....	34
Figura 11: Aumento en la resolución del análisis de microscopía electrónica hasta $5\mu\text{m}$ . ....	35
Figura 12: (a) EDS de tanino insoluble, (b) EDS de tanino insoluble impregnado con Fe.....	36
Figura 13: (a) TGA-MS para tanino insoluble (b) TGA-MS tanino impregnado con Fe(II); (c) TGA-MS para tanino impregnado con Fe(III); (d) TGA-MS posterior a tratamiento con Fe(III) y $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	37
Figura 14: (a) Perfil DSC para tanino insoluble ( $10\text{-}200^\circ\text{C}$ ); (b) DSC tanino impregnado con Fe(II); (c) tanino impregnado con Fe(III).....	39
Figura 15: Espectros normalizados para tanino insoluble, tanino insoluble impregnado con Fe(II) y Fe(III) y tanino posterior a la reacción de Fenton y Fenton-like.....	41
Figura 16: Estructuras habituales en los anillos A y B de los monómeros de los extractos tánicos. 42	
Figura 17a: Monómero modelo para descripción de $^{13}\text{C}$ -RMN.....	42
Figura 17b: Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN de sólidos para tanino insoluble de corteza de <i>Pinus radiata</i> .....	43
Figura 18: (a) Cromatograma <i>py</i> -GC/MS para catequina; (b) Cromatograma <i>py</i> -GC/MS de tanino insoluble a $500^\circ\text{C}$ y 6 segundos.....	44
Figura 19: Distribución de compuestos determinados por <i>py</i> -GC/MS para catequina y para tanino insoluble.....	46
Figura 20: Perfiles de formación del complejo Fe(II)-ferrozina a diferentes tiempos para catequina a $\text{pH}=3.40$ en fase homogénea. ....	49

Figura 21: Perfiles de formación del complejo Fe(II)-ferrozina a diferentes tiempos a pH 3.4 para tanino en fase heterogénea. ....	50
Figura 22: Perfiles de formación del complejo Fe(II)-ferrozina a diferentes tiempos a pH 7.0 para catequina.....	51
Figura 23: Perfiles de formación del complejo Fe(II)-ferrozina a diferentes tiempos a pH 7.0 para tanino. ....	52
Figura 24: Espectrograma para sistema Fe(III)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /tanino/colorante. ....	53
Figura 25: Cinética de degradación de naranja de metilo a pH 3.40 por los diferentes sistemas estudiados. ....	54
Figura 26: Distintas intensidades de la señal del aducto DMPO/·OH para los sistemas Fenton evaluados .....	56
Figura 27: Perfiles cinéticos de producción de radicales hidroxilo.....	58
Figura 28: Perfiles de producción de radicales ·OH determinados por HPLC-fluorescencia. ....	59
Figura 29: Propuesta de ciclo redox en el cual la catequina quela y reduce el Fe(III). ....	60
Figura 30: Ensayo preliminar de degradación de atrazina en agua a pH 3.40.....	62
Figura 31: Superficies de respuesta para <i>screening</i> de degradación de atrazina .....	63
Figura 32: Superficies de respuesta para modelo CCC.....	65
Figura 33: Controles cinéticos para degradación de atrazina .....	66
Figura 34: GC-MS para productos de degradación de atrazina por el sistema Fe(III)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /tanino .	67



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Esquema general de estrategia analítica para el desarrollo de la tesis doctoral.....	16
Tabla II: Rango de variables utilizadas en el barrido.....	29
Tabla III. Variables usadas para el diseño.....	30
Tabla IV: Parámetros instrumentales utilizados para el análisis por GC-MS en la determinación de compuestos de degradación. ....	32
Tabla V: Análisis elemental de taninos insolubles .....	34
Tabla VI: Cuantificación por ICP-OES de contenido de Fe en muestras de taninos.....	39
Tabla VII: ANOVA para <i>screening</i> en degradación de atrazina. ....	64
Tabla VIII: ANOVA para modelo de optimización.....	65
Tabla IX: Compuestos determinados en el reactor posterior a la reacción de Fenton por GC-MS..	68



## RESUMEN

En las últimas décadas, la presencia de contaminantes orgánicos en efluentes municipales e industriales ha sido un problema de creciente consideración lo que ha llevado a la búsqueda de métodos eficientes para el tratamiento de la contaminación ambiental abriendo el campo a la investigación de nuevas tecnologías. Entre éstas, los llamados Procesos de Oxidación Avanzada (AOPs) son particularmente importantes, ya que son capaces de degradar completamente y convertir en productos inocuos y/o biodegradables un amplio espectro de compuestos orgánicos e inorgánicos.

El proceso Fenton heterogéneo es un AOP, que emplea peróxido de hidrógeno y un sólido contenedor/portador de hierro, se basa en la generación in situ de radicales hidroxilo, los cuales reaccionan rápidamente y en forma no selectiva con cualquier compuesto, debido a su gran capacidad oxidante ( $E^{\circ}(\cdot\text{OH}/\text{H}_2\text{O})= 2.8 \text{ V/SHE}$ ).

En la presente tesis se realizó la modificación de la convencional reacción de Fenton, en un sistema heterogéneo que emplea peróxido de hidrógeno, hierro y un sólido contenedor de dihidroxibencenos, que como señala la literatura conducen y amplifican esta reacción, sin embargo, al ser sistemas en fase homogénea no presentan aplicación en limpieza de contaminantes. De este modo, la ventaja consiste en la utilización de un sólido insoluble en agua, lo que evita la contaminación del efluente con compuestos fenólicos, además de presentar también, un importante valor ambiental al ser obtenido desde un residuo forestal, específicamente de corteza de *Pinus radiata*.

Como resultado de esta investigación se caracterizó el tanino proveniente de la corteza de *Pinus radiata* con metodologías analíticas desarrolladas y otras rutinarias en el estudio de matrices sólidas. Posteriormente, se evaluó su efectividad como soporte y catalizador de reacción para Fenton heterogéneo con el cual se degradó atrazina en un sistema modelo optimizado, de forma más rápida y efectiva que la reacción de Fenton convencional.

## ABSTRACT

In recent decades, the presence of organic pollutants in municipal and industrial effluents has been a problem of increasing consideration, which has led to the search for efficient methods for the treatment of environmental pollution, opening the field to new technology research. Among these, the so-called Advanced Oxidation Processes (AOPs) are particularly important because they are able to completely degrade and turn into harmless products and / or biodegradable a broad spectrum of organic and inorganic compounds.

The heterogeneous Fenton process is an AOP, employing hydrogen peroxide and a solid container/ carrier of iron it is based on the in situ hydroxyl radical generation, which react rapidly and non-selectively with any compound, due to its great oxidant capacity ( $E^{\circ}(\cdot\text{OH}/\text{H}_2\text{O})=2.8 \text{ V/SHE}$ ).

In this thesis, the modification of the conventional Fenton reaction in a heterogeneous system employing hydrogen peroxide, iron and solid container with dihydroxybenzenes, which as stated in the literature lead and amplify this reaction was carried out. However, being systems in homogeneous phase, have no application in water treatment. Thus, the advantage is the use of a water insoluble solid, which prevents contamination of the effluent with phenolic compounds, in addition also have an important environmental value to be obtained from a forest residue, specifically bark of *Pinus radiata*.

As a result of this investigation it was characterized tannin from the bark of *Pinus radiata* with developed and other routine analytical methodologies in the study of solid matrices. Later, its effectiveness as a support and catalyst reaction for Fenton heterogeneous which was used to degrade atrazine, as a model system. This degradation was faster and more effective with heterogeneous Fenton than that a conventional Fenton reaction.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

Chile posee un área de recursos forestales de unos 15.6 millones de hectáreas ubicadas entre las regiones de Coquimbo y Magallanes, los cuales corresponden a 86% de plantaciones naturales y 14% a plantaciones forestales. El crecimiento sostenido que ha tenido el sector forestal chileno en las últimas décadas se ha basado principalmente en las plantaciones de especies de rápido crecimiento, pasando de 340,000 hectáreas en el año 1974 (año de promulgación del D. L. 701), a 2,309,000 hectáreas en la actualidad<sup>1,2</sup>.

Una parte importante de los recursos madereros disponibles en el país son desechados en forma de residuos (astillas, corteza, aserrín, entre otros) que se generan durante la cadena productiva forestal, desde la obtención de la madera en los bosques hasta la planta de procesamiento. Sin embargo, las actuales tecnologías de recolección tienden a dejar cada vez menos residuos en el bosque y la mayor cantidad de desechos forestales se producen en las plantas de procesamiento (aserraderos), se estima que son aproximadamente unos 3 millones de m<sup>3</sup> de residuos madereros<sup>1,3</sup>. La corteza es parte de estos residuos madereros, aproximadamente una décima parte de la masa de árboles talados es corteza. En la actualidad, esta corteza se extrae antes de la transformación mecánica y se quema para obtener energía<sup>4</sup>. La corteza de maderas blandas como el *Pinus radiata* contiene sobre un 60% de compuestos fenólicos, de los cuales 8-12% son solubles en agua y 15-20% solubles en metanol<sup>5</sup>.

Los polifenoles de la corteza del *Pinus radiata* corresponden a taninos condensados (CT), que están constituidos por polímeros de flavonoides con varios grados de condensación. Estos CT se encuentran ampliamente distribuidos dentro de la madera y corteza de ciertas especies de árboles, algunas de gran explotación industrial. Su aplicación tradicional que actualmente es menos frecuente, es en la industria de curtido de cuero, pero la evolución histórica del mercado de los derivados del petróleo los posicionó como fuente renovable de compuestos fenólicos condensados y posibles sustitutos del fenol en alguna de sus aplicaciones<sup>6-8</sup>.

En la actualidad, los CT son ampliamente utilizados en adhesivos para paneles de madera, para lo cual se requiere que el tanino sea completamente soluble en agua para obtener un fuerte entrecruzamiento con formaldehído, de lo contrario se obtiene una resina quebradiza. En consecuencia, la fracción insoluble de estos CT, queda sin utilizar<sup>9</sup>.

En el presente trabajo de tesis se utilizó la fracción de taninos insolubles del extracto de corteza como fuente de compuestos fenólicos. La ventaja de esta fracción es que se encuentra libres de azúcares, furfural y otros compuestos que posee la corteza en su forma nativa, lo que mejora la disponibilidad de estos grupos<sup>9</sup>.

Recientes análisis de micropirólisis acoplado a cromatografía gaseosa con detección de espectrometría de masa (*py*-GC/MS) de estos taninos, han mostrado que catecol es uno de los principales productos de descomposición térmica (Figura 1) y moléculas de metilcatecol en menor proporción<sup>10-12</sup>. De estos resultados se infiere que los taninos insolubles de corteza están conformados por unidades de dihidroxibencenos condensadas, principalmente catequina.

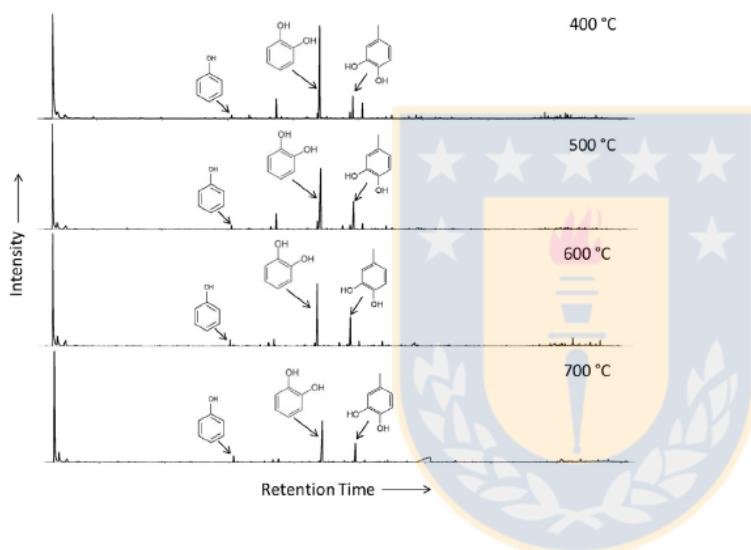


Figura 1: Comparación de cromatogramas de micropirólisis-GC/MS de taninos insolubles a diferentes temperaturas de pirólisis (Modificado de Case et al. 2014<sup>9</sup>).

En consideración a lo anterior, se ha propuesto que la estructura química CT del extracto de corteza de *Pinus radiata* correspondería a unidades de catequina enlazadas (Figura 2). En el esquema se puede observar que presenta grupos de 1,2-dihidroxibenceno que no se encuentran enlazados y se mantendrían reactivos en el polímero<sup>13</sup>.

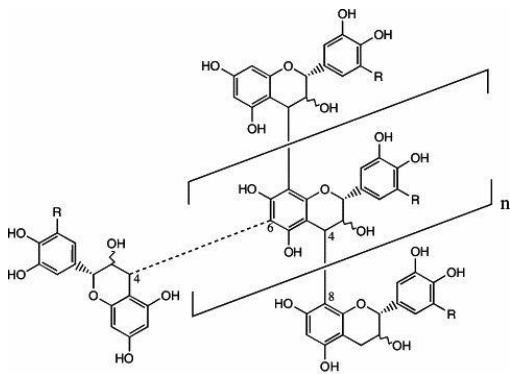


Figura 2: Estructura química propuesta para taninos condensados (modificado de Pizzi et al. 1993)<sup>14</sup>.

## 1.1 Dihidroxibencenos

Los dihidroxibencenos (DHBs) más estudiados son las hidroquinonas (p-dihidroxibencenos) y los del tipo catecol (Figura 3)<sup>15</sup>, estos últimos han sido ampliamente investigados en su rol amplificador y modulador de la reacción de Fenton.

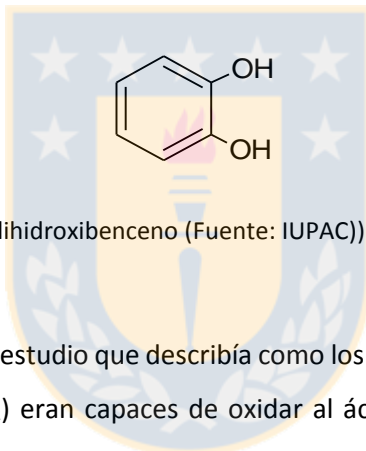


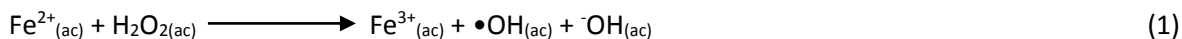
Figura 3 : Estructura química de 1,2-dihidroxibenceno (Fuente: IUPAC)

## 1.2 Reacción de Fenton

En 1894, H.J.H. Fenton publicó un estudio que describía como los iones Fe(II) en presencia de ciertos agentes oxidantes (como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eran capaces de oxidar al ácido tartárico<sup>16</sup>. En 1934, Haber y Weiss<sup>17</sup> propusieron que la especie oxidante generada por la reacción de Fenton correspondía al radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ )<sup>18,19</sup>, que resulta ser una de las especies oxidantes más reactivas que se conocen ( $E_0 = 2.8 \text{ V}$ )<sup>20</sup>.

La reacción de Fenton más conocida es la que ocurre con Fe(II), sin embargo, también puede ocurrir en presencia de otros metales de transición como níquel, cobre, manganeso, hierro(III), entre otros<sup>21,22</sup>; en este último caso la reacción se denomina reacción tipo Fenton (Fenton-like).

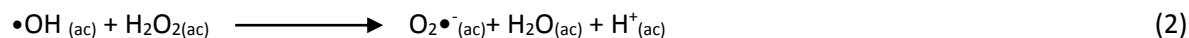
La reacción de Fenton con Fe(II), queda expresada como indica la Ecuación 1<sup>17</sup>:



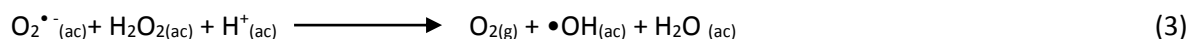
Esta reacción se lleva a cabo a bajos valores de pH, para mantener una cantidad mínima de Fe(II) en solución, esto debido a que el Fe(III) forma un compuesto poco soluble en medio básico, Fe(OH)<sub>3</sub>

( $pK_{ps}=38.8$ ) provocando que la concentración de Fe(III) en solución disminuya y por lo tanto desplace el equilibrio del par redox Fe(II)/Fe(III) hacia la formación de Fe(III) disminuyendo la concentración de Fe(II) disponible para la reacción de Fenton<sup>23</sup>.

El mecanismo propuesto por Haber-Weiss es un sistema de reacción en cadena. La primera reacción utiliza el radical  $\cdot\text{OH}$  producido por la reacción de Fenton para reaccionar con más peróxido de hidrógeno (como en la reacción de Fenton) y originar radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ )<sup>17,18</sup> (Ecuación 2).



El radical superóxido recién producido reacciona con más peróxido de hidrógeno (como en la reacción de Fenton), para generar  $\cdot\text{OH}$  (Ecuación 3).



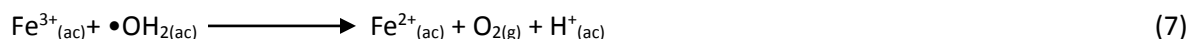
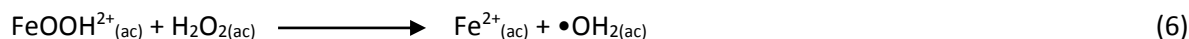
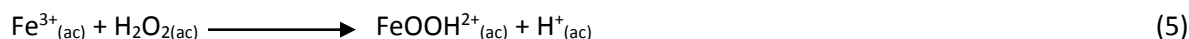
El término de la reacción en cadena está dado por Ecuación 4<sup>24</sup>.



El hierro funciona como catalizador en el mecanismo propuesto por Haber-Weiss, pues se ha demostrado en estudios previos que la reacción en ausencia de Fe(II) sólo disminuye su velocidad<sup>25-27</sup>.

En la reacción de Fenton se ha propuesto que existen más especies oxidantes, además del  $\cdot\text{OH}$ <sup>28-33</sup>, las que dependiendo de su tipo y proporción tendrán directa relación con las condiciones de reacción presentes, sin embargo, aún existe controversia en esto<sup>34</sup>.

Por otro lado, la reacción de tipo Fenton o Fenton-*like*, está definida por las siguientes reacciones (Ecuaciones 5- 7):



La reacción de Fenton ha sido utilizada con éxito en la descomposición de xenobióticos recalcitrantes, por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales<sup>35-38</sup> y saneamiento de las aguas subterráneas<sup>38,39</sup>. Junto con lo anterior, a la reacción de Fenton se le atribuye un rol iniciador del estrés oxidativo en sistemas biológicos por presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS)<sup>40-42</sup>,

lo que tiene como consecuencia, la oxidación de distintas biomoléculas y desempeña un papel importante en el proceso de envejecimiento y en una variedad de enfermedades provocadas por estrés oxidativo<sup>42-49</sup>.

### 1.3 Dihidroxibencenos en reacción de Fenton

Los 1,2-DHBs han sido ampliamente estudiados pues se asocian con un aumento de la cantidad de especies activadas generadas por una reacción de Fenton y con el desarrollo enfermedades degenerativas por generación de ROS<sup>50-52</sup>. Por otro lado, se les ha atribuido capacidad de prevenir y revertir algunas patologías<sup>43,53,54</sup>.

Los 1,2-DHBs mantienen en solución una parte del Fe(III), además de reducir al menos dos átomos de Fe(III) a Fe(II) por molécula de 1,2-DHB<sup>55</sup>, quedando el Fe(II) dentro de la esfera de coordinación. Posteriormente estos complejos de Fe(II) podrían formar peroxo-complejos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>28</sup> dando origen a distintas especies activadas<sup>56</sup>.

La capacidad de participar en reacciones redox es la característica más importante de los 1,2-DHBs<sup>57,58</sup>. Se ha establecido que estos compuestos presentan actividad antioxidante y prooxidante en distintos sistemas biológicos<sup>51,59</sup>, la que depende de las condiciones de la reacción<sup>60</sup>.

#### 1.3.1 Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante de los 1,2-DHBs ha sido ampliamente estudiada debido a su propiedad de proteger de ataques de radicales a biomoléculas en diversos sistemas biológicos<sup>61</sup>. Las propiedades antioxidantes de los 1,2-DHBs se basan principalmente en dos mecanismos: capacidad de atrapar radicales y quelar el Fe(III) presente en la solución<sup>62</sup>.

#### 1.3.2 Capacidad Prooxidante

Se ha reportado que la presencia de 1,2-DHBs en la reacción de Fenton aumenta la producción de radicales ·OH en comparación con la reacción de Fenton convencional<sup>63</sup>. Estos sistemas mantienen una sostenida producción de ·OH en el tiempo, lo que permite una reacción más eficiente con el sustrato, ya que los radicales ·OH se producen lentamente y aumenta la probabilidad de que estos reaccionen con los sustratos a diferencia de lo que ocurre en los sistemas sin DHBs, donde el ·OH se produce rápidamente y reaccionan entre sí por recombinación radical<sup>15</sup>.

Se han propuesto distintos mecanismos en los cuales los 1,2-DHBs aumentan la producción de especies reactivas. Uno de éstos, propone que los 1,2-DHBs mantienen parte del Fe(III) en solución y participa en la reducción de al menos dos átomos de Fe(III) a Fe(II) por molécula de 1,2-DHB



presente en el sistema<sup>64-66</sup>. En este mecanismo el 1,2-DHB es oxidado a semiquinona, siendo posible que esta especie también participe en la actividad prooxidante. Según estudios previos, cualquier grupo fenólico tiene capacidad de reducir metales de transición<sup>67</sup>.

Como ha sido mencionado anteriormente, los 1,2-DHBs incrementan la reactividad de la reacción de Fenton debido a su capacidad para quelar Fe(III) y mantenerlo en disolución, facilitando además, la reducción de Fe(III) a Fe(II) a través de un mecanismo de transferencia electrónica por esfera interna. La Figura 4 presenta un mecanismo propuesto para la reducción de Fe(III) en presencia de 1,2-DHBs. Dentro de esta clasificación encontramos a la catequina (monómero de tanino insoluble) que posee una estructura de 3 anillos, entre los cuales uno posee estructura de 1,2-DHB y por lo tanto también tanino insoluble de corteza de pino (como lo han demostrado ensayos previos de *py-GC-MS*).

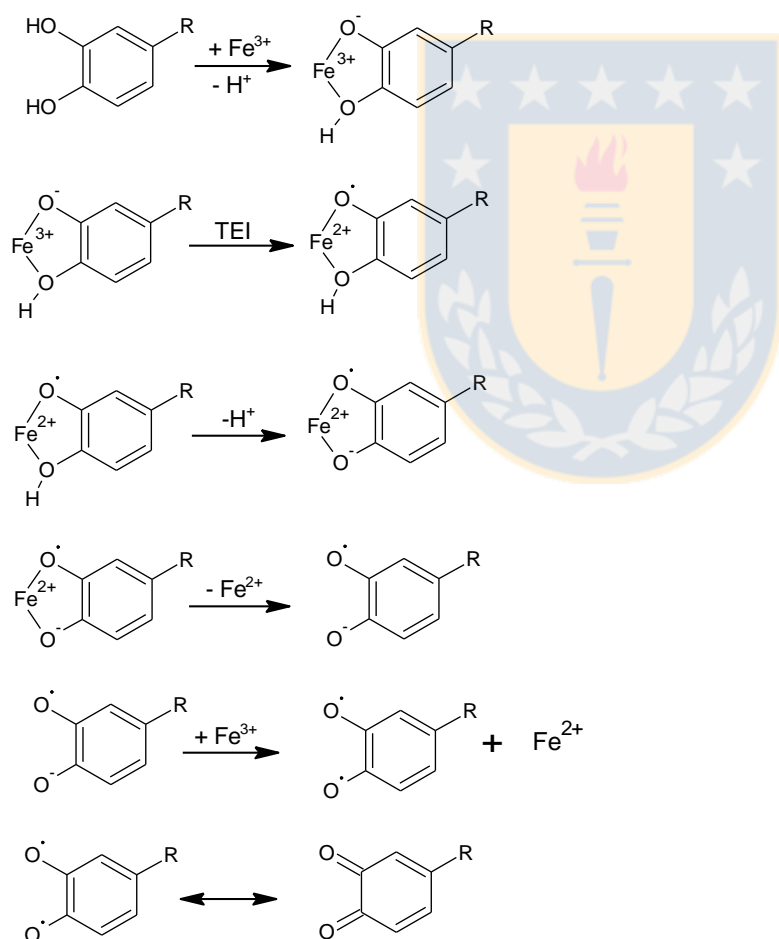


Figura 4: Reducción de Fe(III) por 1,2-DHB (modificado de Kristinová et al. 2009<sup>68</sup>). TEI es transferencia electrónica intramolecular.

Como es posible observar en la Figura 4, en cuanto la semiquinona es generada es capaz de reducir otro equivalente de Fe(III)<sup>69</sup> y se oxida a quinona<sup>67,70,71,68</sup>.

La reacción de Fenton conducida por 1,2-DHBs ha sido utilizada ampliamente en la degradación de xenobióticos y compuestos recalcitrantes en agua<sup>72-74</sup>, como también en el tratamiento de efluentes de celulosa<sup>75,76</sup>. Esta reacción es considerada un proceso de oxidación avanzada (AOP) y una variante de la reacción de Fenton convencional.

En sistemas Fenton se han utilizado diversos compuestos tipo DHB, dentro de los cuales se encuentran los flavonoides. Estos compuestos en presencia de Fe(II) aumentan la producción de ROS, causando estrés oxidativo y posterior daño a las biomoléculas (Figura 5)<sup>77</sup>.

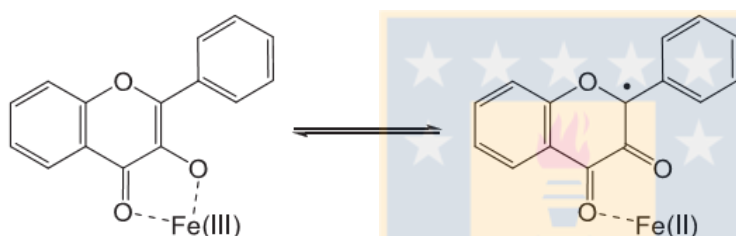
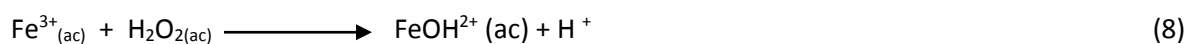


Figura 5: Mecanismo propuesto para la generación del complejo Fe(III)-Flavonoide (Modificado de Procházková et al. 2011)<sup>77</sup>

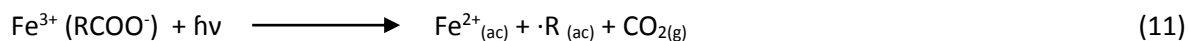
#### 1.4 Reacción de Fenton como proceso de oxidación avanzada (AOP)

Una gran proporción de los AOPs se basan en la generación in situ de radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), los cuales reaccionan rápidamente y en forma no selectiva debido a su gran capacidad oxidante. Estos AOPs incluyen diferentes combinaciones, subdividiéndose en general en dos grandes ramas, aquellos procesos que utilizan radiación para la generación del radical hidroxilo y los que no la utilizan<sup>78</sup>. La reacción de Fenton se encuentra entre aquellas que no requieren radiación.

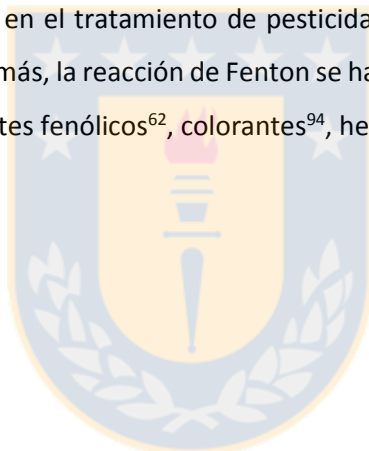
La presencia de una fuente de luz acelera la degradación de contaminantes<sup>79</sup>. El proceso recibe el nombre de Foto-Fenton (Ecuaciones 8 y 9)<sup>80</sup>, y en este caso el reciclaje de Fe(III) es posible a través de un proceso fotorreductor.



Se ha demostrado que ciertos compuestos orgánicos generan intermediarios capaces de formar complejos fotosensibles con Fe(III) y regenerar así el Fe(II) (Ecuación 10). Este proceso ha sido probado con éxito en los complejos formados entre Fe(III) y ácidos carboxílicos (Ecuación 11), especies que aparecen en grandes cantidades como intermediarios de degradación en las reacciones de Fenton. Se ha demostrado también que la adición de estos compuestos orgánicos, ligandos (L), junto con el reactivo de Fenton incrementa el rendimiento de las reacciones de oxidación. El oxalato es un ejemplo de este tipo de compuestos<sup>80-85</sup>.



El proceso Fenton ha sido aplicado al tratamiento de una amplia variedad de contaminantes, tanto para su degradación, como para mejorar la biodegradabilidad de efluentes que lo contengan. Se ha aplicado con resultados exitosos en el tratamiento de pesticidas<sup>86</sup>, efluentes farmacéuticos<sup>87-91</sup> y efluentes petroquímicos<sup>92,93</sup>. Además, la reacción de Fenton se ha aplicado al estudio en laboratorio de la degradación de contaminantes fenólicos<sup>62</sup>, colorantes<sup>94</sup>, herbicidas<sup>95</sup>, entre otros.



## 1.5 Tratamiento de aguas residuales con procesos Fenton

Entre los diferentes AOPs disponibles, los procesos Fenton y Foto-Fenton son considerados los más prometedores (debido a su elevada eficacia y bajo coste) en la remediación de aguas contaminadas con compuestos tóxicos y/o no biodegradables<sup>96</sup>. El proceso Fenton ha resultado efectivo para degradar compuestos alifáticos y aromáticos clorados, PCBs, nitroaromáticos, colorantes azo, cloro bencenos, fenoles, entre otros. Son muy pocos los compuestos que no pueden ser degradados por esta reacción, entre ellos la acetona o el ácido acético<sup>80,97</sup>. Se ha aplicado exitosamente para la reducción de la DQO (demanda química de oxígeno) de aguas municipales y subterráneas y en el tratamiento de efluentes de lixiviados de vertederos municipales y empresas papeleras y textiles<sup>98-100</sup>. Oliveira et al. (2007) compararon la eficacia del proceso Fenton y foto-Fenton en el tratamiento de aguas residuales con resinas alquílicas de una planta de fabricación de pinturas en Brasil. La aplicación del proceso Fenton redujo la DQO en un 60%, mientras que con foto-Fenton se alcanzaron valores de reducción de DQO del 95%.

Particularmente el proceso Fenton ha sido empleado con éxito en el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria farmacéutica<sup>101</sup>. La composición de este tipo de efluentes depende de las materias primas y del proceso empleado. Se caracterizan por contener una variedad de compuestos orgánicos con estructuras complejas y resistentes a la degradación biológica<sup>102,103</sup>. La utilización de sistemas Fenton en el tratamiento de este tipo de efluentes ha demostrado ser capaz de mineralizar una gran parte de estos compuestos orgánicos presentes, disminuyendo la toxicidad y mejorando la biodegradabilidad de los efluentes, permitiendo un tratamiento biológico posterior<sup>104</sup>.

Si bien los procesos Fenton aplicados al tratamiento de aguas residuales ha generado gran interés por sus bajos costos y fácil implementación, además a la limitada toxicidad de los reactivos y a que el peróxido de hidrógeno es sencillo de manejar y el exceso se descompone en productos inocuos<sup>105</sup>. Sin embargo, su uso se ha visto limitado por el elevado consumo de  $H_2O_2$  y por la generación de importantes volúmenes de lodos  $Fe(OH)_3$  tras la etapa de neutralización previa a su vertido<sup>106,107</sup>. Algunas de estas desventajas pueden resolverse mediante la combinación del proceso Fenton con el tratamiento biológico<sup>108</sup>. El efluente se trata primero mediante oxidación química reduciendo la toxicidad y aumentando la biodegradabilidad hasta unos límites aceptables para el posterior tratamiento biológico, minimizando de esta forma el consumo de  $H_2O_2$ . Otras posibilidades se basan en una adición continua de  $H_2O_2$ <sup>109</sup> o integrando el proceso Fenton con la coagulación-floculación<sup>110</sup>.

Por otro lado, el empleo de catalizadores heterogéneos<sup>111,112</sup>, en el que el hierro se fija en la superficie del soporte, se plantea como una alternativa viable para evitar la formación de lodos de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  en el vertido final, evitando las etapas adicionales de tratamiento y disminuyendo el costo<sup>113,114</sup>. En estos catalizadores la fase activa se encuentra constituida por metales de transición, principalmente hierro, que son soportados sobre carbón activo, alúmina, sílice, tamices moleculares meso-porosos, zeolitas, arcillas o resinas de intercambio iónico, lo que se mejora el proceso, pero a la vez, también lo encarece el costo de algunos soportes<sup>115-117</sup>.

Otra alternativa de mejora a los sistemas Fenton que ha sido ampliamente reportada en la literatura, consiste en incorporar 1,2-DHBs en solución acuosa, que han demostrado conducir y amplificar la reacción de Fenton, aumentando su eficiencia en la degradación de compuestos recalcitrantes<sup>118-121</sup> y en efluentes de la industria papelera<sup>75</sup>. Sin embargo, este AOP no puede ser escalado, pues el tratamiento se realiza en fase homogénea en solución acuosa. De este modo, los productos de oxidación de los DHBs (principalmente quinonas) y los DHB remanentes, permanecen en la solución después del tratamiento. Estos compuestos poseen propiedades tóxicas lo que limita el proceso<sup>122</sup>. De acuerdo con esto, los DHBs deben ser utilizados en fase heterogénea para evitar la liberación de estos compuestos (o productos de oxidación) al agua tratada, lo cual manifiesta la necesidad de una alternativa de mejorar el proceso Fenton con la incorporación de 1,2-DHBs insolubles.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es utilizar la fracción insoluble de taninos de corteza de *Pinus radiata* como fuente de DHBs. Éstos pueden conducir la reacción de Fenton y al mismo tiempo, proveer un soporte heterogéneo para el sistema. Este AOP podría ser utilizado y escalado en el futuro, pues no contaminaría con compuestos fenólicos el medio ambiente.

## CAPÍTULO 2

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 2.1 Hipótesis general

Se ha demostrado el aumento en la eficiencia en la degradación de contaminantes de la reacción de Fenton cuando es conducida por dihidroxibencenos en fase homogénea. La fracción insoluble de taninos condensados de corteza de *Pinus radiata* posee grupos fenólicos del tipo dihidroxibenceno (catequinas condensadas) que podría tener un doble efecto: mantener el hierro en fase heterogénea y promover la reacción de Fenton.

En el presente trabajo se propuso desarrollar y caracterizar un sistema Fenton heterogéneo que utiliza los polifenoles del tanino insoluble del extracto de corteza de *Pinus radiata* como fuente de 1,2-DHBs que permiten la promover y amplificar la reacción de Fenton en la degradación de compuestos recalcitrantes.

#### 2.2 Objetivo principal

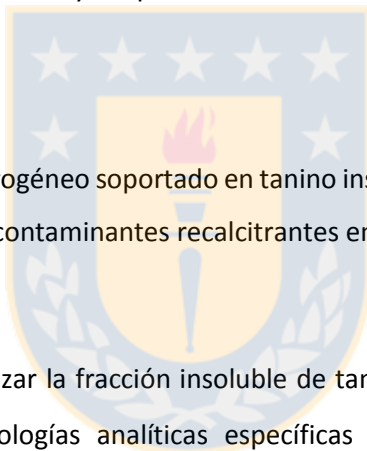
“Desarrollar sistema Fenton heterogéneo soportado en tanino insoluble de corteza de *Pinus radiata* y evaluar su capacidad de oxidar contaminantes recalcitrantes en sistemas modelo”.

#### 2.3 Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Caracterizar la fracción insoluble de tanino de corteza de *Pinus radiata* a través de desarrollo de metodologías analíticas específicas para el sistema y metodologías modificadas para análisis de sólidos.

Objetivo específico 2: Determinar reactividad del catalizador heterogéneo en la reacción de Fenton.

Objetivo específico 3: Utilizar catalizador heterogéneo en un sistema Fenton en la degradación de atrazina como contaminante modelo.



## CAPÍTULO 3

### ESTRATEGIA ANALÍTICA Y MATERIAL DE ESTUDIO

#### 3.1 Introducción

Uno de los objetivos de esta tesis es el desarrollo de metodologías analíticas para la caracterización del extracto insoluble de taninos de corteza de *Pinus radiata*, con el objeto de utilizarlo como soporte de reacción de un AOPs que permita la degradación de compuestos recalcitrantes en matrices acuosas.

Como estrategia analítica se plantea el uso de técnicas cromatográficas, como cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), cromatografía de permeación en gel (GPC) y análisis de micropirólisis acoplada a cromatografía gaseosa con detección de espectrometría de masas (*py*-GC/MS). También, se utilizaron métodos estandarizados para análisis cualitativos y cuantitativos en matrices sólidas, como termogravimetría (TGA), calorimetría diferencial (DSC), espectroscopia infrarroja media con transformada de Fourier (FT-IR), microscopia electrónica (SEM), espectrometría de dispersión de energía (EDS), espectroscopia de emisión acoplado a plasma inductivamente (ICP-OES), entre otros. Dichas metodologías se detallan en el capítulo 4: Metodología.

#### 3.2 Materia prima

Los taninos utilizados (Figura 6) fueron aislados de la corteza de *Pinus radiata* utilizando extracción con metanol, usando el proceso patentado por la Unidad de Desarrollo Tecnológico (Patente US 20090077871 A1)<sup>123,124</sup>. La corteza se obtuvo de árboles 15 años de edad y se secó a 12 % de contenido de agua, después se pulverizó en un molino de martillos con ranuras 1.20mm de diámetro.

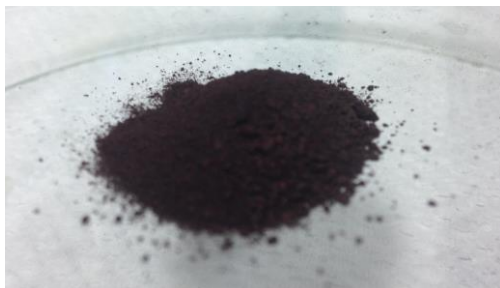


Figura 6: Fotografía del tanino insoluble proveniente de corteza de *Pinus radiata*.

El proceso de extracción de los taninos se realizó en la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT) de la Universidad de Concepción, Chile, en una planta piloto presurizada de 4m<sup>3</sup> con recirculación y calefacción indirecta. La corteza se mezcló en un reactor discontinuo en una relación de 1:5 en masa/volumen con el fin de cubrir completamente la corteza con el licor de extracción que corresponde a una solución de metanol/agua al 75% en peso. La mezcla, se calentó luego a una temperatura de 120°C durante de 90 min. Posteriormente, la solución se enfrió a temperatura ambiente y se descargó desde el extractor. La solución de tanino diluida se concentró a 20 % de sólidos, se evaporó completamente el metanol y se separaron las fracciones solubles e insolubles en agua. A continuación, ambas fracciones de tanino se secaron (Patente US 20090077871 A1).

Como parte fundamental de esta investigación es la caracterización del extracto insoluble de corteza (taninos condensados) por diferentes metodologías analíticas. Lo anterior, plantea un desafío en desarrollar métodos analíticos precisos, robustos y reproducibles para la determinación de diferentes características en la matriz de trabajo.

### 3.3 Tratamiento de muestra

Por lo general las matrices que provienen de productos naturales presentan incompatibilidad de análisis directo por las técnicas a utilizar, por lo cual se vuelve necesario una etapa previa de preparación de muestra que permite compatibilizar los analitos con el análisis. En este punto es importante mencionar que en la mayoría de los casos la muestra se analizó directamente, pues el objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de un soporte natural para un proceso AOP, por lo que se requiere su caracterización con el mínimo pretratamiento posible, sin embargo, en ciertas técnicas analíticas fue necesario aplicar dicha preparación de muestra.

Los métodos de preparación de muestra usados en esta investigación corresponden a digestión ácida y extracción en fase sólida (SPE).

#### 3.3.1 Digestión

El objetivo de los métodos de digestión consiste en convertir muestras sólidas y/o líquidas en disoluciones acuosas, destruir la materia orgánica, no adicionar iones interferentes y obtener el analito de interés a concentraciones detectables. Este pretratamiento es fundamental en la espectroscopía atómica y la plasma inductivamente acoplado (ICP-OES), donde dicho paso se vuelve aún más crítico cuando se requiere detección a nivel trazas o de elementos minoritarios.



a) Digestión ácida tradicional: Se refiere a la digestión en placa calefactora, disolviendo la muestra en ácidos inorgánicos lo cual permite su mineralización. Existen distintos tipos de digestión ácida que emplean distintos ácidos dependiendo de la complejidad y abundancia del elemento que se desea estudiar.

Las desventajas de la digestión ácida en placas consisten en el tiempo de análisis, posibles contaminaciones de la muestra, pérdida de elementos volátiles, vaporización del disolvente (ácidos) y un control limitado de la temperatura de reacción.

b) Digestión ácida por microondas: Esta digestión erradica considerablemente las desventajas que presenta la digestión ácida tradicional. El uso de microondas permite la descomposición adecuada de la muestra, retención de los elementos y compuestos volátiles, reduce la contaminación, se reduce la cantidad de reactivos necesarios y existe un control estricto de la temperatura. Además posee rapidez de análisis en un sistema cerrado.

Para el extracto insoluble de taninos condensados se deben evaluar ambas digestiones de manera de tener la mejor cuantificación de hierro (Fe, elemento mayoritario) presente en la muestra en estado natural y cuando es impregnada con  $\text{Fe}(\text{NO})_3$  para su análisis por espectroscopia ICP-OES.

### 3.3.2 Extracción en fase sólida (SPE)

Esta técnica fue utilizada para la preparación de muestra en la determinación de atrazina y productos de degradación en matrices acuosas por GC-MS posterior al tratamiento Fenton heterogéneo evaluado en esta tesis.

La preparación de muestras más común para la detección de trazas de atrazina en aguas involucra una extracción en fase sólida (SPE)<sup>125</sup>, la cual se recomienda como técnica para concentrar contaminantes en aguas naturales debido a las ventajas que posee en comparación a la tradicional extracción líquido-líquido: disminuye el uso y exposición a solventes riesgosos; posee metodología adaptable a la automatización, es simple y reproducible; consume menos tiempo; las extracciones no son obstaculizadas por formación de emulsiones que deben ser separadas por centrifugación; no se presentan numerosas interferencias durante el análisis lo cual es relevante ya que las concentraciones de pesticidas o herbicidas en aguas naturales resultan ser de una parte por billón y pueden verse afectadas por interferencias<sup>126</sup>. Por lo tanto, se concluye que la técnica más utilizada y efectiva es SPE-GC/MS, debido a que posee precisión, bajo porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) y altos porcentajes de recuperación en muestras<sup>127</sup>.

### 3.4 Derivatización

La derivatización es una reacción química del analito (alta constante de equilibrio e irreversible), que permite la modificación de éste en una matriz que no es compatible con el sistema instrumental. La derivatización puede eliminar las interferencias de la muestra, ya que el reactivo derivatizante reacciona selectivamente con ciertos grupos químicos. Dependiendo del sistema a utilizar, hay una variedad de reactivos derivatizantes.

El utilizado en esta tesis corresponde a derivatización alquílica que tiene como finalidad la reducción de la polaridad de los compuestos mediante sustitución de grupos polares por un grupo alquílico o alifático aromático. Entre las ventajas que presentan las reacciones de alquilación está el alto número de reactivos disponibles, las condiciones de reacción son muy amplias, variando entre medios muy ácidos a medios muy básicos. Además, los derivados obtenidos son generalmente muy estables (Handbook of Derivatives for Chromatography, 2<sup>nd</sup> Edition).

En esta tesis se utilizó la derivatización alquílica en determinación de masa molar por cromatografía de permeación en gel (GPC) donde se requiere la apolaridad del extracto de insoluble de taninos para ser disueltos en THF.

### 3.5 Métodos quimiométricos

En la evaluación del rendimiento del catalizador soportado en tanino insoluble fue necesaria la cuantificación del contaminante modelo en condiciones optimizadas. Para lo anterior se utilizó la herramienta quimiométrica de diseño experimental, donde el objetivo fue la determinación de las variables con mayor importancia y su valor óptimo en la aplicación del sistema desarrollado a la degradación de atrazina.

### 3.6 Propuesta de estrategia analítica

Para el desarrollo de los objetivos planteados en esta tesis doctoral se plantea en la Tabla I un esquema para abordar analíticamente la caracterización y aplicación del catalizador desarrollado. En la Tabla I se pueden observar aquellas metodologías necesarias en cada objetivo y lo necesario para su aplicación en la matriz en estudio.

Tabla I: Esquema general de estrategia analítica para el desarrollo de la tesis doctoral.

EXTRACTO INSOLUBLE DE CORTEZA DE <i>PINUS RADIATA</i>		
Objetivos tesis doctoral	Métodos desarrollados	Métodos aplicados directamente
Caracterización extracto insoluble de corteza	GPC (D) Py-GC/MS	SEM, FT-IR, TGA, DSC, ICP-OES (DG), RMN <sup>13</sup> C
Evaluación del soporte en reacción de Fenton	-Reducción de Fe(III) por UV-Vis -EPR en fase acuosa -Degradación de naranjo de metilo por UV-Vis	HPLC-fluorescencia
Aplicación del sistema heterogéneo en la degradación de contaminante modelo	Diseño experimental GC-MS (SPE)	HPLC-UV

\* (D): derivatización; (DG): digestión; (SPE): extracción en fase sólida



## CAPÍTULO 4

### METODOLOGÍA

#### 4.1 Caracterización de fracción insoluble de tanino de corteza

En esta unidad se caracterizó la materia prima utilizada en este estudio en su estado natural y modificada con Fe, con el fin de determinar propiedades físicas y químicas del soporte a utilizar.

##### 4.1.1 Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

La distribución de masas molares del compuesto en estudio, se determinó por cromatografía de permeación en gel (GPC), utilizando un equipo Shimadzu compuesto por una bomba (LC-20AT), un detector refractométrico (RID-10A), un detector UV-Vis (SPD-20AV), con un inyector manual Rheodyne y un horno (CTO-20A). Se utilizaron tres columnas en serie Styragel® HR3, HR1 y HR 0.5 (en orden de posición hacia el detector), las dos primeras de 7.8•300mm y 4.6•300mm la HR 0.5. Para la adquisición y análisis de datos se empleó el software *LC solutions*.

Se utilizó como punto de partida lo reportado para GPC de polímeros de proantocianidina por Williams *et al.* (1983)<sup>128</sup>, que como se detalló en el punto 3.3 se realizó la acetilación de las muestras previo al análisis cromatográfico, lo cual es necesario para cambiar la solubilidad del tanino. Para lo anterior, fue necesario pesar 20 mg de muestra (tamizada y seca) y agregar 2 mL de piridina y 2 mL de anhídrido acético (1:1 %v/v) con agitación lenta durante 20 horas. Posteriormente, se adicionaron 40 mL de agua milliQ en un tubo falcon de 50 mL y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. Una vez separadas las fases, se eliminó el líquido sobrenadante y el sólido decantado se secó en estufa a 105°C durante 2 horas. Una vez completamente seco, se masó en una balanza analítica y se adicionó 1 mL tetrahidrofurano (THF), se pasó por un filtro de nylon de 0.22 µm (Rephile Bioscience) y se inyectó en el cromatógrafo.

Las variables cromatográficas utilizadas fueron optimizadas para la muestra de tanino con respecto a la menor dispersión de la campana gaussiana de la señal, donde la variable crítica corresponde al uso de 3 columnas en serie y las siguientes condiciones: temperatura de 31°C (horno de columnas) y flujo de 0.8 mL/min de tetrahidrofurano filtrado (Millipore 0.22µm) y desgasificado con helio como fase móvil. El tiempo de análisis es de 40 minutos y el volumen de inyección de 20 µL.

Se preparó la curva de calibrado con los siguientes estándares de poliestireno (PS): 850 g/mol (DS: 1.07); 2500 g/mol (DS: 1.00); 4130 g/mol (DS: 1.00); 13200 g/mol (DS: 1.06); 18000 g/mol (DS: 1.00).

Todas las masas molares están expresadas en masa (Mw). Donde, DS corresponde a la polidispersidad (Mw/Mn) (Mn: masa molar en número de moléculas).

#### 4.1.2 Análisis elemental

Esta técnica fue utilizada para determinar el contenido de C, H, N y O en el tanino insoluble de corteza sin modificar. Dicho análisis se realizó en un equipo LECCO CHN628 con detector TCD e Infrarrojo, con temperatura de horno entre 950-1050°C y temperatura del postquemador entre 850-1050°C. El pretratamiento de muestra consiste en secarlas y determinar su % de humedad y posteriormente, envolverlas en papel de estaño previo al análisis.

#### 4.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica fue utilizada para la determinación del tamaño y morfología de partículas en el tanino y además, para conocer la distribución del Fe a nivel microscópico dentro del tanino. Dicho análisis se solicitó en el Centro de Espectroscopia y Microscopía Electrónica (CESMI) de la Universidad de Concepción. Se analizaron muestras de tanino seco y tamizado en su estado natural y muestras de tanino impregnadas con Fe en un equipo ETEC Autoscan (SEM), las frecuencias utilizadas fueron de 2.5 segundos por ciclo (0.40 Hz). La preparación de la muestra consistió en recubrirla con una capa de oro de modo que pueda conducir la corriente. Este recubrimiento debe ser lo suficientemente grueso para que circule la corriente eléctrica que se deposita en la muestra y suficientemente delgado para que no enmascare las características superficiales de la muestra.

Para complementar el análisis anterior, se realizó un ensayo de Espectrometría de Energía Dispersiva, EDS por sus siglas en inglés (*Energy Dispersive Spectrometry*), en un equipo Bruker Quantax a la muestra de tanino y la muestra de tanino impregnada con Fe(III). Con esta técnica se analizó la composición elemental de cada muestra en áreas específicas y las condiciones de análisis fueron replicadas del estudio de Trâistarú et al. 2013<sup>129</sup>.

#### 4.1.4 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) fue la técnica utilizada para medir el cambio de masa de una muestra mientras se sometía a un programa de temperatura controlado en una atmósfera definida. Se evaluó la estabilidad térmica del tanino insoluble en estado natural y modificado con Fe. El equipo utilizado que corresponde a un TGA-MS el cual posee un detector de espectrometría de masa que informa las pérdidas en masa más importantes a una determinada temperatura de descomposición.

Este análisis fue realizado a muestras de tanino insoluble en un equipo Netzsch TG 209 F1. El horno y el equilibrio se purgaron continuamente con nitrógeno a 60 y 40 mL/min, respectivamente. Tamaño de la muestra fue de  $5 \pm 1$  mg. La temperatura varió de 30 a 550°C con velocidades de calentamiento de 2, 5, 10, 15, y 20°C/min. Los perfiles de descomposición térmica resultantes se representan como la pérdida de peso (%) y su primera derivada en función de la temperatura.

#### 4.1.5 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) fue utilizada para determinar la energía absorbida o desprendida por una muestra de tanino insoluble y tanino modificado cuando se sometieron a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Todos los procesos físicos y químicos llevan asociados una variación de entalpía por lo que provocan respuesta en DSC.

Este análisis fue realizado a muestras de tanino insoluble y muestras de tanino impregnadas con hierro en un equipo TA instruments 200. Se realiza el análisis con aproximadamente 6mg de muestra en base seca con una velocidad de 10 K/min de calentamiento desde 0-200°C.

#### 4.1.6 Espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

La espectroscopia emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) fue utilizada para determinar el contenido de Fe en el tanino insoluble. Además, se evaluó el contenido de Fe que se retiene en el tanino después de la impregnación y el Fe que se lixivia del sólido.

Inicialmente, se realizó un *screening* para determinar los metales presentes en la muestra de tanino, con el fin de comparar si hay diferencias cuantitativas entre ellos. Para el análisis de las muestras sólidas se requiere un pretratamiento de digestión ácida, procedimiento basado en el método de digestión para Biomasa (UNE EN 15290) utilizando un microondas CEM Mars 6. El ensayo de ICP-OES fue realizado en un equipo Perkin Elmer Optima 7000D.

Para el sistema de tanino modificado con Fe, se montó un sistema *batch* con agitación. El sistema consiste en un vaso precipitado de 500 mL sobre una placa agitadora, donde se pesan 0.5 g de tanino insoluble y se le adicionan 400 mL de solución ferrosa 1g/L. Se mantiene en agitación durante 5 horas. Posteriormente, el tanino es filtrado al vacío y el sólido es secado en estufa a 105°C por 2 horas.

#### 4.1.7 Infrarrojo medio (FT-IR)

El análisis de infrarrojo fue realizado para determinar los grupos funcionales más característicos en el tanino insoluble. Además, se evaluaron las variaciones en las bandas del tanino al adicionar Fe y posterior a la reacción de Fenton.

El análisis de FT-IR se realizó en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  en un equipo Perkin Elmer 2000 utilizando una pastilla de KBr con el propósito de incrementar la absorbancia de las bandas IR características del extracto, como también sus variaciones al ser unido a Fe(II)/Fe(III) y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La data fue adquirida en modo de transmitancia con 32 *scans* a 8  $\text{cm}^{-1}$  de resolución utilizando el software *Spectrum*.

#### 4.1.8 RMN $^{13}\text{C}$ de sólidos

Se utilizó esta técnica para caracterizar los enlaces existentes en el tanino a través de los acoplamientos químicos entre los carbonos existentes. Se efectuó el análisis utilizando una sonda de sólidos de manera de no modificar la estructura natural del tanino. Dicho análisis se realizó en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear Bruker 400 MHz con una muestra del extracto pulverizado y seco. La muestra se traspasó a una cerámica cilíndrica de 4mm y la frecuencia de operación fue 100.55 MHz en un total de 8000 *scans*.

#### 4.1.9 Desarrollo de metodología para análisis de tanino insoluble por *py*-GC/MS

Se realizó un análisis de *py*-GC/MS para la determinación de los grupos de fragmentos presentes en el tanino insoluble y también en la catequina, de modo de comparar ambos compuestos y sus respectivos componentes mayoritarios.

Se desarrolló una metodología para el análisis de tanino insoluble por *py*-GC/MS, la cual consiste en la carga de aproximadamente 80  $\mu\text{g}$  en una capsula de metal que se piroliza dentro de un tubo de cuarzo en rangos de temperatura entre 450°C-600°C. Se realiza la pirólisis en una unidad de micropyrolysis (EGA/PY-3030D, Frontier laboratorios, Fukushima, Japón). Este dispositivo está conectado en línea a un cromatógrafo de gases (GC, 6890N GC, Agilent Technologies) equipado con un detector de espectrometría de masas (MSD 5975C, Agilent Technologies). Donde, la muestra se colocó en un dispositivo de metal (vaso) (Frontier Laboratorios Eco-cup, 80 $\mu\text{l}$ ) que se posicionó en el muestreador auto-shot (EGA/PY-3030D) del pirolizador. El vaso con la muestra cargada se dejó caer a través de un tubo de cuarzo para ser calentado en el horno de pirólisis. Una vez calentado a la temperatura deseada, los vapores ingresaron al GC/MS. El calentamiento de la muestra a la

temperatura de pirólisis se llevó a cabo a 2000 °C/s bajo un flujo de He de alta pureza (Air Liquid, Chile,  $\geq 99.999\%$ ). La temperatura de pirólisis utilizada fue de 500°C.

Con el propósito de caracterizar el tanino, se evalúan los grupos funcionales y sus variaciones en las rupturas al modificar la temperatura de pirólisis. Se establece una rampa de temperatura en columna del GC adecuada para la determinación de grupos fenólicos y policíclicos aromáticos. La columna utilizada corresponde a una VF-1701 de 30mx 0.25x0.25mm (VF-1701ms). La temperatura del inyector se mantuvo a 250°C con un Split de 50:1 y el programa de temperatura en el horno del GC corresponde a 45°C durante 4 minutos, se calentó hasta 60°C a 1°C/min y se mantuvo durante 4 min. Posteriormente, se calentó a 150 ° C a razón de 3°C/min y se mantuvo por 10 min, después se calentó a 230°C a 3°C/min y se mantuvo por 10 min, finalmente, se calentó a 280°C a 3°C/min y se mantuvo por 30 minutos, con un tiempo total de análisis de 146 minutos. El flujo de gas en la columna se mantuvo a 2.0 mL/min. Los compuestos fueron identificados con la biblioteca espectral de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).





## 4.2 Determinación de la reactividad del catalizador heterogéneo en la reacción de Fenton.

### 4.2.1 Reducción de Fe(III)

En esta determinación se cuantifica el Fe(II) reducido a partir del Fe (III) mediante la formación de un complejo entre el ion Fe(II) y ferrozina (3-(piridil)-5,6-bis(ácido-4-fenilsulfónico)-1,2,4-triazina), siendo seguida la formación de este complejo mediante un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible a 567nm. La técnica empleada es una variante de la utilizada por Chen y Pignatello<sup>130</sup> que evita el desplazamiento en el equilibrio Fe(II)/Fe(III) debido a la quelación de Fe(II) por ferrozina. Para la preparación de las soluciones se pesan 0.059g de ferrozina (97%, Sigma Aldrich) en 100 mL, 0.0242g de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O (≥98%, Sigma Aldrich) en 100 mL, 0.174g de catequina (≥98%, Sigma Aldrich) en 100 mL, 2.324g de KF (≥99%, Sigma Aldrich) en 100 mL, 4.182g de Buffer Bis-tris (≥98%, Sigma Aldrich) y 60 mg de tanino. Todas las soluciones son preparadas con agua *nanopure* hervida y burbujeada con argón.

La reacción se lleva a cabo en un reactor de 25 mL desde el cual se tomaron alícuotas a distintos tiempos. Las alícuotas fueron mezcladas en una cubeta con 0.3 μmol·L<sup>-1</sup> de ferrozina y 100 mmol·L<sup>-1</sup> de KF como agente complejante de Fe(III). El F<sup>-</sup> en el sistema de reacción permite obtener medidas estables y reproducibles de la absorbancia del complejo [Fe(ferrozina)<sub>3</sub>]<sup>4-</sup> debido a que retarda el desplazamiento del equilibrio mediante la formación de un complejo estable con Fe(III)<sup>50</sup>.

La reducción se evalúa en presencia de catequina y tanino para contrastar el efecto de estos compuestos en la reducción de Fe(III). La reducción de Fe(III) por estos compuestos fue determinada mediante la cuantificación del Fe (II) formado a distintos tiempos de reacción valores de pH de 3.40 y 7.00. El pH de cada solución se ajustó antes de cada reacción en el pHmetro 3 Start Thermo Orion. Para el pH 7.00 se utilizó buffer bis-tris 0.05 mol·L<sup>-1</sup> y para pH 3.40 se ajustó con HNO<sub>3</sub>. La concentración final dentro de cada sistema de reacción fue: 0.15 μmol·L<sup>-1</sup> Fe(III) y 1.5 μmol·L<sup>-1</sup> de catequina. Para tanino se agregan los 60 mg formándose un sistema de reacción heterogéneo. Cada reacción se inició al agregar la respectiva alícuota de Fe(III).

#### 4.2.2 Determinación de constantes de velocidad en la degradación de naranja de metilo

Para determinar la reactividad del tanino cargado con Fe(III) se evaluó la velocidad de degradación de naranja de metilo, un compuesto ampliamente utilizado en la evaluación de distintos sistemas AOP y se comparó con los sistemas: reacción de Fenton tradicional y reacción de Fenton conducida por catequina.

Los análisis se realizaron en el espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible que posee sistema de arreglo de diodos, adquiriendo los cambios en la absorbancia a través del tiempo. Se cuantificó la concentración de naranja de metilo remanente utilizando curvas de calibrado (0-35  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de concentración a pH=3.4).

El reactor utilizado consiste en una cubeta de plástico con tanino insoluble en el fondo separado físicamente del resto de los componentes de la mezcla por lana de vidrio. Se usó además, un agitador magnético en el fondo de la cubeta que mediante el movimiento de agitación permite el contacto entre el tanino y la solución con naranja de metilo, hierro y peróxido. Se adicionan soluciones de 500  $\mu\text{L}$  de naranja de metilo ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  ( $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y 20 mg de tanino insoluble. Para el sistema de Fenton conducido por catequina se utilizaron 500  $\mu\text{L}$  de catequina ( $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), en ambos casos se completa hasta 2 mL la cubeta con agua *nanopure* hervida y burbujeada con argón.

Debido la dispersión en los espectros que se genera por la agitación, es necesario realizar una corrección a todos los espectros obtenidos. Se realiza una división del valor obtenido por un valor de absorbancia a una distinta longitud de onda que no interfiera en la región UV-Vis de la determinación (ecuación 12).

$$\lambda_{\text{corregida}} = \frac{\lambda - \lambda_0}{\lambda_0} \quad (12)$$

Para efectos de comparación entre los sistemas en la degradación del colorante se calculan las constantes de velocidad de primer orden para los sistemas Fenton convencional, Fenton conducida por catequina y Fenton heterogénea conducida por tanino insoluble. Las concentraciones fueron calculadas a través de una curva de calibrado ( $y=27643\pm 36x - 0.0081\pm 0.003$ ;  $R= 0.999$ ).

El valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{\text{exp}}$ ) fue de  $27643 \text{cm}^2\cdot\text{mmol}^{-1}$  cercano al valor reportado en bibliografía ( $\epsilon= 27900 \text{cm}^2\cdot\text{mmol}^{-1}$ )<sup>131</sup>.

#### 4.2.2.1 Efecto adsorbente

Se evaluó el efecto adsorbente del tanino sobre naranja de metilo para corroborar que la disminución en la concentración del colorante se produce por efecto de la degradación por la reacción de Fenton conducida y no por otro efecto secundario. Para lo anterior, se preparó una solución de naranja de metilo con absorbancia cercana a 1.0 y se le adicionó tanino y se dejó en reposo durante 24 horas. Posterior a eso, se filtra la solución y se mide la disminución de absorbancia por UV-Vis.

#### 4.2.3 Determinación de producción de radicales hidroxilo por resonancia paramagnética electrónica (EPR)

Se utilizó la técnica de EPR para la determinación de radicales hidroxilo en cada sistema en estudio. Además, dicha técnica fue validada por los resultados de detección de radical hidroxilo por cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por fluorescencia (HPLC-Fl). Los análisis de EPR fueron realizados en la Universität de Stuttgart en el Departamento de Química Inorgánica en Alemania.

La detección directa de algunos radicales como  $\cdot\text{OH}$  es muy difícil o prácticamente imposible en solución a temperatura ambiente. La técnica de *spin-trapping* es una técnica donde un compuesto nitrona (por ejemplo, 5-dimetil-1-pirrol N-óxido (DMPO)) reacciona con un radical objetivo para formar un compuesto estable y distinguible para ser detectado por EPR. Los radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) producidos por los diferentes sistemas estudiados en este trabajo fueron detectados por la formación de un aducto radical paramagnético que tiene la ventaja que puede ser fácilmente observado por espectroscopia EPR (Janzen 1980)<sup>132</sup>.

Las muestras fueron transferidas a través de una jeringa que se une a una celda de flujo AquaX que está conectada con la cavidad Bruker 4108 TMH / 9701 en el instrumento Bruker ESP 300, con el objetivo de adquirir el primer espectro correspondiente a la señal del aducto DMPO/ $\cdot\text{OH}$  en el menor tiempo posible. La reacción se inicia con la adición de la alícuota de hierro al reactor.

La reacción no puede ser detenida debido a que el aducto paramagnético presenta descomposición a través del análisis, por lo que los espectros son adquiridos de manera continua. Además, el aducto puede ser desactivado por los remanentes de peróxido en el sistema.

Después de iniciada la reacción el campo magnético fue ajustado a una de las dos señales más importantes en el espectro del aducto y el cambio en la intensidad de esta señal fue estudiada a

través del tiempo que continúa la reacción. El cambio en la intensidad se puede asociar de manera indirecta con una medida de la cantidad de radicales ·OH en el sistema. La cantidad de DMPO /·OH producido es considerado proporcional a la altura de esta señal<sup>133</sup>.

Los perfiles que se obtienen por EPR corresponden a cambios en la señal del aducto DMPO/·OH en el tiempo que son resultado de dos procesos: la formación del aducto por producción de radicales ·OH por reacción de Fenton y la descomposición del mismo por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en el sistema, el cual oxida el grupo nitróxido del aducto a productos no radicalarios por medio de una cinética de pseudo primer orden. Por otro lado, los perfiles obtenidos por mediciones en EPR exhiben un comportamiento complejo, pues contienen variables involucradas en ambos procesos. De modo de simplificar el análisis, la data original fue ajustada a ecuaciones para comparar todos los perfiles entre sí en la producción de radicales hidroxilo, donde una señal normalizada es obtenida por la división entre la data original y el valor límite cuando el tiempo tiende a infinito.

Una vez normalizados los perfiles fueron ajustados a la ecuación 12 ( $r^2 > 0.98$ ), donde A representa la altura de la señal más grande del aducto, b es la pendiente de la recta, t es el tiempo y C es una constante.

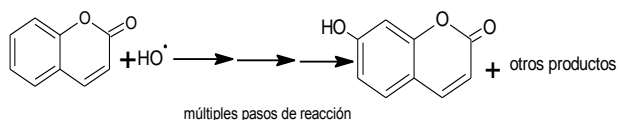
$$\ln (A_t) = -b \cdot t + C \quad (12)$$

Las variaciones observadas en los perfiles de decaimiento del aducto están reflejados en los valores de b, que es interpretado como una diferencia relativa en la producción de radicales ·OH. Toda la data fue analizada con Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA).

Las concentraciones fueron: 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> de catequina o 60mg de tanino insoluble, 0.15 mmol·L<sup>-1</sup> Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> o FeSO<sub>4</sub>, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 40 mmol·L<sup>-1</sup> de DMPO. El pH fue ajustado a 3.4 con HNO<sub>3</sub> y a pH 7.0 con buffer bis-tris.

#### 4.2.4 Determinación de producción de radicales hidroxilo por HPLC-fluorescencia

Para la comparación entre los sistemas Fenton en estudio en la producción de radicales hidroxilo a mayores tiempos de análisis que los obtenidos por EPR se desarrolló una metodología por HPLC-fluorescencia. La técnica empleada consistió en monitorear la formación de 7-hidroxycumarina (7OHC) (ecuación 13), la cual fluoresce en la región del visible a 456nm.



(13)

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en triplicado, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón. Las concentraciones finales en el reactor fueron 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> de catequina o 60 mg de tanino insoluble (según corresponda), 0.15 mmol·L<sup>-1</sup> Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> o FeSO<sub>4</sub>, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 500 μmol·L<sup>-1</sup> de cumarina. El pH fue ajustado a 3.4 con ácido nítrico.

De forma análoga se realizaron los experimentos para las mismas concentraciones en el reactor a pH=7.0.

La reacción fue iniciada con la adición de la alícuota de hierro al reactor. Las alícuotas desde el reactor fueron tomadas cada 5 minutos desde el inicio y fueron detenidas EDTA a pH=7.0. Después de esto, cada punto de la reacción fue analizado por HPLC-fluorescencia a pH=3.40.

El sistema de cromatografía líquida utilizado fue un Merck Hitachi HPLC. El análisis fue realizado en fase reversa con una columna Merck LICHROSPHER C18 de 15 cm. El software *Chromatography data station* se utilizó para controlar el sistema. En todos los análisis el flujo fue 1.0 mL/min. La solución A corresponde a 99% agua y 1% de ácido fórmico, por otro lado, la solución B corresponde a 100% de acetonitrilo. La proporción de fase móvil fue 85% de solución A y 15% de solución B en modo isocrático.

### 4.3. Aplicación del sistema Fenton heterogéneo en la degradación de contaminante recalcitrante

#### 4.3.1 Introducción

Posterior a la caracterización del tanino y evaluación del rendimiento del catalizador heterogéneo en sistemas Fenton, se evaluó el soporte en un sistema de degradación a través de la generación de especies activadas en el sistema Fenton heterogéneo soportado y conducido por tanino insoluble en la degradación de atrazina como contaminante modelo, que fue escogido por el amplio estudio existente de su eliminación en efluentes por procesos Fenton convencionales<sup>134-136</sup>. Se degradó el contaminante en condiciones optimizadas obtenidas a través de un diseño experimental, donde se evaluaron las variables de pH, concentración de Fe(III), concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cantidad de tanino necesaria para la mayor degradación.

Posterior a la degradación de atrazina por sistema Fenton heterogéneo soportado en tanino insoluble, se evaluaron los productos de degradación del sistema mediante SPE-GC/MS para lo cual se analizó un nuevo reactor de mayor volumen en condiciones optimizadas.

#### 4.3.2 Contaminante modelo: Atrazina

La atrazina es actualmente el herbicida más utilizado en unos 80 países. Este herbicida se descubrió e introdujo al mercado en los años 50's y actualmente se utiliza debido a su bajo costo y a su efectividad para evitar la pérdida de cultivos por la proliferación de hierba (IARC, 1999). En la Unión Europea se ha prohibido su uso debido al comprobable efecto de disruptor endocrino en diversas especies<sup>137</sup>.

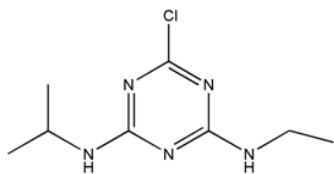


Figura 7: Estructura química de atrazina

A diferencia de la tendencia de los países del hemisferio norte, a reducir y en algunos casos a eliminar completamente el producto, en Chile se observa un aumento en el consumo. Valores publicados por el Servicio Agrícola Ganadero para el año 2001 muestran que en ese entonces, se transaban 140,473 Kg/L del producto. La última publicación disponible que data del año 2012 evalúa en 461,340 Kg/L la cantidad transada. El consumo de atrazina creció a más del triple en 11 años, lo

cual debe generar algún tipo de alarma, tanto en la población como en los servicios que autorizan el uso del producto.

#### 4.3.3 Degradación de atrazina

Se desarrolló una metodología analítica mediante HPLC UV-Vis para la determinación y cuantificación de atrazina en agua. Las muestras a cuantificar fueron inyectadas con *autosampler* en un HPLC Merck Hitachi provisto de una columna en fase inversa C18 de 15 cm de largo con partículas de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Merck) y detector UV-VIS con longitud de onda a 222 nm. La fase móvil utilizada fue metanol y buffer fosfato 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  a pH 2.5 en una relación 70:30, bomba isocrática.

##### 4.3.3.1 Reactor batch

El recipiente utilizado como reactor fue una placa Petri de 14 cm de diámetro, en la que se depositó la cantidad requerida de tanino insoluble y 43 mL de agua pH requerido, esta mezcla fue agitada durante 20 minutos antes de completar el volumen total del reactor. Transcurrido este tiempo, se añadió 5 mL de la solución madre de atrazina, 1 mL de solución madre de peróxido y 1 mL de la solución madre de Fe(III) para dar inicio a la reacción, en un volumen total de 50 mL (se desprecia el volumen ocupado por los mg de tanino). La reacción fue detenida utilizando EDTA a pH=7.0 3.00  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Las concentraciones en el reactor corresponden a 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma Aldrich, Germany), 12.50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de Fe(III) (Sigma Aldrich, Germany), 12 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de atrazina (Supelco, analytical standard) y 40 mg de tanino.

Las muestras fueron tomadas en alícuotas de 1 mL a 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 30 y 60 minutos desde el inicio de la reacción y posteriormente, depositadas en un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de la solución EDTA (concentración en el tubo 1.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Posteriormente, la mezcla es filtrada con filtros PES de 0.22  $\mu\text{m}$  y se inyectan en el cromatógrafo.

### 4.3.4 Diseño Experimental

#### 4.3.4.1 Barrido (diseño experimental preliminar, screening)

Las variables consideradas fueron cantidad de tanino (mg), concentración de Fe(III), concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y pH (Tabla II).

Tabla II: Rango de variables utilizadas en el barrido.

Variable	Valor mínimo (-1)	Valor central (0)	Valor máximo (+1)
Tanino (mg)	20	40	60
Fe III ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	50	150	250
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.5	1.5	3.0
pH	2.5	4.5	7.0
Respuesta	concentración de atrazina en el reactor		

Al ingresar los valores extremos de cada variable al software MODDE, el barrido resultante constó de 16 experimentos más 4 puntos centrales (20 reacciones en total).

Todas las soluciones madres fueron llevadas a aforo con agua hervida, que fue preparada acidificando 1 litro de agua nanopure hervida (enfriada a temperatura ambiente) con cantidad suficiente de ácido nítrico o alcalinizada con hidróxido de sodio diluido, según pH requerido.

#### 4.3.4.2 Modelo circunscrito central compuesto (CCC)

Para optimizar las variables se utiliza un diseño circunscrito central compuesto (Figura 8).

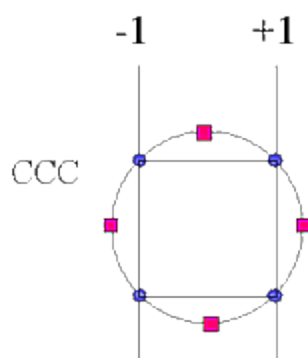


Figura 8: Representación gráfica del modelo utilizado en la optimización.



Las variables consideradas fueron cantidad de tanino, concentración de Fe(III), concentración de peróxido y pH (Tabla III).

Tabla III. Variables usadas para el diseño.

Variable	Valor mínimo (-1)	Valor central (0)	Valor máximo (+1)
Tanino (mg)	30	40	50
Fe III ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	50	100	150
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.85	1.5	2.4
pH	2.4	3.4	4.4
Respuesta	Concentración atrazina en el reactor		

Al ingresar los valores extremos de cada variable al software MODDE, el diseño resultante constó de 24 experimentos más 3 puntos centrales (27 reacciones), los experimentos se realizaron con detención a los 30 minutos de iniciada la reacción.

#### 4.3.5 Determinación de productos de degradación

Las muestras de agua con contenido de atrazina no pueden ser analizadas directamente en un GC-MS<sup>138</sup>, por lo tanto necesitan un tratamiento previo. La preparación de muestras más común para la detección de trazas de atrazina en aguas involucra una extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés)<sup>125</sup> la cual ha sido ampliamente utilizada como técnica para concentrar contaminantes en aguas naturales, debido a las ventajas que posee en comparación a la tradicional extracción líquido-líquido; disminuye el uso y exposición a solventes riesgosos, posee metodología adaptable a la automatización, es simple y reproducible, consume menos tiempo, las extracciones no son obstaculizadas por formación de emulsiones que deben ser separadas por centrifugación<sup>126</sup>, además no se presentan numerosas interferencias durante el análisis, lo cual es relevante ya que las concentraciones de pesticidas o herbicidas en aguas naturales resultan ser de una parte por billón y pueden verse afectadas por interferencias<sup>126</sup>. Por lo tanto, se concluye que la técnica más utilizada y efectiva es SPE-GC-MS<sup>126,139,140</sup>, debido a que posee además de una buena precisión, un bajo porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), altos porcentajes de recuperación en muestras, también existe la posibilidad de tratar muestras de matrices de rango relativamente simple, como aguas subterráneas, hasta las más complejas como aguas superficiales, aguas residuales o muestras de suelo<sup>141</sup> y tiene la capacidad de extenderse para determinar otros compuestos del grupo triazina y sus posibles interferentes orgánicos, en el medio ambiente<sup>127,138</sup>.

#### 4.3.5.1 Reactor

El recipiente utilizado como reactor fue un vaso de precipitado de 1000 mL donde se adicionan aproximadamente 600 mg de tanino insoluble y 820 mL de agua a pH 3.3 (pH óptimo para la degradación), esta mezcla fue agitada durante 20 minutos y trasvasiados a un matraz de aforo de 1000 mL, se añadió 100 mL de la solución madre de atrazina, seguido de 20 mL de solución madre de peróxido y 20 mL de la solución madre de Fe(III) para dar inicio a la reacción. Se completó el aforo con agua hervida a pH 3.4 y se trasvasió a vaso de 1000 mL para mantener la agitación.

La reacción se detuvo con 10 mL de solución madre EDTA a pH=7.0 (20 mmol·L<sup>-1</sup> en reactor), las concentraciones finales en el reactor fueron: atrazina 12 μmol·L<sup>-1</sup>, Fe(III) 150 μmol·L<sup>-1</sup> y peróxido 2.4 mmol·L<sup>-1</sup>.

#### 4.3.5.2 Extracción SPE

Esta técnica requiere de un disco de extracción HLB (6cc, Oasis®) el cual ha resultado adecuado para aislar y retener la atrazina junto con sus productos de degradación de matrices acuosas en comparación con otros tipos de adsorbentes<sup>142,143</sup>.

Se comenzó por el montaje del cartucho de extracción HLB (6cc, Oasis®) en un cámara colectora conectada a un sistema de vacío, para proceder al acondicionamiento de los cartuchos portadores de la fase estacionaria, en esta etapa se utilizó 6 mL de metanol, con el propósito de incrementar la interacción entre la superficie de sílice del disco y los analitos a retener.

Luego de que pasara todo el metanol a través del cartucho, se continuó con la etapa de lavado, para lo que se utilizó 6 mL agua *nanopure*. En las etapas de acondicionamiento y lavado se dejó pasar los líquidos por gravedad.

Posterior al acondicionamiento se procedió a cargar la mezcla reaccionante (detenida con EDTA a pH 7.0) utilizando una bomba de vacío para controlar el flujo a 12 mL/min, necesario para mantener la interacción entre fase estacionaria y los analitos. Una vez que se hizo pasar el litro de muestra se dejó secar el disco durante 15 minutos conectado al sistema de vacío. Para la elución de la muestra se dejó pasar por gravedad 5 mL de metanol a través del cartucho, el extracto fue recibido en un vial ámbar.

#### 4.3.5.3 GC-MS

Posterior a lo realizado en el punto 4.2.5.2, se llevó el vial a sequedad con gas nitrógeno a flujo suave. Posteriormente se añadió 200 µL (con microjeringa) de diclorometano al vial, que luego fue agitado en un vórtex para asegurarse de que no existieran pérdidas de muestra. Posteriormente, se filtra el contenido con filtro de jeringa Nylon (0.22µm), el cual posteriormente es inyectado en un equipo GC-MS Agilent 7890 provisto de una columna HP-5 (60m• 0.25mm• 0.25 µm), donde se determina la presencia de atrazina y los productos de descomposición del sistema Fenton. Los parámetros instrumentales utilizados en las mediciones por GC-MS son detallados en la Tabla IV.

Tabla IV: Parámetros instrumentales utilizados para el análisis por GC-MS en la determinación de compuestos de degradación.

Flujo de columna	1.0 mL/min
Flujo purga de septa	3.0 mL/min
Temperatura horno	100 °C por un minuto. 30 °C/min hasta 130° C por un minuto. 8.0 °C/min hasta 220° C por un minuto. 30 °C/ min hasta 280°C por un minuto.
Duración programa de análisis:	18.25 minutos.
Temperatura inyector	250°C
Temperatura detector	280°C
Temperatura fuente de iones	230°C
Purga de Split	1/10
Volumen de inyección	1µL

#### 4.3.6 Carbono Orgánico Total (TOC)

Se determinó el carbono orgánico total (TOC) en muestras del reactor posterior a la degradación de atrazina, con el fin de estimar el contenido de carbono en la solución. Se analizó el contenido de carbono directamente en 50 mL del reactor resultante posterior a la reacción de degradación de atrazina.

Se utilizó un equipo de modelo Vario TOC (Elementar, Alemania). Se realizaron curvas de calibración con biftalato de potasio en un rango de 0.2-20mg•L<sup>-1</sup><sup>144</sup>.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1 Caracterización de fracción insoluble de tanino de corteza

##### 5.1.1 Cromatografía de permeación en gel (GPC)

###### Estimación de masa molar promedio de taninos insolubles

Una vez inyectada la curva de calibrado por las columnas HR3, HR1 y HR 0.5, se procedió a inyectar las muestras de taninos acetiladas. En la Figura 9 se muestra el cromatograma GPC obtenido para tanino insoluble, previamente acetilado y disuelto en THF.

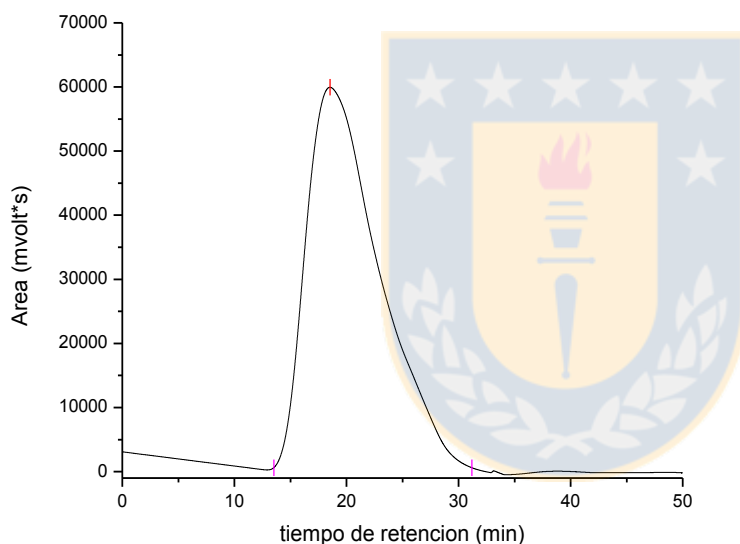


Figura 9: Cromatograma GPC obtenido para tanino insoluble.

Al evaluar la distribución de masa molar de la fracción insoluble de taninos de corteza se obtiene un *peak* sobre los 20 minutos de análisis, que abarca cerca del 98% de la señal total resultando un valor promedio de  $M_w$  cercano a 2800 g/mol obtenido a través de la curva de calibrado polinomial de orden 2 (Figura A6). La polidispersidad (DS) obtenida en el análisis es variable y poco reproducible, obteniendo así valores entre 1.1-2.3. Lo anterior ha sido ampliamente discutido en la bibliografía donde se señala que la distribución de la masa molar de los taninos condensables provenientes de fuentes naturales dependerá directamente del método de extracción y de la heterogeneidad del extracto debido a que existe una mezcla de diferentes oligómeros dentro del tanino lo que dificulta una estimación reproducible en términos de dispersidad<sup>145</sup>.

### 5.1.2 Análisis elemental

El análisis elemental obtenido taninos insolubles de corteza de *Pinus radiata* se muestra en la Tabla V. Los resultados obtenidos indican que el polímero está constituido básicamente por átomos de C, H, y O que se obtiene por diferencia. La muestra presenta un nulo contenido de azufre y nitrógeno, lo anterior es concordante con lo descrito en la bibliografía<sup>9</sup>. Al comparar con el análisis de catequina se puede concluir el similar contenido elemental con el extracto insoluble de corteza.

Tabla V: Análisis elemental de taninos insolubles

	%C	%N	%H	%O
Tanino insoluble	63.9±0.9	0±1	6.2±0.2	29.9±0.8
Catequina	63.8±0.2	0±0.1	5.1±0.03	31.3±0.2

### 5.1.3 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)/EDS

Este análisis se realiza con fines comparativos para determinar los cambios o modificaciones en el tanino al agregar Fe. En la Figura 10 (a) y 10 (b) se puede observar con una resolución de 50µm las diferencias entre tanino insoluble e impregnado con Fe que hay una disminución de las partículas en forma esférica, lo que podría indicar que el Fe cubre ciertos espacios intermoleculares que existen en el tanino de modo que pierde la forma característica. O por otro lado, que se rompen los enlaces de hidrógeno entre ciertos grupos fenólicos presentes en el tanino, que le confieren una estructura cíclica y, que al quelarse con Fe, pierden dicha orientación.

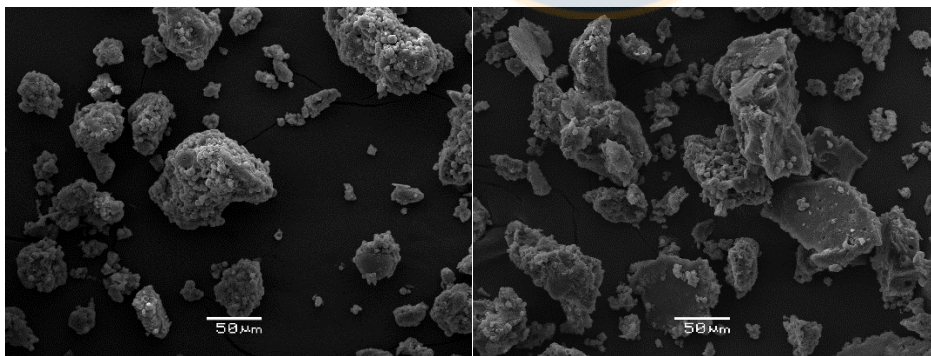


Figura 10: (a) SEM de tanino insoluble, (b) SEM tanino insoluble impregnado con Fe (1g•L<sup>-1</sup>).

Al aumentar la resolución del análisis se puede observar en la Figura 11 que la tendencia se mantiene. Además, se aprecia que en el tanino sin impregnar existen micro-fibrillas que no habrían sido destruidas en el proceso de extracción ni en la reducción mecánica de la muestra que podrían corresponder a ácidos grasos detectados por la técnica de GC-MS (5.1.9)

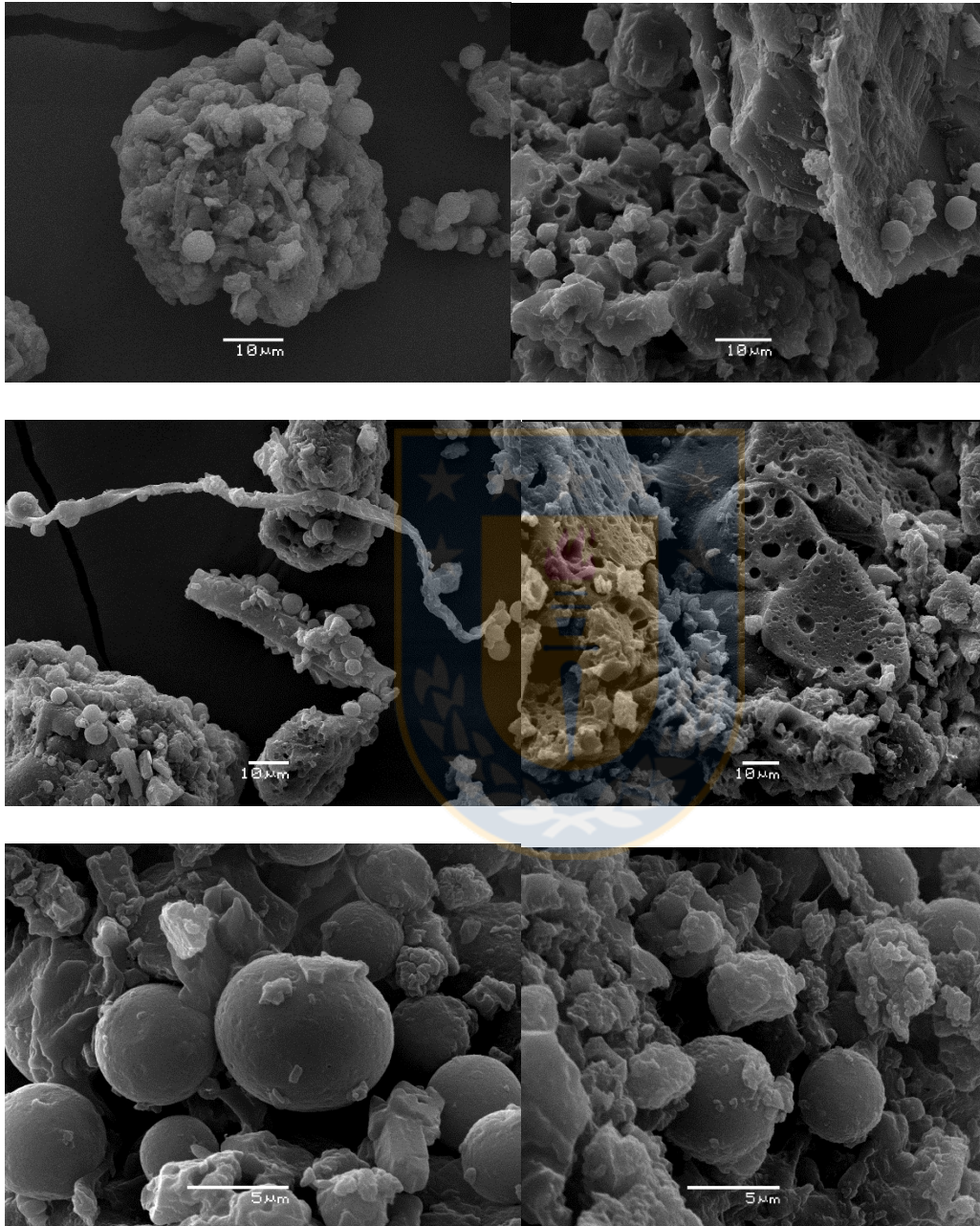


Figura 11: Aumento en la resolución del análisis de microscopía electrónica hasta 5μm.

En la Figura 12 (a), se presenta el resultado del análisis EDS obtenido para la muestra de tanino donde se puede apreciar la forma esférica de las partículas. Según el análisis EDS el contenido elemental en masa de la muestra corresponde a 62.88% de carbono, 30.04% de oxígeno y 0.08% de hierro. A su vez, en la Figura 12 (b), se muestra el análisis para tanino impregnado con hierro, en el cual los resultados de composición en masa fueron: 71.02% de carbono, 26.12% de oxígeno y 1.86% de hierro.

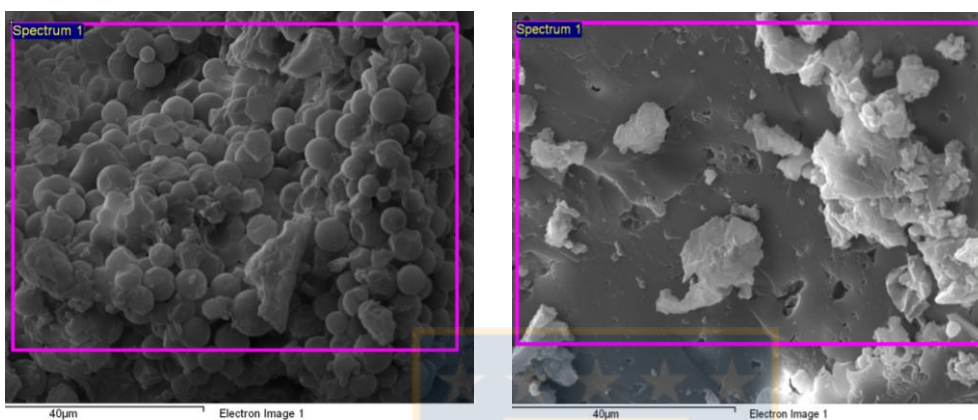


Figura 12: (a) EDS de tanino insoluble, (b) EDS de tanino insoluble impregnado con Fe.

### 5.1.4 Análisis termogravimétrico

Se registra constantemente la masa de una muestra, colocada en una atmósfera controlada de N<sub>2</sub>, en función de la temperatura.

El TGA/DTG obtenido para el tanino se muestra en la Figura 13 (a). El análisis cualitativo permite determinar la estabilidad térmica del tanino en atmósfera inerte N<sub>2</sub>, presentando una gran pérdida de masa (~25%) alrededor de los 270 °C, que corresponde a la pérdida de grupos funcionales oxigenados lábiles presentes en el material en forma de CO, CO<sub>2</sub> y vapor de agua. A partir de 300 °C hay una lenta y constante pérdida de masa (~15%), asociada a la desorción de grupos funcionales oxigenados más estables. La eliminación del agua adsorbida se refleja en una pérdida de masa (~10%) por debajo de 100 °C<sup>13</sup> (Figura 13 a). A 548°C se determinó una masa residual de 47.57%. Análisis en las mismas condiciones experimentales se realizaron para el tanino insoluble impregnado con Fe(II) y Fe(III), Figura 13 (b) y 13 (c), respectivamente. A su vez también se analiza el tanino posterior a la reacción *Fenton-like*, esto es decir, después de la acción de Fe(III) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la Figura 13 (d).

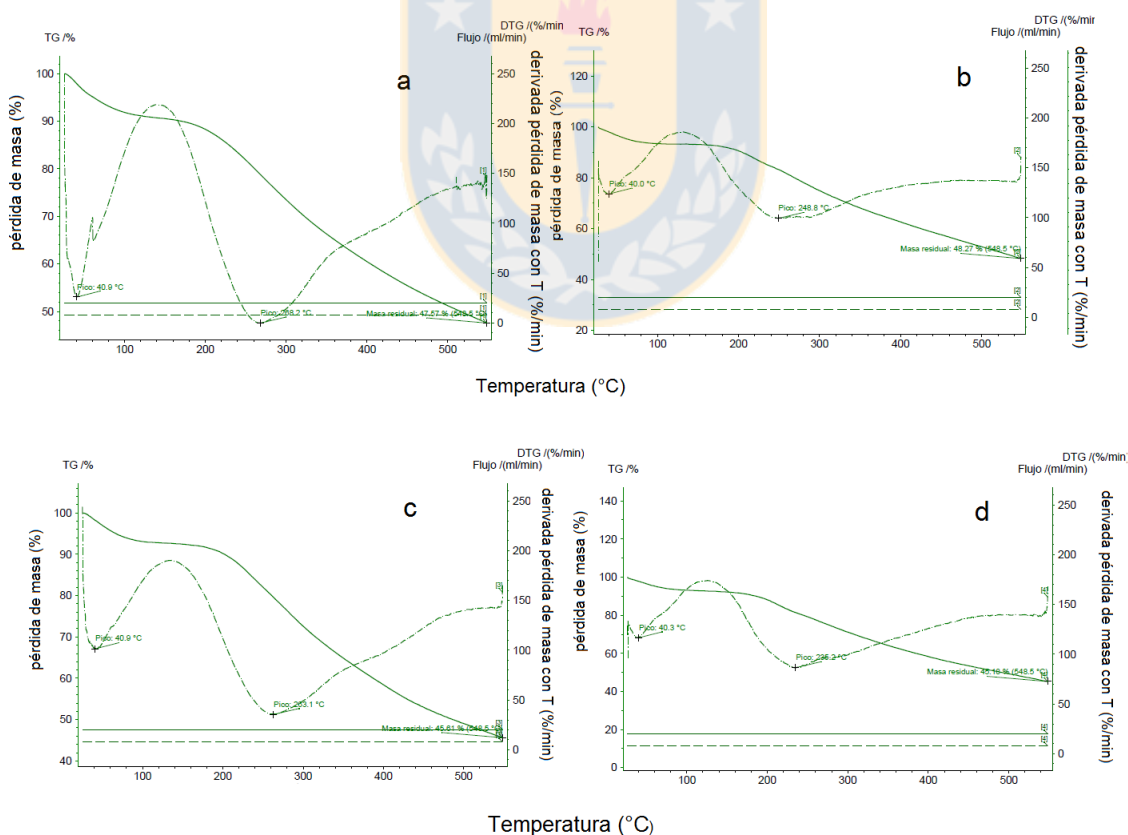


Figura 13: (a) TGA-MS para tanino insoluble (b) TGA-MS tanino impregnado con Fe(II); (c) TGA-MS para tanino impregnado con Fe(III); (d) TGA-MS posterior a tratamiento con Fe(III) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Al analizar los perfiles TGA-MS obtenidos se puede concluir que no existen importantes diferencias entre ellos, ya que en los cuatro termogramas se observa la pérdida cercana a 40°C, producto del agua adsorbida por las muestras. En el rango cercano a 250°C se observa una pérdida importante en ambas muestras impregnadas con Fe, que también se observa en la muestra de tanino sin impregnar (a) que se asocia a la pérdida de grupos funcionales oxigenados lábiles presentes en el material en forma de CO, CO<sub>2</sub> y vapor de agua. En el caso de d, la temperatura de ésta pérdida disminuye a 235°C.

En el caso de todas las muestras, se observa un decaimiento sobre los 300°C, con un remanente en masa sobre el 40% para todos los casos.

#### 5.1.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El termograma de un barrido dinámico del tanino insoluble (hasta 10% humedad) a una velocidad de 10 K/min de calentamiento se presenta en la Figura 14. Se evalúa el comportamiento del extracto en un rango entre 20-200°C. La curva ha sido normalizada con respecto a la masa de muestra pesada en cada ensayo (~6 mg). La transición que se muestra en la Figura 14(a) con un máximo de pico a 130°C señala un proceso endotérmico, que se puede atribuir, ya sea, a pérdida de agua que no haya sido eliminada en el proceso endotérmico hasta 100°C o a la fusión de posibles cristales de monómero catequina presentes en la muestra. Si los taninos presentan en su composición una fracción de monómero, sería de esperar que la pérdida de esta fracción fuera evidente en los termogramas de los taninos (174°C, señal característica en catequina). En el termograma analizado se observa la presencia de endotermia a temperaturas del orden de 130°C en el primer barrido dinámico que desaparece o disminuye considerablemente al secar la muestra. Por tanto la endotermia presente a estas temperaturas podría ser atribuida fundamentalmente a la presencia de agua en las muestras.

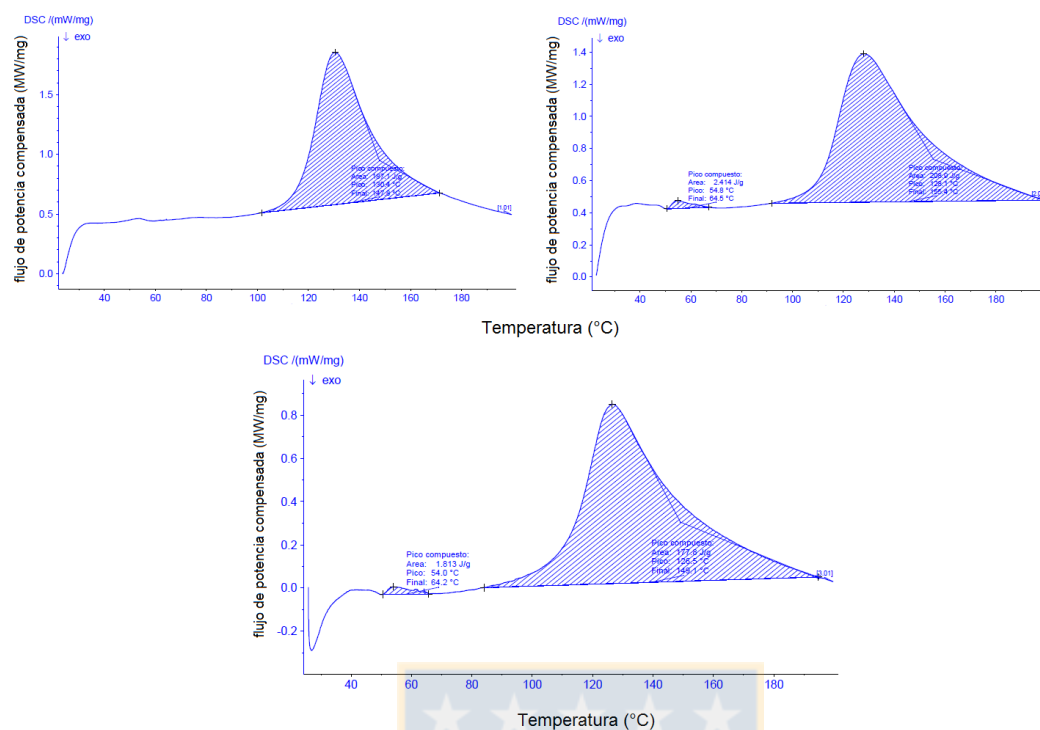


Figura 14: (a) Perfil DSC para tanino insoluble (10-200°C); (b) DSC tanino impregnado con Fe(II); (c) tanino impregnado con Fe(III)

La fusión de posibles cristales de monómero catequina presentes en la muestra es descartado considerando la información entregada por la microscopía electrónica de barrido (5.1.3) donde es posible observar la ausencia de estructuras cristalinas en el tanino. Al comparar ambos perfiles con el tanino original, no se observan diferencias que muestren algún cambio en los procesos internos de la muestra aun cuando es impregnada con Fe.

### 5.1.6 Espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

El análisis de ICP-OES se realiza para comparar el contenido de Fe en el tanino impregnado con el tanino sin impregnar. Con esto se puede determinar la cantidad de Fe no lixiviable en el sólido. En la Tabla VI, se muestra el contenido de Fe en ambos análisis.

Tabla VI: Cuantificación por ICP-OES de contenido de Fe en muestras de taninos.

Muestra	Sólido (g•Kg <sup>-1</sup> )	Lixiviado (g•L <sup>-1</sup> )
Tanino	7.909	-----
Tanino + Fe	35.87	23.24

Los ensayos de tanino impregnado se realizan por triplicado con un RSD= 4.3%. El error se asocia al proceso de digestión por separado que se le realiza a cada muestra (UNE-EN 15290). De este modo, el valor promedio obtenido de concentración de Fe (Tabla VI) muestra que el tanino impregnado con Fe ( $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) aumenta su contenido unas 4.5 veces frente al tanino insoluble en estado natural. Este análisis indica que el tanino es capaz de retener Fe y podría ser utilizado como soporte de reacción.

#### 5.1.7 Infrarrojo medio (FT-IR)

Se analizó una muestra pulverizada y seca de tanino insoluble por FT-IR en infrarrojo medio ( $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ ). Se puede observar en la Figura 15 una banda intensa aproximadamente a  $3300 \text{ cm}^{-1}$ , característica de los grupos hidroxilo ( $-\text{OH}$ ). El espectro presenta una banda a  $1320 \text{ cm}^{-1}$  y otra en la zona  $1610 \text{ cm}^{-1}$  características de los anillos bencénicos presentes en los extracto tánicos, tal y como presentan en la bibliografía Nakagawa y Sugita (1999)<sup>146</sup>. Por otro lado, la banda a  $1280 \text{ cm}^{-1}$  es característica de vibración de tensión C-O aromático y  $1111 \text{ cm}^{-1}$  a balanceo C-H.

Al comparar el espectro del tanino insoluble y el tanino impregnado por Fe y/o posterior a la reacción de Fenton se observan cambios en las bandas de hidroxilo ( $\sim 3000\text{cm}^{-1}$ ) y las bandas del carbonilo ( $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ ), dos bandas útiles para comparar la oxidación del sustrato. En la Figura 15 se pueden observar los espectros IR de tanino insoluble sin modificar, tanino insoluble impregnado con Fe(II) y Fe(III), tanino insoluble posterior a la reacción de Fenton y *Fenton-like*. Todos los espectros fueron corregidos y normalizados a  $1525\text{cm}^{-1}$  (banda correspondiente a vibración de estiramiento de anillos aromáticos). Al comparar los espectros normalizados, se pueden apreciar diferencias en la banda característica del hidroxilo, donde el espectro con mayor %transmitancia corresponde a un sistema oxidado por Fenton, el mismo efecto se observa en la región cercana a los  $1300 \text{ cm}^{-1}$ , donde se encuentran los  $-\text{OH}$  de compuestos fenólicos, esto tiene explicación pues los grupos fenólicos en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se oxidan a la forma de quinona, lo que disminuye los grupos hidroxilos de la estructura. En esta misma línea, las quinonas aumentan la banda del carbonilo, lo que es una señal de que la reacción de Fenton está oxidando el sustrato.

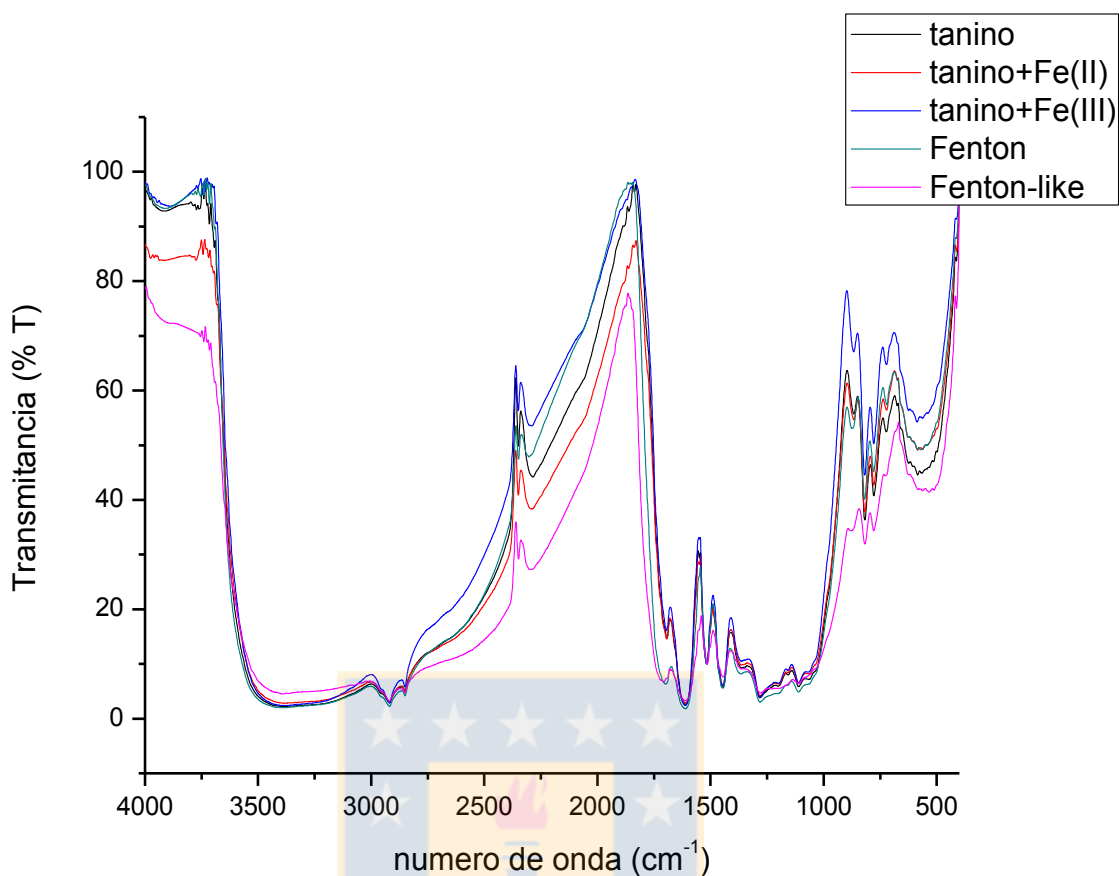


Figura 15: Espectros normalizados para tanino insoluble, tanino insoluble impregnado con Fe(II) y Fe(III) y tanino posterior a la reacción de Fenton y Fenton-like.

#### 5.1.8 RMN $^{13}\text{C}$ de sólidos

Mediante técnicas de análisis  $^{13}\text{C}$ -RMN se han diferenciado cuatro estructuras básicas habituales en los extractos tánicos (Ferreira y Bekker 1996; Hemingway 1989) (Figura 16), que difieren en el número de grupos hidroxilo que presentan en el anillo A y B. Se distinguen así:

- Profisetinidina, compuesta de resorcinol como anillo A y catecol como anillo B.
- Prorobinetinidina, con resorcinol en el anillo A y en el B pirogalol.
- Procianidina, compuesto por fluoroglucinol y catecol en los anillos A y B respectivamente.
- Prodelfinidina, compuesto por fluoroglucinol en el anillo A y pirogalol en el B.

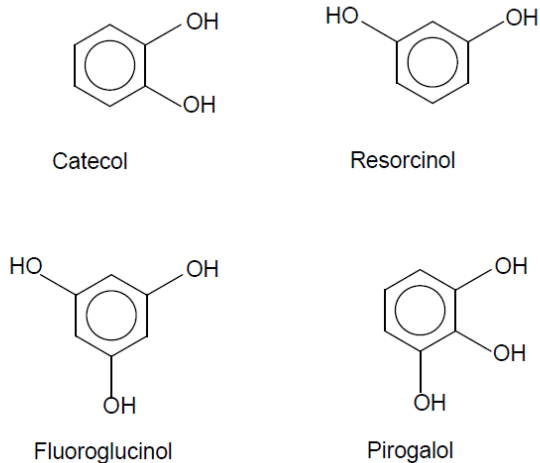


Figura 16: Estructuras habituales en los anillos A y B de los monómeros de los extractos tánicos.

Estas diferencias en la estructura, confieren a los taninos comportamientos característicos bien definidos. Así, por ejemplo se ha comprobado que los taninos con estructuras profisetinidina y prorobinetinidina son menos reactivos que los procianidina y prodelfinidina (Pizzi y Mittal 1994). Pizzi et al. (1993)<sup>14</sup> han identificado mediante <sup>13</sup>C-RMN la estructura de diversos taninos condensados.

La Figura 17a representa una estructura de modelo de monómero (catequina) que permite explicar el espectro RMN del tanino. En la Figura 17b se muestra el espectro <sup>13</sup>C-RMN para tanino insoluble, analizado con sonda para sólidos.

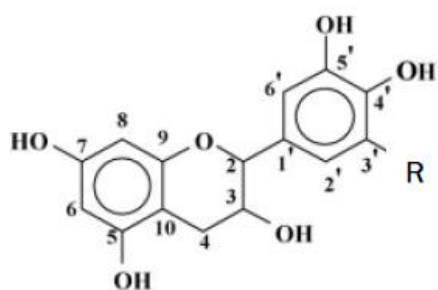


Figura 17a: Monómero modelo para descripción de <sup>13</sup>C-RMN

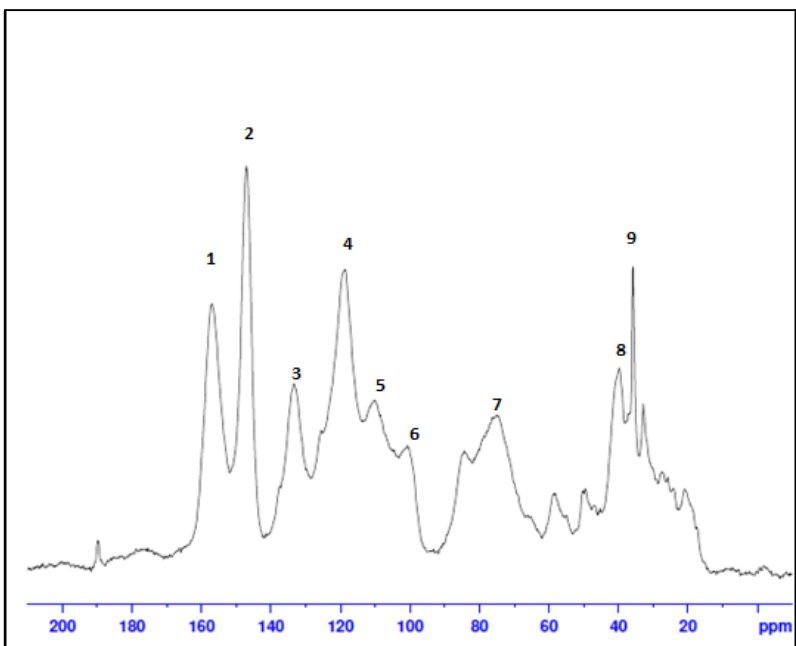


Figura 17 b: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de sólidos para tanino insoluble de corteza de *Pinus radiata*.

La señal 1 es característica de los carbonos C5 y C7, carbonos unidos a grupos hidroxilo (Figura 17a). La señal a 2 corresponde a los carbonos C5' y C4', carbonos unidos a grupos hidroxilo en el anillo de catecol. Por otro lado, la señal 3 corresponde a C1' carbono con enlace interflavonoide. La señal 4 se atribuye a C3'. La señal 5 es característica para demostrar que C4 y C8 son los carbonos de unión entre los monómeros de catequina. La señal 6 corresponde a C6, C8 y C10. La señal 7, 8 y 9, corresponden a C3, C4 y C4 libre, respectivamente.

El análisis realizado se basó en lo descrito por Pizzi et al. 1993<sup>14</sup> para distintos extractos de corteza.

### 5.1.9 Desarrollo de metodología para análisis de tanino insoluble por *py*-GC/MS

El análisis se realiza para completar la caracterización del sólido determinando los compuestos de mayor abundancia presentes en el tanino insoluble. Se evaluaron distintas rampas de temperatura en el horno para el análisis *py*-GC/MS en muestras de tanino insoluble y catequina (Figura 18). La pirólisis se realiza a 500°C y por 6 segundos. Todas las identificaciones señaladas poseen una probabilidad de identificación superior al 80%.

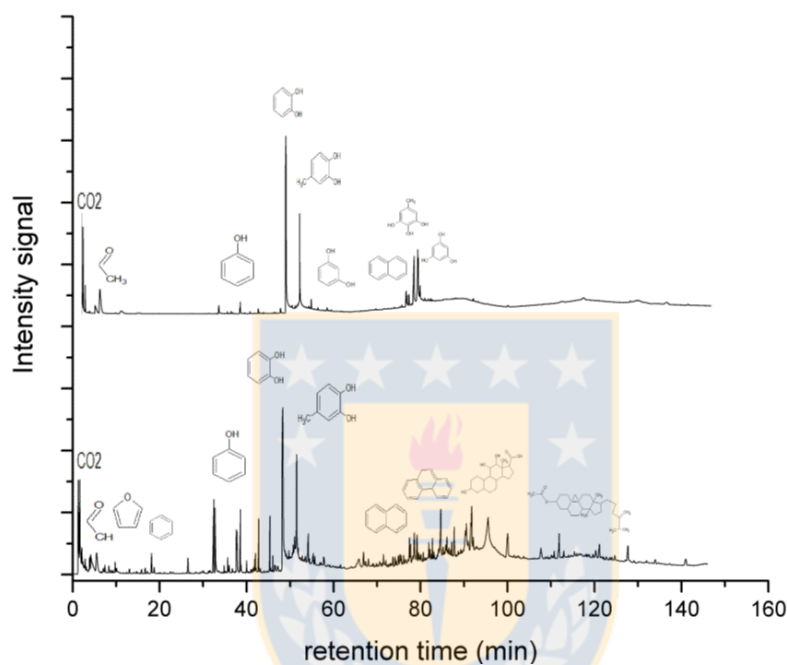


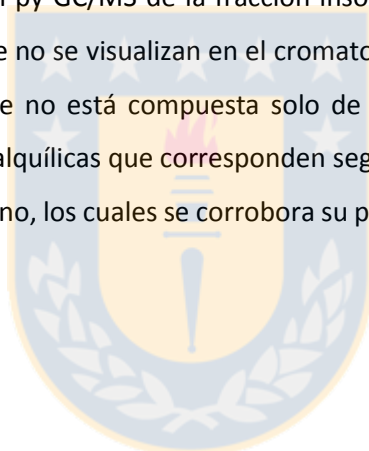
Figura 18: (a) Cromatograma *py*-GC/MS para catequina; (b) Cromatograma *py*-GC/MS de tanino insoluble a 500°C y 6 segundos

En el cromatograma que se muestra en la Figura 18a, se puede observar que los principales productos de descomposición térmica de la catequina corresponden a catecol (17) y a metilcatecol (21). En la primera parte del cromatograma se pueden apreciar compuestos volátiles que se obtienen en la ruptura de moléculas más grandes, como por ejemplo, dióxido de carbono (1), acetona (3), entre otros. Esto constituye una ventaja frente al análisis GC-MS habitual, ya que la muestra al estar en estado sólido en la cápsula, sin ningún disolvente, se puede adquirir el cromatograma desde el tiempo cero, sin *delay* de solvente. Posteriormente, se observan compuestos como fenol (9), *p*-cresol (12) y metilfenol (15). Los últimos compuestos en mayor proporción en la pirólisis de catequina corresponden a bencenotriol (35) y trihidroxitolueno (36). Las rupturas observadas en la catequina podrían orientar acerca del mecanismo de descomposición

del tanino por ser la unidad principal. Dichas rupturas serían concordantes con la hipótesis que los taninos están compuestos principalmente por moléculas del tipo procianidina.

Para el tanino se puede observar en la Figura 18b que los compuestos principales de la descomposición corresponden a catecol (30) y metilcatecol (31), lo que concuerda con lo realizado por Case et al. 2014. En la primera fracción del cromatograma se presentan compuestos volátiles de baja masa molar, después de los 30 minutos de análisis se presentan los compuestos fenólicos, donde destacan por su abundancia 4-metoxifenol (18), fenol (19), p-cresol (21), o-cresol (23), 4-etil-2-metoxifenol (27), 4-hidroxi-3-metilacetofenona(28) y resorcinol (32). Posterior a los 74 minutos de análisis, se observa el grupo de policíclicos aromáticos, compuestos derivados principalmente de fenantreno y naftaleno. En la Figura 19, se agrupan para catequina y tanino los principales grupos determinados en los análisis *py*-GC/MS.

Es importante destacar que en el *py*-GC/MS de la fracción insoluble de tanino se pudo distinguir numerosos otros compuestos que no se visualizan en el cromatograma de catequina, lo que indica que la matriz de tanino insoluble no está compuesta solo de catequinas enlazadas, además se observa la presencia de cadenas alquílicas que corresponden según la biblioteca consultada NIST a ácidos grasos presentes en el tanino, los cuales se corrobora su presencia mediante lo realizado por microscopía electrónica (5.1.3).





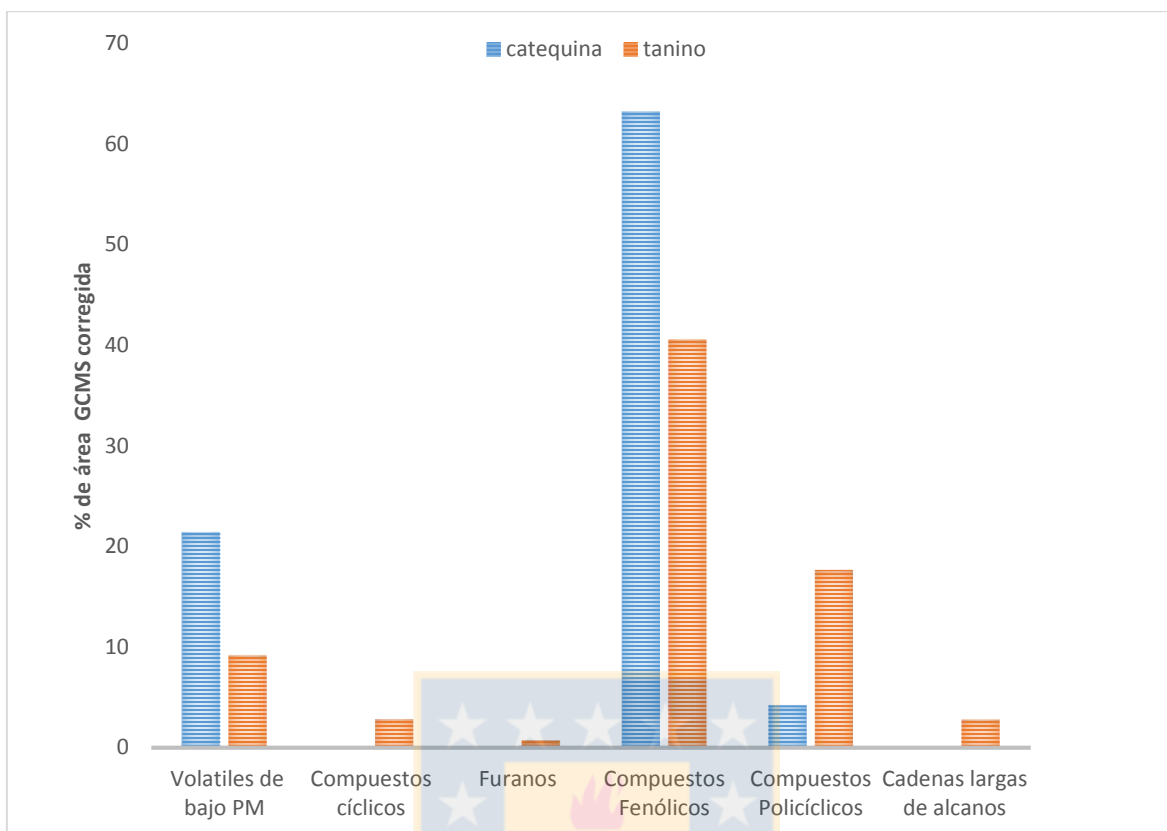


Figura 19: Distribución de compuestos determinados por *py*-GC/MS para catequina (bloque azul) y para tanino insoluble (bloque rojo).

### 5.1.10 Conclusiones

En este capítulo se realizó la caracterización del extracto insoluble de corteza como etapa fundamental en el conocimiento del polímero natural y sus propiedades para ser aplicado en un sistema AOP. Para esto, fue necesario el desarrollo de técnicas analíticas específicas para la matriz en estudio.

La estimación de masa molar en el tanino insoluble se desarrolló tomando como punto de partida una metodología existente para lignina, sin embargo, se tuvo que optimizar ciertas variables que permitieran la mejor resolución cromatográfica posible. Sin embargo, a través de este estudio fue posible concluir que la heterogeneidad de la muestra no permite una determinación reproducible en términos de dispersión de los resultados ( $M_w/M_n$ ), donde en ciertas fracciones de la muestra se obtiene una campana gaussiana con una dispersión cercana a 1 (monodisperso) y en otras sobre 2.5. Esto tiene total relación con el método de extracción del tanino, donde no se controlan ciertas variables al ser este tanino un material polidisperso.

Por otro lado, se realizaron análisis de rutina para estabilidad y comportamiento de sólidos, así, por ejemplo TGA y DSC mostraron que el tanino no presenta una degradación térmica distinta en presencia de Fe(III) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frente al tanino sin modificar. Por otro lado, es importante destacar que los análisis SEM permiten visualizar el cambio a nivel microscópico del tanino al ser impregnado con Fe, el cual pierde la esfericidad en las partículas que quedan cubiertas con Fe o en su defecto, que se abren para formar algún tipo de complejo con el metal.

El análisis infrarrojo permite visualizar en ciertas bandas la oxidación presente en las muestras posterior a la reacción de Fenton frente a las bandas del tanino sin modificar, lo que señala que la reacción redox está ocurriendo con la oxidación a las respectivas quinonas. Uno de los análisis que queda como proyección en este trabajo es medir a través de infrarrojo lejano las interacciones metal-ligando que permitan aclarar el mecanismo de reacción.

Finalmente, se desarrolló una metodología para la determinación de los principales grupos de descomposición térmica por *py*-GC/MS para catequina y tanino insoluble, de modo de comparar los productos de cada uno. Una vez normalizados ambos cromatogramas, fue posible concluir que el tanino insoluble presenta un comportamiento de descomposición térmica similar a la catequina, donde los productos principales corresponden en ambos casos a catecol y 4-metilcatecol, sin embargo, es importante mencionar que el tanino no estaría solo compuesto de catequinas enlazadas, pues se observa la presencia de furanos (provenientes básicamente de carbohidratos) y también de cadenas alquílicas de elevada masa molar, que corresponderían a ciertos ácidos grasos. En ambos cromatogramas se observa la tendencia de ciclación de los fenoles a grupos de mayor masa molar, esto se ve con mayor claridad en el tanino donde existen mayor número de grupos que pueden interaccionar y unirse.

## 5.2 Determinación de la reactividad del catalizador heterogéneo en la reacción de Fenton.

En esta sección se evaluó la reactividad del catalizador de fracción insoluble de tanino insoluble de corteza en términos de su capacidad de reducción de Fe(III) mediante técnica de absorción UV-Vis y producción de radicales ( $\cdot\text{OH}$ ) mediante EPR y HPLC-fluorescencia. En dichos análisis fue posible determinar la mayor capacidad de amplificación y conducción de la reacción de Fenton en fase heterogénea del tanino frente a los sistemas convencionales. Se concluye el capítulo con la propuesta de mecanismo redox para el monómero del tanino (catequina) en un sistema Fenton.

### 5.2.1 Reducción de Fe(III)

La reducción de Fe(III) es indicada como el principal mecanismo por el cual los 1,2-DHB incrementan la reacción de Fenton. Debido a ello, es relevante determinar la capacidad de reducción de Fe(III) por cada compuesto estudiado. Para esto, se determinaron los perfiles de reducción de Fe(III) a pH 3.40 y 7.00 para catequina y tanino.

#### 5.2.1.1 Reducción de Fe(III) con catequina a pH=3.40

A pH 3.40 para la reacción conducida por catequina, se muestran en la Figura 20 las absorbancias del complejo Fe(II)-ferrozina obtenidas. Como es posible apreciar, en el tiempo 0 la absorbancia a 567nm es cercana a cero, sin embargo, a medida que el tiempo es mayor, la absorbancia aumenta. Consecuentemente, lo anterior indica que la reducción de Fe(III) en presencia de catequina aumenta a mayor tiempo de reacción. En el anexo 2 se muestran las concentraciones de complejo Fe(II)-ferrozina.

La concentración de Fe(II) se determinó mediante ley de Lambert Beer<sup>147</sup> utilizando el coeficiente de extinción molar del complejo  $[\text{Fe}(\text{ferrozina})_3]^{4-}$  calculado desde la curva de calibración.

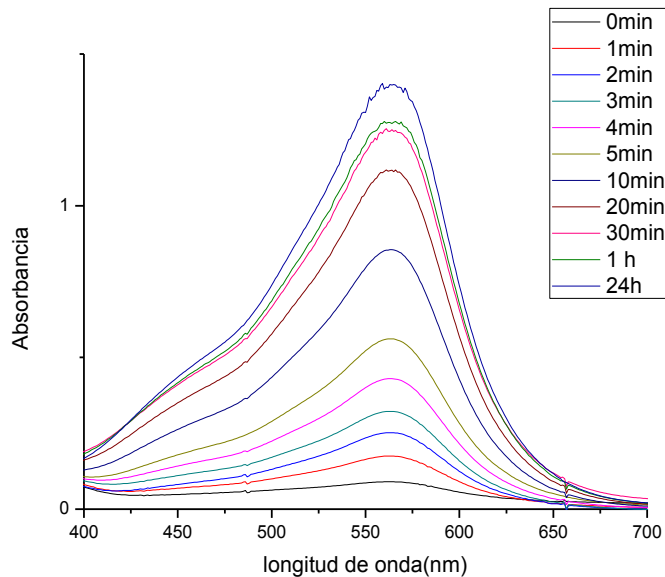


Figura 20: Perfiles de formación del complejo Fe(II)-ferrozina a diferentes tiempos para catequina a pH=3.40 en fase homogénea.

De la Figura 20 se puede observar el aumento en la absorbancia del complejo coloreado entre Fe(II)-ferrozina a medida que el tiempo de reacción entre la catequina y el Fe(III) aumenta. Lo anterior, indica que la catequina reduce el Fe(III) a Fe(II) favoreciendo el ciclo redox de la reacción de Fenton.

#### 5.2.1.2 Reducción de Fe(III) con tanino a pH=3.40

Para la fracción insoluble de tanino a pH 3.40, se muestran los perfiles de formación del complejo a diferentes tiempos en la Figura 21. La concentración del complejo Fe(II)-ferrozina determinada en presencia de tanino insoluble a pH 3.40 se muestran en el anexo 2.

En la Figura 21 se puede observar el aumento paulatino en la reducción de Fe(III) en presencia del tanino a través del tiempo. Lo anterior permite concluir que el tanino puede aumentar la producción de especies activadas en la reacción de Fenton al amplificarla y conducirla a pH 3.40. Además, el tanino presenta mayor capacidad reductora que la catequina, lo cual se puede verificar en las Figuras 20 y 21, donde se observa la clara tendencia de que en menos tiempo el tanino produce mayor concentración del complejo de Fe(II) con ferrozina, consecuentemente, el tanino puede ser utilizado para la amplificación de la reacción de Fenton en fase heterogénea.

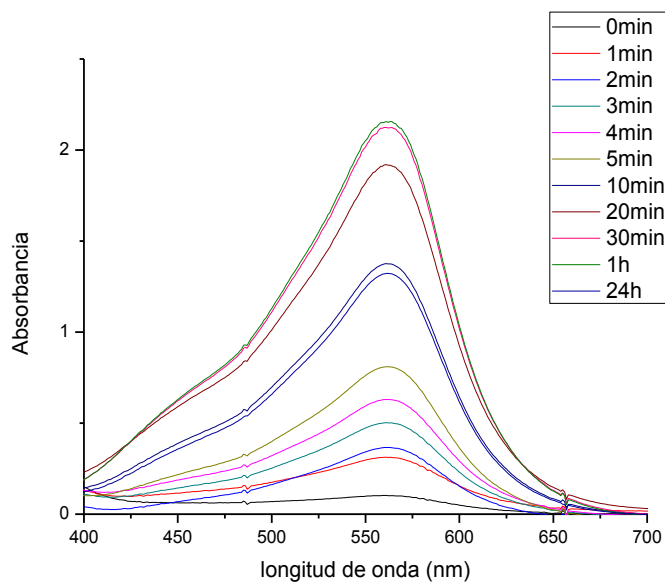


Figura 21: Perfiles de formación del complejo Fe(II)-ferrozina a diferentes tiempos a pH 3.4 para tanino en fase heterogénea.

#### 5.2.1.3 Reducción de Fe(III) con catequina a pH=7.00

En la Figura 22 es posible observar la formación del complejo Fe(II)-ferrozina a distintos tiempos de reacción. La catequina a pH 7.0 no reduce el Fe(III) del sistema aún a prolongados tiempos de reacción. La concentración del complejo no aumenta con el tiempo, lo que indica que el pH es un factor determinante en la reacción de reducción de Fe(III) y que además, la conducción y amplificación de la reacción de Fenton por catequina a pH neutro no se ve favorecida.

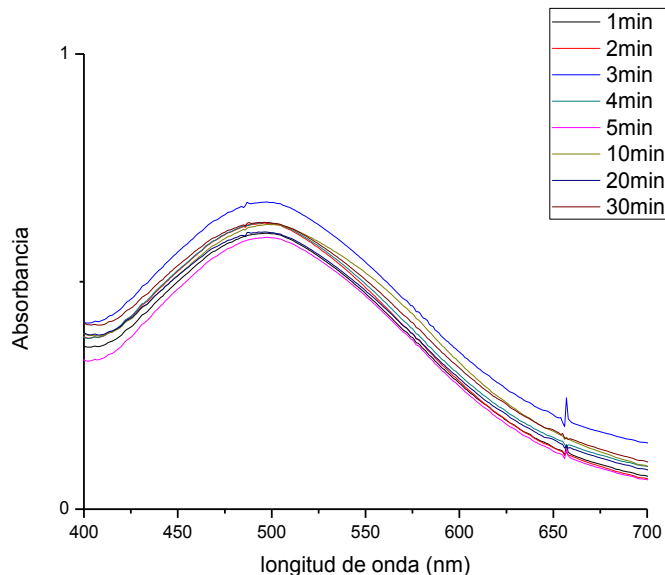


Figura 22: Perfiles de formación del complejo Fe(II)-ferrozina a diferentes tiempos a pH 7.0 para catequina.

De los perfiles de formación (Figura 22) se puede observar que el máximo de las curvas no se presentan en el típico rango de longitudes de onda del complejo Fe(II)-ferrozina (563-567nm), lo que indica que la absorción que se muestra en los perfiles corresponde a la formación de otra especie que está absorbiendo en la región de los 480-490nm, por lo que no se puede determinar con las curvas de calibración las concentraciones del complejo a otra longitud de onda. No se observa presencia de precipitado de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , lo que indica que el mecanismo de reacción favorece el equilibrio hacia la formación de otro compuesto a longitudes de onda menores.

#### 5.2.1.4 Reducción de Fe(III) con tanino a pH=7.00

Al realizar la reducción de Fe(III) en presencia de tanino insoluble (Figura 23), se esperaría un comportamiento similar a la reducción con catequina, sin embargo, la solución se colorea y hay formación de complejo Fe(II)-ferrozina, sin embargo, en concentraciones mucho menores que a pH 3.40. Además, el aumento de absorbancia es prácticamente nulo con el tiempo, la tendencia general a pH neutro es la formación del complejo a una longitud de 563nm, sin embargo, no hay aumento en la formación del complejo a través del tiempo como se puede observar en la Figura 23.

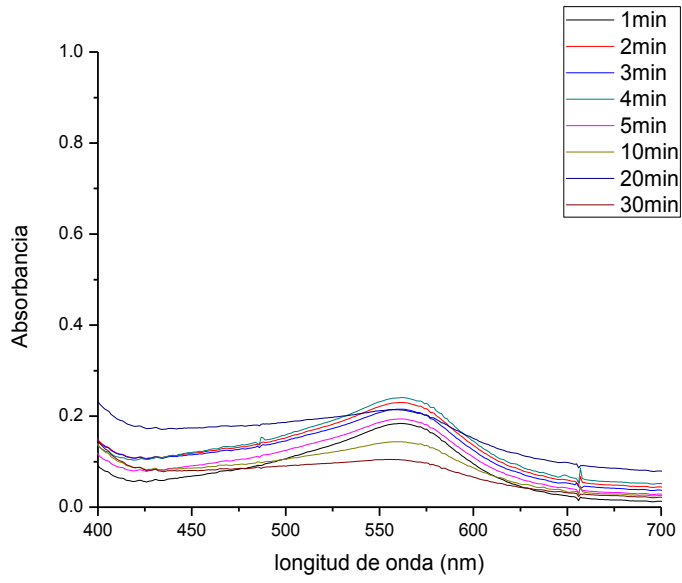


Figura 23: Perfiles de formación del complejo Fe(II)-ferrozina a diferentes tiempos a pH 7.0 para tanino.



### 5.2.2 Determinación de constantes de velocidad en la degradación de naranja de metilo

Las mediciones de reacción de Fenton para degradación de naranja de metilo se realizaron en un rango entre 300-900nm, presentado el máximo de absorción a 499nm.

Las medidas de reacción de Fenton, se realizaron en tres sistemas para comparar las velocidades de degradación del colorante en cada uno. Las mediciones se realizaron por media hora de reacción para los tres casos. Los sistemas evaluados corresponden: a) Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/colorante, b) Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/catequina/colorante y c) Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tanino/colorante.

Como es posible observar en la Figura 24, que corresponde al barrido realizado para el sistema heterogéneo con tanino, existe ruido en las mediciones generado por la agitación usada dentro de la cubeta para que el tanino en el fondo tuviese contacto con solución de la cubeta. Para eliminar el efecto del ruido, se dividió todas las absorbancias a 499nm por una longitud de onda de referencia, de modo de normalizar las absorbancias obtenidas. Esto solo se realiza en el sistema Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tanino/colorante, pues los otros sistemas son en fase homogénea sin necesidad de agitación.

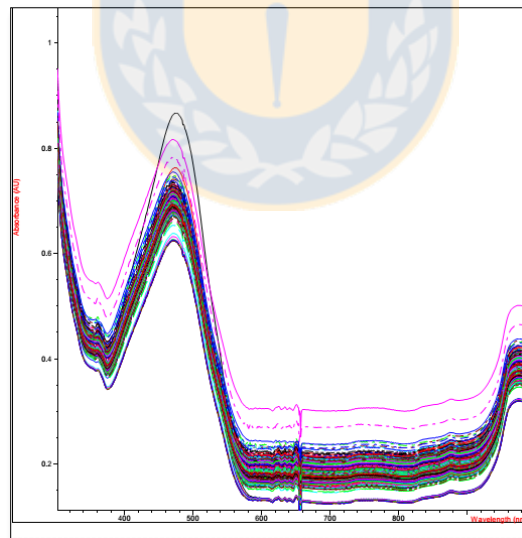


Figura 24: Espectrograma para sistema Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tanino/colorante.



En la Figura 25, se grafica el logaritmo natural de las absorbancias versus el tiempo para determinar la pendiente que corresponde a la constante de velocidad ( $-k$ ). De este modo, es posible observar la comparación entre las constantes de velocidad de primer orden para los 3 sistemas, donde la reacción de Fenton-*like* es la que tiene menor constante de velocidad. Al adicionar catequina a sistema, y como se discutió en el punto 5.2.1.1, la catequina favorece la reducción de Fe(III) para catalizar la degradación del colorante. Por otro lado, en el sistema heterogéneo con tanino, es posible aumentar la velocidad de degradación del colorante 18 veces frente a la reacción de Fenton-*like* convencional y 12 veces con respecto a la reacción conducida por catequina, lo que le confiere al tanino la capacidad de degradar un compuesto modelo en menor tiempo que los otros sistemas aun formando parte de un sistema heterogéneo.

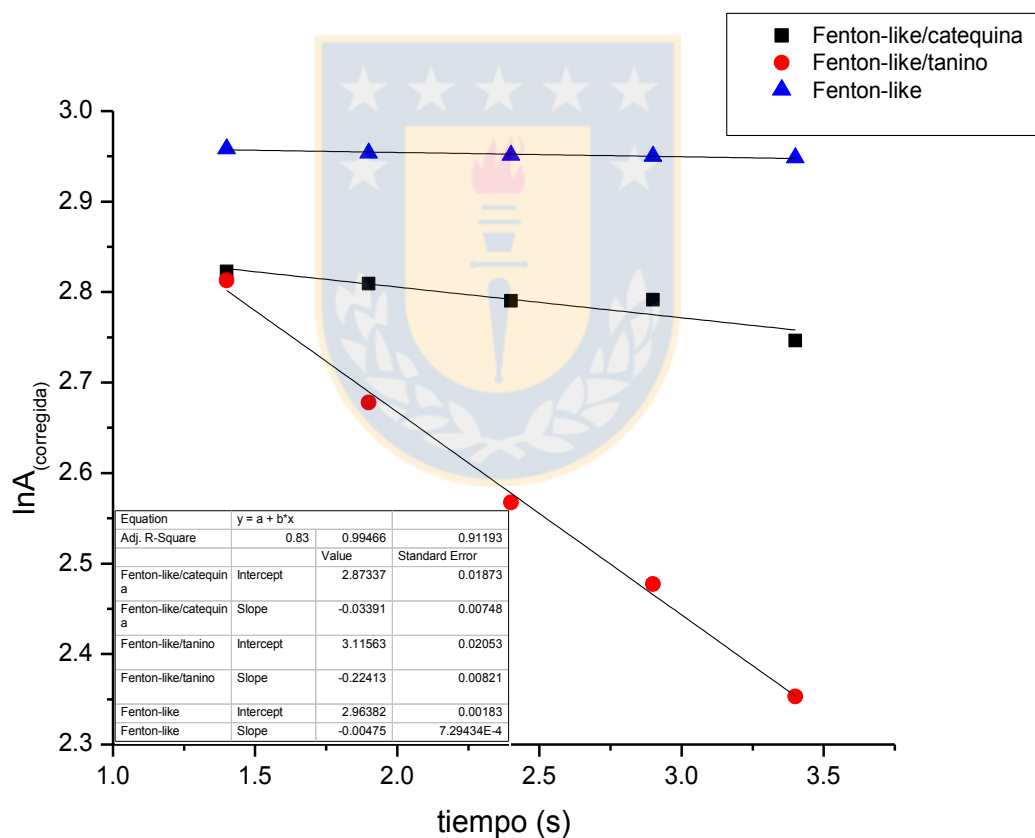


Figura 25: Cinética de degradación de naranja de metilo a pH 3.40 por los diferentes sistemas estudiados.

### 5.2.2.1 Efecto adsorbente

Se evaluó el efecto adsorbente del tanino sobre el colorante. Fue necesario realizar la comparación de rendimientos de la reacción para verificar que el aumento en la velocidad de degradación del colorante se deba a la reacción de Fenton y no un efecto secundario. Para lo anterior, se evalúan los sistemas: a) tanino+colorante y b) tanino+Fe(III)+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ colorante. Las mediciones se realizaron a 4 tiempos: 1) 1 minuto, 2) 15 minutos, 3) 60 minutos y 4) 24 horas.

Para los sistemas a) y b) no se observa variación en la absorbancia después de 24 horas, en contraste, para el sistema Fenton-like conducido por tanino insoluble se observó el doble de disminución en la absorbancia que para los sistemas control. De este modo, se puede concluir que el efecto adsorbente es despreciable en términos de disminución de la absorbancia en el tiempo con respecto a la reacción de Fenton. Ambos ensayos se realizaron con las mismas concentraciones de reactivos y por el mismo tiempo de reacción.



### 5.2.3 Determinación de producción de radicales hidroxilo por Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

La producción de radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) se estudió en un sistema Fenton y un sistema Fenton-*like* (ecuaciones 1 y 2), además en los sistemas Fenton-*like* conducido por catequina (monómero principal presente en los taninos insolubles) y Fenton-*like* conducida por taninos, el estudio se realiza a valores de pH cercanos a los valores óptimos para la reacción de Fenton<sup>80</sup>.

Se detectó la producción de  $\cdot\text{OH}$  en todos los sistemas a través del análisis de la señal característica del aducto DMPO/ $\cdot\text{OH}$  (Figura 26). Se midieron las señales durante 1 hora a intervalos de 0.3 segundos. El aducto DMPO/ $\cdot\text{OH}$  se inactiva alrededor de los 60 segundos desde el inicio de la reacción, según lo informado por Contreras et al. (2007)<sup>63</sup>. Para todos los sistemas, la producción de  $\cdot\text{OH}$  fue determinada hasta los 60 segundos mediante la técnica de EPR (Figura 26). En todos los casos, los datos para los primeros segundos del análisis no estaban disponibles debido a un *delay* que se produce por la mezcla de los reactivos previo a la inyección por lo que el primer punto considerado fue posterior a ese tiempo de *delay*.

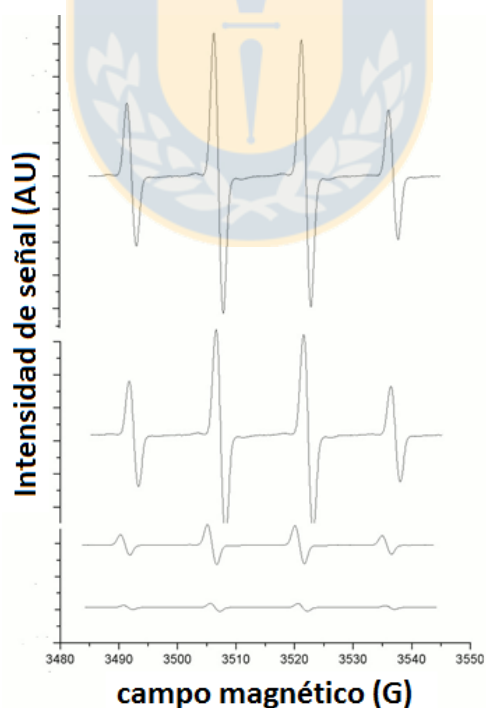
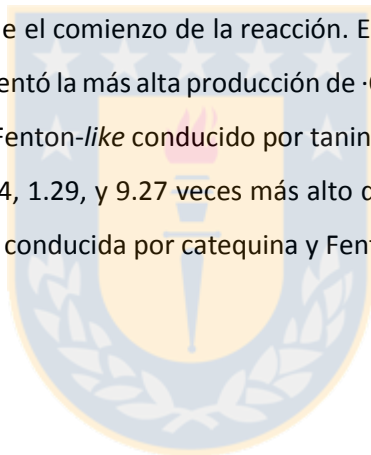


Figura 26: Distintas intensidades de la señal del aducto DMPO/ $\cdot\text{OH}$  para los sistemas Fenton evaluados, donde la señal superior corresponde a sistema conducido por taninos, el segundo en intensidad corresponde a la reacción de Fenton convencional, el tercero a la reacción conducida por catequina y finalmente, la de menor intensidad corresponde al sistema Fenton-*like* convencional<sup>148</sup>.

La Figura 27 muestra los perfiles de producción  $\cdot\text{OH}$  en los sistemas Fenton y Fenton-*like* convencionales y los sistemas Fenton-*like* conducidos por catequina y taninos. Es importante mencionar, que se obtuvo la señal más baja para la producción de  $\cdot\text{OH}$  en el sistema Fenton-*like* (triángulo azul), lo que está acorde con los datos de la literatura<sup>80</sup>. El sistema de Fenton convencional (círculo rojo) produjo más  $\cdot\text{OH}$  que los sistemas Fenton-*like* (excepto el sistema conducido por taninos, cuadrado negro); de este modo, la producción alcanzó un valor máximo cerca de los 15 segundos, posteriormente la señal se mantuvo constante y luego disminuyó.

La producción de radicales observada es rápida, lo cual está conforme a lo reportado en la literatura<sup>63</sup>. La señal inicial para la reacción de Fenton-*like* conducida por catequina (triángulo verde) fue menor, pero aumentó y alcanzó un valor superior a la de la reacción de Fenton convencional en alrededor de 60 segundos. Esta producción de  $\cdot\text{OH}$  más lenta es similar a los comportamientos observados con otros DHB<sup>63</sup>. El sistema de Fenton-*like* conducida por taninos dio la más alta producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  desde el comienzo de la reacción. En contraste, el sistema de Fenton-*like* conducida por catequina presentó la más alta producción de  $\cdot\text{OH}$ , sin superar a los taninos, sobre los 60 segundos. Para el sistema Fenton-*like* conducido por taninos en fase heterogénea los niveles de producción de  $\cdot\text{OH}$  fueron 1.44, 1.29, y 9.27 veces más alto que los obtenidos con los sistemas Fenton convencional, Fenton-*like* conducida por catequina y Fenton-*like*, respectivamente.



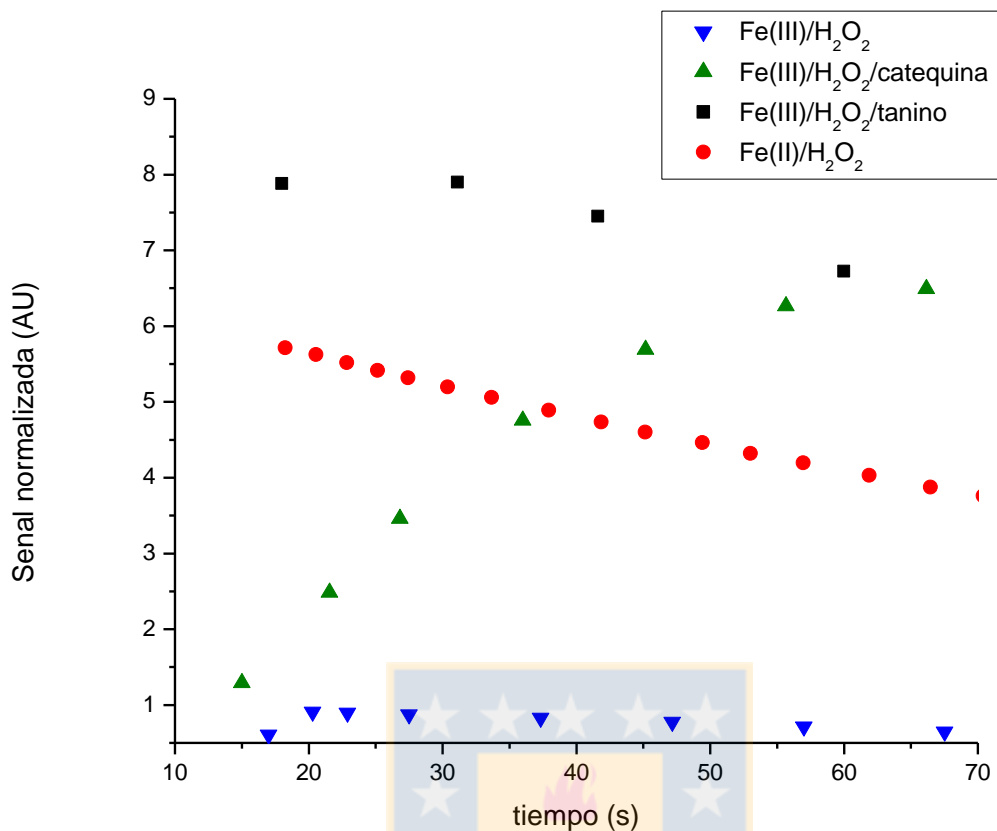


Figura 27: Perfiles cinéticos de producción de radicales hidroxilo. Se presentan los sistemas evaluados: Sistema Fenton (círculos rojos), Fenton-like (triángulos azules), Fenton-like conducido por catequina (triángulo verde) y Fenton-like conducido por taninos (cuadrados negros)<sup>148</sup>.

La mayor producción de  $\cdot\text{OH}$  en las reacciones convencionales se observó en la etapa inicial en el sistema Fenton (Figura 27), esto se debe a que el Fe(II) está presente, mientras que en el sistema Fenton-like es necesario que el Fe(III) sea reducido como primera etapa. Este proceso es lento en los sistemas de Fenton-like, solo en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>38</sup>, pero se hace más rápido cuando se usan DHB<sup>58</sup>. Los resultados presentados en el punto 5.2.1 demuestran que el Fe(III) se reduce más rápido por taninos insolubles que por catequina en un período corto y a pH ácido, lo que resulta en una señal inicial más intensa para estos sistemas. La señal inicial más baja presente en el sistema conducido por catequina puede estar relacionada con una menor capacidad de reducción de Fe(III). Además, la producción  $\cdot\text{OH}$  fue menor en el tiempo de análisis.

#### 5.2.4 Determinación de producción de radicales hidroxilo por HPLC-fluorescencia

Como fue presentado en el punto anterior, la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  se pudo determinar por 60 segundos, debido a la limitada estabilidad de DMPO/ $\cdot\text{OH}$  en el sistema de reacción. Así, la técnica de EPR no permite determinar la producción  $\cdot\text{OH}$  por un tiempo más prolongado. De este modo, se utilizó un método de HPLC-fluorescencia basado en la hidroxilación selectiva de cumarina (Ecuación 13) para estimar la producción de  $\cdot\text{OH}$  durante períodos más largos.

La producción de  $\cdot\text{OH}$  de 300 a 1200 s se muestra en la Figura 28. Las tendencias de señal son concordantes con los resultados obtenidos usando el método de EPR. En períodos más prolongados la producción  $\cdot\text{OH}$  en la reacción de Fenton-like conducida por taninos (cuadrados negros) aumentó hasta 1200 s. Las pendientes de las rectas de producción  $\cdot\text{OH}$  fueron similares para todos los sistemas Fenton-like (cuadrados negros, triángulos verdes y triángulos azules). Para el sistema Fenton (círculos rojos), la producción de  $\cdot\text{OH}$  aumentó hasta 600 s y luego se mantuvo (la disminución que se observa en el gráfico se debe a error experimental en mediciones de baja magnitud). A su vez, la reacción de Fenton-like conducida por taninos insolubles (cuadrados negros) presentó una producción máxima  $\cdot\text{OH}$  inclusive después de 1200 s. En la Figura 27 (EPR), se observó que la producción más alta de  $\cdot\text{OH}$  en periodos cortos fue en el sistema Fenton-like conducido por taninos (Figura 27, cuadrado negro); el mismo efecto se vuelve a presentar en periodos más prolongados de análisis. De este modo, el sistema impulsado por taninos exhibe por ambas técnicas la mayor producción de radicales  $\cdot\text{OH}$ .

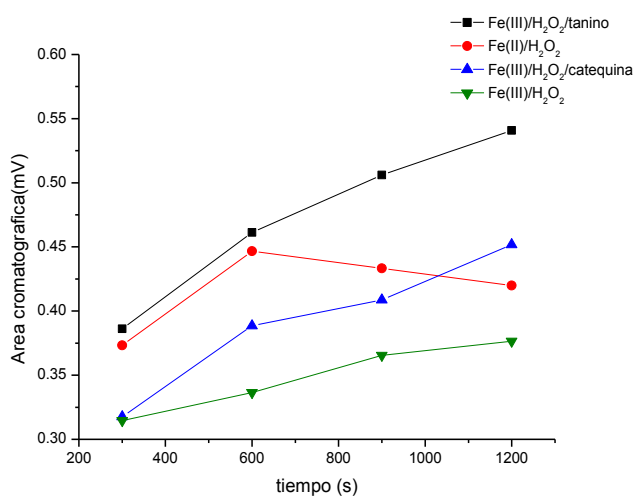


Figura 28: Perfiles de producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  determinados por HPLC-fluorescencia<sup>148</sup>.

El incremento en la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  puede ser explicada basándose en los ciclos redox de la reacción de Fenton<sup>149</sup> y Fenton-like<sup>150</sup>, en la cual la etapa limitante es la reducción de Fe(III) a Fe(II). La Figura 29 muestra una propuesta de ciclo redox en el cual la catequina quelata y reduce el Fe(III). A su vez, la reacción de Fenton (Figura 29, inserto) se inicia con la formación de  $[\text{Fe}(\text{OOH})]^+$  proveniente de Fe(II) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y posteriormente, el radical  $\cdot\text{OH}$  es producido y el Fe(II) se oxida a Fe(III). Como se mencionó anteriormente, la reducción de Fe(III) a Fe(II) es la etapa limitante para continuar con la producción de radicales por sistemas Fenton. Así, la formación de  $[\text{Fe}(\text{OOH})]^{2+}$  a partir de Fe(III) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  es fundamental. Posteriormente, el Fe(III) es reducido a Fe(II) y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es oxidado a  $\text{HOO}\cdot$  ( $k = 2.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )<sup>149</sup>.

En la reacción de Fenton conducida por taninos insolubles la etapa limitante es distinta porque el Fe(III) es reducido y quelado por los grupos catequinas presentes en el polímero natural (Figura 29).

Como primera etapa en el ciclo redox, el Fe(III) forma un complejo con la catequina (monómero del tanino). Posteriormente, el Fe(III) en el complejo es reducido por un mecanismo de esfera interna, generando un complejo de Fe(II) y la respectiva semiquinona. Este paso, que previamente ya ha sido descrito en la literatura para otros derivados del catecol, corresponde a la etapa limitante<sup>58</sup>.

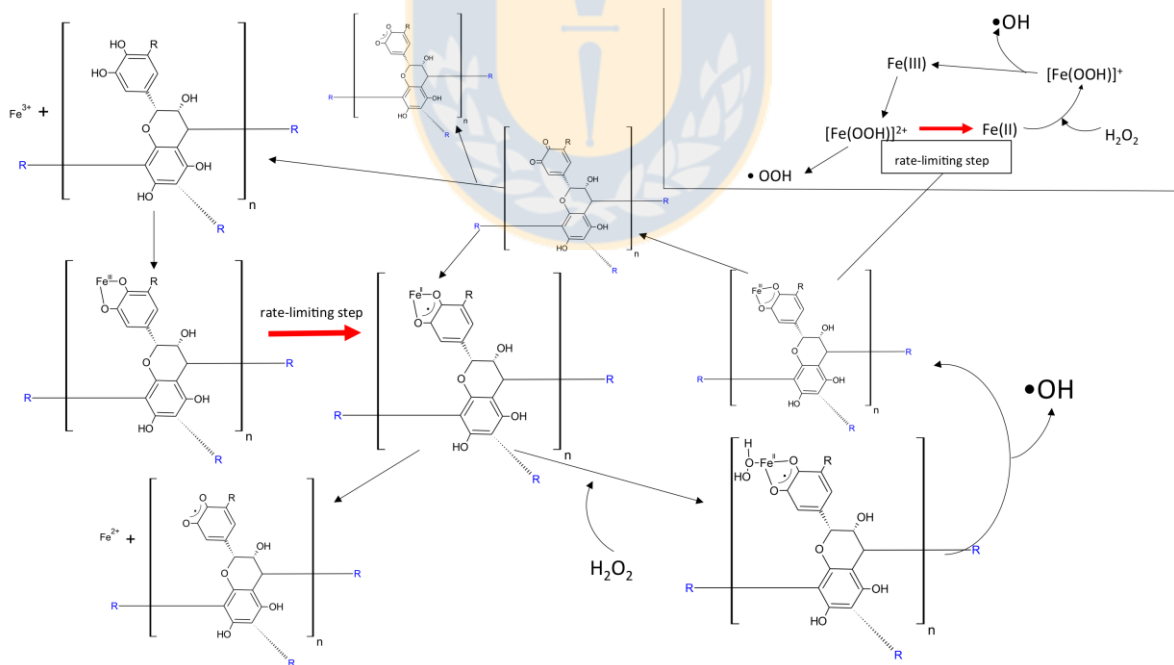


Figura 29: Propuesta de ciclo redox en el cual la catequina quelata y reduce el Fe(III). En el inserto se presenta el mecanismo propuesto para reacción de Fenton<sup>148</sup>.

### 5.2.5 Conclusiones

En este capítulo se evaluó la reactividad del sistema heterogéneo soportado en tanino insoluble. Para lo anterior se evaluó la capacidad de reducción de Fe(III) del tanino comparado con catequina en fase homogénea a pH óptimo para la reacción de Fenton y a pH neutro. Como es bien sabido, los rendimientos de producción de radicales aumentan en presencia de DHBs debido al ciclo redox que permite la producción sostenida de radicales por mayor tiempo<sup>55</sup>, lo cual depende de la capacidad de reducción de hierro del DHB. De este modo, para tanino se obtuvo mayor capacidad de reducción en ambos pH, sin embargo, a pH 7.0 la tendencia no es directamente proporcional con respecto al tiempo de reacción, debido al desplazamiento de los equilibrios de constantes de formación frente al pKps de Fe(OH)<sub>3</sub>. Si bien no se observa precipitado en la cubeta, existe una disminución en la intensidad de la banda y no tiene ninguna tendencia. Sumado a lo anterior, es importante destacar que ha sido reportado en la literatura la disminución de capacidad prooxidante en la reacción de Fenton conducida por DHBs sobre pH 5 por formación de bis y tris complejos con Fe(III)<sup>150</sup>.

Por otro lado, se evaluó la capacidad del sistema Fenton heterogéneo soportado en tanino insoluble de degradar naranja de metilo (colorante), donde los resultados permiten concluir la mayor capacidad de degradación de este sistema frente al Fenton-like conducido por catequina en fase homogénea y Fenton-like convencional.

Como el tanino presenta una textura porosa, fue necesario evaluar también que el aumento en la velocidad de degradación de naranja de metilo no era debido a efecto adsorbente del tanino sobre el colorante. Se evaluó durante 24 horas y la disminución de absorbancia de naranja de metilo no mostró variaciones significativas. Lo anterior, permite concluir que el efecto de disminución con una mayor constante de velocidad en el sistema heterogéneo desarrollado es por su mayor rendimiento en la degradación de naranja de metilo frente a los otros sistemas evaluados.

Posteriormente, se realizó una determinación en la producción de radicales ·OH por dos metodologías: EPR y HPLC-FI, donde ambos resultados fueron concordantes en tendencias a distintos tiempos de análisis. En ambos casos, el sistema desarrollado en tanino insoluble fue el que presentó mayor producción de radicales en el inicio de la reacción como a través del tiempo de análisis. Lo anterior, nos permite concluir el mayor rendimiento a nivel de producción de radicales ·OH que presenta el sistema desarrollado y se finaliza el capítulo con una propuesta de mecanismo en la reacción de Fenton conducida por los grupos DHBs presentes en el extracto insoluble de corteza.



### 5.3 Aplicaciones sistema Fenton heterogéneo en la degradación de contaminantes recalcitrantes

Como ha sido demostrado en este trabajo, la producción de  $\cdot\text{OH}$  en una reacción de Fenton-like conducida por taninos insolubles hace este sistema adecuado para su uso como un AOP para la eliminación de contaminantes. De este modo, se utilizó el tanino insoluble para amplificar en fase heterogénea el sistema Fenton y degradar atrazina en agua en condiciones optimizadas mediante un diseño experimental cuyas variables correspondieron a pH, concentración de Fe(III), concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y cantidad de tanino.

Posteriormente, se evaluaron los productos de descomposición del sistema Fenton en la degradación de atrazina por una metodología GC-MS y el contenido de TOC en la solución final.

#### 5.3.1 Resultados preliminares

A pH 3.40 en un reactor de volumen 50 mL se adicionó el tanino insoluble con agitación. El reactor posee  $12\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de atrazina,  $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 40 mg de tanino y Fe(III)  $150\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los ensayos preliminares demuestran la degradación de atrazina a través del tiempo (Figura 30). La reacción en cada punto se detiene con EDTA a pH=7.0 (En el anexo se presentan ensayos EPR que evidencian que EDTA es suficiente para la detención de la reacción).

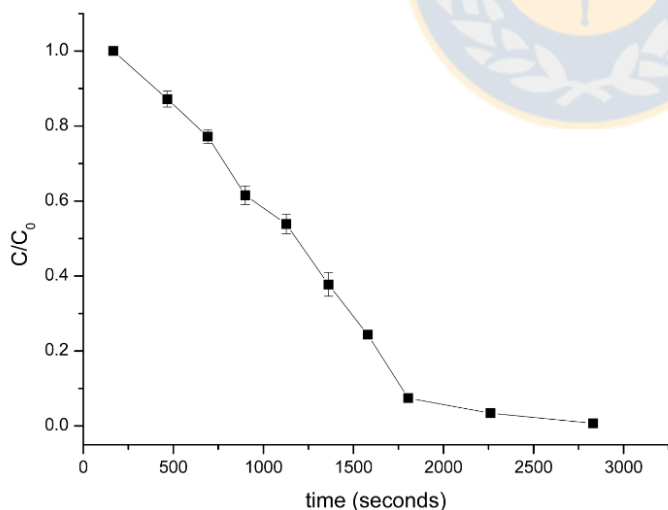


Figura 30: Ensayo preliminar de degradación de atrazina en agua a pH 3.40 (Modificado de Romero et al. 2016)<sup>148</sup>

Para determinar las condiciones óptimas de degradación se realizó un diseño experimental con el software MODDE 7.0.

### 5.3.2 Diseño experimental

#### 5.3.2.1 Barrido

Las variables a optimizar fueron concentración de Fe(III), concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cantidad de tanino (mg) y pH. Inicialmente se realiza un *screening* para evaluar la dirección de máxima inclinación.

En la Figura 31, se puede observar la dirección de máxima inclinación del *screening*, el cual indica que las condiciones óptimas son de 40-50 mg de tanino en el reactor, 250 μmol·L<sup>-1</sup> de Fe(III), un rango de pH inferior a 4.0 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 2.2-2.8 mmol·L<sup>-1</sup>.

A valores elevados de pH no se favorece la degradación lo que está de acuerdo a lo determinado en este trabajo de tesis con respecto a la producción de radicales ·OH por reacción de Fenton.

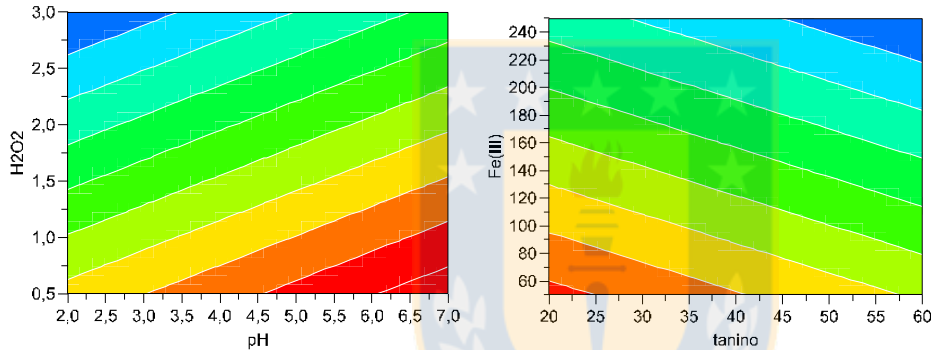


Figura 31: Superficies de respuesta para *screening* de degradación de atrazina, la zona azul indica el menor % de área de atrazina, en consecuencia, mayor degradación. Cada bloque del diseño abarca 12.5% de degradación.

En la Tabla VII, se muestran los resultados de análisis de varianza (ANOVA) para el modelo descrito anteriormente.

Tabla VII: ANOVA para *screening* en degradación de atrazina.

Degradación	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	varianza	F	p	SD
<b>Total</b>	20	1.4x10 <sup>12</sup>				
<b>Constante</b>	1	7.8x10 <sup>11</sup>				
<b>Total Corregido</b>	19	6.6x10 <sup>11</sup>	3.5x10 <sup>10</sup>			1.9x10 <sup>5</sup>
<b>Regresión</b>	8	5.4x10 <sup>11</sup>	6.8x10 <sup>10</sup>	6.1	<b>0.004</b>	2.6x10 <sup>5</sup>
<b>Residual</b>	11	1.2x10 <sup>11</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>			1.1x10 <sup>5</sup>
<b>Falta de Ajuste</b>	8	1.1x10 <sup>11</sup>	1.4x10 <sup>10</sup>	5.3	<b>0.100</b>	1.2x10 <sup>5</sup>
<b>Error puro</b>	3	8.1x10 <sup>9</sup>	2.7x10 <sup>9</sup>			5.2x10 <sup>5</sup>

### 5.3.2.2 Optimización

Las variables utilizadas en el diseño se modifican a partir de los resultados obtenidos en el *screening* del sistema. Es importante mencionar que en el *screening* realizado del modelo, la concentración de Fe(III) debía ser mayor o igual a 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , sin embargo, no fue posible de realizar por saturación de la columna cromatográfica con el Fe(II) en solución, por lo que se fijó dicha variable a un máximo de 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En la Figura 32, se puede observar la superficie de respuesta donde apunta a que las condiciones óptimas son para tanino sobre 50 mg, el pH posee un rango óptimo entre 3.3-3.9, el Fe(III) fue fijado al valor máximo que soportaba la columna HPLC sin presentar alza de presión (150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y 2.4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

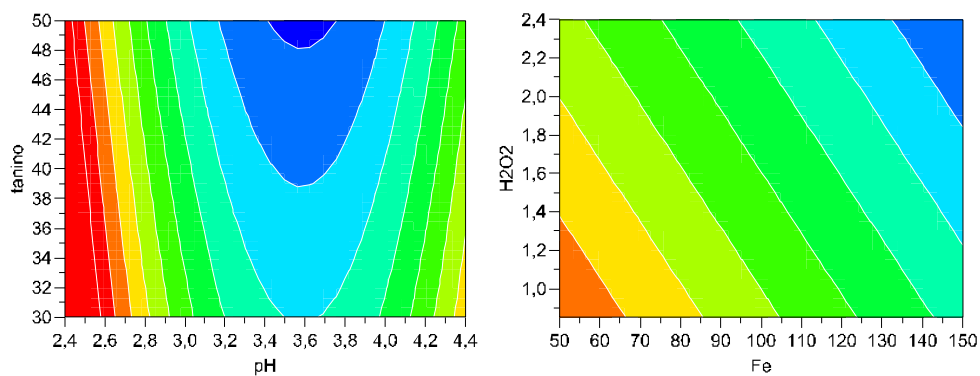


Figura 32: Superficies de respuesta para modelo CCC, la zona azul indica el menor % de área de atrazina, en consecuencia, mayor degradación. Cada bloque del diseño abarca 12.5% de degradación.

En la Tabla VIII se muestra el análisis de varianza para el modelo

Tabla VIII: ANOVA para modelo de optimización.

Degradación	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	varianza	F	p	SD
<b>Total</b>	24	$6.0 \times 10^{11}$	$2.5 \times 10^{10}$			
<b>Constante</b>	1	$3.1 \times 10^{11}$	$3.1 \times 10^{11}$			
<b>Total Corregido</b>	23	$2.9 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^{10}$			$1.1 \times 10^5$
<b>Regresión</b>	5	$2.5 \times 10^{11}$	$5.1 \times 10^{10}$	26	<b>0.001</b>	$2.2 \times 10^5$
<b>Residual</b>	18	$3.5 \times 10^{10}$	$1.9 \times 10^9$			$4.4 \times 10^5$
<b>Falta de Ajuste</b>	16	$3.5 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^9$	$2.4 \times 10^4$	<b>0.004</b>	$4.7 \times 10^4$
<b>Error puro</b>	2	$1.8 \times 10^5$	$9.2 \times 10^4$			$3 \times 10^2$

### 5.3.3 Degradación atrazina en condiciones óptimas

Se utilizó la reacción de Fenton-like conducida por taninos insolubles para la degradación de la atrazina. La Figura 33 muestra el perfil de descomposición de la atrazina durante 3000 s. La velocidad de degradación fue un decaimiento de orden exponencial y se alcanzó un porcentaje de degradación de  $92.6 \pm 0.3\%$ . El porcentaje de degradación aumentó aún más a  $97.1 \pm 0.7\%$  (el límite de detección de la técnica analítica, HPLC) a 3000 s. Los datos se ajustaron utilizando una cinética de decaimiento exponencial ( $r=0.98$ ). Experimentos cinéticos controlados mostraron que no se produjo la degradación de la atrazina en ausencia de taninos. Resultados similares se obtuvieron en ausencia de hierro y  $H_2O_2$ .

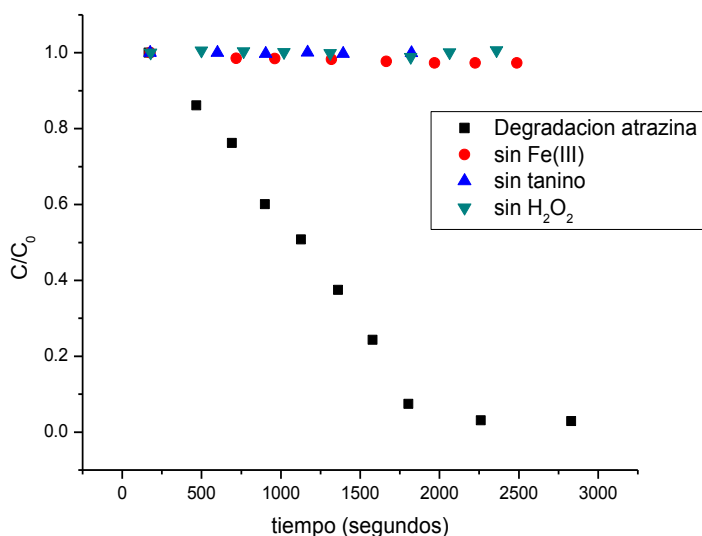


Figura 33: Controles cinéticos para degradación de atrazina. Cuadrados negros corresponden a la degradación de atrazina en condiciones optimizadas. Círculos rojos a sistema sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Triángulos verdes sistema sin Fe(III) y triángulos azules sistema en ausencia de tanino.

Como se puede observar en la Figura 33, a los 60 minutos de análisis ya no es posible la detección de atrazina en el sistema por HPLC-UV. Lo anterior demuestra la alta efectividad del tanino insoluble de conducir y amplificar la reacción de Fenton, además, de mantener los grupos fenólicos en fase heterogénea.

### 5.3.4 Identificación de los productos de degradación

Se realizó el análisis a los productos de degradación de atrazina por GC-MS (Figura 34). Se evaluó el sistema antes del final de la reacción, en la alícuota de 30 minutos. En la Tabla IX se muestran los resultados que indican como productos de descomposición a la atrazina aún remanente en el sistema y productos propios de su descomposición por un proceso oxidativo.

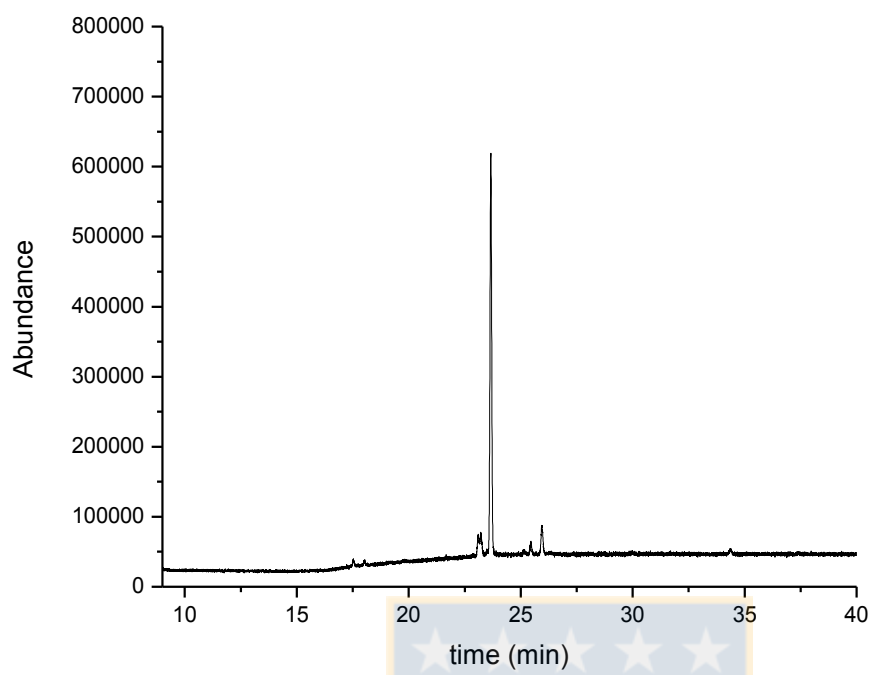


Figura 34: GC-MS para productos de degradación de atrazina por el sistema Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tanino



Tabla IX: Compuestos determinados en el reactor posterior a la reacción de Fenton por GC-MS.

Compuesto	Tiempo retención (min)	% Área	Quelite (%)	Estructura
Diclorometano (solvente)	8.392	98.20	91	
6-cloro-2,4-diamin-N-(1-metil-etil)-1,3,5-Triazina	23.105	0.04	95	
Atrazina	23.667	1.61	99	

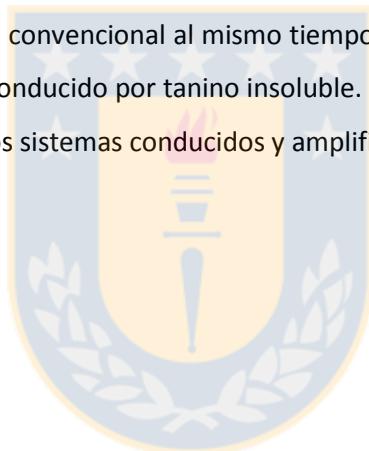
### 5.3.5 Carbono orgánico total (TOC)

Se evaluó el contenido de carbono orgánico total del reactor con Fenton soportado en tanino insoluble posterior a la degradación de atrazina. Se observó un una remoción sobre el 91% de carbono orgánico, lo que indica que el contenido de carbono en la solución no se ve aumentado por presencia del tanino posterior a la reacción de degradación.

### 5.3.6 Conclusiones

En este capítulo se evaluó la capacidad de degradación del sistema Fenton heterogéneo desarrollado con extracto insoluble de corteza de *Pinus radiata* como soporte. El contaminante modelo utilizado correspondió a atrazina y la medición en el cambio de la concentración fue determinada a través de una metodología por HPLC-UV.

Además, se optimizaron las variables con mayor influencia en el sistema de degradación, lo que permitió determinar el rendimiento de degradación en un tiempo determinado de análisis. De este modo fue posible concluir que las variables óptimas en la degradación de este contaminante corresponden a 50 mg de tanino en el reactor de 50 mL, el pH tiene un rango óptimo entre 3.3-3.9, el Fe(III) fue fijado al valor máximo que soportaba la columna HPLC sin presentar alza de presión ( $150\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y  $2.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Con estas variables fijadas se obtuvo sobre un 97% de degradación de atrazina a 50 minutos de reacción. Lo anterior, al ser comparado con la degradación de atrazina en un sistema Fenton convencional al mismo tiempo de análisis se ve incrementado al menos en un 30% en el sistema conducido por tanino insoluble. Esto, es concordante con la mayor producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  en los sistemas conducidos y amplificados por el extracto insoluble.





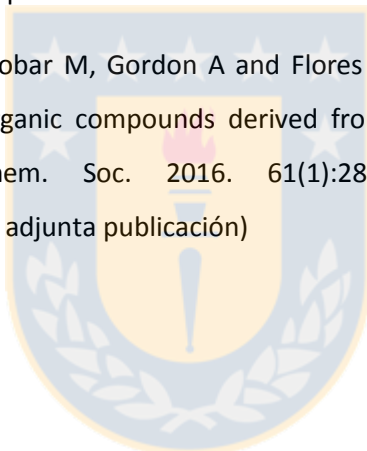
## 5.4 Productividad científica

La primera publicación que se presenta corresponde a los resultados previamente exhibidos en el capítulo 5, donde se han publicado aquellos correspondientes al objetivo específico 2 y 3 de la tesis doctoral, con respecto a la capacidad de producción de radicales hidroxilo en una reacción de Fenton heterogénea soportada en tanino insoluble de corteza de *Pinus radiata* y su aplicación en la degradación de atrazina en agua.

- Romero R, Contreras D, Segura C, Schwederski B, Kaim W. Hydroxyl radical production by a heterogeneous Fenton reaction supported in insoluble tannin from bark of *Pinus radiata*. *Environ Sci Pollut Res*. 2016:1-8. doi:10.1007/s11356-016-7532-1. (Se adjunta publicación)

La segunda publicación corresponde al trabajo realizado en el desarrollo de metodología analítica para análisis de líquidospirolíticos por HPLC-UV-RID .

- Tessini C, Romero R, Escobar M, Gordon A and Flores M. Development of an analytical method for the main organic compounds derived from thermochemical conversion of biomass. *J. Chil. Chem. Soc.* 2016. 61(1):2837-2842. doi: 10.4067/S0717-97072016000100018. (Se adjunta publicación)



# Hydroxyl radical production by a heterogeneous Fenton reaction supported in insoluble tannin from bark of *Pinus radiata*

Environ Sci Pollut Res  
DOI 10.1007/s11356-016-7532-1



AOPS: RECENT ADVANCES TO OVERCOME BARRIERS IN THE TREATMENT OF WATER, WASTEWATER AND AIR

## Hydroxyl radical production by a heterogeneous Fenton reaction supported in insoluble tannin from bark of *Pinus radiata*

Romina Romero<sup>1</sup> · David Contreras<sup>1</sup> · Cristina Segura<sup>2</sup> · Brigitte Schwederski<sup>3</sup> · Wolfgang Kaim<sup>3</sup>

Received: 19 January 2016 / Accepted: 26 August 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** Fenton reactions driven by dihydroxybenzenes (DHBs) have been used for pollutant removal via advanced oxidation processes (AOPs), but such systems have the disadvantage of DHB release into the aqueous phase. In this work, insoluble tannins from bark can be used to drive Fenton reactions and as a heterogeneous support. This avoids the release of DHBs into the aqueous phase and can be used for AOPs. The production of ·OH was investigated using a spin-trapping electron paramagnetic resonance technique (5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide/·OH) in the first minute of the reaction and a high-performance liquid chromatography-fluorescence technique (coumarin/7-hydroxycoumarin) for 20 min. The ·OH yield achieved using insoluble tannins from *Pinus radiata* bark was higher than that achieved using catechin to drive the Fenton reaction. The Fenton-like system driven by insoluble tannins achieved  $92.6 \pm 0.3$  % degradation of atrazine in 30 min. The degradation kinetics of atrazine was linearly correlated with ·OH production. The increased reactivity in ·OH production and insolubility of the ligand are promising for the development of a new technique for degradation of pollutants in wastewater using heterogeneous Fenton systems.

**Keywords** Heterogeneous Fenton · Tannin · Bark · Hydroxyl radical · Dihydroxybenzenes

### Introduction

Chile has about 15.6 million ha of forest. A major part of the available wood resources is discarded as waste (e.g., chips, bark, and sawdust), which is generated during the chain from timber production in the forest to the processing plant. It is estimated that forest activity produces approximately 3 million m<sup>3</sup> of wood residues (CNE 2008; INFOR 2010). Bark is part of these wood residues, and about one tenth of lumber mass is bark. Currently, this bark is removed prior to mechanical processing and burned to obtain process energy (Corder 1976). The bark of *Pinus radiata* contains about 60 % phenolic compounds, of which 8–12 % is soluble in water and 15–20 % are soluble in methanol (Berg et al. 2007). The polyphenols from the bark of *P. radiata* are condensed tannins, which consist of polymers of flavonoids with various degrees of condensation (Pepino et al. 2000). The phenolic compounds in pine bark are catechin, epicatechin, quercetin, dihydroquercetin, taxifolin, phenolic acids, procyanidin dimers, trimers, and oligomers as well as polymers formed from catechin and epicatechin (Yazaki and Hillis 1977; Packer et al. 1999).

At present, soluble tannins are widely used in adhesives for wood panels; only water-soluble tannins are used, to obtain a strong cross-linking with formaldehyde; otherwise, brittle resins are obtained (Pizzi 2008; Tondi and Pizzi 2009). The insoluble portion of bark tannin is of little use.

In this work, the portion of insoluble tannins from bark is used. This portion is free from sugars, furfural, and another compounds present in the native form of the bark, and which must be separated to improve the availability of phenolic

Responsible editor: Philippe Garrigues

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11356-016-7532-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ David Contreras  
dcontrer@udec.cl

<sup>1</sup> University of Concepción, Concepción, Chile

<sup>2</sup> Unit of Technological Development (UDT), Coronel, Chile

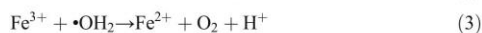
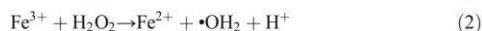
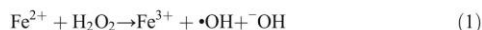
<sup>3</sup> Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany

Published online: 02 September 2016

Springer

groups. Another advantage over other types of biomass is the unusual structure; condensed tannins consist of linked catechins and therefore form a polymer that is more uniform than lignin (Khanbabaee and van Ree 2001). Recent analyses of these tannins using micropyrolysis have shown that catechol is a major product of thermal decomposition, with a smaller amount of methylcatechol. These results show that insoluble bark tannins consist mainly of condensed dihydroxybenzenes (DHBs) (Case et al. 2014).

The properties of DHB-driven Fenton (Eq. 1) and Fenton-like reactions (Eqs. 2–3) are well known (Salgado et al. 2013). It should be noted that the Fenton reaction ( $k = 76 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Eq. 1) is faster by four orders of magnitude than Fenton-like reaction ( $k = 0.01 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Chen and Pignatello 1997).



Fenton reactions driven by DHBs have been studied in various systems such as metabolic pathways in biological systems (Kerem et al. 1999; Paszczyński et al. 1999; Jensen et al. 2002) and advanced oxidation processes (AOPs) for water or wastewater treatment (Rodríguez et al. 1999; Rodríguez et al. 2001; Contreras et al. 2007). Various reaction pathways have been reported. One of the most cited is DHB complexation with Fe(III) and then reduction to Fe(II) (Contreras et al. 2011). In this process, the DHB itself is oxidized to a semiquinone; the pKa of the OH groups is therefore important because the ligating species is deprotonated DHB. The semiquinone can reduce Fe(III) to Fe(II), forming the corresponding quinone (Kristinová et al. 2009).

Several studies of the use of DHB-driven Fenton reactions in AOPs for the treatment of recalcitrant compounds (Valenzuela et al. 2008; Contreras et al. 2006; Monroy et al. 2007; Oviedo et al. 2004) and pulp mill wastewater (Rodríguez et al. 1999) have been reported. However, this type of AOP cannot be scaled because the treatment is performed homogeneously in aqueous solution. The oxidized products of DHBs (mainly quinones) and the remaining DHBs are present after treatment and these compounds are toxic (Bukowska and Kowalska 2004; Lofrano et al. 2009). DHB-driven Fenton reactions therefore have to be performed in a heterogeneous system to avoid the release of DHBs (or their oxidation products) into the treated water. The main objective of this study was to investigate the use of insoluble tannins from *P. radiata* bark as a source of DHBs. These can drive the Fenton reaction and simultaneously provide a heterogeneous support in the system. This AOP will be useful in future applications because the DHBs (and quinones) are retained in the heterogeneous phase rather than being released into the treated water.

## Experimental

### Materials and methods

All the required chemicals such as catechol (99 %, Sigma-Aldrich), catechin (99 %, Sigma-Aldrich),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %, Merck),  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 98$  %, Sigma Aldrich),  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 99$  %, Sigma Aldrich), coumarin ( $\geq 99$  %, Sigma Aldrich) and 5,5-dimethyl-1-pyrrolidine-*N*-oxide (97 %, Sigma-Aldrich, Germany) used in the experiment were of high purity and used as received without any further purification.

### Reaction conditions

DHBs can be partly oxidized to quinones or semiquinones by oxygen and then reduced to  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Melin et al. 2015); therefore, all reactions were performed in an argon atmosphere at room temperature to control the reaction conditions.

### Tannin extraction

The tannins used in these experiments were isolated from the bark of *P. radiata* using methanol extraction. The bark was obtained from 15-year-old trees, dried to a 12 % water content, and then ground in a hammer mill with slots of diameter 1.20 mm. The tannin extraction was performed in a 4-m<sup>3</sup> pressurized pilot plant with recirculation and indirect heating, at the Unit of Technology Development, University of Concepción, Chile. The bark was mixed in a batch reactor in a 1:5 mass/volume ratio to completely cover the bark with the extracting liquor (75 wt% methanol/water). The mixture was then heated to 120 °C in 90 min. After reaching 120 °C/120 min, the solution was cooled to ambient temperature and then discharged from the extractor. The tannin solution was diluted to give a solid concentration of 20 % and the methanol was completely removed by evaporation. The water-soluble and water-insoluble fractions were separated and both tannin fractions were dried. The procedure corresponds to that used in operation of the pilot plant, which essentially consists of a conical extractor of volume 4.0 L, a circulation pump, and a heat exchanger. The optimal conditions for extracting the tannins were concentration 75 wt% and extracting temperature 120 °C. The heating time was a crucial factor in the pilot plant used (Berg et al. 2007; Case et al. 2014).

### EPR measurements

The direct detection of some free radicals, e.g.,  $\bullet\text{OH}$ , is difficult or impossible in solution at room temperature. In spin trapping, a technique that was developed in the late 1960s, a nitron, e.g., 5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO), reacts with a target free radical to form a stable and identifiable

compound that can be detected using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. In this work, the ·OH radicals produced using various systems were detected by forming a paramagnetic radical DMPO/·OH adduct, which has a characteristic signal that can be easily observed using EPR spectroscopy (Janzen 1980).

#### Hydroxyl radical determination by spin-trapping technique

The ·OH radicals were detected by the DMPO spin-trapping method using EPR spectroscopy (Janzen 1980). The samples were transferred, using a syringe, to an AquaX flow-through sample cell located in a Bruker 4108 TMH/9701 cavity in a Bruker ESP 300 instrument to acquire the first spectrum, corresponding to the signal of the DMPO/·OH adduct, in the shortest possible time. The reaction was initiated by adding an aliquot of iron. The reaction cannot be stopped because the paramagnetic adduct decomposes throughout the analysis. The adduct can be inactivated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavengers.

After reaction initiation, the magnetic field was adjusted to one of the two dominant peaks of the adduct spectrum, and the change in the absorption at this field was used as a measure of the concentration of the adduct and thereby of the ·OH radical (Fig. 1). The amount of DMPO/·OH produced is proportional to the height of this peak (Yamazaki and Piette 1990).

The EPR profiles corresponding to changes in the signal from the DMPO/·OH adduct with time are the result of two processes: adduct formation with ·OH radicals produced by the Fenton reaction and decomposition of the adduct by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> present in the system, which oxidizes the paramagnetic nitroxide adduct group to non-radical products via reaction with pseudo-first-order kinetics. The EPR profiles obtained indicate complex behavior, with variables involved in both processes. The analysis was simplified by fitting the raw data

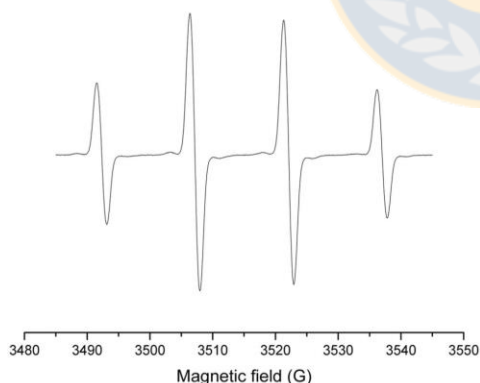


Fig. 1 Characteristic signal of DMPO-OH adduct in EPR spectra

to equations to compare all the ·OH production profiles; a normalized signal was obtained by dividing the raw signal by the limiting value when the time tends to infinity.

The normalized data profiles were fitted to Eq. 4 ( $R = 0.99$ ), where  $A$  represents the height of the highest peak corresponding to the adduct signal,  $b$  is the slope of the line,  $t$  is the time, and  $C$  is a constant.

$$\ln(At) = -b \times t + C \quad (4)$$

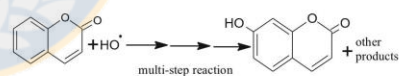
The variations observed in the decay profiles of the adduct, reflected in the values of  $b$ , were interpreted as the differences among the ·OH radical production levels. All data were analyzed using Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA).

The main objective of the EPR measurements was to compare ·OH radical production in different homogeneous and heterogeneous systems using a spin-trapping technique. In this work, a Fenton system, Fenton-like system, homogeneous catechin-driven Fenton-like system (catechin is the main monomer present in the insoluble tannins), and Fenton-like system driven by insoluble tannins in a heterogeneous phase were compared. The final concentrations were 1.5 mmol L<sup>-1</sup> catechin or 60 mg of insoluble tannin, 0.15 mmol L<sup>-1</sup> Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> or FeSO<sub>4</sub>, 1.5 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 40 mmol L<sup>-1</sup> DMPO. The pH was adjusted to 3.4 by addition of HNO<sub>3</sub>.

#### Hydroxyl radical determination using HPLC-fluorescence technique

A number of fluorescent probes, including terephthalic acid (Matthews 1980), benzoic acid (Armstrong et al. 1960), and coumarin (Louit et al. 2005), have been used to study ·OH scavenging.

The ·OH production can be monitored by formation of 7-hydroxycoumarin (7OHC; Eq. 5), which fluoresces in the visible region, at 456 nm.



All reactions were performed in triplicate at room temperature in an argon atmosphere. The reaction was initiated by addition of an iron aliquot to the reactor. Aliquots were removed every 5 min, the reaction was terminated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at pH 7.0, and the aliquots were analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC)-fluorescence at pH 3.40.

A Merck Hitachi HPLC system with a Merck LICHROSPHER C18 column was used for reverse-phase chromatography. Chromatography data station software was used to control the system. The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup>,

and a gradient between two solutions (A and B) was used throughout the analyses. Solution A consisted of 99 % water and 1 % formic acid, and solution B was 100 % acetonitrile. The mobile phase contained 85 % solution A and 15 % solution B; isocratic mode was used.

The  $\cdot\text{OH}$  radical production was determined using HPLC fluorescence in the same systems as were used for analyses by EPR spectroscopy. The final concentrations were  $1.5 \text{ mmol L}^{-1}$  catechin or 60 mg of insoluble tannin,  $0.15 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  or  $\text{FeSO}_4$ ,  $1.5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , and  $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  coumarin. The pH was adjusted to 3.4 with  $\text{HNO}_3$ . The reaction was initiated by addition of an aliquot of iron and stopped with EDTA before analysis at pH 7.0.

#### Atrazine degradation

Atrazine degradation was performed in a reactor at a final volume of 50 mL. The final concentrations in the reactor were  $12 \text{ } \mu\text{M}$  atrazine,  $150 \text{ } \mu\text{M}$   $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ,  $2 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , and 40 mg of insoluble tannins. The reaction was started by addition of an aliquot of iron. The reaction was stopped before analysis with EDTA at pH 7.0.

A Merck Hitachi HPLC system with a C18 column Merck LICHROSPHER of length 15 cm was used for reverse-phase chromatography. The mobile phase was methanol and 20 mM phosphate buffer, pH 2.5, in a ratio of 70:30; an isocratic pump was used. The wavelength was fixed at 222 nm.

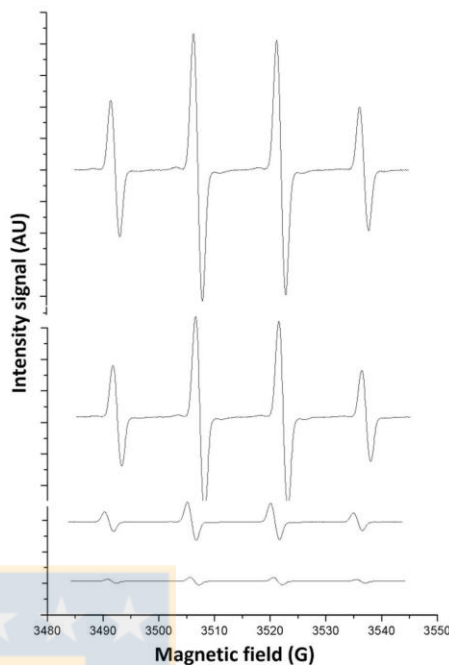
## Results and discussion

### Hydroxyl radical determination using spin-trapping technique

The  $\cdot\text{OH}$  production was studied in a Fenton system and a Fenton-like system (Eqs. 1 and 2), and Fenton-like systems driven by catechin (the main monomer present in the insoluble tannins) and tannins at pH values close to the optimal values for the Fenton reaction (Pignatello et al. 2006).

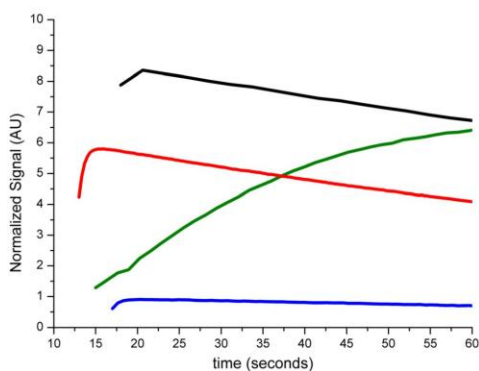
The production of  $\cdot\text{OH}$  was detected in all systems through observation of the characteristic signal from the DMPO/ $\cdot\text{OH}$  adduct (Fig. 2). The signals were observed for 1 h at intervals of 0.3 s. The DMPO/ $\cdot\text{OH}$  adduct was inactivated at around 60 s by reaction initiation, as reported by Contreras et al. (2007). For all the systems,  $\cdot\text{OH}$  production up to 60 s was determined using the EPR technique (Fig. 2). In all cases, data for the first seconds of the analysis were unavailable because of solution mixing; the first point considered was that after this time delay.

Figure 3 shows the  $\cdot\text{OH}$  production profiles for conventional Fenton and Fenton-like reactions, and reactions using  $\text{Fe}(\text{III})$  systems driven by catechin and tannins. The lowest signal for  $\cdot\text{OH}$  production was obtained for the Fenton-like



**Fig. 2** DMPO- $\cdot\text{OH}$  signal for the different systems obtained by EPR spin-trapping technique. The first DMPO- $\cdot\text{OH}$  signal corresponds to the system  $\text{Fe}(\text{III})/\text{tannin}/\text{H}_2\text{O}_2$ , the second one in intensity to  $\text{Fe}(\text{II})/\text{H}_2\text{O}_2$ , the third to  $\text{Fe}(\text{III})/\text{catechin}/\text{H}_2\text{O}_2$  and the less intense to  $\text{Fe}(\text{III})/\text{H}_2\text{O}_2$ . All reactions were performed at pH = 3.4,  $0.15 \text{ mmol L}^{-1}$  of  $\text{Fe}(\text{II})$  or  $\text{Fe}(\text{III})$ ,  $1.5 \text{ mmol L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $1.5 \text{ mmol L}^{-1}$  catechin or 60 mg of tannin and  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  of DMPO

system (blue line), in good agreement with the literature data (Salgado et al. 2013; Pignatello et al. 2006). The Fenton system (red line) produced more  $\cdot\text{OH}$  than did the Fenton-like systems (except the tannin-driven system); production reached a maximum value at close to 15 s, the signal remained constant, and then decreased. The observed fast radical production is in accordance with that reported in the literature (Contreras et al. 2007). The initial signal for the Fenton-like reaction driven by catechin (green line) was lower, but increased and reached a higher value than that for the Fenton reaction at around 60 s. This slow  $\cdot\text{OH}$  production is similar to the behaviors observed with other DHBs (Contreras et al. 2007). The tannin-driven Fenton-like system gave the highest  $\cdot\text{OH}$  production. In contrast, the catechin-driven Fenton-like system gave the highest  $\cdot\text{OH}$  production at approximately 20 s. The signal remained constant and then decreased, similar to the Fenton system. The tannin-driven Fenton-like system is a heterogeneous Fenton reaction system with insoluble tannins. The  $\cdot\text{OH}$  production levels achieved with this system



**Fig. 3** The production of hydroxyl radical measured by EPR spin-trapping technique. The profiles correspond to Fe(III)/tannin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (black line), Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (red line), Fe(III)/catechin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (green line), and Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (blue line). All reactions were performed at pH = 3.4, 0.15 mmol L<sup>-1</sup> of Fe(II) or Fe(III), 1.5 mmol L<sup>-1</sup> of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.5 mmol L<sup>-1</sup> of catechin or 60 mg of tannin, and 40 mmol L<sup>-1</sup> of DMPO

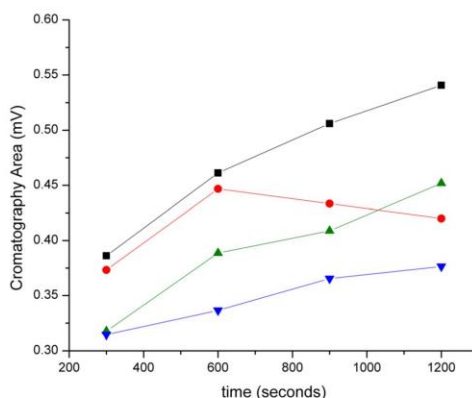
were 1.44, 1.29, and 9.27 times higher than those achieved with the Fenton system, catechin-driven Fenton-like system, and Fenton-like system, respectively.

The highest production of ·OH was observed in the initial stage for the Fenton system; this is because Fe(II) is present, whereas Fe(III) reduction is necessary as a first step in the Fenton-like systems. This process is slow in Fenton-like systems in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone (Ensing et al. 2003) but becomes fast when DHBs are used (Mentasti et al. 1976). Our previous unpublished results show that Fe(III) is reduced more rapidly by insoluble tannins than by catechin for a short period, resulting in the largest initial signal among those for the systems tested. The lowest initial signal, in the catechin-driven system, may be related to a lower rate of Fe(III) reduction. In addition, ·OH production was lower.

#### Hydroxyl radical determination using HPLC-fluorescence technique

In the present work, the production of ·OH radicals was maintained for more than 60 s. However, because of the limited stability of DMPO/·OH in the reaction system, the EPR technique could not be used to determine ·OH production on this timescale. An HPLC-fluorescence method based on selective hydroxylation of coumarin (Eq. 4) was therefore used to estimate ·OH production over longer periods.

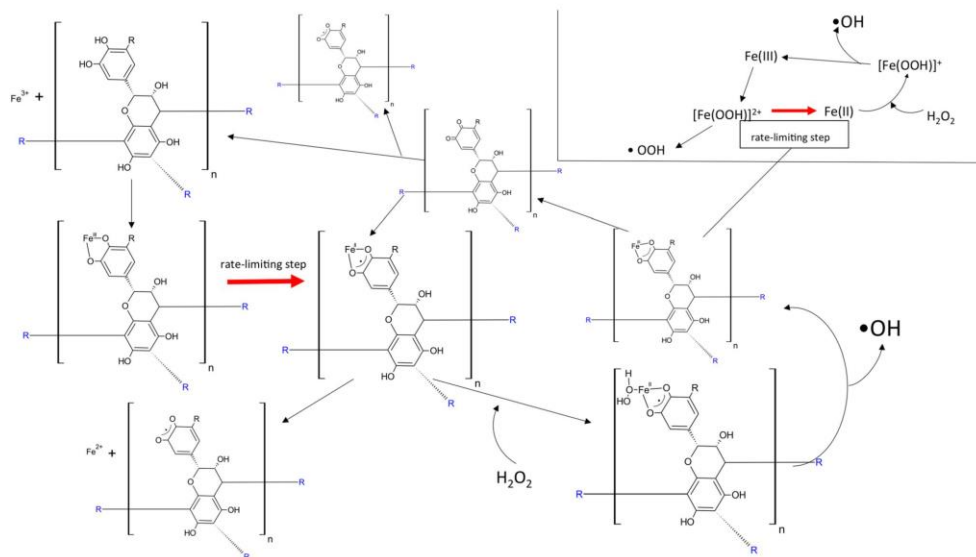
Figure 4 shows the ·OH production from 300 to 1200 s. The signal trends are in agreement with the results obtained using the EPR method. In this period, ·OH production in the tannin-driven Fenton-like reaction (black squares) increased until 1200 s. The slopes of the ·OH production plots were similar for all the Fenton-like systems (black squares, green



**Fig. 4** The production of hydroxyl radical measured by HPLC-fluorescence method. The profiles correspond to black line to Fe(III)/tannin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, red line to Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, green line to Fe(III)/catechin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and blue line to Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $n = 3$ ). All reactions were performed at pH = 3.4, 0.15 mmol L<sup>-1</sup> of Fe(II) or Fe(III), 1.5 mmol L<sup>-1</sup> of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.5 mmol L<sup>-1</sup> catechin or 60 mg of tannin, and 500 μmol L<sup>-1</sup> of coumarin

triangles, and blue triangles). For the Fenton system (red circles), ·OH production increased until 600 s and then decreased slowly. The Fenton-like reaction driven by insoluble tannins (black squares) showed maximum ·OH production after 1200 s and the signal further increased over this period. The highest ·OH production was reached in a short period by the Fenton-like reaction driven by insoluble tannins (Fig. 3, black line); over longer durations, the same system reached maximum ·OH production, with the highest rate of increase (Fig. 4, black squares).

The increases in ·OH production can be explained based on the redox cycles in the Fenton reaction (Salgado et al. 2013) and Fenton-like systems (Melin et al. 2015), in which the limiting step is Fe(III) reduction. Figure 5 shows proposed redox cycles in which catechin chelates with and reduce Fe(III). The Fenton reaction (Fig. 5, inset) starts with the formation of [Fe(OOH)]<sup>+</sup> from Fe(II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and then ·OH is produced and Fe(II) is oxidized to Fe(III). The reduction of Fe(III) is the rate-limiting step. In this case, the formation of [Fe(OOH)]<sup>2+</sup> from Fe(III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is necessary; Fe(III) is then reduced to Fe(II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is oxidized to HOO· ( $k = 2.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) (Salgado et al. 2013). In the Fenton-like reaction driven by insoluble tannins, the rate-limiting step is different because Fe(III) is chelated with and reduced by catechin (Fig. 5). In the first stage in this redox cycle, Fe(III) complexes with catechin (a tannin monomer). In the second stage, Fe(III) in the complex is reduced via an inner-sphere mechanism, giving an Fe(II) complex and a semiquinone. This step, which has already been reported for catechol derivatives, is assigned as the rate-limiting step (Mentasti et al.



**Fig. 5** Proposed redox cycle for Fenton reaction driven by insoluble tannin

1976). The rate of the reaction of Fe(II) in the complex with  $\text{H}_2\text{O}_2$  differs from the rate for the aqueous complex because the electron densities at Fe(II) differ (Morgan and Lahav 2007). The sources of  $\cdot\text{OH}$  in these systems are the classical Fenton reaction (Fig. 5, inset) and the Fenton-like reaction driven by insoluble tannins (Fig. 5). The latter is slower because iron chelates on the tannin surface (heterogeneous system) and then  $\cdot\text{OH}$  is released.

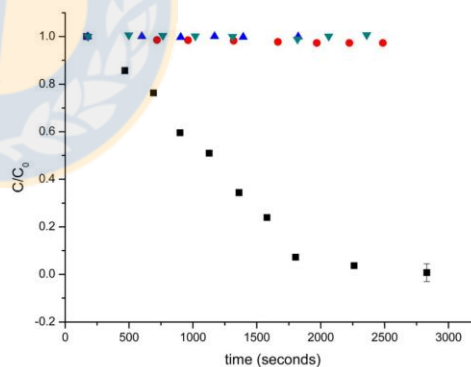
#### Atrazine degradation

The production of  $\cdot\text{OH}$  in a Fenton-like reaction driven by insoluble tannins makes this system suitable for use as an AOP for pollutant removal. The insoluble tannin-driven Fenton-like system was used for the degradation of atrazine. Figure 6 shows the atrazine degradation profile during 3000 s. The degradation rate was linear up to 1800 s and a percentage degradation of  $92.6 \pm 0.3\%$  was reached. The degradation percentage further increased to  $97.1 \pm 0.7\%$  (the detection limit of the analytical technique) at 3000 s. The data were fitted using first-order kinetics ( $R = 0.97$ ) and the rate constant was  $9.7 \pm 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Controlled kinetic experiments showed that no atrazine degradation occurred in the absence of tannins. Similar results (Fig. 6) were obtained in the absence of iron and  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Atrazine degradation was correlated with  $\cdot\text{OH}$  production, which was determined using EPR and HPLC-fluorescence techniques. A linear correlation was obtained in both cases

and the  $R$  values were 0.993 and 0.975 for EPR and HPLC-fluorescence, respectively. These results show that the relationship between atrazine degradation and  $\cdot\text{OH}$  production is linear.

HPLC with diode array detection at 200 to 800 nm and gas chromatography-mass spectrometry (column HP-5 ms) after solid-phase extraction (Oasis<sup>®</sup>, HLB 6  $\text{cm}^3$ ) showed that DHBs and other compounds did not leach from the tannin bark during the reaction.



**Fig. 6** The degradation of atrazine measured by HPLC-UV at 222 nm. The black squares represent the degradation of atrazine by (III)/insoluble tannin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  system in water at pH = 3.4. The kinetic controls were made, the red circle corresponds to system without tannin, blue triangle corresponds to system without iron, and the green triangle corresponds to system without peroxide

## Conclusions

The production of ·OH in a Fenton-like system driven by insoluble tannins from *P. radiata* bark was higher than that achieved using a Fenton system. A good linear correlation was obtained between atrazine degradation and ·OH production in the tannin-driven system. The increased ·OH production and solid-phase ligands are promising for the development of new techniques for degradation of pollutants in wastewater using heterogeneous Fenton systems.

**Acknowledgments** The authors gratefully acknowledge FONDECYT (Grant no. 1131101 and 1160100), FONDEQUIP (EQM 140075), INNOVA Chile (Grant no. 14IDL2-30128), and FONDAP Solar Energy Research Center, SERC-Chile (Grant No. 15110019) for financial assistance, and Romina Romero wish to thank the CONICYT PhD fellowship.

## References

- Armstrong WA, Black BA, Grant DW (1960) The radiolysis of aqueous calcium benzoate and benzoic acid solutions. *J Phys Chem* 64(10): 1415–1419. doi:10.1021/j100839a013
- Berg, A., Navarrete, P., Olave, L., 15th European Biomass Conference & Exhibition, Berlin, Germany, p. 2198 (2007).
- Bukowska B, Kowalska S (2004) Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicol Lett* 152(1):73–84. doi:10.1016/j.toxlet.2004.03.025
- Case P, Bizama C, Segura C, Wheeler MC, Berg A, DeSisto W (2014) Pyrolysis of pre-treated tannins obtained from Radiata pine bark. *J Anal Appl Pyrolysis* 107:250–255. doi:10.1016/j.jaap.2014.03.009
- Chen R, Pignatello JJ (1997) Role of quinone intermediates as electron shuttles in Fenton and photoassisted Fenton oxidations of aromatic compounds. *Environmental Science & Technology* 31(8):2399–2406. doi:10.1021/es9610646
- CNE, Unconventional Renewable Energy Project in Chile (2008). The National Energy Commission.
- Contreras D, Rodríguez J, Basaez L, Freer J, Valenzuela R, Mansilla H, Vanysek P (2011) New insights in the dihydroxybenzenes-driven Fenton reaction: electrochemical study of interaction between dihydroxybenzenes and Fe(III). *Water Sci Technol* 64(10):2103–2108. doi:10.2166/wst.2011.420
- Contreras D, Rodríguez J, Freer J (2006) Veratryl alcohol degradation by a catechol-driven Fenton reaction as lignin oxidation by brown-rot fungi model. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57(1): 63–68. doi:10.1016/j.ibiod.2005.11.003
- Contreras D, Rodríguez J, Freer J, Schwederski B, Kaim W (2007) Enhanced hydroxyl radical production by dihydroxybenzene-driven Fenton reactions: implications for wood biodegradation. *J Biol Inorg Chem* 12(7):1055–1061. doi:10.1007/s00775-007-0274-2
- Corder Stanley E (1976) Properties and uses of bark as an energy source. Forest research laboratory, Oregon State University. XVI IUFRO World Congress, Oslo, Norway
- Ensing B, Buda F, Baerends EJ (2003) Fenton-like chemistry in water: oxidation catalysis by Fe(III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *The Journal of Physical Chemistry A* 107(30):5722–5731. doi:10.1021/jp0267149
- INFOR (2010). Update availability of wood residues generated by the primary wood industry. Chilean Forest Institute.
- Janzen EG (1980). A critical review of spin trapping in biological systems. *Free radicals in biology*. Vol. 4. Academic Press New York, Chapter 4: 116–154. ISBN: 0-12-566504-0 (v.4)
- Jensen Jr KA Jr, Ryan ZC, Vanden Wymelenberg A, Cullen D, Hammel KE (2002) An NADH:quinone oxidoreductase active during biodegradation by the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol* 68(6):2699–2703. doi:10.1128/AEM.68.6.2699-2703.2002
- Kerem Z, Jensen KA, Hammel KE (1999) Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. *FEBS Lett* 446(1):49–54. doi:10.1016/S0014-5793(99)00180-5
- Khanbabae K, van Ree T (2001) Tannins: classification and definition. *Nat Prod Rep* 18(6):641–649. doi:10.1039/B101061L
- Kristinová V, Mozuraityte R, Storø I, Rustad T (2009) Antioxidant activity of phenolic acids in lipid oxidation catalyzed by different prooxidants. *J Agric Food Chem* 57(21):10377–10385. doi:10.1021/jf901072t
- Lofrano G, Rizzo L, Grassi M, Belgiomo V (2009) Advanced oxidation of catechol: a comparison among photocatalysis, Fenton and photo-Fenton processes. *Desalination* 249(2):878–883. doi:10.1016/j.desal.2009.02.068
- Louit G, Foley S, Cabillic J, Coffigny H, Taran F, Valleix A, Pin S (2005) The reaction of coumarin with the OH radical revisited: hydroxylation product analysis determined by fluorescence and chromatography. *Radiat Phys Chem* 72(2):119–124. doi:10.1016/j.radphyschem.2004.09.007
- Matthews RW (1980) The radiation chemistry of the terephthalate dosimeter. *Radiat Res* 83(1):27–41. doi:10.2307/3575256
- Melin V, Henriquez A, Freer J, Contreras D (2015) Reactivity of catecholamine-driven Fenton reaction and its relationships with iron(III) speciation. *Redox Rep* 20(2):89–96. doi:10.1179/1351000214.Y.0000000119
- Mentasti E, Pelizzetti E, Baiocchi C (1976) Interactions of Fe(III) with adrenaline, L-DOPA and other catechol derivatives: electron-exchange kinetics and mechanism in acidic perchlorate media. *J Inorg Nucl Chem* 38(11):2017–2021. doi:10.1016/0022-1902(76)80460-5
- Monrroy M, Baeza J, Freer J, Rodríguez J (2007) Degradation of tribromophenol by wood-decaying fungi and the 1,2-dihydroxybenzene-assisted Fenton reaction. *Bioremediation Journal* 11(4):195–200. doi:10.1080/10889860701710560
- Morgan B, Lahav O (2007) The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O<sub>2</sub> in aqueous solution—basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere* 68(11):2080–2084. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.02.015
- Oviedo C, Contreras D, Freer J, Rodríguez J (2004) Fe(III)-EDTA complex abatement using a catechol driven Fenton reaction combined with a biological treatment. *Environ Technol* 25(7):801–807. doi:10.1080/09593330.2004.9619371
- Packer L, Rimbach G, Virgili F (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark. *pycnogenol*. *Free Radic Biol Med* 27(5):704–724. doi:10.1016/S0891-5849(99)00090-8
- Paszczyński A, Crawford R, Funk D, Goodell B (1999) De novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol* 65(2):674–679
- Pepino L, Brito P, Jorge FC, Costa RP, Gil MH, Portugal A (2000). Extraction of pine bark tannins in aqueous-organic systems. In 2nd International Conference on Biopolymer Technology, Ischia, Italy p.36.
- Pignatello JJ, Oliveros E, MacKay A (2006) Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Crit Rev Environ Sci Technol* 36(1):1–84. doi:10.1080/10643380500326564
- Pizzi A (2008) Tannins: major sources, properties and applications. *Monomers, polymers and composites from renewable resources* 8: 179–199 ISBN: 978-0-08-045316-3



- Rodríguez J, Contreras D, Parra C, Freer J, Baeza J (2001) Dihydroxybenzenes: driven Fenton reactions. *Water Sci Technol* 44(5):251–256. doi:10.1007/978-3-642-56777-3\_11
- Rodríguez J, Contreras D, Parra C, Freer J, Baeza J, Durán N (1999) Pulp mill effluent treatment by Fenton-type reactions catalyzed by iron complexes. *Water Sci Technol* 40(11–12):351–355. doi:10.1016/S0273-1223(99)00738-6
- Salgado P, Melin V, Contreras D, Moreno Y, Mansilla HD (2013) Fenton reaction driven by iron ligands. *J Chil Chem Soc* 58(4):2096–2101. doi:10.4067/S0717-97072013000400043
- Tondi G, Pizzi A (2009) Tannin-based rigid foams: characterization and modification. *Ind Crop Prod* 29(2):356–363. doi:10.1016/j.indcrop.2008.07.003
- Valenzuela R, Contreras D, Oviedo C, Freer J, Rodríguez J (2008) Copper catechol-driven Fenton reactions and their potential role in wood degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61(4):345–350. doi:10.1016/j.ibiod.2007.10.006
- Yamazaki I, Piette LH (1990) ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe<sup>2+</sup> ions with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reactive species in oxygen toxicity in biology. *J Biol Chem* 265(23):13589–13594
- Yazaki Y, Hillis WE (1977) Polyphenolic extractives of *Pinus radiata* bark. *Holzforschung—International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* 31(1):20–25. doi:10.1515/hfsg.1977.31.1.20



# Development of an analytical method for the main organic compounds derived from thermochemical conversion of biomass.

J. Chil. Chem. Soc., 61, N° 1 (2016)

## DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE MAIN ORGANIC COMPOUNDS DERIVED FROM THERMOCHEMICAL CONVERSION OF BIOMASS

Catherine Tessini<sup>1</sup>, Romina Romero<sup>2</sup>, Mauricio Escobar<sup>2</sup>, Alfredo Gordon<sup>3</sup> and Mauricio Flores<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María.

<sup>2</sup>Área de Bioenergía, Unidad de Desarrollo Tecnológico, Universidad de Concepción.

<sup>3</sup>Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Concepción.

### ABSTRACT

In this work, high-performance liquid chromatography (HPLC-UV/RID) is applied to the simultaneous determination of acetic acid, formic acid, acetol, glyoxal, glycolaldehyde and levoglucosan in a by-product in an aqueous liquid phase that is produced by the Hydrothermal Carbonization (HTC) process and in an aqueous bio-oil phase, which comes from a fast pyrolysis process. Both processes were run in forest biomass.

For the development and optimization of the proposed method, some chromatographic columns were evaluated based on separation principles of reversed phase and ionic exclusion, although it was previously performed with a solid phase extraction (SPE) process.

Concentrations of acetic and formic acids in the liquids of the HTC process ranged from 0.26 to 1.5 % and from 0.14 to 2.7 %, respectively.

Concentrations of acetic and formic acids, levoglucosan and glycolaldehyde in the aqueous bio-oil phases ranged from 0.4 – 4.6 %, 0.4 – 1.4 %, 0.13 – 2.5 % and 0.5 – 3.5 %, respectively.

**Keywords:** liquid chromatography, organic acids, levoglucosan, solid phase extraction, aqueous bio-oil, liquid HTC process.

### 1. Introduction

There is a strong global effort to replace chemical compounds of fossil origin with renewable sources with similar characteristics for ecological, economic and social reasons. Alternatively, the production of chemical intermediates and final products from renewable forest biomass can change the scenario. In this paper, the by-product of the HTC process and the aqueous bio-oil fraction are considered.

HTC is an exothermal process that reduces both the oxygen and hydrogen content of the feed, primarily by dehydration and decarboxylation. In forest biomass, it is mainly used to increase the energetic density and homogenization of such biomass. One of the by-products of the aforementioned process is a liquid (aqueous) that contains a complex mixture of several chemical compounds (e.g., levoglucosan, water and organic acids, mainly acetic and formic) suitable for use in the industrial field as a raw material [1-7].

However, bio-oil, which is a liquid product of fast biomass pyrolysis, is attracting considerable interest as a renewable source of liquid fuels and chemicals. Bio-oil contains between 10 and 30 wt% of water and hundreds of oxygenated organic compounds, such as pyrolytic lignin (15–20 %), aldehydes (10–20 %), organic acids (10–15 %), anhydrosugars (5–10 %) and other compounds [8,9]. This composition makes bio-oil a very complex matrix from the analytical point of view.

Within this context, it is very important to develop a selective analytical method to quantify these chemical compounds. We propose a versatile and easier method for characterizing acetic and formic acids, levoglucosan, glyoxal, acetol and glycolaldehyde in the liquid by-product of the HTC process and aqueous bio-oil phases.

The identification and/or quantification of the main chemicals of interest have been described in a wide array of studies, using the gas chromatography (GC) techniques coupled with mass spectroscopy (MS) [10-14], pyrolysis-GC/MS [15-16] and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), evaluating separation principles based on inverse phase and ionic exclusion [17-18].

For the separation, identification and quantification of compounds in pyrolysis liquids, a GC/MS/FID method was implemented using a medium polarity column (VF-1701) and quantified by a "relative response factor" [11]. Through this method it is possible to determine almost 40 % of the compounds in pyrolysis liquids (bio-oil) in a fast and selective way. Nevertheless, the liquid obtained through the HTC process contains high levels of water and polar compounds, which prevent identification/quantification using this method.

Moreover, some analytical methods based on HPLC have been proposed to measure the concentration of sugars in pyrolysis liquids using Aminex

HPX-87P, HyperRez XP Carbohydrate columns with a detection by refraction index (RI) [17-18]. Additionally, HPLC methods have been proposed for determining organic acids using Aminex HPX-87H columns [19]. However, chromatographic parameters (e.g., resolution) and method validation are often not reported.

Considering the complexity of the sample composition, it is necessary to conduct a pre-treatment or cleaning of the sample. Treatments of samples were based on solid phase extraction methods for determining organic acids and sugars in food samples. Among the principal resins or phases used, the one that is most commonly used is the strong anion exchange column for the determination of organic acids in wine, coffee, and biological samples [20-22] and for the determination organic acids and sugars in juice samples [23]. It has also been used in reversed-phase C-18 columns in the determination of organic acids in milk, tobacco, coffee, propolis samples and marine products [24-28]. The separation and detection systems are based on liquid chromatography with reversed phase columns and ion exclusion columns [17,18,29], coupled with UV detection (for organic acids) – RID (for sugars) [30], ELSD (for sugars) [29], and mass detection [26].

The analytic strategy in this work was to develop an easy analytical method with reliable results, using equipment of lower cost with greater accessibility. Therefore, we hereby present a versatile and selective analytical method that was validated for the determination of acetic acid, formic acid, acetol, glyoxal, glycolaldehyde and levoglucosan in aqueous bio-oil phase and liquid HTC. It is based on the use of HPLC, with ionic exclusion separation and a serial detection system (UV/RID) for simultaneous determination of the aforementioned chemicals; prior to injection, a solid-phase extraction was implemented. We illustrate its usefulness for the quantification of organic compounds susceptible to be used as raw materials in the chemistry industry.

### MATERIALS AND METHODS

#### 2.1 Instrumentation and HPLC method

The HPLC analyses were carried out with a Shimadzu HPLC system equipped with a SIL-20A auto-sampler, a LC-20AT pump, a CTO-20AC oven column, a SPD-20AV UV-Vis detector and an RID-10A refractometer (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan). Data processing was performed using a Lab-Solution of LC-solution version 1.25 from Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan).

In the present study, three column systems were evaluated: Symmetry® C-18 of 5 µm, 4.6 x 150 mm (A System) provided by Waters (Milford Massachusetts, USA); Symmetry® C-18 of 5 µm, 4.6 x 150 mm + Rezex™ ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8 %), 300 x 7.80 mm (B system) and two Rezex™ ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8 %), 300 x 7.80 mm (C system) obtained from Phenomenex (Torrance, C.A. USA). The mobile phase was isocratic, consisting of 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in deionized water with a flow rate 0.5 ml min<sup>-1</sup>. The UV

detector at 210 nm and the refractometer were serially connected. The injection volume was 10 µl. All solutions and samples were filtered through a 0.45 µm membrane filter.

### 1.2 Materials and reagents

Acetic acid 99.9 %, glyoxal 40 %, levoglucosan 98 % and formic acid 99 % were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetol 90 %, and glycolaldehyde (dimer) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Deionized water (18 mΩ) was produced by a Millipore Milli-Q water purification system (Bedford, MA, USA).

Oasis® mixed-mode, reversed-phase/strong cation-exchange (MCX); Oasis® mixed-mode, reversed-phase/strong anion-exchange (MAX); Oasis® mixed-mode, reversed-phase/weak cation-exchange (WCX) and Oasis® mixed-mode, reversed-phase/weak anion-exchange (WAX), all 500 mg/3 ml, cartridges were obtained from Waters Corporation (Milford Massachusetts, USA). The ODS C-18 (500 mg/3 ml) cartridges were purchased from Agilent (Santa Clara, CA, USA).

### 1.3 Sample pre-treatment

For the pre-treatment of the sample, three types of fillers were evaluated in solid phase extraction (MAX, MCX and C-18) with both sample types. The cleaning methods used in this work were based on the recommendations of the manufacturer and on some studies described in other matrices [29-31]. The methods are described below.

#### 1.3.1 SPE procedure using Oasis® MAX and Oasis® WCX

500 µl of diluted sample (1/10 dilution in water) is added to a cartridge of 500 mg / 3 ml.  
The sample is washed with NaOH (0.5 M) and subsequently eluted with HCl (1.0 M).

#### 1.3.2 SPE procedure using Oasis® MCX and Oasis® WAX

500 µl of sample (1/10 dilution in water) is added to a cartridge of 500 mg / 3 ml, followed by washing with water and subsequent elution with methanol. The sample is evaporated to dryness and reconstituted in mobile phase (0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in deionized water).

#### 1.3.3 SPE procedure using ODS C-18

500 µl of the sample (1/10 dilution in water) is added to a cartridge of 500 mg/3 ml, followed by washing with water and subsequent elution with mobile phase.

### 1.4 Samples

#### 2.4.1 Liquid by-product from HTC process

Hydrothermal processing of pine was performed in a 1.2 L Parr stirred pressure reactor (model 4540 C). During each run, a mixture of pine and water in a mass ratio of 1:8 was loaded into the reaction vessel. Nitrogen was passed through the reactor for 10 min to purge oxygen. The reactor was heated to the desired temperature and maintained at that temperature for the required time period, after which the reactor was rapidly cooled off by immersion in a water bath. Subsequently, the process gas was collected in a bag; the solid and aqueous HTC by-products were separated via vacuum filtration.

#### 2.4.2 Aqueous bio-oil phases

Bio-oil samples were produced in a bench-scale pyrolysis plant at the Technological Development Unit of Universidad de Concepción. During each run, oven-dry sawdust was fed into a fluidized bed reactor using nitrogen and pyrolyzed in contact with hot sand (temperature of pyrolysis = 530 °C). After removing the char, bio-oil was condensed and collected. Twenty milliliters of bio-oil was very slowly dispersed in 200 ml cold water (5 °C) with the help of an IKA T-25 Ultra-Turrax at 6000 rpm. The precipitate or "pyrolytic lignin" was filtered off and the aqueous phase was analyzed.

## 2 RESULTS AND DISCUSSION

### 1.1 Optimization of separation parameters and sample pre-treatment

#### 1.1.1 HPLC column conditioning

For separation/chromatographic detection, two detectors were used

to enhance the sensitivity and selectivity of the compounds. Thus, the concentrations of formic acid, acetic acid and acetol were measured using the UV detector (210 nm), and glyoxal, glycolaldehyde and levoglucosan were determined by the refractometer. For chromatographic separation, three systems were evaluated using various columns for separation of the seven standard compounds. For systems A and B, chromatographic resolutions under 1.0 were obtained in both detectors and the compounds eluted near the mobile phase. In the case of system C, separations with resolutions over 1.0 was achieved for six compounds in both detectors using two ionic exclusion columns connected in series. This system was chosen for determining the compounds above.

To obtaining the best column system (C system), an experimental design and subsequent screening were performed to optimize the chromatographic conditions. The experimental design's response was the resolution, and the variables studied were: concentration of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mobile phase) between 0.0025 and 0.0075 M, flow rate of mobile phase between 0.4 and 0.6 ml min<sup>-1</sup> and column temperature between 55-75 °C. In Figure 1, the coefficient plots with confidence intervals for UV (Y<sub>1</sub>) and refractometer detector (Y<sub>2</sub>) are shown.

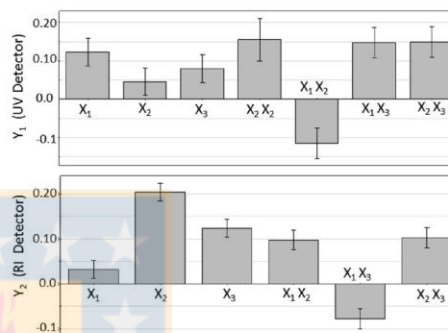


Figure 1: The coefficient plots with confidence intervals for separation optimization in UV detector (Y<sub>1</sub>) and refractometer (Y<sub>2</sub>).

$$Y_1 = 1.4242 (\pm 0.0425) + 0.1230 (\pm 0.0355) X_1 + 0.0460 (\pm 0.0335) X_2 + 0.079 (\pm 0.0335) X_3 + 0.1557 (\pm 0.0554) X_2 X_3 - 0.115 (\pm 0.0397) X_1 X_2 + 0.1475 (\pm 0.0397) X_1 X_3 + 0.150 (\pm 0.037) X_2 X_3$$

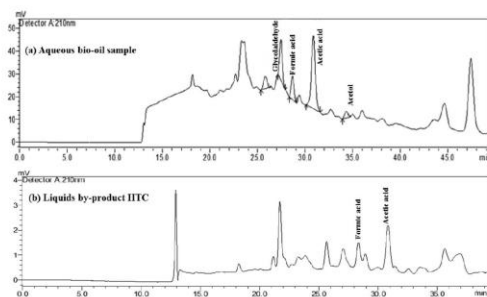
$$Y_2 = 1.2270 (\pm 0.0153) + 0.0320 (\pm 0.0199) X_1 + 0.204 (\pm 0.0199) X_2 + 0.124 (\pm 0.0199) X_3 + 0.0975 (\pm 0.0223) X_1 X_2 - 0.0775 (\pm 0.0223) X_1 X_3 + 0.1025 (\pm 0.0223) X_2 X_3$$

Here X<sub>1</sub> is the column temperature, X<sub>2</sub> is the mobile phase flow and X<sub>3</sub> is the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration in the mobile phase. This method was validated by analysis of variance (ANOVA) using MODDE 7.0.0.0 software.

The optimal separation conditions were: X<sub>1</sub> = 75 °C, X<sub>2</sub> = 0.6 ml min<sup>-1</sup> and X<sub>3</sub> = 0.0075 M. Under these conditions (table 1), the chromatographic resolutions in both detectors were greater than 1.7.

#### 1.1.2 Extraction method optimization

The main drawback of aqueous bio-oil phase analysis, or of the by-product HTC process, is the complexity of the samples. For example, Figure 2 shows HTC liquid (by-product) and aqueous bio-oil phase chromatograms for samples without previous treatment injected into the HPLC-UV/RID in the optimized separation conditions mentioned in 3.1.1. For this reason, treatments of samples prior to chromatographic separation were evaluated to eliminate interference. At first, liquid-liquid extraction methods were employed to remove low polarity compounds, but these did not give satisfactory results. Subsequently, the solid phase extraction (SPE) technique was evaluated, which showed favorable results. From this technique, fillings that have been used by several authors in the determination of organic acids, sugars and aldehydes in liquid samples, primarily in wines, were evaluated [20].



**Figure 2:** Chromatograms of HTC liquid (by-product) and aqueous bio-oil phase injected without previous treatment in the HPLC-UV/RID.

The objective of this treatment is to obtain a chromatogram free of interference affecting the quantification of the compounds, and also to obtain compound recoveries between 85–110 % [32]

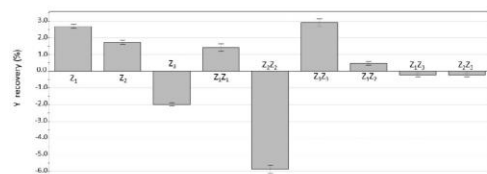
In the first stage, the WCX, WAX, MAX, C-18 and MCX columns were evaluated only with aqueous bio-oil. However, WCX and WAX columns were eliminated because they exhibited low retention of the compounds of interest and inefficient removal of compounds interfering with chromatographic analysis. This is primarily due to the low pH range that can be tolerated by these columns [31]. In the case of MCX, C-18 and MAX columns, these exhibited greater interference elimination in a second stage; assays were performed with aqueous bio-oil and liquid HTC samples. In the case of the MCX columns, an important elimination of interferences was shown, but the retention of compounds of interest was not optimum. The C-18 extraction column has a higher retention of the interference compounds, and this column is extensively used for retention of the compounds studied. A disadvantage of this method occurs when working with samples containing compounds of similar polarity. Of the latter, the MAX column was the one that showed chromatograms with less interference and high retention compounds of interest.

Considering that the second goal of this treatment is to obtain a high recovery from the solid phase extraction, a screening and an experimental design were carried out with recovery response. The variables studied were: HCl (solution elution) concentration between 0.5 – 1.0 M HCl, elution flow (drop per second) and concentration of NaOH in the washing solution (0.1-0.5 M). In all tests, the sample volume was 1.5 mL.

The polynomial response obtained from the experimental design is shown below:

$$y = 89.055 (\pm 0.1530) + 2.6799 (\pm 0.1057) Z_1 + 1.7354 (\pm 0.1161) Z_2 - 1.980 (\pm 0.1057) Z_3 + 1.4023 (\pm 0.2252) Z_1 Z_2 - 5.8749 (\pm 0.2508) Z_1 Z_3 + 2.9023 (\pm 0.2252) Z_2 Z_3 + 0.4750 (\pm 0.1182) Z_1 Z_2 Z_3 - 0.2249 (\pm 0.1182) Z_1^2 Z_3 - 0.142188 (\pm 0.101235) Z_2^2 Z_3$$

In Figure 3, the coefficient plots with confidence intervals for SPE optimization are shown.



**Figure 3:** The coefficient plots with confidence intervals for solid phase extraction optimization

Here  $Z_1$  is HCl concentration,  $Z_2$  is extraction flow and  $Z_3$  is NaOH concentration. This method was also validated by analysis of variance (ANOVA) using MODDE 7.0.0.0 software.

The optimal SPE conditions were: 1.0 M HCl concentration (elution with 1.5 ml), flow rate of 1 drop per second and NaOH concentration 0.5 M (washing solution with 1.5 ml). Table 1 shows a summary of the optimum conditions of the chromatographic separation and the solid phase extraction.

**Table 1:** Chromatographic and SPE optimal conditions.

SPE conditions	Optimum
SPE column	MAX (reversed-phase/strong anion-exchange)
Bio-oil sample	1 mL of aqueous phase
HTC sample (liquid by-product)	1 ml (def. 25 with deionized water)
Washing solution NaOH (0.5 M)	1 mL
Elution solution HCl (1.0 M)	1 mL
<b>Chromatographic conditions</b>	
Columns	Two Rezex™ ROA-Organic Acid H <sup>+</sup> (8 %), 300 x 7.80 mm
Oven temperature	75°C
Mobile phase	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.0075 M
Flow	0.6 mL min <sup>-1</sup>
Detector	UV (210 nm) – Refractometric detector

<sup>a</sup>df: Dilution factor

The optimization of the solid phase extraction protocol using strong anion exchange phases coincides with published works, which have been used to determine organic acids and sugars in fruit juice matrix [23].

### 1.2 Analytical parameters and quantification

The calibration curves were built based on standards of the compounds, injecting 9 points in triplicate. In figure 4, the chromatograms of 6 standard compounds are shown in both detectors (UV/RID). Moreover, due to absence of reference material for these samples, recoveries were determined based on standard addition (50 mg L<sup>-1</sup>). For liquid samples of HTC, recovery was evaluated for levoglucosan, acetic and formic acids only. For aqueous bio-oil samples recovery was evaluated for the six aforementioned compounds. Each spike was processed in triplicate by the overall method, including the SPE pre-treatment and HPLC analysis. Each injection was carried out in triplicate, in tables 2 and 3, the results are shown.

The detection limit (LD) and quantification limit (LQ) were determined using the method described by Miller et al [33]. The determined detection limits were lower in the UV detector. However, this analytical method was developed for the determination of compounds found in a high percentage in the samples studied. If relevant, the working range offered by this method avoids dilution of the sample, which added uncertainty to the analytical result. The working range of this method is to 400 to 500 mg L<sup>-1</sup> for the compounds studied (tables 2 and 3).

**Table 2:** Analytical parameter by UV detector.

	Formic acid	Acetic acid	Acetol
Calibration curve	y=970.33x - 3302.9	y=575.22x - 1473.5	y=97.0x - 453.2
R <sup>2</sup>	0.9997	0.9996	0.9997
<sup>a</sup> LD (mg L <sup>-1</sup> )	5.3	2.5	3.7
<sup>b</sup> LQ (mg L <sup>-1</sup> )	17.6	8.3	12.3
Linear range (mg L <sup>-1</sup> )	LQ-500	LQ-500	LQ-500
<sup>c</sup> Recovery liquid HTC (%)	92	89	-
<sup>c</sup> Recovery aqueous bio-oil (%)	91	95	101

Intermediate precision of liquid HTC (% RSD)	3.6	2.9	-
Intermediate precision of aqueous bio-oil (% RSD)	4.4	3.3	4.9

<sup>a</sup> LD: detection limit.  
<sup>b</sup> LQ: quantification limit.  
<sup>c</sup> Added (50 mg L<sup>-1</sup>) of each compounds.

**Table 3:** Analytical parameter by refractometric detector

	Glyoxal	Levogluconan	Glycolaldehyde
Calibration curve	$y=173.1x - 326.9$	$y=84.5x - 120.3$	$y=74.5x - 1101.7$
R <sup>2</sup>	0.9994	0.9992	0.9981
<sup>a</sup> LD (mg L <sup>-1</sup> )	2.2	1.8	0.9
<sup>b</sup> LQ (mg L <sup>-1</sup> )	7.3	6.0	3.0
Linear range (mg L <sup>-1</sup> )	LQ-500	LQ-400	LQ-400
<sup>c</sup> Recovery liquids HTC (%)	-	91	-
<sup>c</sup> Recovery aqueous Bio-oil (%)	93	90	88
Intermediate precision of liquids HTC (% RSD)	-	3.1	-
Intermediate precision of aqueous Bio-oil (% RSD)	5.2	4.5	6.7

<sup>a</sup> LD: detection limit.  
<sup>b</sup> LQ: quantification limit.  
<sup>c</sup> Added (50 mg L<sup>-1</sup>) of each compounds.

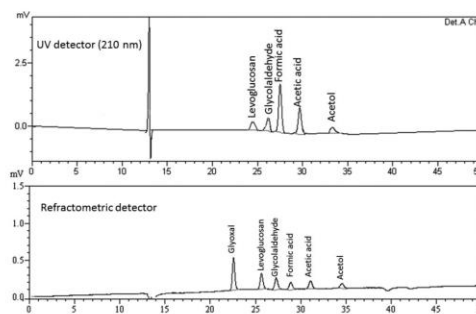
To determine intermediate precision, 2 samples (of each process) were analyzed on different days and with different analysts in triplicate (n = 6). The determined analytical parameters are shown in tables 2 and 3 for UV and the refractometer, respectively. Intermediate precision is a little higher in the samples of aqueous bio-oil; this finding can be attributed to the fact that these samples exhibit more compounds than liquid HTC samples.

The importance of a correct validation for this analytical method in complex matrices is based on the high variability that is found in several publications. The work involved in this problem is the Round robin test that was performed in 2005 [34]. In this test, the results obtained by different laboratories were compared. The most extreme cases are in the determination of organic acids (e.g., formic acid, results of the same sample find between 0.3-9.5 wt%); these were performed by GC derivatization with benzylic esters (prior to analysis), GC without derivatization and HPLC. In all these methods, no validation parameters are presented.

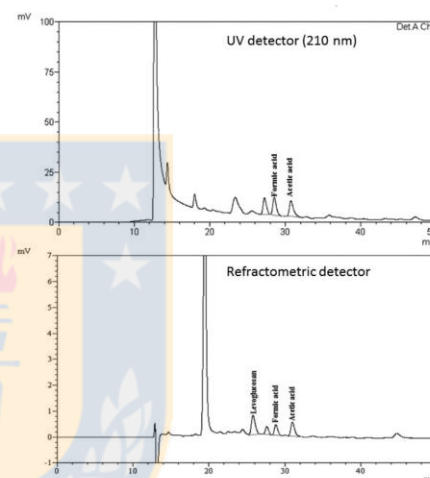
**Table 4** Quantification of acetic acid, formic acid, and levogluconan in liquids HTC by-product by HPLC-UV/RID.

Samples	Formic acid wt%	Acetic acidwt%	Levogluconan wt%
<sup>b</sup> HTC-1	2.7 ± 0.1	0.26 ± 0.02	<sup>d</sup> ND
<sup>c</sup> HTC-2	0.14 ± 0.02	0.33 ± 0.03	ND
<sup>a</sup> HTC-3	0.35 ± 0.02	1.5 ± 0.1	0.10 ± 0.01

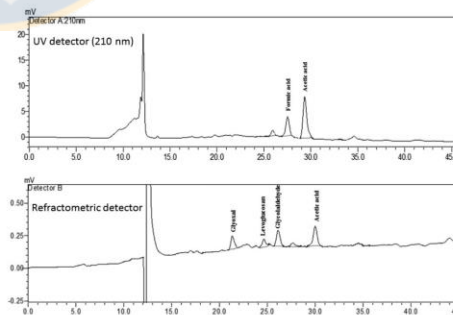
<sup>a</sup> wt% : weight/weight percent in liquid sample.  
<sup>b</sup> The liquids samples (HTC process) were produced at 255°C for 1 hour, immediate analysis.  
<sup>c</sup> The liquids samples (HTC process) were produced at 255°C for 1 hour, analysis carried out after a month of the process.  
<sup>d</sup> The liquid sample (HTC process) were produced at 275°C for 0.5 hour, immediate analysis.  
<sup>e</sup> ND: no detected.



**Figure 4:** HPLC-UV/RID chromatograms of six standard compounds of 50 mg L<sup>-1</sup> each.



**Figure 5:** HPLC-UV/RID chromatogram in liquid HTC (by-product) sample.



**Figure 6:** HPLC-UV/RID chromatogram in aqueous bio-oil sample.

For this study, different liquid HTC processes and aqueous bio-oil samples were analyzed. Figures 5 and 6 present a typical chromatogram of a liquid HTC (by-product) and an aqueous bio-oil sample by both detectors, respectively, and tables 4 and 5 summarize the samples analyzed with the developed method.

**Table 5** Quantification of organic compounds in aqueous bio-oil samples by HPLC-UV/RID.

Samples	Formic acid wt%	Acetic acid wt%	Glicolaldehyde wt%	Levogluconan wt%	Acetol wt%	Glyoxal wt%
<sup>b</sup> MP-1	1.2 ± 0.1	4.6 ± 0.2	3.5 ± 0.3	2.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.52 ± 0.02
<sup>c</sup> EXT-1	0.50 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.18 ± 0.03	ND <sup>e</sup>
<sup>c</sup> EXT-2	0.44 ± 0.02	0.72 ± 0.02	0.66 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.30 ± 0.03	ND
<sup>c</sup> EXT-3	1.2 ± 0.1	0.71 ± 0.02	ND	0.14 ± 0.01	ND	ND
<sup>c</sup> EXT-4	1.4 ± 0.1	0.76 ± 0.02	ND	0.13 ± 0.01	ND	ND

<sup>a</sup>wt.% : wt.% based on wet liquid.

<sup>b</sup>Bio-oil aqueous phase (extraction with anhydrous bio-oil/butyl acetate/water, 1/0.8/2).

<sup>c</sup>Testing with 35.6 gr de aqueous bio-oil (MP-1)+ 114.4 gr of deionized water.

<sup>d</sup>Testing with 35.6 gr de aqueous bio-oil (MP-1)+ 114.4 gr of deionized water + catalyst (HPA: H<sub>2</sub>PV<sub>2</sub>Mo<sub>10</sub>O<sub>40</sub>).

<sup>e</sup>No detected.

Previous studies have reported concentrations of acetic acid in liquid HTC by-product ranging from 0.1 to 0.3 % in pine wood [35], similar to those proposed by this method. Moreover, for the aqueous phase of bio-oil, the results obtained with this method are in the range determined by other studies, for example levogluconan by HPTLC (1–2 wt%) [36], and acetic acid and glycolaldehyde (hydroxyacetaldehyde) by GC-FID/MS (2.5–8.5 wt% and 7.3–11.3 wt% dry basis, respectively) [37]. Is important to mention, in this last work, formic acid cannot be determined by GC-MS/FID [37].

Regarding the process of HTC, the first tests were performed at a different temperature and time. However, the most significant change is with respect to the stability of the sample; it should be analyzed the same day of the process. Furthermore, the reactor for the HTC process requires a short time for use, and for this reason, more trials are needed to optimize the operation conditions.

In contrast to the HTC process, operating conditions for fast pyrolysis are studied. For this reason, efforts are focused on obtaining compounds of interest. Preliminary studies of the aqueous bio-oil samples indicate that the use of the catalyst may be useful for extraction of formic acid, acetic acid and levogluconan.

#### 4. CONCLUSIONS

The quantitative determination of organic compounds that are suitable for use as raw materials in the chemical industry could be performed using HPLC-UV/RID, preceded by a solid phase extraction using a MAX column. The solid phase extraction is necessary because it delivers cleaner chromatograms, improving the resolution of the previously mentioned compounds. The developed method shows a good resolution and recovery (between 88–101 %). Additionally, the method might be used in the pyrolysis of liquids from different types of forest biomass.

This method allows a fast and accurate identification of compounds in complex liquids from liquid HTC (by-product) and aqueous bio-oil phases using readily accessible equipment.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the financial support received from CONICYT/FONDECYT Chile Grant N° 11121259; FONDEF IDeA/CHILE CA12 I 10375; CA12i10339, and Proyecto Basal PFB-27.

#### REFERENCES

- M. Guiotokua, C.R. Rambob, F.A. Hansela, W.L.E. Magalhães, D. Hotzab, Microwave-assisted hydrothermal carbonization of lignocellulosic materials, *Mater. Lett.*, 63 (2009) 2707-2709.
- H. Kambo, A. Dutta, Strength, storage, and combustion characteristics of densified lignocellulosic biomass produced via torrefaction and hydrothermal carbonization, *Appl. Energ.*, 135 (2014) 182-191.
- Z. Liu, F.S. Zhang, J. Wu, Characterization and application of chars produced from pinewood pyrolysis and hydrothermal treatment, *Fuel*, 89 (2010) 510-514.
- J. Libra, K. Ro, C. Kammann, A. Funke, N. Berge, Y. Neubauer, M.M. Titirici, C. Fühner, O. Bens, J. Kern and K. Emmerich, Hydrothermal carbonization of biomass residuals: a comparative review of the chemistry, processes and applications of wet and dry pyrolysis, *Biofuels* 2 (2011) 89-124.
- A. Funke, F. Ziegler, Hydrothermal carbonization of biomass: A summary and discussion of chemical mechanisms for process engineering, *Biofuels*, *Bioprod. Bioref.*, 4 (2010), 160–177.
- A. Kruse, A. Funke, M.M. Titirici, Hydrothermal conversion of biomass to fuels and energetic materials, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 17 (2003) 515–521.
- S. Hoekman, A. Broch, C. Robbins, Hydrothermal Carbonization (HTC) of Lignocellulosic Biomass, *Energ. Fuel.*, 25 (2011) 1802–1810.
- Z. Qi, C. Jie, W. Tiejun, X. Ying, Review of biomass pyrolysis oil properties and upgrading research *Energy Convers. Manage.* 48 (2007) 87-92.
- J.P. Diebold, National renewable energy laboratory, NREL/SR-570-27613, 2000.
- D. Mohan, C.U. Pittman, P.H. Steele, Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review, *Energ. Fuel.*, 203 (2006) 848–889.
- A. Bridgwater, S. Czernik, J. Diebold, D. Meier, A. Oasmaa, C. Peacocke, J. Piskorz, D. Radlein, *Fast Pyrolysis of Biomass: A Handbook*, Aston University, Birmingham, 2008.
- A.A. Boateng, C.A. Mullen, Fast pyrolysis of biomass thermally pretreated by torrefaction, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 100 (2013) 95-102.
- M. Asadullah, A. Mohammad, N. Suhada, N. Hanina, M. Ilmam, A. Azdarpour, Optimization of palm kernel shell torrefaction to produce energy densified bio-coal, *Energ. Convers. Manage.*, 88 (2014) 1086–1093.
- S. Ren, H. Lei, L. Wanga, Q. Bu, S. Chen, J. Wua, J. Julson, R. Ruan, The effects of torrefaction on compositions of bio-oil and syngas from biomass pyrolysis by microwave heating, *Bioresour. Technol.*, 135 (2013) 659–664.
- M. Pelaez-Samaniego, V. Yadamac, M. Garcia-Pereza, E. Lowelle, A.G. McDonald, Effect of temperature during wood torrefaction on the formation of lignin liquid intermediates, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 109 (2014) 222–233.
- Z. Yang, M. Sarkar, A. Kumar, J. Tumuluru, R.L. Huhnke, Effects of torrefaction and densification on switchgrass pyrolysis products, *Bioresour. Technol.*, 174 (2014) 266-273.
- Y. Choia, P. Johnston, R. Brown, B. Shanksa, K-H. Lee, Detailed characterization of red oak-derived pyrolysis oil: Integrated use of GC, HPLC, IC, GPC and Karl-Fischer, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 110 (2014) 147–154.
- Satyanarayan Naik, Vaibhav V. Goud, Prasant K. Rout, Ajay K. Dalai, Supercritical CO<sub>2</sub> fractionation of bio-oil produced from wheat-hemlock biomass, *Bioresour. Technol.*, 101 (2010) 7605–7613.
- C. Mullen, A. Boateng, Chemical Composition of Bio-oils Produced by Fast Pyrolysis of Two Energy Crops, *Energ. Fuel.*, 22 (2008) 2104–2109.
- A. Zotou, Z. Loukou, O. Karava, Method Development for the Determination of Seven Organic Acids in Wines by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, *Chromatographia*, 60 (2004)

- 39–44.
21. S. Deshmukh, A. Frolov, A. Marcillo, C. Birkemeyer, Selective removal of phosphate for analysis of organic acids in complex samples, *J. Chromatogr. A*, 1388 (2015) 1–8.
  22. C. Rodrigues, L. Marta, R. Maia, M. Miranda, M. Ribeirinho, C. Máguas, Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC, *J. Food. Compos. Anal.*, 20 (2007) 440–448.
  23. F. Chinnici, U. Spinabelli, C. Riponi, A. Amati, Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography, *J. Food. Compos. Anal.*, 18 (2005) 121–130.
  24. J. Ma, B. Zhang, Y. Wang, X. Hou, Comparison of Six Sample Preparation Methods for Analysis of Food Additives in Milk Powder, *Food Anal. Method.*, 7 (2014) 1345–1352.
  25. D. Han, M. Tian, D.W. Park, K.H. Row, Determination of organic acids in *Salicornia herbacea* by solid-phase extraction combined with liquid chromatography, *Nat. Prod. Commun.*, 8 (2013) 203–206.
  26. G. Xiang, L. Yang, X. Zhang, H. Yang, Z. Ren, M. Miao, A Comparison of Three Methods of Extraction for the Determination of Polyphenols and Organic Acids in Tobacco by UPLC–MS–MS, *Chromatographia*, 70 (2009) 1007–1010.
  27. K. Hrobonova, J. Lehotay, J. Cizmarik, Determination of Organic Acids in Propolis by HPLC Using Two Columns with an On-Line SPE System, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 32 (2009) 125–135.
  28. W. Xu, L. Liang, M. Zhu, Determination of Sugars in Molasses by HPLC Following Solid-Phase Extraction, *Int. J. Food Prop.*, 18 (2015) 547–557.
  29. A. de Villiers, F. Lynen, A. Crouch, P. Sandra, Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine, *Chromatographia*, 59 (2004) 403–409.
  30. M. Castellari, E. Sartini, U. Spinabelli, C. Riponi, S. Galassi, Determination of Carboxylic Acids, Carbohydrates, Glycerol, Ethanol, and 5-HMF in Beer by High-Performance Liquid Chromatography and UV–Refractive Index Double Detection, *J. Chromatogr. Sci.*, 39 (2001) 235–8.
  31. J. Arsenault, *Beginner's Guide to SPE*, Waters Corporation, (2012).
  32. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, [www.aoac.org](http://www.aoac.org), 2012, pp. 18–19.
  33. J. Miller, J. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, sixth ed, Calibration methods in instrumental analysis: regression and correlation, Pearson Education Limited, Edinburgh, 2010, pp. 110–150.
  34. A. Oasmaa, D. Meier, Norms and standards for fast pyrolysis liquids I. Round robin test, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 73 (2005) 323–334.
  35. R. Becker, U. Dorgerloh, E. Paulke, J. Mumme, I. Nehls, Hydrothermal Carbonization of Biomass: Major Organic Components of the Aqueous Phase, *Chem. Eng. Technol.* 37 (2014) 511–518.
  36. Tessini, C, M. Vega, N. Müller, L. Bustamante, D. von Baer, A. Berg, C. Mardones, High performance thin layer chromatography determination of cellobiosan and levoglucosan in bio-oil obtained by fast pyrolysis of sawdust, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 3811–3815.
  37. A. Azeez, D. Meier, J. Odermatt, T. Willner, Fast Pyrolysis of African and European Lignocellulosic Biomasses Using Py-GC/MS and Fluidized Bed Reactor, *Energ. Fuel.*, 2010, 24, 2078–2085



## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se ha demostrado que el tanino insoluble de corteza de *Pinus radiata* es capaz de amplificar la reactividad de una reacción de Fenton y Fenton-like en fase heterogénea. El incremento de la reactividad depende del pH al cual ocurre la reacción. A valores de pH superiores a 5.00, el tanino actúa principalmente como antioxidante debido a la formación de *bis* y *tris*-complejos con Fe(III), los que retienen al hierro desde los sistemas de reacción. Los complejos Fe(III)-tanino, formados a pH mayor a 5.00, poseen una mínima capacidad de reducir Fe(III). Sin embargo, a pH inferiores a 5.00, el sistema Fenton heterogéneo conducido por tanino insoluble presenta mayor capacidad de reducción de Fe(III) que el sistema conducido por catequina en fase homogénea.

Por otro lado, se ha demostrado el aumento en la eficiencia en la degradación de atrazina en la reacción de Fenton cuando es conducida por tanino insoluble en fase heterogénea frente a los sistemas Fenton y Fenton-like convencionales y el sistema conducido por catequina en fase homogénea. Además, al evaluar los productos de degradación por GC-MS posterior a la degradación, no hay evidencias de descomposición del tanino y liberación de compuestos fenólicos al ambiente.

La mayor eficiencia en la producción de radicales  $\cdot\text{OH}$  ha sido evaluada por dos metodologías analíticas, en las cuales el sistema conducido por tanino insoluble a pH 3.40 fue el que presentó mayor rendimiento.

De este modo, la fracción insoluble de taninos condensados de corteza de *Pinus radiata* posee un doble efecto: mantiene los grupos fenólicos en fase sólida y promueve la reacción de Fenton. Lo anterior, es prometedor desde el punto de vista ambiental, debido a que el tanino proviene de la corteza que es un residuo forestal y que podría servir de soporte de bajo costo para la reacción de Fenton además de amplificarla, lo que podría permitir el uso de la reacción de Fenton en la degradación de contaminantes en efluentes, sin la liberación de compuestos fenólicos al ambiente.



## REFERENCIAS

1. INFOR. *Update Availability of Wood Waste Generated by the Primary Timber Industry.*; 2012.
2. Haig IT, Teesdale L V., Briegleb PA, Payne BH, Haertel MH. *Forest Resources of Chile as a Basis for Industrial Expansion.*; 1946.
3. CNE. *Non-Conventional Renewable Energy in Chile Project.*; 2008.
4. Austin D. *Bark. The Formation, Characteristics, and Uses of Bark around the World.*; 1993.
5. Berg A. Bio-Chemicals and standarized Solid Fuels from Radiata Pine Bark. In: Berlin, Germany; 2007.
6. R. Soto. Aislamiento, purificación, caracterización y modificación química de los taninos aislados de corteza de Pinus radiata D. 2001.
7. Salema AA, Ani FN. Pyrolysis of oil palm empty fruit bunch biomass pellets using multimode microwave irradiation. *Bioresour Technol.* 2012;125:102-107. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.002.
8. Amen-Chen C, Riedl B, Wang XM, Roy C. Softwood bark pyrolysis oil-PF resols - Part I. Resin synthesis and OSB mechanical properties. *Holzforschung.* 2002;56(2):167-175. doi:10.1515/HF.2002.028.
9. Case PA, Bizama C, Segura C, Clayton Wheeler M, Berg A, Desisto WJ. Pyrolysis of pre-treated tannins obtained from radiata pine bark. *J Anal Appl Pyrolysis.* 2014;107:250-255. doi:10.1016/j.jaap.2014.03.009.
10. Ohara S, Yasuta Y, Ohi H. Structure Elucidation of Condensed Tannins from Barks by Pyrolysis/ Gas Chromatography. *Holzforschung.* 2003;57(2):145-149. doi:10.1515/HF.2003.023.
11. Galletti GC, Reeves JB. Pyrolysis/Gas Chromatography/Ion-trap Detection of Polyphenols (Vegetable Tannins): Preliminary Results. *Org Mass Spectrom.* 1992;27(September 1991):226-230. doi:10.1002/oms.1210270313.
12. Kaal J, Nierop KGJ, Kraal P, Preston CM. A first step towards identification of tannin-derived black carbon: Conventional pyrolysis (Py-GC-MS) and thermally assisted hydrolysis and methylation (THM-GC-MS) of charred condensed tannins. *Org Geochem.* 2012;47:99-108. doi:10.1016/j.orggeochem.2012.03.009.
13. Gaugler M, Grigsby WJ. Thermal Degradation of Condensed Tannins from Radiata Pine Bark. *J Wood Chem Technol.* 2009;29(4):305-321. doi:10.1080/02773810903165671.
14. Pizzi A, Stephanou A. Comparative C13 NMR study of polyflavonoid tannin extracts for phenolic polycondensates. *J Appl Polym Sci.* 1993;50(12):2105-2113. doi:10.1002/app.1993.070501209.
15. Chen F, Ma W, He J, Zhao J. Fenton degradation of malachite green catalyzed by aromatic additives. *J Phys Chem A.* 2002;106(41):9485-9490. doi:10.1021/jp0144350.
16. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc.* 1894;65:899-910.

doi:10.1039/ct8946500899.

17. Haber F, Weiss J. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. *Proc R Soc A Math Phys Eng Sci.* 1934;147(861):332-351. doi:10.1098/rspa.1934.0221.
18. Koppenol WH, Butler J, Leeuwen JW van. The Haber-Weiss cycle. *Photochem Photobiol.* 1978;28(4-5):655-658.
19. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000;149(1):43-50. doi:10.1016/S0300-483X(00)00231-6.
20. Brillas E, Sirés I, Oturan M a. Electro-Fenton process and related electrochemical technologies based on Fenton's reaction chemistry. *Chem Rev.* 2009;109(12):6570-6631. doi:10.1021/cr900136g.
21. Bali U, Karagözoğlu B. Decolorization of Remazol-Turquoise Blue G-133 and other dyes by Cu(II)/pyridine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Dye Pigment.* 2007;73(2):133-140. doi:10.1016/j.dyepig.2005.11.003.
22. Li Y, Zhang P, Wu M, et al. An effective oxidation of 2,3,6-trimethylphenol to 2,3,5-trimethylbenzoquinone using Fenton's reagent under mild conditions. *Chem Eng J.* 2009;146(2):270-274. doi:10.1016/j.cej.2008.09.031.
23. Kremer ML. The Fenton Reaction. Dependence of the Rate on pH. *J Phys Chem A.* 2003;107(11):1734-1741. doi:10.1021/jp020654p.
24. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep.* 2001;6(4):229-234. doi:10.1179/135100001101536373.
25. Ferradini C, Foos J, Jouee C, Pucheault J. The reaction between superoxide anion and hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol.* 1978;28:697-700.
26. McClune GJ, Fee JA. Biophysics Research Division and Department of Biological Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109, USA. 1976;67(3).
27. Rigo a, Viglino P, Bonori M, Cocco D, Calabrese L, Rotilio G. The binding of copper ions to copper-free bovine superoxide dismutase. Kinetic aspects. *Biochem J.* 1978;169(2):277-280. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1184164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
28. Buda F, Ensing B, Gribnau MCM, Baerends EJ. DFT study of the active intermediate in the Fenton reaction. *Chem - A Eur J.* 2001;7(13):2775-2783. doi:10.1002/1521-3765(20010702)7:13<2775::AID-CHEM2775>3.0.CO;2-6.
29. Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G. The Fenton reagents. *Free Radic Biol Med.* 1993;15(4):435-445. doi:10.1016/0891-5849(93)90043-T.
30. Sawyer DT, Sobkowiak A, Matsushita T. Metal [ML<sub>x</sub>; M = Fe, Cu, Co, Mn]/Hydroperoxide-Induced Activation of Dioxygen for the Oxygenation of Hydrocarbons: Oxygenated Fenton Chemistry. *Acc Chem Res.* 1996;29(9):409-416. doi:10.1021/ar950031c.
31. Shen X, Tian J, Li J, Li X, Chen Y. Formation of the excited ferryl species following fenton reaction. *Free Radic Biol Med.* 1992;13(5):585-592. doi:10.1016/0891-5849(92)90152-7.
32. Walling C. Intermediates in the Reactions of Fenton Type Reagents. *Acc Chem Res.*

- 1998;31(4):155-157. doi:10.1021/ar9700567.
33. Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res.* 1996;145(5):523-531. doi:10.2307/3579270.
  34. Sawyer DT. Metal [Fe(II), Cu(I), Co(II), Mn(III)] hydroperoxide-induced activation of dioxygen (center dot O-2 center dot) for the ketonization of hydrocarbons: oxygenated Fenton Chemistry. *Coord Chem Rev.* 1997;165:297-313. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545(97)90161-2.
  35. Gogate PR, Pandit AB. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: Oxidation technologies at ambient conditions. *Adv Environ Res.* 2004;8(3-4):501-551. doi:10.1016/S1093-0191(03)00032-7.
  36. Huston PL, Pignatello JJ. Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction. *Water Res.* 1999;33(5):1238-1246. doi:10.1016/S0043-1354(98)00330-3.
  37. Engwall MA, Pignatello JJ, Grasso D. Degradation and detoxification of the wood preservatives creosote and pentachlorophenol in water by the photo-Fenton reaction. *Water Res.* 1999;33(5):1151-1158. doi:10.1016/S0043-1354(98)00323-6.
  38. Ensing B, Buda F, Baerends EJ. Fenton-like chemistry in water: Oxidation catalysis by Fe(III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Phys Chem A.* 2003;107(30):5722-5731. doi:10.1021/jp0267149.
  39. Neyens E, Baeyens J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J Hazard Mater.* 2003;98(1-3):33-50. doi:10.1016/S0304-3894(02)00282-0.
  40. Aruoma OI. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *Jaocs.* 1998;75(2):199-212. doi:10.1007/s11746-998-0032-9.
  41. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance? *Hypertension.* 2004;44(3):248-252. doi:10.1161/01.HYP.0000138070.47616.9d.
  42. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992;59:1609-1623. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.
  43. Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl Chem.* 2007;79(12):2325-2338. doi:10.1351/pac200779122325.
  44. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas a J, Agarwal a. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod.* 1999;14(11):2801-2807. doi:10.1093/humrep/14.11.2801.
  45. Ko EY, Sabanegh ES, Agarwal A. Male infertility testing: Reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril.* 2014;102(6):1518-1527. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.10.020.
  46. Touati D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys.* 2000;373(1):1-6. doi:10.1006/abbi.1999.1518.
  47. Thomas C, Mackey MM, Diaz A a, Cox DP. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: Implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep.* 2009;14(3):102-108.

doi:10.1179/135100009X392566.

48. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
49. Kanti Das T, Wati MR, Fatima-Shad K. Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease. *Arch Neurosci.* 2014;2(2):1-8. doi:10.5812/archneurosci.20078.
50. Rodríguez J, Parra C, Contreras D, Freer J, Baeza J. Dihydroxybenzenes : driven Fenton reactions. 1999;(lii):251-256.
51. Cavalieri EL. Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. *Carcinogenesis.* 2002;23(6):1071-1077. doi:10.1093/carcin/23.6.1071.
52. Nardini M, Pisu P, Gentili V, et al. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(9):1098-1105. doi:10.1016/S0891-5849(98)00180-4.
53. Krishna CM, Liebmann JE, Kaufman D, et al. The catecholic metal sequestering agent 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate confers protection against oxidative cell damage . *ArchBiochemBiophys.* 1992;294 (0003-9861 (Print)):98-106. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1312813](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1312813).
54. Mohanraj P, Merola a J, Wright VP, Clanton TL. Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. *J Appl Physiol.* 1998;84:1960-1966.
55. Edoardo Mentasti and Ezio Pelizzetti. Reactions between Iron(III) and Catechol (o-Dihydroxybenzene). Part I. Equilibria and Kinetics of Complex Formation in Aqueous Acid Solution. *J Chem Soc Dalt Trans.* 1973:2605-2608. doi:10.1039/DT9730002605.
56. Hamilton GA, Friedman JP, Campbell PM. The hydroxylation of anisole by hydrogen peroxide in the presence of catalytic amounts of ferric ion and catechol. Scope, requirements, and kinetic studies. *J Am Chem Soc.* 1966;88(22):5266-5268. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0542364354&partnerID=40&md5=532662a3a9af1612c6f59b5bd49e99a8>.
57. Uchimiya M, Stone AT. Redox reactions between iron and quinones: Thermodynamic constraints. *Geochim Cosmochim Acta.* 2006;70(6):1388-1401. doi:10.1016/j.gca.2005.11.020.
58. Mentasti E, Pelizzetti E, Giraudi G. Redox Reaction of 1, 2-Dihydroxybenzene Perchlorate Media . Kinetics and Mechanism with Mn ( II ) in Aqueous. 1975;12:61-65.
59. Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact.* 1994;91(2-3):133-140. doi:10.1016/0009-2797(94)90033-7.
60. Uchimiya M, Stone AT. Aqueous oxidation of substituted dihydroxybenzenes by substituted benzoquinones. *Environ Sci Technol.* 2006;40(11):3515-3521. doi:10.1021/es052578k.
61. Barclay LRC, Edwards CE, Vinqvist MR. Media Effects on Antioxidant Activities of Phenols

- and Catechols. *J Am Chem Soc.* 1999;121(26):6226-6231. doi:10.1021/ja990878u.
62. Silva F a, Borges F, Guimarães C, Lima JL, Matos C, Reis S. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *J Agric Food Chem.* 2000;48(Figure 1):2122-2126.
  63. Contreras D, Rodríguez J, Freer J, Schwederski B, Kaim W. Enhanced hydroxyl radical production by dihydroxybenzene-driven Fenton reactions: implications for wood biodegradation. *J Biol Inorg Chem.* 2007;12(7):1055-1061. doi:10.1007/s00775-007-0274-2.
  64. Mentasti E, Pelizzetti E, Saini G. Reactions between iron(III) and catechol (o-dihydroxybenzene). Part II. Equilibria and kinetics of the redox reaction in aqueous acid solution. *J Chem Soc Dalt Trans.* 1973;(23):2609. doi:10.1039/dt9730002609.
  65. Hynes MJ, O'Coinceanainn M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *J Inorg Biochem.* 2004;98(8):1457-1464. doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.05.009.
  66. Jordan RB, Xu JH. Substitution and oxidation kinetics in substituted catechol - iron(III) systems. *Pure Appl Chem.* 1988;60(8):1205-1208. doi:10.1351/pac198860081205.
  67. Hider RC, Liu ZD, Khodr HH. Metal chelation of polyphenols. *Methods Enzymol.* 2001;335(1993):190-203. doi:10.1016/S0076-6879(01)35243-6.
  68. Kristinová V, Mozuraityte R, Storrø I, Rustad T. Antioxidant activity of phenolic acids in lipid oxidation catalyzed by different prooxidants. *J Agric Food Chem.* 2009;57(21):10377-10385. doi:10.1021/jf901072t.
  69. Ma J, Song W, Chen C, Ma W, Zhao J, Tang Y. Fenton degradation of organic compounds promoted by dyes under visible irradiation. *Environ Sci Technol.* 2005;39(15):5810-5815. doi:10.1021/es050001x.
  70. Ryan P, Hynes MJ. The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCG and ECG with iron(III). *J Inorg Biochem.* 2007;101(4):585-593. doi:10.1016/j.jinorgbio.2006.12.001.
  71. MJ Hynes MC. The kinetics and mechanisms of the reactions of aluminium(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and adrenaline. *J Inorg Biochem.* 2001;84(1-2):1-12. doi:10.1016/S0162-0134(00)00232-4.
  72. Babuponnusami A, Muthukumar K. Degradation of Phenol in Aqueous Solution by Fenton, Sono-Fenton and Sono-photo-Fenton Methods. *Clean - Soil, Air, Water.* 2011;39(2):142-147. doi:10.1002/clen.201000072.
  73. Prousek J, Palackova E, Priesolova S, Markova L, Alevova A. Fenton- and Fenton-Like AOPs for Wastewater Treatment: From Laboratory-To-Plant-Scale Application. *Sep Sci Technol.* 2007;42:1505-1520. doi:http://dx.doi.org/10.1080/01496390701290151.
  74. Rodríguez J, Contreras D, Oviedo C, Freer J, Baeza J. Degradation of recalcitrant compounds by catechol-driven Fenton reaction. :81-84.
  75. Rodríguez J, Contreras D, Parra C, Freer J, Baeza J, Durán N. Pulp mill effluent treatment by Fenton-type reactions catalyzed by iron complexes. In: *Water Science and Technology.* Vol 40. ; 1999:351-355. doi:10.1016/S0273-1223(99)00738-6.

76. Arantes V, Milagres AMF. Degradation of cellulosic and hemicellulosic substrates using a chelator-mediated Fenton reaction. *J Chem Technol Biotechnol*. 2006;81(3):413-419. doi:10.1002/jctb.1417.
77. D Procházková, I Boušová NW. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011;82(4):513-523. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018.
78. Domènech X, Jardim WF, Litter MI. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. *Elimin Contam por Fotocatálisis Heterogénea*. 2001:3-26.
79. Pupo Nogueira RF, Trovó AG, Da Silva MRA, Villa RD, De Oliveira MC. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e foto-Fenton. *Quim Nova*. 2007;30(2):400-408. doi:10.1590/S0100-40422007000200030.
80. Pignatello JJ, Oliveros E, MacKay A. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2006;36(1):1-84. doi:10.1080/10643380500326564.
81. Sarria V, Péringier P, Cáceres J, Blanco J, Malato S, Pulgarin C. Solar degradation of 5-amino-6-methyl-2-benzimidazolone by TiO<sub>2</sub> and iron(III) catalyst with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> as electron acceptors. *Energy*. 2004;29(5-6):853-860. doi:10.1016/S0360-5442(03)00190-7.
82. Kušić H, Koprivanac N, Božić AL, Selanec I. Photo-assisted Fenton type processes for the degradation of phenol: A kinetic study. *J Hazard Mater*. 2006;136(3):632-644. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.12.046.
83. Kavitha V, Palanivelu K. The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton processes for the degradation of phenol. *Chemosphere*. 2004;55(9):1235-1243. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.12.022.
84. Vogelpohl A. Applications of AOPs in wastewater treatment. In: *Water Science and Technology*. Vol 55. ; 2007:207-211. doi:10.2166/wst.2007.408.
85. Martínez F, Calleja G, Melero JA, Molina R. Heterogeneous photo-Fenton degradation of phenolic aqueous solutions over iron-containing SBA-15 catalyst. *Appl Catal B Environ*. 2005;60(3-4):181-190. doi:10.1016/j.apcatb.2005.03.004.
86. Oller I, Gernjak W, Maldonado MI, Pérez-Estrada LA, Sánchez-Pérez JA, Malato S. Solar photocatalytic degradation of some hazardous water-soluble pesticides at pilot-plant scale. *J Hazard Mater*. 2006;138(3):507-517. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.05.075.
87. Pérez-Estrada LA, Malato S, Gernjak W, et al. Photo-fenton degradation of diclofenac: Identification of main intermediates and degradation pathway. *Environ Sci Technol*. 2005;39(21):8300-8306. doi:10.1021/es050794n.
88. De Luna MDG, Veciana ML, Su CC, Lu MC. Acetaminophen degradation by electro-Fenton and photoelectro-Fenton using a double cathode electrochemical cell. *J Hazard Mater*. 2012;217-218:200-207. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.03.018.
89. Bae S, Kim D, Lee W. Degradation of diclofenac by pyrite catalyzed Fenton oxidation. *Appl Catal B Environ*. 2013;134-135:93-102. doi:10.1016/j.apcatb.2012.12.031.
90. Ravina M, Campanella L, Kiwi J. Accelerated mineralization of the drug Diclofenac via Fenton reactions in a concentric photo-reactor. *Water Res*. 2002;36(14):3553-3560.

doi:10.1016/S0043-1354(02)00075-1.

91. Lee HJ, Lee H, Lee C. Degradation of diclofenac and carbamazepine by the copper(II)-catalyzed dark and photo-assisted Fenton-like systems. *Chem Eng J*. 2014;245:258-264. doi:10.1016/j.cej.2014.02.037.
92. Coelho A, Castro A V., Dezotti M, Sant'Anna GL. Treatment of petroleum refinery sourwater by advanced oxidation processes. *J Hazard Mater*. 2006;137(1):178-184. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.01.051.
93. Diya'Uddeen BH, Daud WMAW, Abdul Aziz AR. Treatment technologies for petroleum refinery effluents: A review. *Process Saf Environ Prot*. 2011;89(2):95-105. doi:10.1016/j.psep.2010.11.003.
94. Youssef NA, Shaban SA, Ibrahim FA, Mahmoud AS. Degradation of methyl orange using Fenton catalytic reaction. *Egypt J Pet*. 2016. doi:10.1016/j.ejpe.2015.07.017.
95. Farré MJ, García-Montaño J, Ruiz N, Muñoz I, Domènech X, Peral J. Life cycle assessment of the removal of Diuron and Linuron herbicides from water using three environmentally friendly technologies. *Environ Technol*. 2007;28(October 2011):819-830. doi:10.1080/09593332808618830.
96. Rahim Pouran S, Abdul Aziz AR, Wan Daud WMA. Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters. *J Ind Eng Chem*. 2015;21:53-69. doi:10.1016/j.jiec.2014.05.005.
97. García J. Combination of Advanced Oxidation Processes and Biological Treatments for Commercial Reactive Azo Dyes Removal. *Appl Catal*. 2007. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3252/jgm1de1.pdf?sequence=1>.
98. Pérez M, Torrades F, Domènech X, Peral J. Fenton and photo-Fenton oxidation of textile effluents. *Water Res*. 2002;36(11):2703-2710. doi:10.1016/S0043-1354(01)00506-1.
99. Kang SF, Liao CH, Chen MC. Pre-oxidation and coagulation of textile wastewater by the Fenton process. *Chemosphere*. 2002;46(6):923-928. doi:10.1016/S0045-6535(01)00159-X.
100. Rodriguez M, Sarria V, Esplugas S, Pulgarin C. Photo-fenton treatment of a biorecalcitrant wastewater generated in textile activities: Biodegradability of the photo-treated solution. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2002;151(1-3):129-135. doi:10.1016/S1010-6030(02)00148-X.
101. San Sebastián Martínez N, Fernández JF, Segura XF, Ferrer AS. Pre-oxidation of an extremely polluted industrial wastewater by the Fenton's reagent. *J Hazard Mater*. 2003;101(3):315-322. doi:10.1016/S0304-3894(03)00207-3.
102. Bautista P, Mohedano AF, Casas JA, Zazo JA, Rodriguez JJ. An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. *J Chem Technol Biotechnol*. 2008;83(10):1323-1338. doi:10.1002/jctb.1988.
103. Klavarioti M, Mantzavinos D, Kassinos D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ Int*. 2009;35(2):402-417. doi:10.1016/j.envint.2008.07.009.
104. Marco-Urrea E, Radjenovi J, Caminal G, Petrovi M, Vicent T, Barcel D. Oxidation of

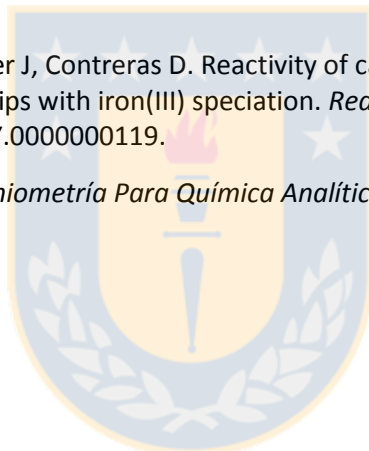
- atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibric acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Res.* 2010;44(2):521-532. doi:10.1016/j.watres.2009.09.049.
105. Forgacs E, Cserh??ti T, Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environ Int.* 2004;30(7):953-971. doi:10.1016/j.envint.2004.02.001.
  106. Barrault J, Abdellaoui M, Bouchoule C, et al. Catalytic wet peroxide oxidation over mixed (Al-Fe) pillared clays. *Appl Catal B Environ.* 2000;27(4). doi:10.1016/S0926-3373(00)00170-3.
  107. Cañizares P, Paz R, Sáez C, Rodrigo MA. Costs of the electrochemical oxidation of wastewaters: A comparison with ozonation and Fenton oxidation processes. *J Environ Manage.* 2009;90(1):410-420. doi:10.1016/j.jenvman.2007.10.010.
  108. Mantzavinos D, Psillakis E. Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *J Chem Technol Biotechnol.* 2004;79(5):431-454. doi:10.1002/jctb.1020.
  109. Zazo JA, Casas JA, Mohedano AF, Rodriguez JJ. Semicontinuous Fenton oxidation of phenol in aqueous solution. A kinetic study. *Water Res.* 2009;43(16):4063-4069. doi:10.1016/j.watres.2009.06.035.
  110. Lucas MS, Dias AA, Sampaio A, Amaral C, Peres JA. Degradation of a textile reactive Azo dye by a combined chemical-biological process: Fenton's reagent-yeast. *Water Res.* 2007;41(5):1103-1109. doi:10.1016/j.watres.2006.12.013.
  111. Carriazo JG, Guelou E, Barrault J, Tatibouët JM, Moreno S. Catalytic wet peroxide oxidation of phenol over Al-Cu or Al-Fe modified clays. *Appl Clay Sci.* 2003;22(6):303-308. doi:10.1016/S0169-1317(03)00124-8.
  112. Bautista P, Mohedano AF, Men??ndez N, Casas JA, Rodriguez JJ. Catalytic wet peroxide oxidation of cosmetic wastewaters with Fe-bearing catalysts. *Catal Today.* 2010;151(1-2):148-152. doi:10.1016/j.cattod.2010.01.023.
  113. Lücking F, Köser H, Jank M, Ritter A. Iron powder, graphite and activated carbon as catalysts for the oxidation of 4-chlorophenol with hydrogen peroxide in aqueous solution. *Water Res.* 1998;32(9):2607-2614. doi:10.1016/S0043-1354(98)00016-5.
  114. Dantas TLP, Mendonça VP, José HJ, Rodrigues AE, Moreira RFPM. Treatment of textile wastewater by heterogeneous Fenton process using a new composite Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/carbon. *Chem Eng J.* 2006;118(1-2):77-82. doi:10.1016/j.cej.2006.01.016.
  115. Liao Q, Sun J, Gao L. Degradation of phenol by heterogeneous Fenton reaction using multi-walled carbon nanotube supported Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2009;345(1-3):95-100. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.04.037.
  116. Cleveland V, Bingham JP, Kan E. Heterogeneous Fenton degradation of bisphenol A by carbon nanotube-supported Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *Sep Purif Technol.* 2014;133:388-395. doi:10.1016/j.seppur.2014.06.061.
  117. Messele SA, Stiber F, Bengoa C, Fortuny A, Fabregat A, Font J. Phenol degradation by heterogeneous Fenton-like reaction using Fe supported over activated carbon. In: *Procedia Engineering.* Vol 42. ; 2012:1373-1377. doi:10.1016/j.proeng.2012.07.529.



118. Valenzuela R, Contreras D, Oviedo C, Freer J, Rodríguez J. Copper catechol-driven Fenton reactions and their potential role in wood degradation. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2008;61(4):345-350. doi:10.1016/j.ibiod.2007.10.006.
119. Contreras D, Freer J, Rodríguez J. Veratryl alcohol degradation by a catechol-driven Fenton reaction as lignin oxidation by brown-rot fungi model. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2006;57(1):63-68. doi:10.1016/j.ibiod.2005.11.003.
120. Monrroy M, Freer J, Baeza J, Rodríguez J. Degradation of tribromophenol by wood-rot fungi and hamilton system. *Electron J Biotechnol*. 2006;9(3):253-257. doi:10.2225/vol9-issue3-26.
121. Oviedo C, Contreras D, Freer J, Rodríguez J. DEGRADATION DEGRADATION OF Fe ( III ) - Fe ( III ) - ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC ACID ( EDTA ) COMPLEX BY A CATECHOL- CATECHOL - DRIVEN FENTON REAC REA CTION DEGRADATION OF Fe ( III ) - ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC ACID ( EDTA ) COMPLEX BY A CATECHOL-DRIVEN. 2003;12(11):1323-1327.
122. Bukowska B, Michałowicz J, Marczak A. The effect of catechol on human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;39(1):187-193. doi:10.1016/j.etap.2014.11.017.
123. Berg A, Olave L, Navarrete P. ( 19 ) United States ( 12 ) Patent Application Publication ( 10 ) Pub . No . : US 2009 / 0077871 A1 PROCESS FOR OBTAINING LOW AND MEDIUM MOLECULAR WEIGHT POLYPHENOLS AND STANDARDIZED SOLID FUEL FROM TREE WOOD OR BARK. 2009;(19).
124. García DE, Fuentealba CA, Salazar JP, Pérez MA, Escobar D, Pizzi A. Mild hydroxypropylation of polyflavonoids obtained under pilot-plant scale. *Ind Crop Prod*. 2016;87:350-362. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.034.
125. Cai ZW, Ramanujam VMS, Giblin DE, Gross ML, Spalding RF. Determination of atrazine in water at low-parts-per-trillion and sub-parts-per-trillion levels by using solid-phase extraction and gas-chromatography high-resolution mass-spectrometry. *Anal Chem*. 1993;65(1):21-26. doi:10.1021/ac00049a006.
126. Johnson WE, Fendinger NJ, Plimmer JR. Solid-phase extraction of pesticides from water: possible interferences from dissolved organic material. *Anal Chem*. 1991;63(15):1510-1513. doi:10.1021/ac00015a003.
127. Quintana J, Martí I, Ventura F. Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. In: *Journal of Chromatography A*. Vol 938. ; 2001:3-13. doi:10.1016/S0021-9673(01)01168-2.
128. Williams VM, Porter LJ, Hemingway RW. Molecular weight profiles of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry*. 1983;22(2):569-572. doi:10.1016/0031-9422(83)83048-9.
129. Tuduce Trăistaru AA, Crina Anca Sandu I, Cristina Timar M, Lucia Dumitrescu G, Sandu I. SEM-EDX, water absorption, and wetting capability studies on evaluation of the influence of nano-zinc oxide as additive to paraloid B72 solutions used for wooden artifacts consolidation. *Microsc Res Tech*. 2013;76(2):209-218. doi:10.1002/jemt.22155.
130. Chen R, Pignatello JJ. Role of quinone intermediates as electron shuttles in fenton and

- photoassisted fenton oxidations of aromatic compounds. *Environ Sci Technol*. 1997;31(8):2399-2406. doi:10.1021/es9610646.
131. Gibbs C. Characterization and Application of FerroZine Iron Reagent as a Ferrous Iron Indicator. *Anal Chem*. 1976;48(8):1197-1201. doi:10.1021/ac50002a034.
  132. Janzen EG, Lai CC, Shetty R V. ELECTRON SPIN RESONANCE SPECTRUM OF A 5-MEMBERED. 21:1201-1204.
  133. Yamazaki I, Piette LH. ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe<sup>2+</sup> ions with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reactive species in oxygen toxicity in biology. *J Biol Chem*. 1990;265(23):13589-13594.
  134. Arnold SM, Hickey WJ, Harris RF. Degradation of Atrazine by Fentons Reagent - Condition Optimization and Product Quantification. *Environ Sci Technol*. 1995;29(8):2083-2089. doi:10.1021/es00008a030.
  135. Ventura A, Jacquet G, Bermond A, Camel V. Electrochemical generation of the Fenton's reagent: Application to atrazine degradation. *Water Res*. 2002;36(14):3517-3522. doi:10.1016/S0043-1354(02)00064-7.
  136. Chan KH, Chu W. Modeling the reaction kinetics of Fenton's process on the removal of atrazine. *Chemosphere*. 2003;51(4):305-311. doi:10.1016/S0045-6535(02)00812-3.
  137. Fan WQ, Yanase T, Morinaga H, et al. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: Implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ Health Perspect*. 2007;115(5):720-727. doi:10.1289/ehp.9758.
  138. Cai Z, Wang D, Ma WT. Gas chromatography/ion trap mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters by an isotope dilution technique. *Anal Chim Acta*. 2004;503(2):263-270. doi:10.1016/j.aca.2003.10.038.
  139. Bruzzoniti MC, Sarzanini C, Costantino G, Fungi M. Determination of herbicides by solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry in drinking waters. *Anal Chim Acta*. 2006;578(2):241-249. doi:10.1016/j.aca.2006.06.066.
  140. Lin C, Lerch RN, Garrett HE, George MF. Improved GC-MS/MS Method for Determination of Atrazine and Its Chlorinated Metabolites in Forage Plants—Laboratory and Field Experiments. *Commun Soil Sci Plant Anal*. 2007;38(13-14):1753-1773. doi:10.1080/00103620701435522.
  141. Hernandez F, Beltran J, Lopez FJ, Gaspar J V. Use of solid-phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples. *Anal Chem*. 2000;72(10):2313-2322. doi:10.1021/ac991115s.
  142. Hladik ML, Smalling KL, Kuivila KM. A multi-residue method for the analysis of pesticides and pesticide degradates in water using HLB solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2008;80(2):139-144. doi:10.1007/s00128-007-9332-2.
  143. Yang S, Carlson KH. Solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices. *J Chromatogr A*. 2004;1038(1-2):141-155. doi:10.1016/j.chroma.2004.02.084.

144. Schumacher B a. Methods for the Determination of Total Organic Carbon in Soils and Sediments. *Carbon N Y*. 2002;32(April):25.  
doi:http://epa.gov/esd/cmb/research/papers/bs116.pdf.
145. Soto R, Freer J, Reyes N, Baeza J. EXTRACTION OF POLYFLAVONOIDS FROM *Pinus radiata* D. Don BARK: EVALUATION OF EFFECTS OF SOLVENT COMPOSITION AND OF THE HEIGHT ON TREE BARK. *Boletín la Soc Chil Química*. 2001;46(1):41-49.
146. Nakagawa K, Sugita M. Spectroscopic characterisation and molecular weight of vegetable tannins. *J Soc Leather Technol Chem*. 83(5):261-264.  
http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=10263428. Accessed September 25, 2016.
147. Swinehart DF. The Beer-Lambert Law. *J Chem Educ*. 1962;39(7):333.  
doi:10.1021/ed039p333.
148. Romero R, Contreras D, Segura C, Schwederski B, Kaim W. Hydroxyl radical production by a heterogeneous Fenton reaction supported in insoluble tannin from bark of *Pinus radiata*. *Environ Sci Pollut Res*. 2016:1-8. doi:10.1007/s11356-016-7532-1.
149. Salgado P, Melin V, Contreras D, Moreno Y, Mansilla HD. Fenton reaction driven by iron ligands. 2013;4:0-5.
150. Melin V, Henríquez A, Freer J, Contreras D. Reactivity of catecholamine-driven Fenton reaction and its relationships with iron(III) speciation. *Redox Rep*. 2015;20(2):89-96.  
doi:10.1179/1351000214Y.0000000119.
151. Miller J. *Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica.*; 2002.



# ANEXOS

## 1. GPC

### Curva de calibración

En la Figura A1, se presenta la curva de calibrado de PS, donde se grafica el log Mw (o en su defecto, Mn) de cada estándar versus el tiempo de retención de éstos. El ajuste corresponde a una curva polinomial de orden 2.

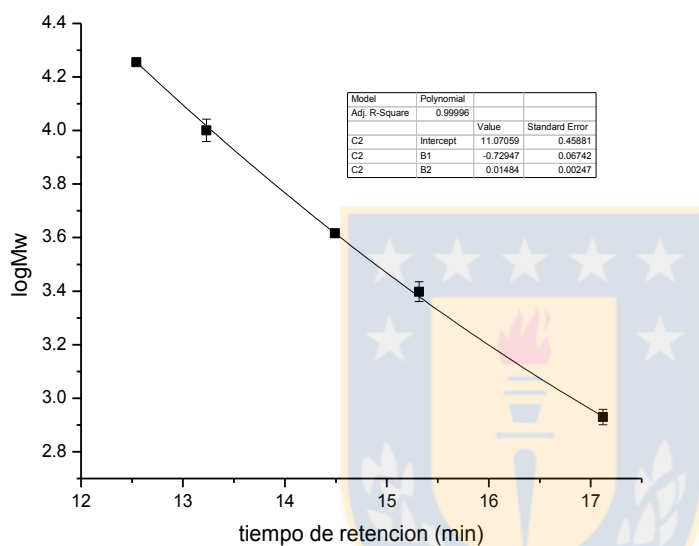


Figura A1: Curva de calibrado de estándares de Poliestireno (PS).

## 2. Reducción de Fe(III)

En la Tabla IA se muestran las concentraciones del complejo Fe(II)-ferrozina para la reacción de reducción de Fe(III) con catequina a pH=3.40.

Tabla IA: Concentraciones de complejo Fe(II)-ferrozina para reducción con catequina a pH=3.40.

Tiempo (min)	$\lambda$ (nm) (experimental)	Absorbancia	b (cm)	$\epsilon_{exp}$	Concentración ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	%CV
0	563	0.090	1	27643±36	3.3	1.2
1	563	0.175	1	27643	6.3	1.1

2	563	0.252	1	27643	9.1	0.8
3	563	0.224	1	27643	11.7	0.8
4	563	0.430	1	27643	15.6	0.8
5	563	0.561	1	27643	20.3	0.7
10	563	0.855	1	27643	30.9	0.8
20	563	1.11	1	27643	*LLB	*LLB
30	563	1.24	1	27643	*LLB	*LLB
60	563	1.27	1	27643	*LLB	*LLB
1440	563	1.39	1	27643	*LLB	*LLB

\*LLB: No cumple Ley de Lambert-Beer.

En la Tabla IIA, se muestran las concentraciones para el complejo Fe(II)-ferrozina cuando se reduce el Fe(III) con tanino a pH=3.40, es posible observar el aumento en la reducción con respecto a catequina (Tabla 1A), lo que indica el mayor rendimiento en esta reacción del tanino insoluble.

Tabla IIA: Concentraciones de complejo Fe(II)-ferrozina para reducción con tanino a pH=3.40.

Tiempo (min)	$\lambda$ (nm) (experimental)	Absorbancia	b (cm)	$\epsilon_{exp}$	Concentración ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	%CV
0	563	0.102	1	27621	3.7	1.4
1	563	0.312	1	27621	11.3	1.2
2	563	0.366	1	27621	13.2	1.2
3	563	0.502	1	27621	18.2	0.8
4	563	0.630	1	27621	22.8	0.7
5	563	0.809	1	27621	29.3	0.7
10	563	1.375	1	27621	*LLB	*LLB
20	563	1.917	1	27621	*LLB	*LLB
30	563	2.122	1	27621	*LLB	*LLB
60	563	2.156	1	27621	*LLB	*LLB
1440	563	1.322	1	27621	*LLB	*LLB

\*LLB: No cumple Ley de Lambert-Beer.

### 3. Evaluación del efecto adsorbente

A continuación se muestran en las Figuras 1A y 2A la evaluación en la disminución de la absorbancia del naranja de metilo solo con presencia de tanino (1A) y con reacción de Fenton soportada en tanino.

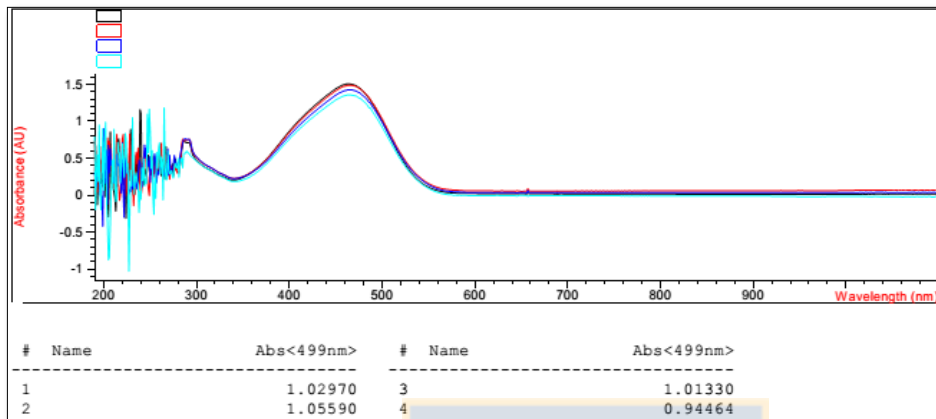


Figura 1A: Naranja de metilo en presencia de tanino insoluble.

Se puede observar en la figura anterior, la mínima disminución de la absorbancia del naranja de metilo a 499nm en presencia de tanino, lo que permite concluir que el efecto adsorbente de este material no es la vía de disminución principal en la concentración final del colorante.

Por otro lado, en la Figura 2A se observa un efecto completamente diferente, en los mismos tiempos y con iguales concentraciones iniciales de reactivos, se observa una disminución paulatina en la absorbancia, destacando que la mayor caída se aprecia en los primeros 5 minutos de análisis, lo cual está de acuerdo a lo reportado para la reacción de Fenton (Pignatello et al.2006)

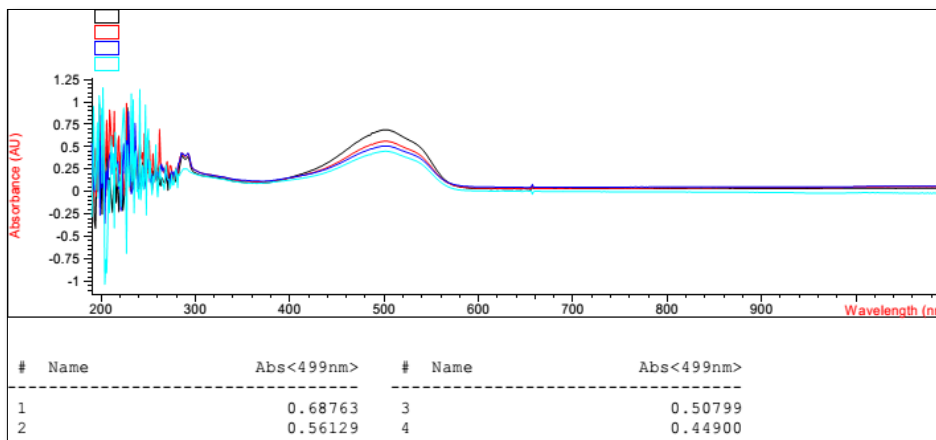


Figura 2A: Disminución en la absorbancia de naranja de metilo en presencia de Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tanino.

#### 4. Análisis por EPR

En la Figura 3A se muestra el análisis por EPR para los diferentes sistemas, la línea continua es producto de las mediciones consecutivas cada 0.03 segundos.

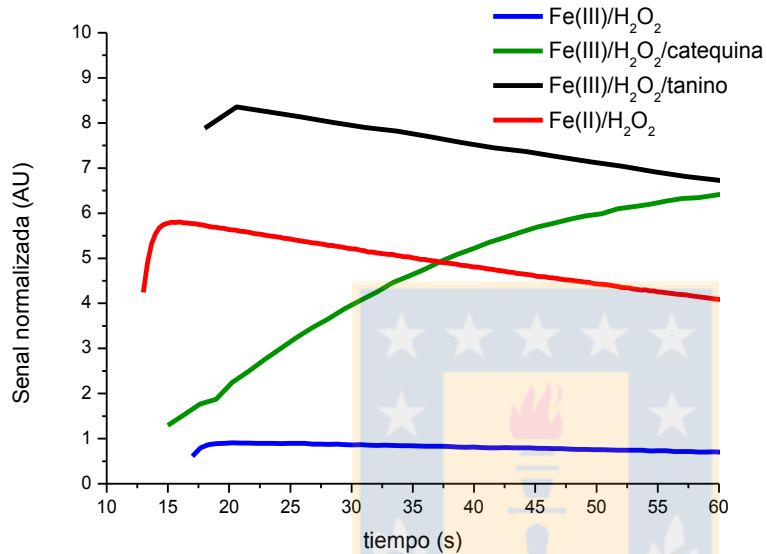


Figura 3A: Tendencia de los distintos sistemas medidos por EPR.

Para cada sistema se realizaron las medidas por EPR a dos distintos pH: 3.4 y 7.0

En la Figura 4A se muestran las tendencias para el sistema con Fe(II)/DHB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 3.40.

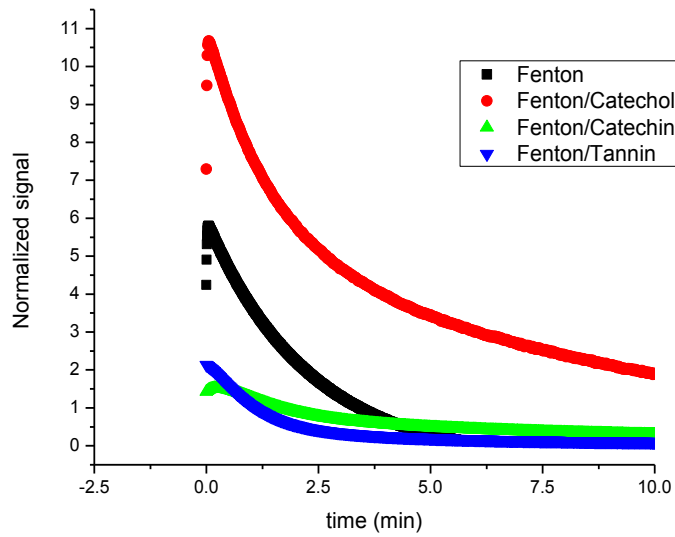


Figura 4A: Tendencias para los 4 sistemas evaluados para Fenton a pH=3.40

En la Figura 5A se muestran las tendencias para Fenton a pH 7.0

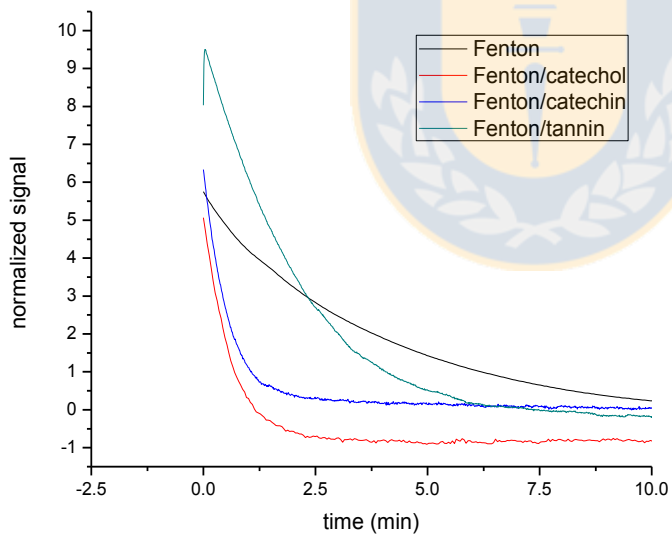


Figura 5A: Tendencias para sistemas Fenton a pH 7.0

En la Figura 6A se muestran los perfiles EPR para los sistemas Fenton-like evaluados



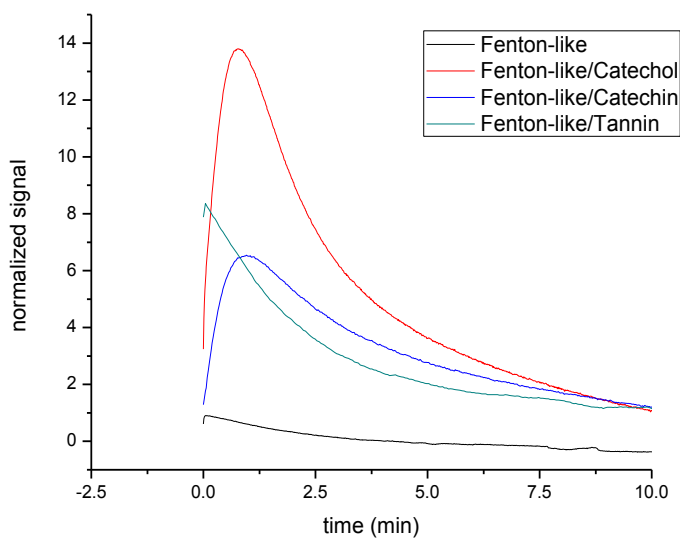


Figura 6A: Tendencias para sistemas Fenton-like evaluados.

## 5. Degradación atrazina

### Cuantificación

En la Tabla IIIA se detalla la cuantificación de atrazina a través del tiempo.

Tabla IIIA: Cuantificación de atrazina en el sistema optimizado.

tiempo (min)	Área 1	Área 2	Área 3	Área promedio	Concentración calculada ATZ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentración*f.d ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
0	929789	905000	914425	916404	5.60	11.20
0.1	902308	906869	906983	905386	5.53	11.07
0.5	882433	853318	853308	863019	5.28	10.55
1.0	862642	823231	847120	844331	5.16	10.32
2.0	760970	766710	757666	761782	4.66	9.32
5.0	656653	639648	641618	645973	3.95	7.90
10.0	460633	495837	479368	478612	2.93	5.86
30.0	80478	132634	95008	102706	0.63	1.27
60.0	1014	118	19	383.7	<LOD	<LOD

## 6. Detención de la reacción con EDTA

Se evaluó por EPR el quenching de la reacción Fenton y Fenton-like con EDTA a pH 7.00.

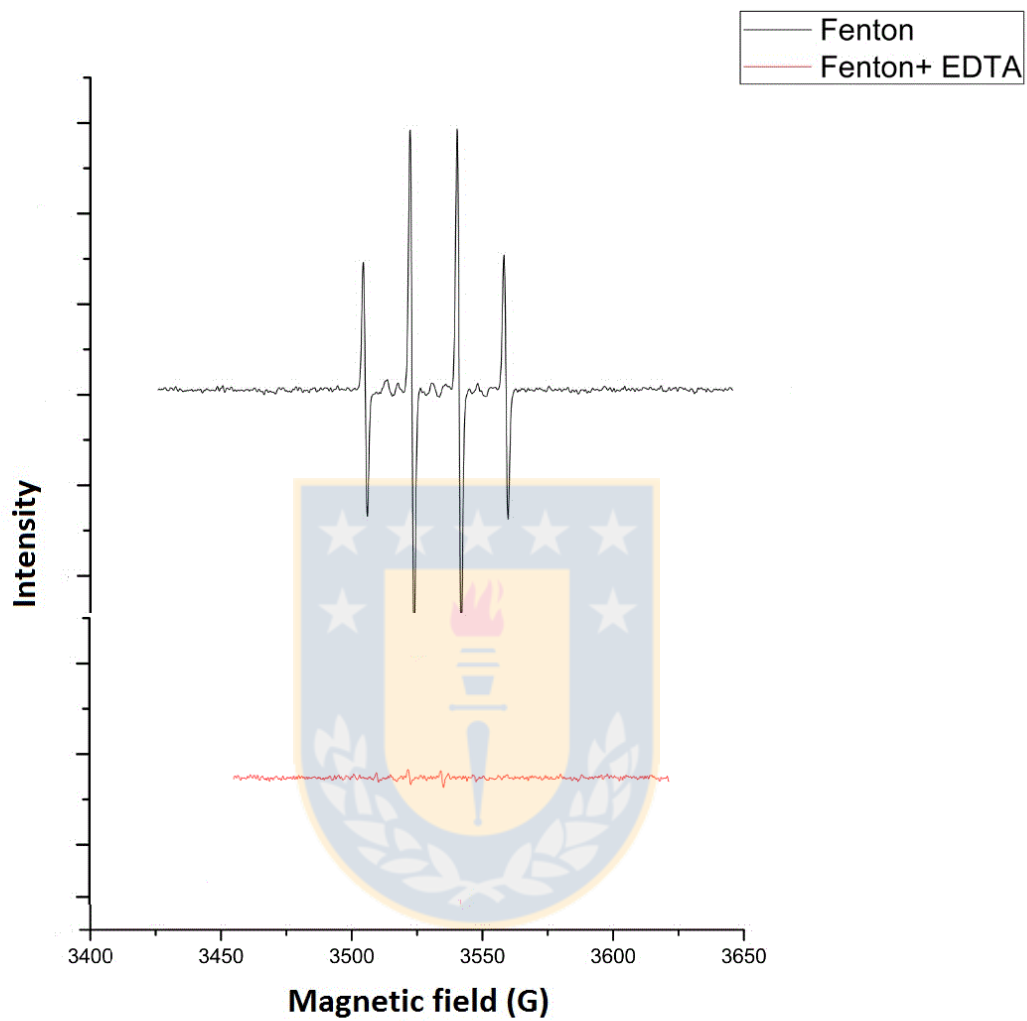


Figura 7A: Quenching de la reacción.

## 7. Diseño experimental

Tabla IVA: Valores máximos y mínimos para *screening*.

Concentración Fe(III) (-1 a 1)	Concentración H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (-1 a 1)	mg de tanino (-1 a 1)	pH
50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	20 mg	2.5
250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	3.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	60 mg	7.0

A continuación, en la Tabla VA se muestran las combinaciones de experimentos realizadas para la determinación de la máxima inclinación.

Tabla VA: Combinaciones para el *screening* diseñado para degradación de atrazina.

Concentración Fe(III)	Concentración H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	mg de tanino	pH	Área de peak (Degradación)
50	0.5	20	2.5	396395
50	0.5	60	2.5	279662
250	0.5	20	2.5	155324
250	0.5	60	2.5	146495
50	3.0	20	2.5	322372
50	3.0	60	2.5	158646
250	3.0	20	2.5	63141
250	3.0	60	2.5	0
50	0.5	20	7.0	684046
50	0.5	60	7.0	428542
250	0.5	20	7.0	226537
250	0.5	60	7.0	61177
50	3.0	20	7.0	468963
50	3.0	60	7.0	292022
250	3.0	20	7.0	69689
250	3.0	60	7.0	0
150	1.75	40	4.5	47386
150	1.75	40	4.5	45323
150	1.75	40	4.5	47691
150	1.75	40	4.5	46839

### Optimización

En la Tabla VIA se detallan las variables y sus valores utilizados.

Tabla VIA: Valores máximos y mínimos para optimización.

Concentración Fe(III) (-1 a 1)	Concentración H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (-1 a 1)	mg de tanino (-1 a 1)	pH
50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.85 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	40 mg	2.4
150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	2.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 mg	4.4

En la Tabla VIIA se muestran las combinaciones de experimentos para la optimización del sistema.

Tabla VIIA: Combinaciones para la optimización en el sistema diseñado para degradación de Atrazina

Concentración Fe(III)	Concentración H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	mg de tanino	pH	Área de peak (Degradación)
50	0.85	30	2.4	329825
50	0.85	50	2.4	287300
150	0.85	30	2.4	122205
150	0.85	50	2.4	89805
50	2.4	30	2.4	250558
50	2.4	50	2.4	222403
150	2.4	30	2.4	15586
150	2.4	50	2.4	10406
50	0.85	30	4.4	213839
50	0.85	50	4.4	237723
150	0.85	30	4.4	53613
150	0.85	50	4.4	108998
50	2.4	30	4.4	142206
50	2.4	50	4.4	158930
150	2.4	30	4.4	8786
150	2.4	50	4.4	21
100	1.625	20	3.4	138235
100	1.625	60	3.4	19447
50	1.625	40	3.4	917355
200	1.625	40	3.4	32
100	0.075	40	3.4	496224
100	3.175	40	3.4	6240
100	1.625	40	1.4	672832
100	1.625	40	5.4	294174
100	1.625	40	3.4	5557
100	1.625	40	3.4	5560
100	1.625	40	3.4	5033
50	0.85	30	2.4	329825
50	0.85	50	2.4	287300
150	0.85	30	2.4	122205

## 8. Degradación atrazina en condiciones óptimas

### Determinación parámetros analíticos instrumentales

#### Curva calibración atrazina

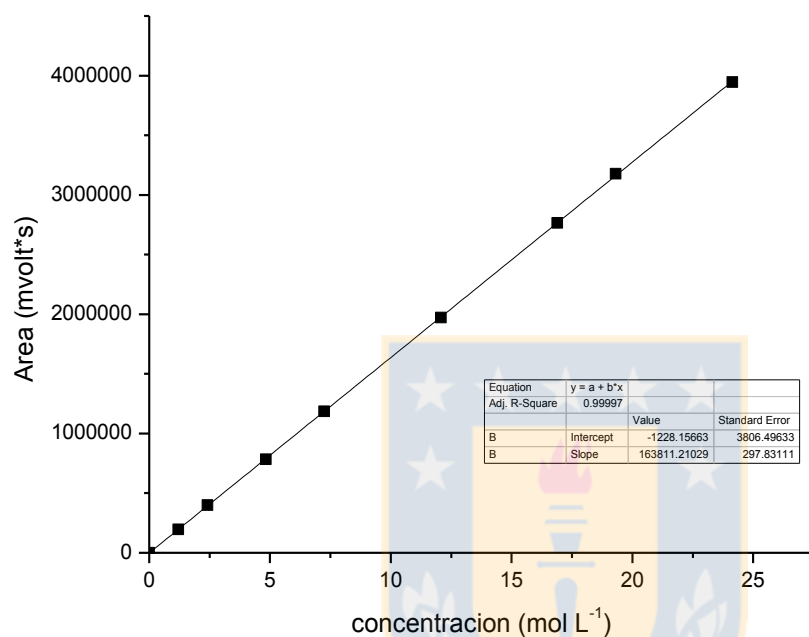


Figura 8A: Curva de calibración de atrazina ( $1.2\text{-}24.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

Tabla VIIIA: Modelo de regresión lineal para curva de calibrado de atrazina

Modelo de regresión lineal			
Fecha	12/11/2015	26/11/2015	10/12/2015
Pendiente Curva ( $\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\text{L}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	$163066\pm 170$	$164323\pm 158$	$164045\pm 166$
Intercepto ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$1674.3\pm 80.6$	$1674.3\pm 77.5$	$3406.6\pm 81.4$
Coefficiente correlación múltiple	1	1	1
Coefficiente de determinación $R^2$	1	1	1
$R^2$ ajustado	1	1	1
Error típico	8732.9	12537.8	10617.6
Límite de detección ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.161	0.229	0.194
Observaciones	24	24	24

\*Límite de detección calculado según método de la AOAC<sup>151</sup>