

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

Escuela Politécnica del Ejército: a través del Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología y el Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI), lugar en el que se encuentra el laboratorio de Biotecnología Ambiental donde se realizaron las distintas actividades experimentales que permitieron el desarrollo de la presente investigación.

La investigación fue llevada a cabo como parte del proyecto “Nanomateriales aplicados a la remediación ambiental”, financiado por la Escuela Politécnica del Ejército.

Las personas que participaron en esta investigación fueron: Ana Belén Peñaherrera Pazmiño en la planificación y desarrollo de la investigación, Dr. Luis Cumbal como director de tesis y Dr. Vicente Delgado como co-director de tesis.

2.2 Zona de estudio

2.2.1 Zonas de muestreo

Las muestras de suelo con textura arena-limosa fueron recolectadas en Capelo donde la ubicación geográfica tiene como coordenadas UTM N 9966932 E 782670.

Las muestras de suelo contaminado con metales fueron recogidas por el Ing. Ricardo Tipán en el campo petrolero Bermejo, en la provincia de Sucumbíos a 130 km de Quito, en el mes de enero de 2010.

2.2.2 Laboratorio de investigación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicada en la Av, Gral. Rumiñahui s/n Sangolquí-Ecuador.

2.3 Periodo de tiempo de investigación

2.3.1 Fecha de inicio de la investigación: Agosto 2009

2.3.2 Fecha de finalización de la investigación: Octubre 2010

2.4 Diseño

La experimentación se dividió en varias etapas, cada una fue evaluada independientemente de la siguiente manera:

Etapa 1.- Contaminación artificial de suelos con níquel y extracción ácida.

El suelo limpio recolectado fue secado y pasado por un cedazo de 2 mm de diámetro de poro. Muestras de este suelo fueron analizadas en el laboratorio GRUNTEC ENVIRONMENTAL SERVICES.

Diez gramos de suelo se contaminaron con concentraciones de 10, 20, 30 40, 50, 100 y 200 mg/kg de níquel en todos los casos. La concentración de níquel fue comprobada aplicando el método de extracción ácida. Para el efecto e utilizaron dos agentes extractantes: ácido sulfúrico (H_2SO_4) y una mezcla de ácido nítrico (HNO_3) y ácido clorhídrico (HCl) en proporción 3:1.

Se aplicó un arreglo factorial 2x5 dispuesto en un diseño experimental completamente al azar (DCA) con tres repeticiones. En los ensayos se utilizaron dos tipos de ácido HNO_3 y HCl en proporción 3:1 y H_2SO_4 y distintas concentraciones de níquel. Los factores del arreglo factorial fueron: el tipo de ácido con dos niveles y la concentración del metal con cinco niveles. La variable dependiente fue el porcentaje de extracción del metal.

Etapa 2.- Aplicación de los nanodendímeros en la extracción de níquel.

Se prepararon soluciones al 0,1% y 0,04% de cada nanodendímero como se explica en la Tabla 2.2. En una columna de lecho fijo que tuvo diez gramos de suelo, se añadieron 25 mL de cada solución. Después el líquido que eluyó se recogió en un Erlenmeyer de 100 ml para su posterior análisis.

Se utilizó la técnica de absorción atómica para cuantificar la concentración de níquel extraído en ambos extractantes, en la solución ácida y la solución de dendímeros, ya que es específica y tiene pocas interferencias. Se empleó un equipo de absorción atómica

Perkin Elmer AA100 equipado con una lámpara de cátodo hueco para Ni^{2+} . La concentración obtenida permitió realizar el cálculo del porcentaje de remoción mediante un balance de masa.

Se aplicó el diseño experimental el cual consistió en un arreglo factorial $2 \times 2 \times 3$ dispuesto en un Diseño Experimental Completamente al Azar con tres repeticiones, siendo la variable dependiente el porcentaje de remoción del metal. Los factores del diseño fueron la concentración de nanodendímero, la concentración de níquel en el suelo y el grupo funcional del nanodendímero. Cada factor tuvo los siguientes niveles: la concentración de nanodendímero tuvo dos niveles 0,1% y 0,04%, la concentración de níquel en el suelo también dos niveles 100 y 200 mg/kg y el grupo funcional del nanodendímero tuvo 3 niveles -COOH, -OH, -NH₂.

Etapa 3.- Evaluación de la competencia entre cationes en el proceso de extracción.

Etapa 3.1.- Níquel y cobre.

Se contaminaron diez gramos de suelo con 100 mg/kg tanto de níquel como de cobre, y se colocaron en una columna de lecho-fijo. Luego se pasó la solución de los nanodendímeros por la columna y se recolectó la solución a la salida. Se utilizó la técnica de absorción atómica para determinar la concentración de níquel y cobre en las muestras del efluente.

Etapa 3.2.-Níquel, calcio, magnesio y cadmio.

Se contaminaron diez gramos de suelo con 100 mg/kg y 200 mg/kg de níquel calcio, magnesio y cadmio y se colocaron en una columna de lecho. A continuación se hizo fluir los dendímeros a través de la columna e igualmente se recolectaron muestras en el efluente. Se utilizó la técnica de absorción atómica para determinar la concentración de níquel, calcio, magnesio y cadmio en las muestras del efluente.



Figura 2. 1 Contaminación artificial de suelo 100 y 200 mg/kg de níquel.

Para la cuantificación de metales, se elaboraron curvas de calibración, con estándares, para cada metal: níquel, calcio, magnesio y cadmio. Se realizó una nueva curva después de 20 muestras analizadas, aceptando un coeficiente de correlación menor al 5%, para cada nueva curva. La concentración obtenida permitió realizar el cálculo del porcentaje de remoción mediante un balance de masa.

Se aplicó un diseño factorial 2x2x3 para cada metal, donde cada factor tuvo los siguientes niveles, concentración de suelo 100 y 200 mg/kg, la concentración del

nanodendímero 0,1% y 0,04% y el grupo funcional del nanodendímero (-COOH, -OH y -NH₂).

Etapa 4.- Regeneración de los nanodendímeros.

Etapa 4.1.- Recuperación de metales pesados inmovilizados en los nanodendímero usando una resina de intercambio iónico DOW 3N.

Con la finalidad de evaluar la reutilización de los nanodendímeros, la solución con los nanomateriales impregnados con los metales pesados se hizo pasar a través de una resina de intercambio iónico, y se cuantificó la cantidad de metales presentes en el efluente mediante espectrofotometría de absorción atómica. Se aplicó un arreglo factorial 2x2x3 dispuesto en un Diseño Experimental Completamente al Azar con tres repeticiones para seleccionar las condiciones que favorecen el mayor porcentaje de remoción, parámetro que fue la variable dependiente.

Etapa 4.2.- Evaluación de la eficiencia de los nanodendímeros regenerados.

Se seleccionaron los 6 tratamientos que mejor porcentaje de remoción presentaron y se los puso en contacto con suelos contaminados con 100 y 200 ppm de níquel, calcio, magnesio y cadmio. La cuantificación de los metales pesados capturados por los nanodendímeros regenerados se realizó por espectrofotometría de absorción atómica.

Etapa 5.- Evaluación del porcentaje de remoción de cadmio alterando el potencial iónico.

Se evaluaron tres concentraciones de NaCl (0,1mM, 1mM y 10 mM) para evaluar la influencia del potencial iónico en la extracción de cadmio usando el nanodendímero con grupos terminales carboxilo. Se aplicó un Diseño Experimental Completamente al Azar con tres repeticiones para seleccionar las condiciones que favorecen el mayor porcentaje de remoción, parámetro que fue la variable dependiente.

Etapa 6.- Medición de la conductividad de la solución PAMAMG4.5-COOH

Se midió la conductividad eléctrica de dos soluciones de nanodendímeros PAMAM-G4.5-COOH, la primera antes aplicar la en la experimentación y la segunda luego de la captura de los metales pesados. De este modo se evaluó la presencia de interacciones electrostáticas en la solución. Se realizaron 3 repeticiones y se muestra el promedio.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Preparación de suelos contaminados con níquel.

Inicialmente varias muestras de suelo se colocaron en recipientes de porcelana resistentes a alta temperatura. Los recipientes fueron puestos en una Thermolyne modelo F-6025 a 200°C de temperatura por 4 horas. A continuación se pesaron 10 gramos de suelo estéril en una balanza electrónica METTLER TOLEDO, se colocaron en una botella Serum

de 60 mL capacidad y posteriormente se dosificaron con 1 mL de solución madre de concentración 1000 mg/kg de níquel. Luego de agitar el envase en el agitador rotativo durante 42 días se obtuvo el suelo contaminado con 100 mg/kg de níquel. Este procedimiento se describe en la Figura 2.2. De manera similar se preparan suelos con otras concentraciones de níquel variando el volumen de dosificación de la solución madre. Como puede apreciarse en la Tabla 2.1.

Con el propósito de evaluar el contenido real de níquel en muestras de suelo preparadas en el laboratorio, se envió un kilogramo de suelo contaminado al laboratorio certificado GRUNTEC ENVIRONMENTAL SERVICES. La cuantificación de níquel se condujo en GRUNTEC aplicando el método EPA 6020A. Además se midieron otros componentes en las muestras de suelo como: nitrógeno total por el método HACH 8075; el carbono orgánico total, por el método SM 5310A y SM5310B; la materia orgánica, por el método HACH 8097. Finalmente se cuantificó la capacidad de intercambio catiónico.

Tabla 2. 1 Volumen necesario para obtener una concentración específica de níquel en 10 gramos de suelo estéril.

Concentración esperada en el suelo (mg Ni . kg ⁻¹ suelo)	Volumen de solución madre de 1000 ppm μL
10	100
20	200
30	300
40	400
50	500
100	1000
200	2000

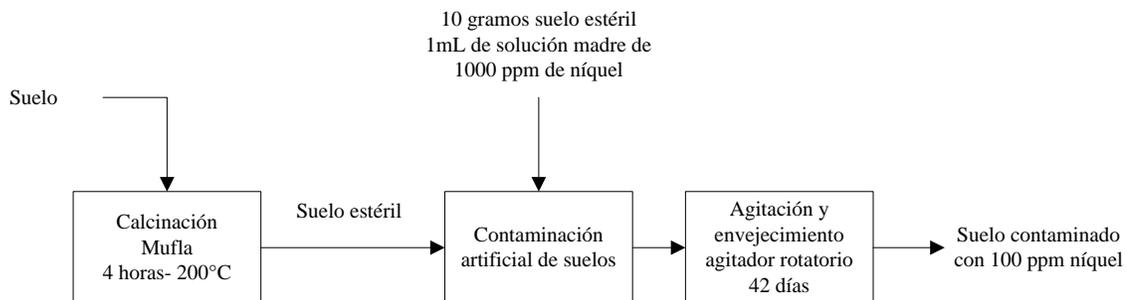


Figura 2. 2 Diagrama de flujo para la preparación de suelos contaminados con 100 ppm de níquel.



Figura 2. 3 Contaminación artificial de suelo con níquel.



Figura 2. 4 Agitador rotativo donde se realiza la contaminación artificial y la digestión ácida.

2.5.2 Extracción ácida

La digestión ácida de sedimentos se condujo usando el método EPA 2050B. Para el ensayo se utilizaron muestras con diez gramos de suelo. A cada muestra se adicionaron 200 mL de dos tipos de ácido: H_2SO_4 y una solución compuesta por ácido nítrico y ácido clorhídrico en proporción 3:1. Las muestras de suelo acidificadas se agitaron durante 48 horas en un agitador rotatorio. El sobrenadante de la digestión fue filtrado con papel Whatman No. 41 y fue diluido para ser analizado por absorción atómica en flama aire/acetileno en un espectrofotómetro PERKIN ELMER modelo Analyst 100, utilizado el método 3111A (Greenberg, *et al.* 1992). Los estándares se prepararon con el estándar de referencia AccuTrace™ de 1000 mg/L de níquel.

2.5.2.1 Evaluación del porcentaje de remoción.

Para cuantificar la concentración del níquel en la solución de nanodendímeros se determinó el porcentaje de remoción aplicando el siguiente balance de masa.

$$V_a * C_o + m * q_o = m * q_e + V_a * C_e$$

si $C_o = 0$, entonces

$$(q_o - q_e) = \frac{C_e * V_a}{m}$$

Ecuación 2. 1

$$\text{Porcentaje de remoción} = (q_o - q_e) * 100$$

Ecuación 2. 2

Donde m representa la masa del suelo; C_o , la concentración inicial de níquel en el ácido; q_o , la concentración inicial de níquel en el suelo; q_e , la concentración de níquel 48 horas después; C_e , la concentración final de níquel en el ácido y V_a , el volumen de ácido.

Las mediciones de la concentración del metal extraído, obtenidas por espectrofotometría de absorción atómica, se repitieron en el laboratorio de Química de la Universidad Central. Los datos fueron contrastados mediante la prueba estadística T de Student para determinar si existe diferencia significativa.

2.5.3 Determinación de la textura del suelo por el método húmedo.

Para este ensayo se pesaron 200 gramos de suelo, los que fueron depositados en el primero de cuatro tamices ordenados según el tamaño de poro de manera ascendente. A continuación, se procedió a lavarlo para facilitar su desplazamiento a través de los tamices. La muestra fue entonces colocada en la estufa a 100°C y luego de 24 horas se pesó el suelo contenido en cada tamiz. Se utilizaron tamices de 4,75 mm, 4,20mm, 2mm, $7\mu\text{m}$ de abertura de poro.

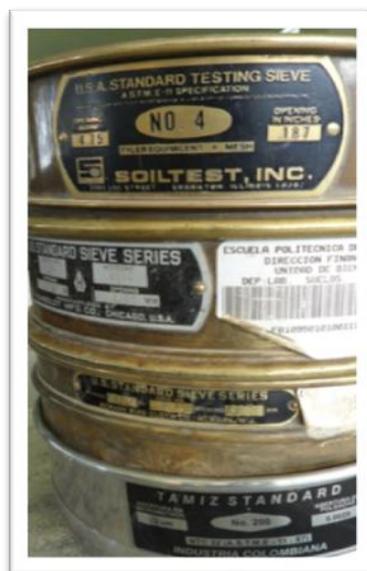


Figura 2. 5 Tamices ordenados según el diámetro de poro de forma ascendente.

2.5.4 Aplicación de los nanodendímeros

2.5.4.1 Preparación de soluciones de nanodendímeros

Los nanomateriales orgánicos fueron adquiridos a Novachem como soluciones stock en metanol y luego se aplicaron en reactores en lotes y en columna de lecho fijo y se evaluó su eficiencia. Tres materiales fueron estudiados, incluyendo G4.5-COOH, G4.0-NH₂ y G4.0-OH (G indica el número de generación; -COOH, -NH₂ y -OH se refieren al grupo terminal) Para los ensayos se prepararon soluciones de 0,1% y 0,04%.

Tabla 2. 2 Volúmenes de solución de nanodendímeros requerida para preparar soluciones de concentración específica.

Nanodendímero	Concentración inicial	Concentración final	Volumen del balón (mL)	Volumen calculado (μL)
-COOH	5%	0,1%	25	500
-NH ₂	10%	0,1%	25	250
-OH	10%	0,1%	25	250
-COOH	5%	0,04%	25	200
-NH ₂	10%	0,04%	25	100
-OH	10%	0,04%	25	100

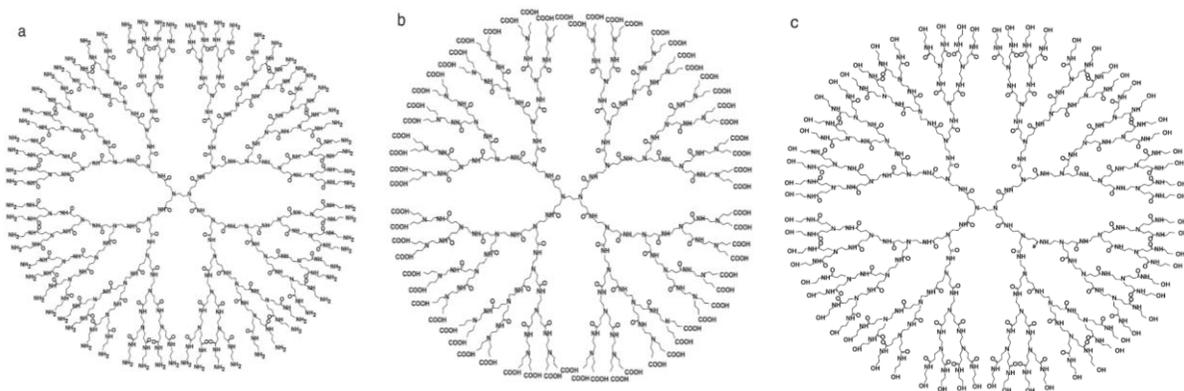


Figura 2. 6 Diagramas de los PAMAM nanodendímeros con distintos grupos funcionales: a) -NH₂, b) -COOH c) -OH. Adaptado de Klajnert *et al.* 2003

Se colocaron 10 gramos de suelo previamente contaminado con níquel en una probeta de 10 mL. A esta muestra se lo compactó 3 minutos y se midió el volumen final. Sobre una capa de 0,5 cm de fibra de vidrio, se colocó el volumen inicial de suelo y se

midió la altura que alcanza en la columna para calcular el caudal. Finalmente se adicionan 0,5 cm de fibra de vidrio sobre el suelo.

Con una bomba peristáltica CERAMPUMP modelo PM6014, número de serie 416678, se controló el caudal de los 25 mL de solución de nanodendímeros en $0,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

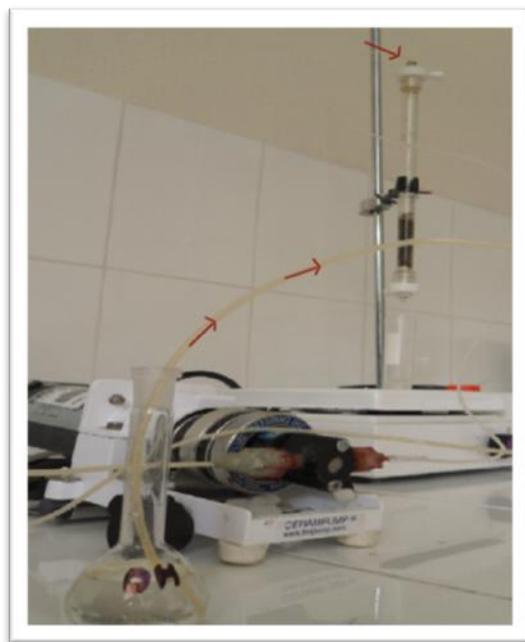


Figura 2. 7 Columna de lecho fijo y bomba peristáltica.

2.5.4.3 Evaluación del porcentaje de remoción

Para cuantificar la concentración del níquel en la solución de nanodendímeros y así determinar el porcentaje de remoción mediante el siguiente balance de masa, el efluente de la columna de lecho fijo se sometió a medición en un espectrofotómetro

PERKIN ELMER modelo Analyst 100 con flama aire/acetileno. El cálculo numérico se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$V * C_o + m * q_o = m * q + V * C$$

si $C_o = 0$, entonces

$$q = \frac{m * q_o - V * C}{m}$$

Ecuación 2. 3

$$\text{Porcentaje de remoción} = \frac{q_o - q}{q_o} * 100$$

Ecuación 2. 4

Donde m representa la masa del suelo; q_o , la concentración inicial de níquel en el suelo; C_o , la concentración inicial de níquel en el nanodendímero; q, la concentración final de níquel en el suelo; C, la concentración final de níquel en el nanodendímero y V el volumen de la solución de nanodendímero.

2.5.5 Ensayos para evaluar la competición entre metales

2.5.5.1 Entre níquel, cadmio, calcio y magnesio.

Se preparan suelos contaminados con los cuatro metales de manera similar a la descrita anteriormente para la preparación de suelo contaminados con níquel; es decir, se tomó 1mL de cada solución estándar del metal y se los adicionó a 10 gramos de suelo para obtener una concentración final de 100 mg/kg de cada metal en el suelo luego de la agitación.

Posteriormente, se armó la columna de vidrio y se colocaron los 10 gramos de suelo contaminado, se selló la columna y se midió la altura del suelo. A continuación, se colocó la solución de nanodendímeros en uno de los extremos de la manguera de la bomba peristáltica, la misma que reguló el caudal con el que fue conducida la solución hacia el suelo para maximizar el tiempo de contacto. El efluente se recogió en un Erlenmeyer de 100 mL y enseguida se cuantificó la concentración de níquel, cadmio y calcio usando espectrofotometría de absorción atómica.



Figura 2. 8 Cuantificación de la concentración de magnesio mediante espectrofotometría de absorción atómica. PERKIN ELMER modelo Analyst 100

Para cuantificar el magnesio se adicionó Cl_2Sr como agente de liberación tanto a los estándares de magnesio como a las muestras para contrarrestar las interferencias químicas. El volumen que debe adicionarse corresponde al 20% del volumen de la muestra o estándar de tal manera que se optimice la lectura de este metal.

2.5.5.2 Cálculo teórico del número de átomos que son capturados por molécula de cada nanodendímero.

Se utilizó la gráfica de Scatchard-Klotz para determinar el número de sitios y constante de unión de los metales níquel y cadmio con cada tipo de nanodendímero.

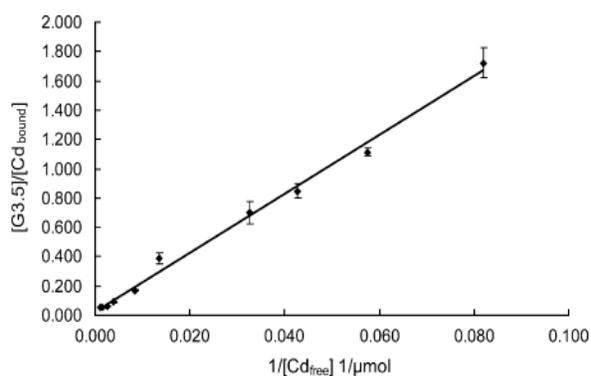


Figura 2. 9 Gráfica de Scatchard-Klotz. Tomada de Sekowski et al. (2009)

Una vez obtenida la ecuación de la recta $y = m x + b$ que se forma al relacionar el recíproco de la concentración de átomos del metal en μmol y la relación de la concentración del nanodendímero y los átomos unidos del metal en μmol , se calcula los parámetros n y K_b con las siguientes ecuaciones.

$$n = \frac{1}{b}$$

Ecuación 2. 5

$$K_b = \frac{1}{m}$$

Ecuación 2. 6

2.5.6 Regeneración de los nanodendímeros utilizados.

2.5.6.1 Activación de la resina de intercambio iónico DOW 3N

Primero se lavaron 6 gramos de la resina con metanol al 4% durante 1 hora. Luego se filtró el metanol con la bomba de vacío BUCHI Labortechnik V-700 y papel filtro para separar el metanol. A continuación se mezcló la resina con 20 mL de una solución de NaCl al 3% durante 24 horas en un agitador circular Heidolph unimax 1010. Luego de filtrar, se procedió a secar la resina a temperatura ambiente durante 24 horas.



Figura 2. 10 Activación de la resina DOW 3N. a) Bomba de vacío. b) Filtración c) Secado

2.5.6.2 Aplicación de la resina de intercambio iónico DOW 3N en la regeneración de los nanodendímeros.

Como se aprecia en la Figura 2.11, la resina fue activada con 20 mL de NaCl al 3%. Cuando estuvo seca, después de 24 horas, la resina activada se puso en contacto durante 24 horas con la solución de nanodendímeros ya utilizada en un tratamiento de

remoción. Posteriormente, se cuantificó la concentración de los metales en la solución de nanodendímeros regenerados.

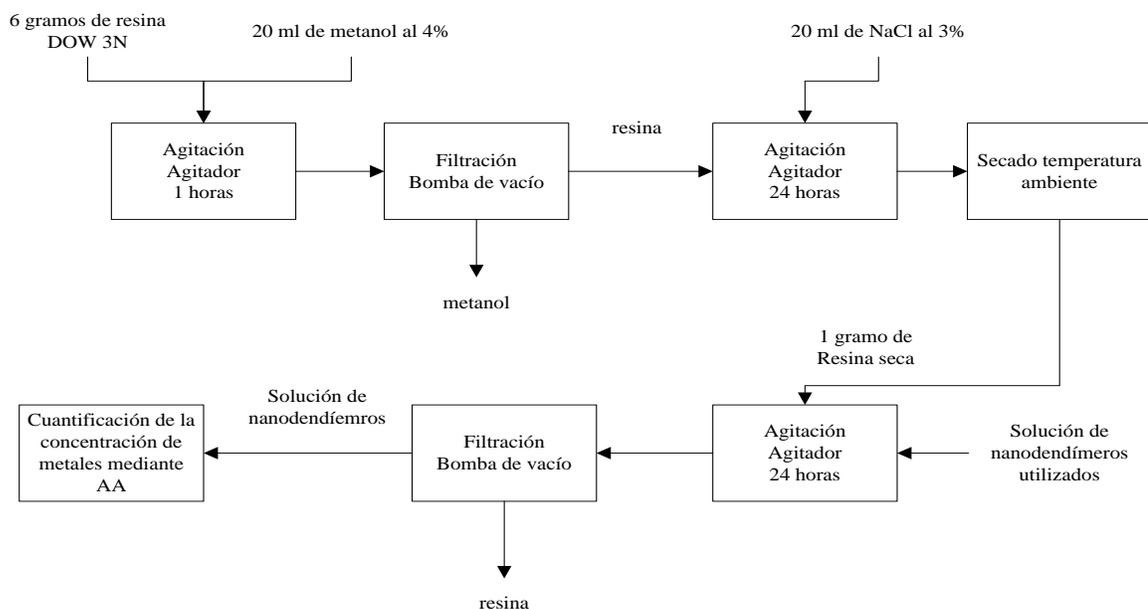
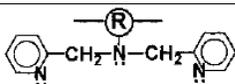


Figura 2. 11 Diagrama de flujo de la activación y aplicación de la resina.

Tabla 2. 3 Propiedades importantes de la resina de intercambio iónico. (Adaptado de Zhao & SenGupta, 2000)

Nombre de la marca / Diseñador	XFS 4195 / DOW 3N
Grupo funcional: Bispicolilamina	
Matriz	Poliestireno, macroporoso
Tamaño (mm)	0.2-1.2
BET (Método Brunaver-Emmett-Teller)	139
Área superficial (m ² g ⁻¹)	
Densidad de cargas (cargas nm ⁻²)	12.9
Capacidad (meq g ⁻¹ seco)	3.0
Porosidad	0.29

2.5.7 Aplicación de los nanodendímeros regenerados.

Se prepararon 60 gramos de suelo contaminados con 200 mg/kg de cada uno de los cuatro metales: níquel, calcio, magnesio y cadmio. A continuación se seleccionaron las condiciones que mejores resultados mostraron en los ensayos con nanodendímeros nuevos y se aplicó las mismas en este ensayo. La solución de nanodendímero regenerado se puso en contacto con el suelo contaminado con los cuatro metales en la columna de lecho fijo. Luego de 48 horas, el efluente recolectado se sometió a espectrofotometría de absorción atómica y se cuantificó el porcentaje de remoción de cada metal.



Figura 2. 12 Soluciones de nanodendímeros regenerados en contacto con el suelo contaminado con 200 ppm de cada metal.

2.5.8 Influencia del potencial iónico en la extracción de cadmio usando el nanodendímero con grupo terminal carboxilo.

El desempeño del nanodendímero de generación media a una concentración de 0,1% se en presencia de NaCl. Se experimentó con tres concentraciones: 0,1 mM, 1mM y 10mM de NaCl. El diseño experimental fue completamente al azar (DCA) con tres repeticiones donde la variable dependiente fue el porcentaje de remoción de cadmio que fue obtenido como resultado de un balance de masa luego de medir la concentración final de cadmio en la solución de nanodendímeros aplicando espectrofotometría de absorción atómica.



Figura 2. 13 Evaluación del desempeño de los nanodendímeros con aplicación de potencial iónico de 10 mM de NaCl por triplicado.

2.5.9 Medición las interacciones de los metales níquel, calcio, cadmio y magnesio con grupos carboxílicos.

Se colocaron 10 gramos de suelo contaminado artificialmente con 100 mg/Kg de níquel, calcio, magnesio y cadmio, en una botella plástica de 500 mL de capacidad, se

adicionaron 20 mL de ácido acético 0,1M (pH=5). La suspensión fue agitada por 24 horas a temperatura ambiente. Se filtró la solución a través de papel filtro. El filtrado resultante se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 µm y el filtrado se analizó por espectrofotometría de absorción atómica. (Furukawa & Tokunaga, 2005) La concentración obtenida C_e en mg/L se consideró en el balance de masa que se muestra a continuación.

$$V_a * C_o + m * q_o = m * q_e + V_a * C_e$$

si $C_o = 0$, entonces

$$(q_o - q_e) = \frac{C_e * V_a}{m}$$

Ecuación 2. 7

$$\text{Porcentaje de remoción} = (q_o - q_e) * 100$$

Ecuación 2. 8

Donde m representa la masa del suelo; C_o , la concentración inicial del metal en el ácido acético; q_o , la concentración inicial del metal en el suelo; q_e , la concentración del metal 24 horas después; C_e , la concentración final del metal en el ácido acético y V_a , el volumen de ácido acético.

2.6 Análisis de datos.

El análisis fue realizado en el programa estadístico SPSS 15.0.

Para analizar los resultados de la digestión ácida se utilizó un análisis de varianza factorial a fin de evaluar el efecto individual y en conjunto de los factores: concentración

del metal en el suelo y tipo de ácido sobre la variable dependiente: porcentaje de remoción del metal.

Igualmente la aplicación de los nanodendímeros en la remoción de níquel, fue analizada con la ayuda de la varianza factorial. En este análisis se evaluó el efecto individual y conjunto de los factores concentración del metal en el suelo, concentración y grupo del nanodendímero sobre la variable dependiente: porcentaje de extracción del metal.

Para el análisis de los ensayos con varios metales se aplicó un ANOVA del diseño factorial, mientras que para los ensayos con distintas concentraciones de NaCl, se aplicó un ANOVA del diseño completamente al azar (DCA).

La evaluación del rendimiento de los nanodendímeros reutilizados, se realizó mediante el ANOVA del DCA. En este análisis se valoraron tratamientos con los metales níquel, calcio, magnesio y cadmio. El análisis del diseño experimental, fue realizado empleando gráficas de perfil a fin de observar la interacción entre factores.

Los balances de masa y gráficos descriptivos fueron realizados en el programa Excel de Microsoft Office 2007.