

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**EFEECTO DEL PRETRATAMIENTO DE BIOMASA
PROCEDENTE DE UN HÁBITAT EUTROFIZADO SOBRE
LA BIOADSORCIÓN DE METALES PESADOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
José María Lezcano Valverde

Bajo la dirección de los doctores
Felisa González González y Antonio Ballester Pérez

Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-1759-7**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE BIOMASA
PROCEDENTE DE UN HÁBITAT EUTROFIZADO
SOBRE LA BIOADSORCIÓN DE METALES
PESADOS**

José María Lezcano Valverde

DIRECTORES:

Dra. Felisa González González

Dr. Antonio Ballester Pérez

Madrid, Abril 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III

**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE BIOMASA
PROCEDENTE DE UN HÁBITAT EUTROFIZADO
SOBRE LA BIOADSORCIÓN DE METALES
PESADOS**

Memoria para optar al grado de
Doctor en Biología, presenta:

José María Lezcano Valverde

DIRECTORES:

Dra. Felisa González González
Dr. Antonio Ballester Pérez

Madrid, Abril 2008

El Dr. Antonio Ballester Pérez y la Dra. Felisa González González, Catedrático y Profesora Titular del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, hacen constar:

1º.- Que José María Lezcano Valverde ha realizado el trabajo titulado "EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE BIOMASA PROCEDENTE DE UN HÁBITAT EUTROFIZADO SOBRE LA BIOADSORCIÓN DE METALES PESADOS", en los laboratorios del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la citada Universidad.

2º.- Que como directores del trabajo, autorizan su presentación en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, para que quien lo ha realizado pueda obtener el grado de Doctor.

Y para que así conste, a los efectos de cumplir los trámites legales que procedan, firmamos el presente en Madrid, a dos de Abril de dos mil ocho.

Fdo. Dr. Antonio Ballester Pérez

Fdo. Dra. Felisa González González

*Dedicada a mis padres,
a mi hermana
y a Laura.*

"Hay hombres que luchan un día y son buenos, otros luchan un año y son mejores, hay quienes luchan muchos años y son muy buenos, pero están los que luchan toda la vida, y esos son los imprescindibles".

(Bertold Brecht)

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra forma, han contribuido a que esta Tesis sea una realidad, de forma muy especial:

Al Dr. Antonio Ballester, por la oportunidad brindada para la realización de esta tesis, así como por su valiosa orientación durante el desarrollo de la misma.

A la Dra. Felisa González, por ser, con su continuo asesoramiento y ayuda, una parte fundamental de esta tesis.

A los miembros del departamento de Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica, por el buen acogimiento mostrado conmigo.

A los miembros del departamento de Microbiología III, por acogerme en su programa de doctorado.

A la Dra. Isabel Pérez-Ruzafa, por su ayuda en la recolección e identificación de las biomásas.

A la Dra. María Luisa Blázquez, por su ayuda prestada en todo momento, en especial en el análisis e interpretación de muestras mediante Difracción de Rayos X

Al Dr. Jesús Ángel Muñoz, por su ayuda prestada en todo momento, en especial en el análisis de muestras mediante SEM.

Al Dr. Adil Hammaini, por su ayuda y por su asesoramiento sobre el manejo de la aplicación MATLAB.

A la Dra. Yasmína Mata y a Elena Torres, por su ayuda prestada en todo momento, especialmente en el análisis e interpretación de muestras mediante FTIR.

A mis compañeros de laboratorio, de tan diferentes nacionalidades, Yohana, Laura, Pedro, Esther, Elcy, Francisco, Segundo, Camino, Mauricio... y todos aquellos con los que tuve más o menos contacto, por su gran disponibilidad para ayudar en todo momento y por crear un ambiente multicultural, del que tanto he aprendido.

A mi madre, por ser siempre un ejemplo de autodisciplina y autosuperación, así como por su gran apoyo, sin el cual, esta tesis no hubiera sido posible.

A mi padre, por haber creído siempre en mí y demostrarme que, con sus casi tres carreras universitarias, siempre es posible seguir subiendo peldaños en la escalera del conocimiento.

A mi querida Laura, por ser esa luz que iluminó mi vida cuando todo parecía derrumbarse, dándome las fuerzas necesarias para terminar este trabajo.

A todos esos amigos que siempre estuvieron ahí, especialmente en los momentos más difíciles de mi vida.

A la gente que nunca creyó en mí, porque sin ellos, no hubiese podido sacar el coraje necesario para llegar hasta donde estoy.

CONTENIDOS

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1- El agua y el medio ambiente	2
1.2.- Los metales pesados	4
1.3.- La contaminación	7
1.3.1.- Contaminación del ecosistema	7
a) Contaminación terrestre	10
b) Contaminación atmosférica	10
c) Contaminación hídrica	10
1.3.2.- Contaminación por metales pesados	11
1.3.3.- Legislación	11
1.3.4.- Remediación de la contaminación por metales pesados	14
a) Métodos físico-químicos	14
b) Métodos biológicos	17
1.4.- Bioadsorción	19
1.4.1.- Biomosas utilizadas	20
1.4.2.- Metales pesados utilizados	26
1.4.3.- Isotermas de adsorción	27
1.4.4.- Mecanismos implicados en el proceso de bioadsorción	31
1.4.5.- Sistemas multimetálicos	33
1.4.6.- Desorción y reutilización de la biomasa	35
1.4.7.- Pretratamiento de la biomasa	37
1.5.- Justificación del trabajo	42
1.5.1.- Objetivo	42
1.5.2.- Plan de trabajo	44
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	48
2.1.- Biomasa	49
2.2.- Disoluciones metálicas	52
2.3.- Sistemática de experimentación	52
2.3.1.- Caracterización química de la biomasa	52

2.3.2.- Estudio de los factores que afectan al proceso de bioadsorción: pH y concentración de biomasa	53
2.3.3.- Isotermas de adsorción	55
2.3.4.- Sistemas bimetálicos	55
2.3.5.- Recuperación del metal adsorbido	56
2.3.6.- Pretratamiento de la biomasa	57
2.3.7.- Técnicas analíticas	58
a) Valoración ácido-base	58
b) Microscopía electrónica de barrido y microanálisis elemental	59
c) Espectroscopía de infrarrojos	59
d) Difracción de rayos X	60
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
3.1.- Estudio comparativo de la capacidad de adsorción de cuatro biomasa residuales	63
3.2.- Factores que influyen en la bioadsorción	64
3.2.1.- Influencia del pH	65
3.2.2.- Influencia de la concentración de biomasa	68
3.2.3.- Cinética de adsorción	70
3.3.- Isotermas de adsorción	74
3.4.- Caracterización de los centros activos de bioadsorción	81
3.4.1.- Análisis por espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR).....	81
3.4.2.- Valoración ácido-base de la biomasa.....	86
3.5.- Sistemas bimetálicos.....	88
3.5.1.- Cinética de adsorción.....	90
3.5.2.- Isotermas de adsorción.....	91
3.6.- Desorción.....	98
3.6.1.- El ácido clorhídrico como desorbente.....	106
3.6.2.- El carbonato sódico como desorbente.....	108
3.7.- Pretratamiento de la biomasa.....	114
3.7.1.- Elección de los agentes pretratantes.....	115
3.7.2.- Optimización del pretratamiento.....	117

3.7.3.- Detección de posibles precipitados metálicos originados por el pretratamiento.....	131
3.7.4.- Cuantificación de la biomasa perdida en el pretratamiento.....	136
3.7.5.- Isotermas de adsorción.....	138
3.7.6.- Caracterización de la biomasa pretratada.....	150
a) Análisis por espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR).....	151
b) Valoración ácido-base	159
c) Determinación mediante SEM de posibles cambios morfológicos en la superficie de la biomasa	164
d) Microanálisis elemental.....	167
4.- CONCLUSIONES.....	180
5.- BIBLIOGRAFÍA.....	188

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- El agua y el medio ambiente

El agua cubre aproximadamente el 70 % de la superficie del planeta Tierra y está presente en todos los espacios del medio ambiente (atmósfera, geosfera, biosfera e hidrosfera), ocupando un volumen total de 1.384 millones de Km^3 de los cuales el 97,4 % se encuentra en los océanos y sólo el 2,6 % en forma de agua dulce. La mayor parte de este agua dulce está contenida en los glaciares ($27,8 \times 10^6 \text{ Km}^3$), las aguas subterráneas ($8,3 \times 10^6 \text{ Km}^3$), las aguas de superficie (ríos y lagos) (225.000 Km^3), la atmósfera (12.700 Km^3) y los seres vivos (400 Km^3) (Dajoz, 2002).

Los ecosistemas de agua dulce se pueden dividir en dos categorías: los ambientes lóticos en los que el agua corre, como es el caso de los ríos, y los ambientes lénticos caracterizados porque el agua está en calma, como es el caso de lagos y lagunas o, incluso, los embalses. La conexión entre ambos ambientes podría encontrarse en los ríos de curso muy lento y en sus brazos muertos. Los ecosistemas de agua salada están constituidos por mares y océanos los cuales ocupan más del doble de la superficie de las tierras emergidas, siendo la profundidad media de los océanos de 3800 m (Dajoz, 2002).

El agua de la superficie del planeta no se encuentra en un estado de reposo, sino que está en continuo movimiento constituyendo el medio por el que los elementos químicos y otros materiales viajan a través del ecosistema permitiendo, así, la persistencia de la vida sobre la tierra. Este movimiento, que es denominado “ciclo del agua” (Figura 1), comienza con la condensación del vapor que circula por la atmósfera y retorna a la tierra en forma de precipitación. Una parte del agua que cae sobre el suelo terrestre queda retenida entre los poros de la tierra, debido a las fuerzas de capilaridad, pasando de nuevo a la atmósfera, directamente, por evaporación o bien a través de las plantas, mediante transpiración. Otra parte, se infiltra en profundidad hasta llegar a la capa freática quedando recogida como agua subterránea y pudiendo salir a las fuentes y riachuelos o ser extraída por el hombre para sus actividades; luego, es liberada a los ríos. El agua que cae sobre los núcleos urbanos no se infiltra sino que es canalizada a través de acequias y canales hasta los ríos. Desde los sistemas acuáticos el agua se evapora de nuevo pasando a la atmósfera y cerrando el ciclo (Margalef, 1991; Smith & Smith, 2000).

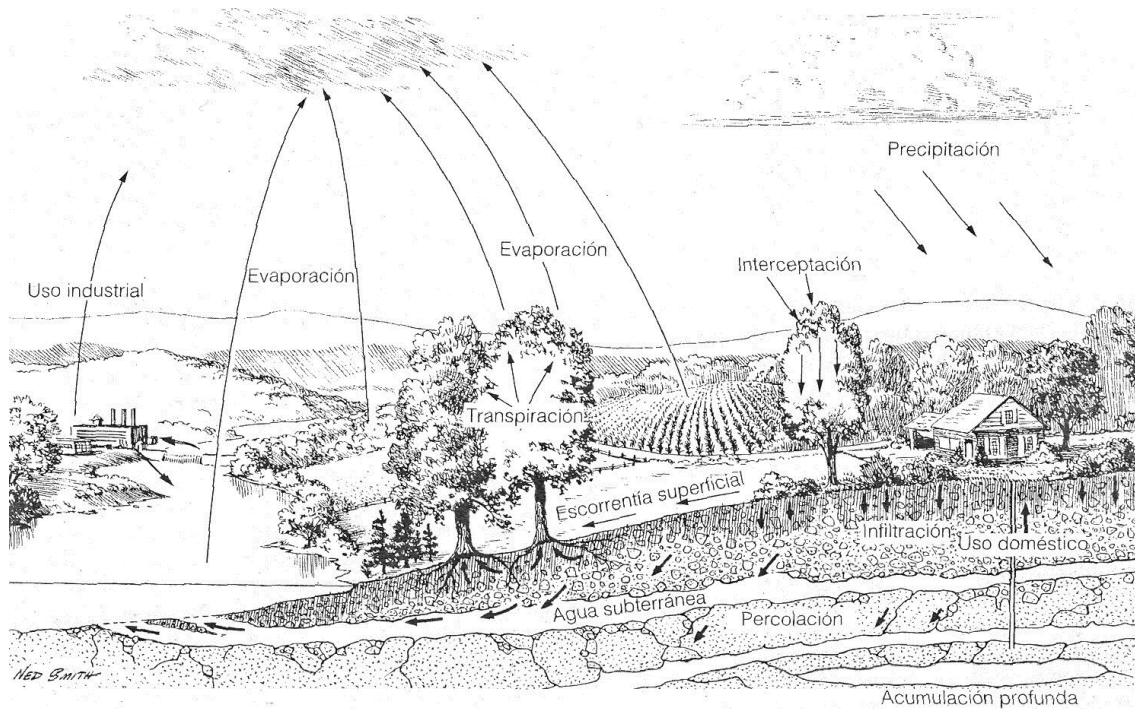


Figura 1.- Ciclo del agua a escala local. Se muestran las principales vías de circulación del agua.

La importancia del agua en el ecosistema radica en su efectividad como medio de transporte de energía y materia entre las diferentes esferas del medio ambiente. Destacan, por ejemplo, la lixiviación de componentes solubles de minerales, el transporte de nutrientes en las plantas o el transporte de la energía solar que, al ser absorbida en los océanos, puede llegar, en forma de calor latente, desde regiones tropicales a zonas más frías generándose, así, tormentas masivas.

La materia viva está fuertemente hidratada (en el caso del ser humano el agua es el principal componente) constituyendo el 70 % del peso total al nacer y el 60 % en edad adulta. De la totalidad del agua en el organismo, el 60 %, aproximadamente, está en el interior de las células (agua intracelular) y el resto es el agua que circula por los vasos sanguíneos y linfáticos y la que baña los tejidos (agua extracelular) (Margalef, 1991).

La mayor parte de las reacciones químicas imprescindibles para la vida se dan entre sustancias disueltas en medio acuoso, como es el caso de las reacciones de metabolismo. En las reacciones de catabolismo las células del organismo oxidan los nutrientes produciendo energía y liberando CO_2 y H_2O ; esta agua producida es denominada agua metabólica y es aprovechada por muchos animales adaptados a condiciones de escasez de la misma (Margalef, 1991).

El equilibrio hídrico de un organismo está estrechamente relacionado con su equilibrio térmico siendo difícil explicar el uno sin el otro. El sudor, por ejemplo, es un mecanismo por el cual algunos animales reducen su calor corporal generado por la liberación de energía en el metabolismo durante una actividad intensa. Este calor es empleado en el proceso de evaporación del agua contenida en el sudor, sin aumento de temperatura, al ser asimilado en forma de calor latente de vaporización (Smith & Smith, 2000).

El agua, además de imprescindible para el ser humano como parte de la alimentación, también es usada por éste para múltiples usos. En la pequeña y gran industria, se usa para producir energía, riego, refrigeración, lavado, como disolvente y como materia prima.

1.2.- Los metales pesados

El término “metales pesados” es empleado de forma genérica para definir a un conjunto de elementos químicos a los cuales se les atribuye diferentes efectos de contaminación, toxicidad y/o ecotoxicidad. A pesar de que existen diversas definiciones en la bibliografía para estos elementos en base a su densidad o masa atómica, hasta el presente no existe una definición generalmente aceptada, que provenga de alguna sociedad científica u organismo referente de alto nivel; no obstante, algunas fuentes bibliográficas consideran metales pesados no sólo a distintos elementos tales como los propios metales (excepto alcalinos y alcalino-térreos), sino también a los semimetales y, en ocasiones, a algunos de sus compuestos o, incluso, algún no metal. De forma común, se suele considerar metales pesados a los siguientes: aluminio, arsénico (semimetal), bario, berilio, cadmio, cobalto, cobre, cromo, estaño, hierro, manganeso, mercurio, molibdeno, níquel, plata, plomo, selenio (no metal), talio, vanadio y zinc (Hawkes, 1997; Duffus, 2002).

El término “metales pesados” en el contexto de la ecología, habitualmente, se relaciona con la contaminación del medio ambiente y con la toxicidad que provocan en los seres vivos. No obstante, es necesario aclarar que, además, de su efecto negativo, en determinados casos, juegan un papel imprescindible para la vida. A continuación, se recoge una serie de efectos que, tienen los metales pesados con los que se ha trabajado

en esta Tesis sobre los seres vivos (Margalef, 1991; Barceló et al., 1992; Dajoz, 2002; Sancho et al., 2003):

Cadmio

➤ Este metal, dada su elevada toxicidad, no se ha encontrado en ninguna forma de vida conocida.

Cobre

- Forma parte de los pigmentos respiratorios de moluscos y crustáceos.
- Las larvas Veliger de las ostras necesitan cobre para fijarse al sustrato.
- Determinados organismos, como los lamelibránqueos, acumulan cobre haciéndoles tóxicos si se destinan al consumo.
- Participa en procesos enzimáticos de las plantas, principalmente en la formación de la clorofila.
- La carencia de cobre provoca necrosis en el ápice de las hojas jóvenes o clorosis.

Níquel

➤ Tiene un papel fundamental en los seres humanos interviniendo en procesos tales como la regulación de la presión arterial, el aumento de la acción de la insulina y el crecimiento, entre otros.

Zinc

➤ Los organismos acuáticos toman activamente zinc; no obstante, es tóxico a ciertas concentraciones; por ejemplo a 4-6 mg/L es fatal para *Salmo gairdneri*. Por otro lado *Polytoma*, *Euglenas* y algunas larvas de insecto resisten altas concentraciones de este elemento.

➤ En plantas, la carencia de este elemento da lugar a enfermedades tales como la clorosis, retardo en el crecimiento o daños en floración y fructificación.

Asimismo, los metales pesados tienen un papel fundamental en la economía al ser usados ampliamente por diferentes industrias como materia prima. A continuación, se recopilan los principales usos y aplicaciones a los que se destinan dichos cinco metales (A. Ramírez, 2002; Sancho et al., 2003):

Cadmio

- Es utilizado como pigmento en la fabricación de diferentes tipos de pinturas.
- Es un componente fundamental en la fabricación de determinados tipos de pilas y baterías.
- El telururo de cadmio es un material semiconductor que es utilizado para la fabricación de células fotovoltaicas como alternativa al silicio.

Cobre

- Debido a sus excelentes propiedades como conductor de la electricidad, casi el 50 % del consumo mundial es para este propósito.
- Es un excelente conductor térmico por lo que, también, es empleado en la fabricación de vasijas y tuberías de intercambio térmico.
- Un 30 % del cobre se emplea en la fabricación de aleaciones, principalmente el bronce. Además, debido a su gran resistencia a la corrosión, es empleado en la industria química, alimentaria, automovilística, naval y de equipos de medida.
- En la construcción se emplea en la fabricación de tuberías y recubrimientos. También se utiliza en la fabricación de pigmentos metálicos y de fungicidas.

Níquel

- El 60 % de la producción mundial, es utilizada en la fabricación de aceros inoxidables, otras aleaciones y recubrimientos.
- Los sectores de la industria en los que se usa el níquel son: construcción mecánica, del automóvil, química, electrónica, construcción, petrolera, aeroespacial, moneda y sales del metal.

Plomo

➤ El principal uso es en la fabricación de baterías para la automoción. No obstante, tiene gran importancia en la industria de pinturas, en la fabricación de tubos para conducciones de agua, en el recubrimiento de cables y en la producción de aleaciones de plomo como metal de soldadura. Además, también se emplea como aditivo de maquinabilidad para aceros y latones, en la fabricación de perdigones, en el equilibrado de ruedas, lastres, protectores frente a radiactividad, etc.

➤ De forma tradicional, este metal se ha utilizado para aumentar el octanaje de la gasolina, aunque hoy en día este uso está en regresión dada la gran contaminación que produce.

Zinc

➤ Principalmente, es utilizado para la galvanización y recubrimiento del acero. El resto de la producción es empleada en la fabricación de aleaciones, como latones y bronces, pigmentos de pinturas y productos químicos

➤ De la totalidad de la producción mundial, que es de 5 millones de toneladas anuales, el 45 % es destinado, en función de sus usos finales, a la construcción, al transporte (25 %), a la maquinaria y equipo (11 %), a infraestructuras públicas (10 %) y a la construcción de baterías eléctricas y otros usos (9 % restante).

1.3.- La contaminación

1.3.1.- Contaminación del ecosistema

El ecosistema puede ser definido como el conjunto de las condiciones del ambiente, de los organismos y de sus propias interrelaciones. No es posible la vida de un organismo de forma aislada al depender de otros organismos, así como de las condiciones que se dan a su alrededor, denominando a este conjunto complejo ecológico (Capó, 2002).

Un ecosistema puede equipararse a un ser vivo con equilibrio biológico, el cual puede estar amenazado por la irrupción no habitual de factores propiamente biológicos, químicos y/o físicos. El término polución haría referencia a esa irrupción de factores en

el entorno capaces de afectar a las condiciones del biotopo. La polución puede afectar, por tanto, al equilibrio de un sistema ecológico alterando los mecanismos defensivos tanto del biotopo como de su biocenosis. Asimismo, el término polución puede ser interpretado desde el punto de vista legal, el cual haría referencia a que un medio determinado se considere inapropiado para un determinado uso (Margalef, 1991; Capó, 2002).

La ecotoxicología es la ciencia encargada de estudiar la polución, su origen, evolución e interacciones con las moléculas que integran dinámicamente los ecosistemas, y sus acciones y efectos sobre los seres vivos que forman estos ecosistemas. Los estudios ecotoxicológicos se componen de tres secuencias (Capó, 2002):

- La eliminación del contaminante, su formación, factores que influyen en su difusión, etc.
- Ingreso de los contaminantes en el medio biológico.
- Calificación y cuantificación de los efectos patológicos entre los seres vivos y sus ecosistemas.

La polución suele asimilarse a la actividad humana, llegando a confundirse industria y polución; no obstante, no todas las industrias son contaminantes. También existe polución de origen natural, como tormentas de arena, erupciones volcánicas, etc. (Capó, 2002).

Por tanto, por contaminante se entiende toda sustancia presente en una concentración mayor de lo habitual, teniendo efectos perjudiciales sobre el medio ambiente. Algunos de estos contaminantes causan sólo desviaciones en la composición normal del medio ambiente, pero otros pueden modificarlo drásticamente. Atendiendo a su naturaleza química, los contaminantes se suelen agrupar según sea la fuente de contaminación, el medio receptor o el impacto ambiental causado (Tabla 1) (Capó, 2002).

Tabla 1.- Clasificación de los contaminantes.

Según su fuente de procedencia	
Agricultura y ganadería	Biocidas, CH ₄ , NH ₃ , H ₂ S, N ₂ O, NO ₃ ⁻ , HPO ₄ ²⁻ , compuestos orgánicos volátiles (COV), purinas
Generadoras de electricidad	CO, CO ₂ , NO _x , SO _x , UOX, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)
Transporte	HC, CO, CO ₂ , NO _x , SO _x , PAH, COV, dioxinas, peroxi acetil nitratos (PAN), O ₃ , Pb
Minería	SO _x , NO _x , CO, CO ₂ , CN ⁻ , aguas ácidas
Metalurgia	COV, aguas ácidas, disolventes
Industria química y electrónica	COV, CN ⁻ , disolventes, demanda química de oxígeno (DQO), CO, CO ₂ , NO _x , SO _x , cloro fluoro carbonos (CFC), H ₂ S, NO ₂ ⁻ , SO ₃ ²⁻
Tratamiento de residuos	CO ₂ , CH ₄ , SO _x , NO _x , dioxinas, COV, bifenilos policlorinados (PCB), DQO, PAH.
Fuentes naturales (erupciones volcánicas e incendios forestales)	Hidrocarburos (HC), COV, CO, CO ₂ , NO _x , N ₂ O, H ₂ S, NH ₃ , CH ₄ , CH ₃ Cl, HCl
Según medio receptor	
Contaminantes atmosféricos (Compuestos volátiles)	CO, CO ₂ , NO _x , SO _x , O ₃ , PAN, NH ₃ , HCl, CFC, CH ₄ , N ₂ O, C _x H _x Cl ₂ (x=1 ó 2), CH ₃ Br
Contaminantes urbanos	CO, CO ₂ , NO _x , SO _x , O ₃ , HC, COV, PAH, dioxinas, Pb, HCl
Contaminantes en interiores	CO, NO _x , SO _x , O ₃ , COV, asbestos
Contaminantes del agua (disueltos o en suspensión)	CH ₃ Hg ⁺ , detergentes, CN ⁻ , HPO ₄ ²⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , biocidas, SO ₃ ²⁻ , HS ⁻ , aguas ácidas y básicas
Contaminantes marinos (disueltos o en suspensión)	HC, tributilo de estaño (TBT), COVs (DDT, PCB, etc), PAH, HPO ₄ ²⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻ , NO ₃ ⁻
Contaminantes del suelo	CH ₃ Hg ⁺ , biocidas, HC, NO ₃ , COVs, PAH, Na ⁺ , vertidos ácidos
Según los impactos ambientales ocasionados	
Efecto invernadero	CO ₂ , CH ₄ , CFC, hidro cloro fluoro carbonos (HCFC), O ₃ , N ₂ O, CH ₃ Cl, CCl ₄
Acidificación (incluidas lluvias ácidas)	SO _x , NO _x , HCl, NH ₄ ⁺
Destrucción del ozono estratosférico	CFC, CCl ₄ , halones, N ₂ O
Formación de "somog" en centros urbanos e industriales	NO _x , SO _x , HC, O ₃ , Pb, CO, PAN, COV, PAH
Eutrofización	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , DQO
Toxicidad humana	NH ₄ ⁺ , CO, Br ⁻ , CN ⁻ , PO ₄ ³⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₂ , NO _x , COV, biocidas, PAH
Ecotoxicidad (abarca a los contaminantes que presentan efectos negativos en los ecosistemas acuáticos y terrestres)	COV, PAH, biocidas

Dentro de la contaminación de los ecosistemas terrestre, atmosférico e hídrico, se encuentran diferencias significativas (Capó, 2002):

a) Contaminación terrestre

Son varios los factores que influyen en el deterioro del suelo:

- Sistemas de utilización inadecuados.
- Estado y situación previa del suelo.
- Conflictos socio-económicos: incendios, incorporación de biocidas, metales pesados, plásticos, etc.

b) Contaminación atmosférica

Los contaminantes aéreos pueden encontrarse en forma de gas y de partículas sólidas y líquidas. Están sujetos a fenómenos estocásticos y meteorológicos (impredecibles).

c) Contaminación hídrica

El agua puede contener dos formas de sustancias contaminantes: disueltas y en suspensión. Actualmente, las condiciones para la calidad del agua van encaminadas a su potabilidad, así como a salvaguardar el equilibrio ecológico. Dentro de los contaminantes acuáticos más importantes del agua cabe destacar los detergentes sintéticos y los metales, dada la facilidad que tienen algunas especies para concentrarlos.

La fragilidad del medio acuático deriva principalmente de su elevado poder disolvente para una gran gama de productos de deshecho, así como de su gran poder de transporte para la evacuación de materiales de muy diversa índole, tanto en estado sólido como líquido o gaseoso, bien sea en suspensión, disolución o flotación.

Las consecuencias de la degradación del medio acuático se manifiestan fundamentalmente de dos formas: pérdida de la calidad intrínseca o natural y la

disminución o agotamiento de los recursos. Los resultados son semejantes puesto que en ambos casos pueden provocar un déficit de los caudales disponibles.

1.3.2.- Contaminación por metales pesados

Una forma de polución química consiste en la aportación de metales pesados al ecosistema procedentes, principalmente, de vertidos industriales y de explotaciones mineras.

Los metales pesados más tóxicos son cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo y zinc. La importancia de este tipo de tóxicos radica en la tendencia a ser acumulados y concentrados por las distintas especies, siendo más peligrosos a medida que se asciende en la cadena evolutiva hacia el hombre (Margalef, 1991; Capó, 2002). En la Tabla 2 se muestran los efectos negativos de diferentes metales pesados en la salud humana (MOPU, 1982; Forster et al., 1997).

En el caso del medio acuático, los metales pesados se encuentran entre los contaminantes más preocupantes debido a que son extraños a este tipo de ecosistema, provocando daños en los organismos más sensibles tales como la inhibición de la fotosíntesis en el fitoplancton, la inhibición del crecimiento y desarrollo del zooplancton y de los primeros estadios de desarrollo de otras formas de vida. Asimismo, los metales pesados se combinan con hidrocarburos procedentes de vertidos de petróleo agravando la acción de estos últimos. Bajo la influencia de la contaminación por metales pesados solamente son capaces de sobrevivir organismos particularmente resistentes como, por ejemplo, algunas diatomeas, euglenales y clorofíceas (Margalef, 1991; Smith & Smith, 2000).

1.3.3.- Legislación

Desde la existencia de epidemias provocadas por los metales pesados, se hizo necesaria la elaboración de leyes por parte de las autoridades competentes, para asegurar la protección contra la contaminación del suministro público y privado del agua.

En la Unión Europea la contaminación del medio acuático por sustancias tóxicas, incluyendo metales pesados, estuvo controlada mediante la directiva 76/464/CEE del 4 de Mayo de 1976, la cual definía dos tipos de contaminantes divididos en dos listas: la lista I (o lista negra), que englobaba a aquellos compuestos altamente tóxicos, persistentes y bioacumulativos, tales como el mercurio, plomo y cadmio, cuya eliminación debe ser prioritaria; y la lista II (o lista verde), que englobaba a aquellos compuestos perjudiciales para el medio ambiente, pero en menor grado que los anteriores, como por ejemplo el cromo, cobre, níquel y zinc.

Tabla 2.- Efecto negativo de los metales pesados en la salud humana.

Metal Pesado Contaminante	Efectos en la salud humana
As	Fiebre, prurito, altragias, trastornos en el sistema nervioso central (adormecimiento, temblores, parálisis de pies), náuseas, vómitos, diarrea, heptomagalia e ictericia
Cd	Dolor de cabeza, vértigo, irritabilidad, alteraciones gastrointestinales, vómitos, dolor abdominal, dolor de pecho intenso, deficiencia respiratoria, hemoptisis, fiebre, transpiración profusa, prostración, pneumonitis, edema pulmonar, rinofaringitis, epistaxis, ulceraciones y atroñas mucosales, anospáticas, anemia, fibrosis y enfisema pulmonar
Cr	Trastornos gastrointestinales (anorexia, náuseas, gastritis hipertrófica, úlcera duodenal y colitis), pulmonares (dolor en el pecho, bronquitis, pneumonitis química, cromitosis, carcinoma broncogénico de pulmón), en piel (úlceras en manos, uñas y articulaciones, dermatitis <i>chrome holes</i>) y ojos (conjuntivitis)
Cu	Rigidez, disartria, disfagia, temblor, falta de coordinación, movimientos coreoatéticos y ataxia, insuficiencia hepática, afecciones oculares (anillo de Kayser-Fleischer)
Hg	Trastornos gastrointestinales (aumento de la salivación, estomatitis, gingivitis, anorexia, náuseas, vómitos y diarrea), respiratorios (rinitis, anosmia, tos y fiebre), en piel (lesiones vesiculares y papulares eritomasos) y oculares (mercurialentis y constricción de los campos visuales)
Pb	Palidez, debilidad, pérdida de peso, lasitud, malnutrición, trastornos en el sistema nervioso central (perturbaciones visuales, dolor de cabeza, vértigo, nerviosismo, depresión, insomnio, hemorragias retinianas, neuritis del nervio óptico), gastrointestinales (sabor metálico, aumento de salivación, ribete de burlón, piorrea, anorexia, náuseas, vómitos, estreñimiento, cólico abdominal)
Zn	Afecciones gastrointestinales (irritación con fiebre, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, sabor metálico en la boca), respiratorios (garganta seca, tos, dolor en el tórax, edema pulmonar) coronarios (taquicardia, hipertensión)

La directiva anterior fue actualizada por la política del agua de la Unión Europea, con la directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y el Consejo del 23 de Octubre de 2000. Esta directiva exigía la adopción de medidas, a nivel comunitario, con el fin de controlar la contaminación del medio acuático, por parte de compuestos que presentan un riesgo significativo, con el fin de garantizar, en un plazo de veinte años, la interrupción o supresión gradual de los vertidos, emisiones o pérdidas de los mismos, así como la reducción en el caso de los menos tóxicos. No obstante, puede haber variaciones entre los países en cuanto a los valores límite de emisión de contaminantes.

La última actualización de la directiva 76/464/CEE viene recogida en la directiva 2006/11/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 15 de Febrero de 2006. En esta nueva directiva se refleja la necesidad de eliminar la contaminación causada por los vertidos de sustancias de la lista I reduciendo, asimismo, la procedente de productos de la lista II. En esta directiva se incluyen las siguientes consideraciones:

Todo vertido efectuado en aguas, tanto continentales como de mar, que puedan contener alguna sustancia de la **lista I**, requerirá una autorización expedida por la autoridad competente. Esta autorización, que tendrá un periodo de validez limitado, fijará las normas de emisión, teniendo en cuenta la concentración y cantidad máxima de una sustancia admisible en los vertidos. Cuando el autor del vertido declare que le es imposible cumplir las normas de emisión, o en el caso de comprobarse esta imposibilidad por parte de la autoridad competente, la autorización será denegada.

La reducción de la contaminación de aguas por las sustancias de la **lista II** será llevada a cabo mediante el establecimiento, por parte de los estados miembros, de programas que incluirán la normativa de calidad medioambiental, disposiciones específicas o relativas a la composición y al empleo de sustancias, grupo de sustancias o productos, teniéndose en cuenta también los progresos técnicos más recientes económicamente viables. Todo vertido que pueda contener una sustancia de la lista II requerirá también una autorización previa cuya normativa estará sujeta a las normas de calidad medioambiental establecidas en estos programas.

1.3.4.- Remediación de la contaminación por metales pesados

El tratamiento de las aguas residuales tiene una doble finalidad; por un lado, cumplir la legislación vigente y, por otro, siempre que sea posible, reutilizar dichas aguas.

Los tratamientos de aguas residuales están basados en procesos de separación mediante los cuales, a partir de una mezcla de sustancias, se obtendrían dos o más productos de composición distinta. El proceso de separación destinado al tratamiento de un agua residual puede variar en función del metal contaminante y de la concentración del mismo.

Desde el punto de vista de la naturaleza del proceso de tratamiento, se pueden distinguir métodos físico-químicos, utilizados de forma tradicional, y métodos biológicos, como alternativa a los primeros.

a) Métodos físico-químicos

Son métodos de separación basados en las diferentes propiedades físicas o químicas de los componentes de la disolución a tratar. Convencionalmente, los métodos utilizados para la descontaminación de aguas residuales con metales pesados, incluyen alguno de los siguientes procesos: precipitación química, filtración, sedimentación, flotación, cementación, ósmosis inversa, electrodiálisis, diálisis, resinas de intercambio iónico, adsorción en carbono activo, extracción con disolventes, dilución y recuperación por vapor. A continuación, se detallan brevemente algunos de estos procesos.

Precipitación química

Es la técnica más ampliamente utilizada para la recuperación metálica. Este proceso está condicionado por el pH, la concentración metálica y los aniones presentes en el agua a tratar. El método consiste en la adición de un reactivo iónico a la disolución metálica, con el fin de que se combine con el catión metálico formando un compuesto insoluble. La limitación principal de este proceso es la gran cantidad de lodos que se generan, de los cuales es económicamente inviable la recuperación de los metales (Poncet, 1996; Ballester et al., 2003; Volesky, 2003).

Separación de sólidos

Tras los procesos de floculación, los sólidos en suspensión se deben separar de la corriente residual con técnicas como sedimentación, flotación, centrifugación o filtración. Estas técnicas se suelen usar de forma combinada con el fin de optimizar los procesos, incluyendo las siguientes etapas: 1) Sedimentación o flotación, 2) clarificación de la corriente obtenida y 3) deshidratación del sólido obtenido.

Cementación

Es uno de los métodos más comunes para precipitar un metal a partir de una disolución. El proceso se basa en la transferencia de electrones de un metal hacia otro como consecuencia de su diferente actividad electroquímica. De esta forma, a una disolución de un metal, se añade otro metal cuyo potencial electrónico es de menor valor, por lo que actuará de donador de electrones desplazando por precipitación al metal originalmente disuelto.

Ósmosis inversa

Consiste en forzar el paso del agua a través de una membrana semipermeable de acetato de celulosa o poliamida porosa, la cual permite el paso únicamente de dicho agua aumentando, por tanto, la concentración metálica en el compartimiento previo a la membrana (Manahan, 1994).

Electrodialisis

Es un proceso de separación que consiste en aplicar una corriente eléctrica continua a través de una masa de agua dividida en varios compartimentos verticales por medio de membranas alternativamente permeables para cationes y aniones, de tal forma que los cationes migran hacia el cátodo y los aniones hacia el ánodo concentrándose ambos tipos de iones en su compartimiento específico (Manahan, 1994).

Intercambio iónico

Este proceso consiste en la sustitución de los iones de un material insoluble (resina) por iones de una especie metálica en disolución. Los intercambiadores de iones operan, generalmente, en columnas de lecho compacto de flujo descendente. La resina, una vez agotada, se lava a contracorriente para eliminar los sólidos atrapados siendo, posteriormente, regenerada con un ácido o una base fuertes, según si son resinas de intercambio catiónico o aniónico, respectivamente.

Este proceso tiene una limitación importante ya que los lechos se obturan por los sólidos suspendidos en los fluidos a tratar, así como por el crecimiento bacteriano, disminuyendo la capacidad de carga (Manahan, 1994). Asimismo, a pesar de que es un proceso muy efectivo, no es válido para tratar grandes volúmenes debido a su alto coste (Volesky, 2003).

Adsorción

Consiste en un fenómeno superficial que tiene lugar entre una fase fluida y otra sólida. En este proceso se distinguen dos elementos: la especie adsorbida o adsorbato y la sustancia sólida o adsorbente. Un buen adsorbente deberá tener una adecuada relación superficie/volumen, siendo el carbono activo el más usado en la actualidad. Este proceso contempla las etapas de: carga del soluto, lavado y descarga o elusión, donde el material se regenera para el siguiente ciclo. Su limitación es el elevado coste tanto para su obtención como para su regeneración periódica, dada la gran cantidad de energía que consumen estos procesos (Ballester et al., 2003).

Extracción con disolventes

Este método consiste en la transferencia, selectiva y eficaz, de determinadas especies iónicas presentes en disolución acuosa a un disolvente orgánico.

El proceso se lleva a cabo mezclando la disolución acuosa, conteniendo el metal de interés, con un disolvente orgánico, el cual contiene un determinado reactivo. El metal de interés reaccionaría con ese reactivo formando un compuesto químico que es más

soluble en la fase orgánica quedando, por tanto, en ésta. Para recuperar el metal extraído, se mezcla la fase orgánica cargada con el metal con una nueva fase acuosa cuya composición es capaz de destruir el compuesto químico formado por el metal y el reactivo, pasando dicho metal a la fase acuosa en forma pura y concentrada (Ballester et al., 2003).

b) Métodos biológicos

A pesar de que los métodos físico-químicos han sido los más utilizados en las últimas décadas para la separación de metales pesados, tienen múltiples desventajas. La principal de ellas es la gran producción de lodos, por lo que transforman la contaminación del agua en otro problema asociado con la eliminación de los desechos sólidos generados. Asimismo, estos métodos resultan poco efectivos o muy caros a concentraciones metálicas bajas (0-100 mg/L) siendo todavía algunos metales, a estas concentraciones, extremadamente tóxicos para el medio ambiente.

Recientemente, el uso de materiales biológicos (biomasas) ha abierto nuevas expectativas para el tratamiento de las aguas residuales, ya sea el objetivo la eliminación de metales contaminantes o la recuperación de metales valiosos de las mismas (Volesky, 1990). El estudio de la aplicabilidad de estos métodos biológicos tendría como finalidad el evitar los problemas ambientales, económicos y técnicos, asociados al uso de métodos físico-químicos. Entre los métodos biológicos más conocidos se pueden distinguir dos grupos:

El primero estaría formado por aquellos métodos basados en la actividad biológica de los organismos que componen la biomasa siendo necesario, por tanto, el uso de organismos con vida, así como el uso de condiciones de manejo que aseguren la misma. En este grupo se incluyen la bioacumulación, la biomineralización, la biotransformación y la quimiosorción mediada por microorganismos.

El segundo grupo estaría formado por los métodos que son independientes de la actividad biológica pudiendo, por tanto, emplearse biomasa muerta con la ventaja de poder suprimir la metodología necesaria para mantenerla viva. En este grupo se incluye, principalmente, la bioadsorción.

A continuación, se detalla más ampliamente cada uno de estos métodos.

Bioacumulación

Es un mecanismo celular basado en un sistema de transporte de membrana mediante el cual el metal pesado es incorporado a la célula con un cierto gasto de energía (aprox. 63 KJ/mol). Una vez en el citoplasma, el metal puede ser secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos, denominadas metalotioneínas, o bien ser englobado en una vacuola (Lovley, 2000; Vullo, 2003). La limitación de este mecanismo es la baja tolerancia del microorganismo a altas concentraciones metálicas. Asimismo, el rendimiento de la bioacumulación es relativamente pequeño; generalmente, se bioacumula una cantidad inferior al 0,5 % del peso seco de la biomasa (Macaskie, 1990).

Biom mineralización

Mediante este mecanismo determinados microorganismos son capaces de precipitar metales pesados en forma de carbonatos o hidróxidos. Suele estar basado en una bomba que expulsa el metal tóxico a costa de incorporar protones, creando así una alcalinización en la superficie celular que provoca la precipitación del metal. Otro mecanismo posible es la precipitación de metales como resultado de alguna actividad enzimática, en forma de sulfuros o fosfatos (Wang et al., 1997; Gadd, 2000; Lovley, 2000; Sharma et al., 2000; Vullo, 2003).

Biotransformación

Involucra un cambio en la naturaleza química del metal pesado, principalmente en su estado de oxidación o metilación, el cual da como resultado compuestos poco solubles en el agua o incluso volátiles. El ejemplo más claro es la biotransformación del mercurio por *Pseudomonas aeruginosa* la cual es capaz de reducir el catión Hg^{2+} a Hg^0 (Lovley, 2000; Srinath et al., 2002; Vullo, 2003).

Quimiosorción mediada por microorganismos

Este proceso consiste en una serie de reacciones, llevadas a cabo por microorganismos, encaminadas a la formación de un depósito primario, que actúa como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización (Lovley, 2000; Vullo, 2003).

Bioadsorción

Se trata de un tipo particular del proceso de adsorción comentado anteriormente, con la particularidad que en este caso el material adsorbente es de origen biológico, por lo que, dada la complejidad de estos materiales, el proceso de recuperación metálica puede ser más complicado que la adsorción sobre materiales no biológicos como carbón activo o resinas de intercambio (Volesky, 2003).

El proceso de bioadsorción, en los últimos años, ha sido ampliamente estudiado en la biorremediación de efluentes contaminados con diversos metales pesados. Consiste en la fijación de metales pesados que se encuentran en disolución acuosa sobre la superficie de una determinada biomasa. Esta fijación puede ser como adsorción física, la cual es debida a fuerzas de atracción débiles como las de Van der Waals, como adsorción química, debido al establecimiento de enlaces que implican intercambio de electrones y, por último, como intercambio de cationes, que se da entre los iones metálicos y los iones o protones de los grupos funcionales de la superficie de la biomasa. Este proceso es independiente de la actividad metabólica, lo que permite minimizar costes al no requerir la adición de nutrientes al sistema (Rossi, 1990; Vullo, 2003). Este proceso por ser central en el desarrollo de esta Memoria, será descrito en profundidad en el siguiente apartado.

1.4.- Bioadsorción

Puede ser considerada como una alternativa viable a los métodos físico-químicos utilizados en la actualidad para la recuperación o eliminación de metales pesados disueltos en efluentes líquidos. Su principal atractivo, desde el punto de vista industrial, es su escaso coste debido a la gran abundancia, fácil obtención y bajo precio del

material bioadsorbente. Asimismo, la aplicación de este proceso permite evitar los problemas secundarios asociados a los métodos habituales como son, por ejemplo, la generación de grandes cantidades de lodos tóxicos. Por último hay que destacar que la bioadsorción es muy efectiva en el tratamiento de concentraciones metálicas de rango inferior a 100 mg/L, donde la aplicación de los métodos físico-químicos no es técnica y económicamente factible (Volesky, 2003).

En los siguientes apartados se describirá el estado actual de la bioadsorción teniendo en cuenta los aspectos fundamentales de proceso.

1.4.1.- Biomosas utilizadas

La biomasa tiene un origen muy diverso, pudiendo ser organismos unicelulares o pluricelulares, compuestos celulares o incluso extractos de seres vivos, siendo las bacterias, hongos y algas los principales organismos estudiados (Rossi, 1990; Hamdy, 2000; Volesky, 2003; Romera et al., 2006) los cuales, generalmente, son utilizados en estado puro o uniespecífico. En la Tabla 3 se recoge información sobre distintos tipos de biomosas que han sido empleadas por diferentes investigadores.

En cuanto a su estado biológico, la biomasa puede ser utilizada en estado vivo o muerto (en la Tabla 3 también se muestra este dato). No obstante, la biomasa muerta es la más adecuada para el proceso de bioadsorción debido, principalmente, a la mayor capacidad de recuperación metálica que posee con respecto a la viva, tal y como se refleja en estudios realizados con ciertos hongos como *Aspergillus niger* (Kapoor et al., 1999) o *Polyporus versicolor* (Satiroglu et al., 2002). Esta ventaja puede deberse a la ausencia de mecanismos lentos de transporte activo de iones (Kuyucak & Volesky, 1988), a la gran resistencia a metales tóxicos o a condiciones adversas de experimentación (Hu et al., 1996; Yetis et al., 2000), así como a una mayor porosidad en la biomasa muerta, que facilita el acceso de los metales pesados al interior de la misma. Asimismo, la manipulación más fácil de este tipo de biomosas, sumado al hecho de no ser necesario el aporte de nutrientes y a la posibilidad de regenerarla mediante tratamientos relativamente simples, aumentan su aceptación para este tipo de estudios en detrimento de las biomosas vivas (Hu et al., 1996; Mehta & Gaur, 2005).

Tabla 3.- Algunas biomásas estudiadas en la bibliografía.

Biomasa	Metales estudiados	Estado biológico	Inmovilización	Referencia bibliográfica
Algas				
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Cd, Co, Cu, Pb, Zn	Muerta	Libre	(Kuyucak & Volesky, 1989; Chong & Volesky, 1995; De Carvalho et al., 1995; Chong & Volesky, 1996; Fourest & Volesky, 1997; Lodeiro et al., 2005)
<i>Durvillaea potatorum</i>	Cd, Cu, Pb	Muerta	Libre	(Matheickal et al., 1999; Matheickal & Yu, 1999; Yu & Kaewsarn, 1999; Figueira et al., 2000)
<i>Laminaria japonica</i>	Al, Au, Cd, Cu, Pb, Zn	Muerta	Libre	(Gardea-Torresdey et al., 1990; Fourest & Volesky, 1997; Figueira et al., 2000)
<i>Padina sp.</i>	Cd, Cu, Ni, Pb, Zn,	Muerta	Libre	(Kaewsarn, 2002; Sheng et al., 2004)
<i>Rhizoclonium</i>	Zn	Muerta	Inmovilizada	(Crist et al., 1994)
<i>Saragassum sp.</i>	Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Muerta	Ambos	(Davis et al., 2000; Davis et al., 2003; Cruz et al., 2004; Davis et al., 2004; Kalyani et al., 2004; Sheng et al., 2004 Padilha et al., 2005)
Bacterias				
<i>Bacillus sp.</i>	Cr, Cu, Fe, Pb	Muerta	Inmovilizada	(Brierley & Brierley, 1993)
<i>Oscillatoria angustissima</i>	Co, Cu, Zn	Muerta	Inmovilizada	(Mohapatra & Gupta, 2005)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cu, Ni, U	Ambos	Libre	(Sar et al., 1999; Hu et al., 1996)
<i>Sphaerotilus natans</i>	Cd, Cu, Pb	Muerta	Libre	(Pagnanelli et al., 2004)
<i>Spirulina platensis</i>	Cd	Muerta	Inmovilizada	(Rangsayatorn et al., 2004)
<i>Streptomyces rimosus</i>	Zn	Muerta	Ambos	(Ddour et al., 1999; Mameri et al., 1999)
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Cu, Zn	Muerta	Libre	(Ruiz-Manriquez et al., 1998; Celaya et al., 2000)
Hongos filamentosos				
<i>Aspergillus niger</i>	Cd, Cu, Ni, Pb	Ambos	Libre	(Kapoor & Viraraghavan, 1998; Kapoor et al., 1999)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Cd, Cu, Pb, Zn	Muerta	Ambos	(Huang & Huang, 1996; Yin et al., 1999)
<i>Mucor rouxii</i>	Cd, Ni, Pb, Zn	Muerta	Libre	(Dow & Rubery, 1977; Yan & Viraraghavan, 2000)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ag, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn	Muerta	Libre	(Fourest et al., 1994; Puranik & Paknikar, 1999; Deng & Ting, 2005)
<i>Polyporus versicolor</i>	Cd, Hg, Zn	Ambos	Libre	(Satiroglu et al., 2002)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Ag, Am ²⁴¹ , Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Muerta	Ambos	(Fourest et al., 1994; Yin et al., 1999; Liao et al., 2004; Naja et al., 2005)
Levaduras				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn	Muerta	Ambos	(Brady et al., 1994; Lu & Wilkins, 1996; Bingol et al., 2004; Goksungur et al., 2005; Lin et al., 2005)
<i>Saccharomycetes pombe</i>	Cd	Muerta	Inmovilizada	(Lin & Lin, 2005)
Plantas				
<i>Amaranthus spinosus</i>	Sr	Muerta	Ambos	(Chen, 1997)
<i>Beta vulgaris</i>	Cu, Ni, Pb	Muerta	Libre	(Reddad et al., 2002; Gerente et al., 2004)
<i>C. Sphagnum</i>	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb	Muerta	Libre	(Gardea-Torresdey et al., 2004)
<i>Cicer arietinum</i>	Cu, Ni, Pb, Zn	Muerta	Ambos	(Saeed et al., 2005)
<i>Hemidesmus indicus</i>	Cr, Pb, Zn	Muerta	Ambos	(Sekhar et al., 2004)
<i>Medicago sativa</i>	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb	Muerta	Libre	(Tiemann et al., 2002; Gardea-Torresdey et al., 2004)

Por otro lado, las biomásas pueden ser utilizadas de dos maneras diferentes: libres, en forma de suspensiones dentro de soluciones metálicas y con agitación, o inmovilizadas, sobre algún tipo de soporte. La Tabla 3 también refleja estudios llevados a cabo bajo ambas condiciones. La utilización de un tipo u otro de biomasa depende principalmente del tipo de escala que se esté utilizando. De este modo, para ensayos de laboratorio, se utiliza de forma preferente, debido a la simplicidad del proceso, biomasa libre en reactores tipo *batch* con agitación donde, una vez finalizado el proceso, la biomasa cargada de metal es separada del efluente mediante técnicas de filtración o centrifugación. No obstante, si se trabaja a mayor escala, con mayores volúmenes de efluentes contaminados, las técnicas de centrifugación o filtración no son las más adecuadas; en su lugar, se tiende a utilizar sistemas con biomásas inmovilizadas, generalmente en reactores de lecho fijo con flujo continuo del efluente contaminado, siendo frecuente el empleo de columnas (Mehta & Gaur, 2005).

Las plantas, a pesar de no haber sido tan utilizadas en ensayos de bioadsorción, también se presentan con un gran potencial de uso como material bioadsorbente debido principalmente a su gran abundancia (Chen, 1997; Sekhar et al., 2004; Pagnanelli et al., 2005; Saeed et al., 2005), así como a su bajo coste y fácil disponibilidad (Lister & Line, 2001; Reddad et al., 2002; Gerente et al., 2004). En este sentido, diversos estudios de bioadsorción con plantas como, por ejemplo, los realizados con *Medicago sativa* (Tiemann et al., 2002), *Fontinalis antipyretica* (Martins et al., 2004) o *Cicer arietinum* (Saeed et al., 2005) han demostrado una gran eficacia en la recuperación de metales pesados.

Desde el punto de vista físico-químico, las biomásas vegetales, tanto algas como plantas, están formadas por células que forman tejidos uniéndose entre sí a través de la lámina media de la pared celular (Figura 2), no existiendo, como en el caso de los tejidos animales, espacio intercelular (Nultsch, 1966; Cassens, 1980; Raven et al., 1991; Strasburger, 1994; Berg, 1997; Moore et al., 1998; Rost et al., 1998; Raven et al., 1999; Mauseth, 2003).

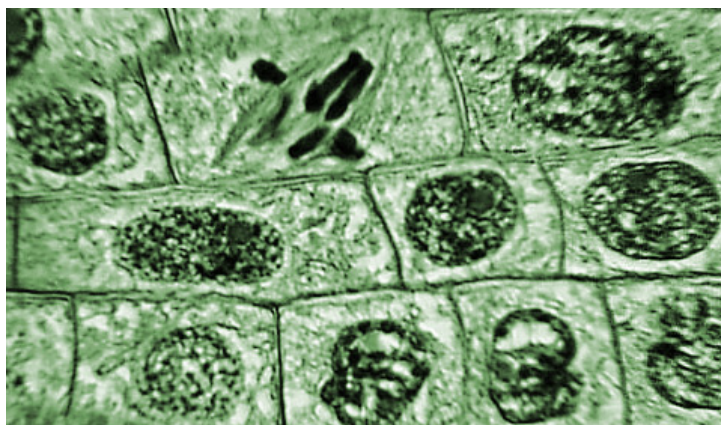


Figura 2.- Microfotografía de tejido vegetal.

Una célula vegetal típica (Figura 3) esta compuesta por núcleo, orgánulos celulares, membrana plasmática y pared celular. De todos estos elementos constitutivos, el que mayor importancia representa para la bioadsorción es la pared celular, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo. En el primer caso, por suponer un 80% del peso total de la biomasa, del cual un 25 - 30 % corresponde a celulosas, un 15-25 % a hemicelulosas un 35 % a pectinas y un 5-10 % a proteínas (extensinas y lectinas); en el segundo caso, debido a que en ella se sitúan la mayoría de los grupos funcionales con capacidad de fijar cationes metálicos.

Con el fin de comprender la naturaleza y origen de dichos grupos funcionales, es necesario analizar la composición química y estructural de la pared celular, la cual estaría constituida principalmente por una fase fibrilar o esqueleto y una fase amorfa o matriz (Esau, 1972; Dyson, 1977; Fahn, 1978; Sheeler & Bianchi, 1980; Esau, 1982; Mauseth, 1988; De Robertis et al., 1996). Estas dos fases están íntimamente unidas dando lugar a una estructura de gran resistencia (Figura 4).

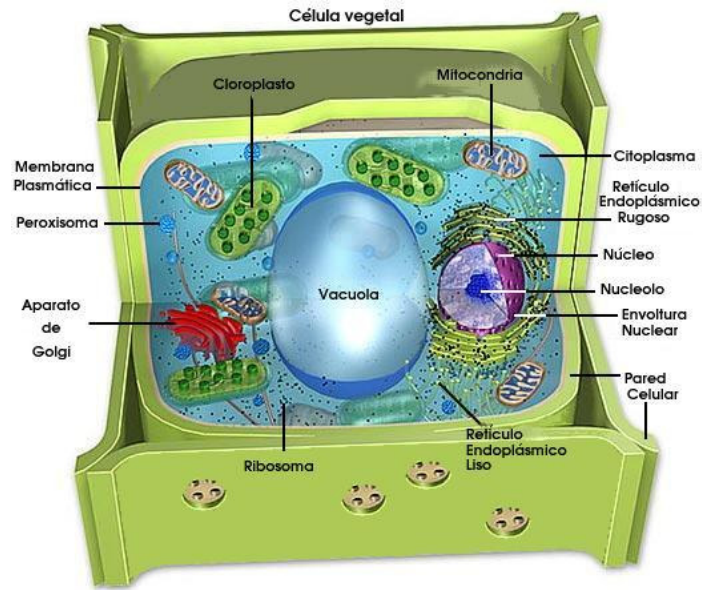


Figura 3.- Célula vegetal.

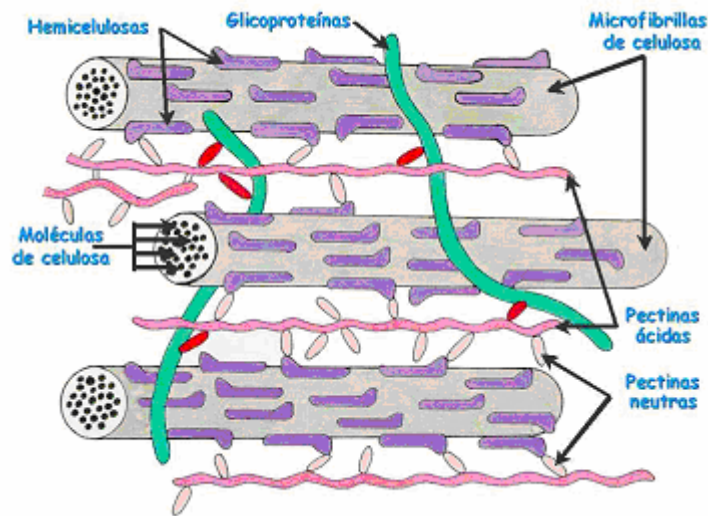


Figura 4.- Estructura química de la pared celular.

Fase fibrilar o esqueleto

Está formada por un entramado de diversas fibras que constituyen el esqueleto de la estructura. En este entramado, es posible distinguir dos tipos de elementos (Figura 5):

- **Micela:** consta de unas 40 moléculas de celulosa dispuestas paralelamente y unidas entre sí por puentes de hidrógeno. Los grupos funcionales que mayoritariamente se encuentran en esta molécula son hidroxilos (-OH).

➤ **Microfibrillas:** finos filamentos (formados de micelas) de unos 10 a 25 nm de longitud.



Figura 5.- Fase fibrilar o esqueleto.

Fase amorfa o matriz:

Su función principal es la de mantener unido el entramado de la fase fibrilar, aumentando la resistencia mecánica del mismo. Está formada por las siguientes moléculas:

➤ **Hemicelulosas:** revisten las fibrillas de celulosa y cristalizan con ella, uniéndolas. Los grupos funcionales serían los mismos que en el caso de la celulosa.

➤ **Compuestos pécticos** (Figura 6): están formados por moléculas de ácido péctico unidas entre sí mediante puentes de Ca^{++} . En este compuesto se destacan los hidroxilos (-OH), carboxilos (-COOH), metoxilos (-COOCH₃) y carboxilatos de calcio (-COOCa), como grupos funcionales.

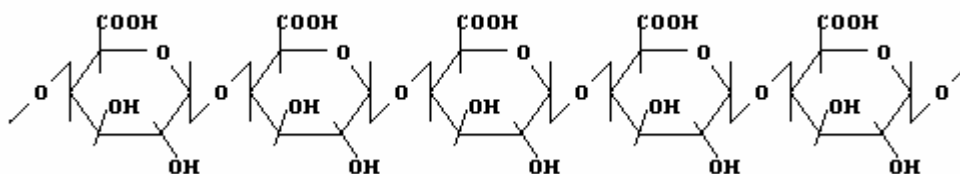


Figura 6.- Cadena típica de un compuesto péctico.

➤ **Proteínas:** son ricas en los aminoácidos serina e hidroxiprolina y están ligadas con azúcares como arabinosa, glucosa y galactosa. Se cree que dichas glucoproteínas actúan como elementos estructurales porque forman cadenas que pueden ligar entre sí otros componentes. Como grupos funcionales, se destacan los grupos hidroxilos (-OH) correspondientes a estos dos aminoácidos y grupos ceto (=O). Los grupos carboxílicos (-COOH) y aminos (-NH₃), dada la estructura de la cadena de proteína, únicamente se encontrarían en los extremos de ésta por lo que su papel no sería importante para la bioadsorción desde el punto de vista cuantitativo (Figura 7).

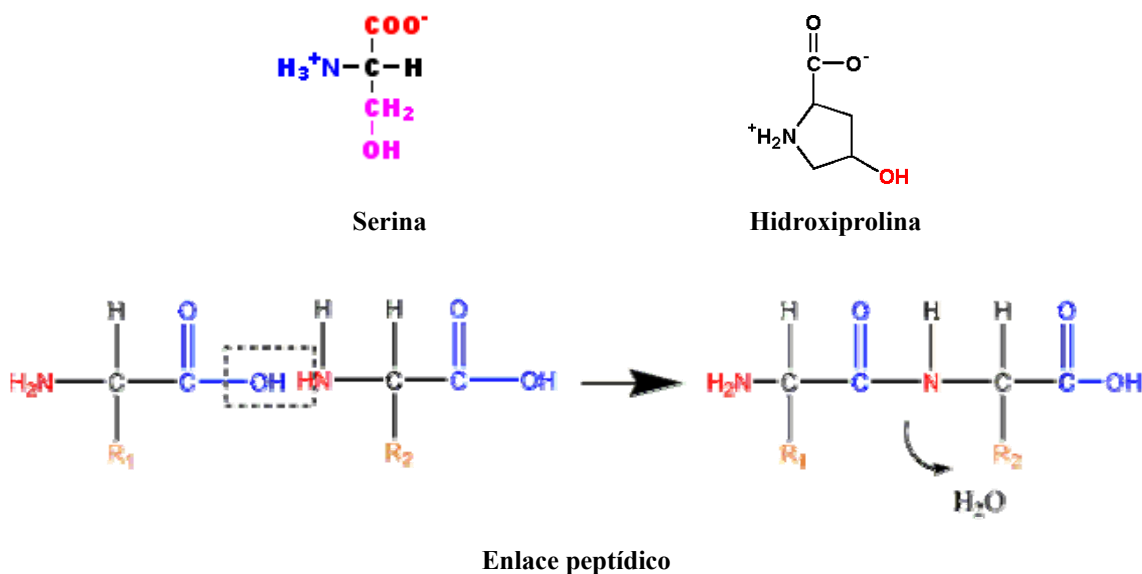


Figura7.- Principales aminoácidos constituyentes de las proteínas de la pared y la formación del enlace peptídico, forma en la que se encuentran los aminoácidos enlazados dentro de la proteína.

1.4.2.- Metales pesados utilizados

En la bibliografía se reflejan distintos trabajos con una amplia variedad de metales pesados a los que se les ha aplicado esta técnica (Tabla 3). Los criterios seguidos a la hora de elegir uno o varios metales en un estudio concreto pueden ser diferentes, siendo la toxicidad de un metal, su presencia en una industria concreta o su interés económico, los principales. Cadmio, cobre, níquel, plomo y zinc han sido los metales más estudiados en la bibliografía debido, posiblemente, a que son los que con mayor frecuencia aparecen contaminando los efluentes industriales.

1.4.3.- Isotermas de adsorción

Con el fin de poder cuantificar el proceso de adsorción, se recurre al cálculo de los parámetros de capacidad de adsorción y afinidad de la biomasa por un determinado metal, mediante el ajuste de los datos experimentales a una isoterma de adsorción. La isoterma de adsorción puede definirse como la relación de equilibrio entre la concentración del adsorbato en la fase fluida y la concentración de partículas de adsorbente, a una temperatura determinada (Aksu et al, 1997). De entre todas las isotermas de adsorción existentes, las más referenciadas en la bibliografía han sido los modelos de Langmuir y de Freundlich, ambos con base teórica diferente tal y como se describe a continuación.

Langmuir

Es el único modelo que permite obtener las constantes necesarias, para definir los equilibrios químicos entre el metal y la biomasa. Está basado en los siguientes supuestos (Webster et al., 1997; Cruz et al., 2004; Goksungur et al., 2005; Gulnaz et al., 2005; Han et al., 2005; Mehta & Gaur, 2005):

- Antes del contacto con el adsorbato, todos los centros activos en la superficie del adsorbente se encuentran libres.
- Todos los centros activos tienen idéntica capacidad de adsorción, no existiendo variación por la presencia de otros adsorbatos en centros vecinos.
- Cada adsorbato se une exclusivamente a un único centro activo.
- La adsorción se limita a una sola capa.

El modelo de Langmuir puede ser representado de la forma siguiente:

$$q_e = \frac{q_{\max} C_e}{K + C_e} \quad \text{ó} \quad q_e = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e} \quad [1]$$

siendo:

q_e: capacidad de adsorción de la biomasa en el equilibrio (mg ó mmol metal/g de biomasa).

q_{max}: capacidad máxima de recuperación metálica por parte de la biomasa (mg ó mmol metal/g de biomasa).

C_e: concentración metálica en el equilibrio (mg ó mmol metal/L).

K: constante de Langmuir, equivalente a la inversa de la constante de equilibrio **b** (mg ó mmol metal/L). El valor de esta constante equivale a la concentración de metal a la cual el valor de q_e es exactamente la mitad que el de la q_{max}. Mide, por tanto, la afinidad entre el metal y la biomasa, de forma inversamente proporcional.

La ecuación de Langmuir puede ser linealizada de la siguiente forma con el fin de facilitar su representación gráfica:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_{\max}} + \frac{K}{q_{\max}} \quad [2]$$

Representando $\frac{C_e}{q_e}$ frente a C_e, a partir de la pendiente de la recta obtenida se conocería

el valor de la q_{max} y a partir de la ordenada en el origen se obtendría el de la K.

A su vez, la capacidad de adsorción q_e se determina en los experimentos de bioadsorción de la forma siguiente:

$$q_e = \frac{V(C_0 - C_e)}{B} \quad [3]$$

siendo:

V: volumen de disolución (L).

C₀: concentración metálica inicial (mg ó mmol metal/L).

B: concentración de biomasa (g biomasa/L).

Freundlich

Es un modelo matemático empírico el cual supone que no existe saturación del adsorbente, por lo que no hay un valor límite para C_e . También considera que cada centro activo puede tener diferente capacidad de adsorción, así como que el proceso puede tener lugar en varias capas (Webster et al., 1997; Goksungur et al., 2005; Gulnaz et al., 2005; Han et al., 2005; Mehta & Gaur, 2005). La expresión de éste modelo es la siguiente:

$$q = K_e \cdot C_e^{1/n} \quad [4]$$

donde K_e es la constante de Freundlich, relacionada con la capacidad de adsorción de la biomasa, y $(1/n)$ indica la intensidad de adsorción.

Esta expresión puede ser transformada en la ecuación de una línea recta tomando logaritmos:

$$\log q = \log K_e + \frac{1}{n} \log C_e \quad [5]$$

La pendiente de la recta obtenida al representar $\log q$ frente a $\log C_e$, equivaldría a $\frac{1}{n}$ y el corte con el eje de ordenadas a $\log K_e$.

En la Tabla 4 se recopilan las capacidades de adsorción máximas (q_{\max}) de diversas biomásas, para los metales Cd, Cu, Ni, Pb y Zn. En general, se puede apreciar como las especies de algas presentan una considerable capacidad de recuperar metales pesados, tal y como defienden diversos autores (Rey-Castro et al., 2004; Sheng et al., 2004; Lodeiro et al., 2005; Mehta & Gaur, 2005; Romera et al., 2006). Por tanto, este grupo es una alternativa de gran peso frente a los hongos y bacterias tradicionalmente más utilizados en los estudios de bioadsorción (Romera et al., 2006). El conocimiento de las capacidades de recuperación de un determinado metal por diferentes biomásas es de vital importancia a la hora de diseñar un proceso de bioadsorción, con el fin de elegir la biomasa más adecuada para tal fin en función del metal que se quiera recuperar de un efluente.

Tabla 4.- Capacidad de adsorción metálica de algunas biomásas de la siguiente naturaleza: algas (a), bacterias (b), hongos filamentosos (h), levaduras (l) y plantas (p).

Especie	q _{max} (mm/g)	Referencia	Especie	q _{max} (mm/g)	Referencia
Cadmio			Plomo		
<i>Anabaena nodosum</i> (a)	0,8100	(Vijayaraghavan et al., 2005)	<i>Durvillaea potatorum</i> (a)	1,6000	(Matheickal & Yu, 1999)
<i>Ascophyllum nodosum</i> (a)	0,7500	(Chong & Volesky, 1995)	<i>Ecklonia radiata</i> (a)	1,3600	(Mehta & Gaur, 2005)
<i>Ceramium rubrum</i> (a)	0,0700	(Mehta & Gaur, 2005)	<i>Padina sp.</i> (a)	1,2500	(Sheng et al., 2004)
<i>Durvillaea potatorum</i> (a)	1,1200	(Yu & Kaewsarn, 1999)	<i>Sargassum fluitans</i> (a)	1,0600	(Fourest & Volesky, 1996)
<i>Pilaella littoralis</i> (a)	0,4300	(Neide et al., 2002)	<i>Sargassum vulgare</i> (a)	1,2000	(Raize et al., 2004)
<i>Sargassum muticum</i> (a)	0,7300	(Lodeiro et al., 2005)	<i>Bacillus sp.</i> (b)	0,9130	(Brierley & Brierley, 1993)
<i>Pseudomonas putida</i> (b)	0,0359	(Harel et al., 1998)	<i>Sphaerotilus natans</i> (b)	0,6500	(Pagnanelli et al., 2004)
<i>Sphaerotilus natans</i> (b)	0,0600	(Pagnanelli et al., 2004)	<i>Streptovercillium cinnamomeum</i> (b)	0,1836	(Puranik & Paknikar, 1997)
<i>Spirulina platensis</i> (b)	0,6310	(Rangsayatorn et al., 2004)	<i>Aspergillus niger</i> (h)	0,0109	(Kapoor & Viraraghavan, 1998)
<i>Aspergillus niger</i> (h)	0,0117	(Kapoor et al., 1999)	<i>Mucor rouxii</i> (h)	0,0828	(Yan & Viraraghavan, 2000)
<i>Mucor rouxii</i> (h)	0,0617	(Yan & Viraraghavan, 2000)	<i>Penicillium chrysogenum</i> (h)	0,9855	(Deng & Ting, 2005)
<i>Polyporus versicolor</i> (h)	0,8007	(Satiroglu et al., 2002)	<i>Rhizopus arrhizus</i> (h)	0,6100	(Yin et al., 1999)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (l)	0,0623	(Goksungur et al., 2005)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (l)	0,0386	(Goksungur et al., 2005)
<i>Saccharomyces pombe</i> (l)	2,0552	(Lin & Lin, 2005)	<i>Cicer arietinum</i> (p)	0,2414	(Saeed et al., 2005)
<i>Cicer arietinum</i> (p)	0,3558	(Saeed et al., 2005)	<i>Hemidesmus indicus</i> (p)	0,4348	(Sekhar et al., 2004)
<i>Fontinalis antipyretica</i> (p)	0,2491	(Martins et al., 2004)	<i>Palma petiolar</i> (p)	0,0551	(Gardea-Torresdey et al., 2004)
<i>Olea europea</i> (p)	0,0130	(Pagnanelli et al., 2005)	<i>Solanum eleagnifolium</i> (p)	0,1541	(Gardea-Torresdey et al., 2004)
Cobre			Zinc		
<i>A. nodosum</i> (a)	0,9900	(Kaewsarn, 2002)	<i>Rhizoclonium</i> (a)	0,5300	(Crist et al., 1994)
<i>Ascophyllum nodosum</i> (a)	0,4600	(Mehta & Gaur, 2005)	<i>Sargassum sp.</i> (a)	0,5000	(Sheng et al., 2004)
<i>D. potatorum</i> (a)	1,3000	(Kaewsarn, 2002)	<i>Ulva lactuca</i> (a)	0,9600	(Webster et al., 1997)
<i>Gracillaria</i> (a)	0,5900	(Sheng et al., 2004)	<i>Oscillatoria angustissima</i> (b)	0,1300	(Mohapatra & Gupta, 2005)
<i>Pilaella littoralis</i> (a)	0,8500	(Neide et al., 2002)	<i>Streptomyces rimosus</i> (b)	0,0444	(Ddour et al., 1999)
<i>Enterobacter cloacae</i> (b)	0,1039	(Iyer et al., 2005)	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> (b)	0,1490	(Celaya et al., 2000)
<i>Oscillatoria angustissima</i> (b)	0,0031	(Mohapatra & Gupta, 2005)	<i>Mucor rouxii</i> (h)	0,0748	(Yan & Viraraghavan, 2000)
<i>Sphaerotilus natans</i> (b)	0,1800	(Pagnanelli et al., 2004)	<i>Polyporus versicolor</i> (h)	0,8275	(Satiroglu et al., 2002)
<i>Aspergillus oryzae</i> (h)	0,0700	(Kaewsarn, 2002)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (l)	0,0694	(Lu & Wilkins, 1996)
<i>Penicillium chrysogenum</i> (h)	1,4478	(Deng & Ting, 2005)	<i>Cicer arietinum</i> (p)	0,5171	(Saeed et al., 2005)
<i>Streptomyces coelicolor</i> (h)	0,6609	(Ozturk et al., 2004)			
<i>P. aeruginosa</i> (l)	0,3000	(Kaewsarn, 2002)			
<i>C. vulgaris</i> (p)	0,6700	(Kaewsarn, 2002)			
Canadian Spaghnum Peat Moss (p)	0,2534	(Gardea-Torresdey et al., 2004)			
<i>Olea europea</i> (p)	0,0830	(Pagnanelli et al., 2005)			
Niquel					
<i>C. vulgaris</i> (a)	0,1700	(Mehta & Gaur, 2005)			
<i>Gracillaria sp.</i> (a)	0,2726	(Kalyani et al., 2004)			
<i>Gracillaria</i> (a)	0,2800	(Sheng et al., 2004)			
<i>Sargassum vulgare</i> (a)	0,9500	(Raize et al., 2004)			
<i>Ulva reticulata</i> (a)	0,7104	(Vijayaraghavan et al., 2005)			
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (b)	2,0698	(Sar et al., 1999)			
<i>Aspergillus niger</i> (h)	0,0298	(Kapoor & Viraraghavan, 1998)			
<i>Penicillium chrysogenum</i> (h)	0,9370	(Deng & Ting, 2005)			
<i>Streptomyces coelicolor</i> (h)	0,1891	(Ozturk et al., 2004)			
<i>Cicer arietinum</i> (p)	0,3332	(Saeed et al., 2005)			
<i>Sphagnum moss peat</i> (p)	0,1567	(Kalyani et al., 2004)			

1.4.4.- Mecanismos implicados en el proceso de bioadsorción

Los mecanismos de unión del metal a la biomasa pueden ser de naturaleza tanto física como química. Al ser los que con mayor frecuencia tienen lugar en los procesos de bioadsorción (Volesky, 2003) se destacan los siguientes:

Intercambio iónico: es una reacción química reversible en la cual un ión de la disolución se intercambia por otro ión del mismo signo, que se encuentra unido a la superficie de la biomasa. Es el mecanismo predominante en la bioadsorción metálica por algas (Volesky, 2003).

Adsorción: es un término amplio que contempla la unión de los iones a la superficie de la biomasa. Esta unión puede ser llevada a cabo a través de fenómenos físicos (no-específicos), tales como atracción electrostática, o químicos (específicos), tales como reacciones de complejación o quelación.

Microprecipitación: tiene lugar cuando la solubilidad del metal alcanza su valor límite. Esto puede tener lugar en condiciones locales, como en la superficie del bioadsorbente o en su interior y no necesariamente en el conjunto de la disolución. Estas condiciones pueden ser creadas por desviaciones locales en las condiciones físico-químicas, como el aumento del pH. Los microprecipitados de metal, se depositarían sobre la superficie de la biomasa.

Existen diferentes técnicas analíticas, que aplicadas al proceso de bioadsorción, permiten obtener una gran información sobre los mecanismos exactos que intervienen en el mismo. Tener un conocimiento amplio de estos mecanismos contribuye a la creación de una base sólida para el diseño de los procesos de bioadsorción, permitiendo la obtención de resultados óptimos. Entre las técnicas analíticas más útiles para este propósito es posible destacar las siguientes:

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Mediante este tipo de microscopía es posible obtener información sobre la morfológica de la muestra, así como de sus características superficiales. La aplicación concreta de esta técnica en el campo de la bioadsorción tiene diferentes objetivos. En determinados estudios, este tipo de microscopía es utilizada con el fin de obtener información sobre el mecanismo de captación del metal, ya que permite detectar la localización exacta de éste en la biomasa (Kuyucak & Volesky, 1988; Kuyucak & Volesky, 1989). Otros estudios estarían dirigidos a estudiar los cambios morfológicos, producidos en la misma, tras la adsorción del metal (Raize et al., 2004). Por último, se destaca un tercer tipo de estudios encaminados a la observación de la morfología de la biomasa, principalmente en lo que se refiere a su grado de porosidad y área, factores que influyen positivamente en la capacidad de adsorción (Yu et al., 2001; Deng & Ting, 2005; Zhou et al., 2005).

Difracción de rayos X

En el campo específico de la bioadsorción, esta técnica tiene cierta relevancia en el estudio del proceso de unión del metal a la biomasa, tal y como se describe en los estudios de captación de cobalto por *Ascophyllum nodosum* (Kuyucak & Volesky, 1989), o en la recuperación de plomo en forma de precipitados sobre una biomasa de origen celulósico (Zhou et al., 2005).

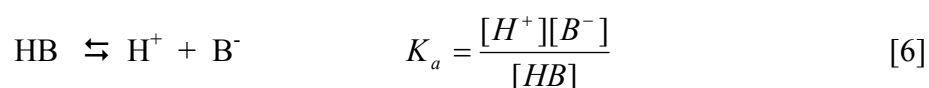
Espectroscopía de infrarrojos (FTIR)

En la bibliografía se encuentran diversos estudios realizados con esta técnica, los cuales están encaminados a la determinación de los grupos funcionales de la biomasa, responsables de la fijación del metal. Mediante esta técnica se han detectado grupos como los hidroxilo en celulosas, proteínas y compuestos pécticos, que presentan absorción a 3400 cm^{-1} (Pretsch et al., 2001; Romero-González et al., 2001; Synytsya et al., 2003; Pagnanelli et al., 2004; Sheng et al., 2004); grupos alcano, que absorben a 2800 cm^{-1} (Pretsch et al., 2001; Romero-González et al., 2001; Sheng et al., 2004); grupos carboxílicos y derivados, tales como carboxilatos y metoxilos, presentes en sustancias pécticas, que absorben entre 1200 y 1700 cm^{-1} (Mameri et al., 1999; Pretsch et al., 2001; Romero-González et al., 2001; Synytsya et al., 2003; Pagnanelli et al.,

2004; Raize et al., 2004; Sheng et al., 2004); o éteres de celulosas y compuestos pécticos cuya absorbancia se detectaría sobre los 1100 cm^{-1} (Pretsch et al., 2001; Romero-González et al., 2001; Synytsya et al., 2003).

Valoración ácido base

Las técnicas de valoración han sido frecuentemente utilizadas por diferentes autores para caracterizar las propiedades de acidez-basicidad de los grupos funcionales presentes en la biomasa. La determinación de las constantes de acidez de equilibrios como el siguiente:



pueden cuantificar este comportamiento. Una herramienta sencilla para este propósito se tiene en la ecuación de Henderdon-Hasselbach (Rossotti and Rossotti, 1965) que permite relacionar el grado de disociación ácida con el valor de pH.

En este sentido, mediante esta técnica, se han detectado grupos funcionales tales como grupos carboxílicos ($\text{pK}_a \approx 3,7$) (Romero-González et al., 2001; Reddad et al., 2002; Veglio et al., 2002); grupos sulfonados ($\text{pK}_a \approx 8,2$) (Fourest & Volesky, 1996; Figueira et al., 2000; Liu & Fang, 2002); grupos fosfórico ($\text{pK}_a \approx 4,7$); grupos amino ($\text{pK}_a \approx 9,8$) o grupos hidroxilo ($\text{pK}_a \approx 11$) (Liu & Fang, 2002).

1.4.5.- Sistemas multimetálicos

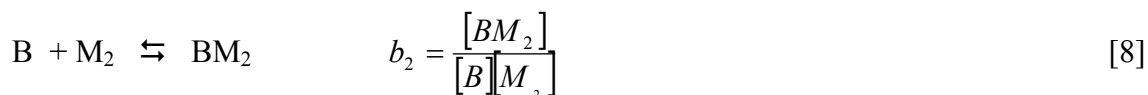
En un intento de aproximación a las condiciones reales de contaminación de aguas por metales pesados, en las que rara vez una especie metálica se encuentra en estado puro (Mehta & Gaur, 2005), la bibliografía recoge algunos trabajos con dos o más metales. En dichos trabajos, se estudia la influencia que ejerce, en la capacidad de adsorción de la biomasa por un metal, la presencia en la misma disolución de otro u otros metales, así como la afinidad relativa de la biomasa por cada uno de ellos. No obstante, la cantidad de estudios de bioadsorción publicados relativos a sistemas multimetálicos es comparativamente menor que la de los llevados a cabo en sistemas monometálicos

(Romera et al., 2006). En la Tabla 5 se muestran diversos trabajos publicados con sistemas bimetálicos y trimetálicos.

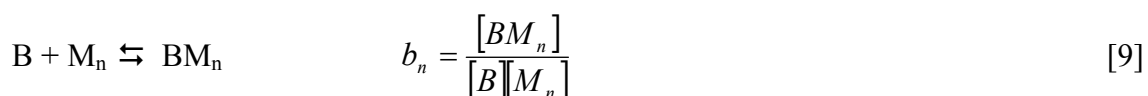
Tabla 5.- Sistemas multimetálicos estudiados en la bibliografía.

Biomasa	Sistemas multimetálicos estudiados	Referencia
Pasta de Papel	Cd-Cu, Cd-Pb, Cd-Zn, Cu-Pb, Cu-Zn y Pb-Zn	(Lister & Line, 2001)
<i>Sphaerotilus natans</i>	Cd-Pb, Cu-Cd y Cu-Pb	(Pagnanelli et al., 2004)
<i>Chryseomonas luteola</i>	Cd-Co	(Ozdemir et al., 2005)
<i>Cicer arietinum</i>	Pb-Cd, Pb-Cu, Pb-Ni y Pb-Zn	(Saeed et al., 2005)
<i>Olea europea</i>	Cu-Cd	(Pagnanelli et al., 2005)
<i>Sargassum polycystum</i>	La-Eu-Yb	(Diniz & Volesky, 2005)
Biomasa vegetal heterogénea	Cd-Cu	(Lezcano et al., 2001)
<i>Fucus spiralis</i>	Cd-Cu, Cd-Ni, Cd-Ni-Cu, Cd-Pb, Cd-Zn, Cu-Pb, Ni-Cu, Ni-Pb, Ni-Zn y Zn-Cu, Zn-Pb	(Romera, 2008)

En sistemas en los que están presentes en la disolución más de un metal, la forma más apropiada de trabajar es ajustar los datos experimentales a un modelo que genere ciertos parámetros y con los que se pueda cuantificar dicho sistema. No obstante, la documentación sobre modelización en sistemas multimetálicos es escasa siendo relativamente frecuente el uso de un modelo de Langmuir que supone un equilibrio entre la biomasa y cada uno de los metales:



.....



Siendo b_1, b_2, \dots, b_n las correspondientes constantes de equilibrio de dichas reacciones.

Para un sistema con n metales, las expresiones matemáticas del modelo son las siguientes (Chong & Volesky, 1995; Chong & Volesky, 1996; Loaec et al., 1997; Sung Lee & Volesky, 1999; Yu & Kaewsarn, 1999; Pagnanelli et al., 2004; Mehta & Gaur, 2005):

$$q_e(M_1) = \frac{q_{\max} \cdot b_1 \cdot Ce(M_1)}{1 + b_1 \cdot Ce(M_1) + b_2 \cdot Ce(M_2) + \dots + b_n \cdot Ce(M_n)} \quad [10]$$

$$q_e(M_2) = \frac{q_{\max} \cdot b_2 \cdot Ce(M_2)}{1 + b_1 \cdot Ce(M_1) + b_2 \cdot Ce(M_2) + \dots + b_n \cdot Ce(M_n)} \quad [11]$$

.....

$$q_e(M_n) = \frac{q_{\max} \cdot b_n \cdot Ce(M_n)}{1 + b_1 \cdot Ce(M_1) + b_2 \cdot Ce(M_2) + \dots + b_n \cdot Ce(M_n)} \quad [12]$$

donde:

$q_e(M_1)$, $q_e(M_2)$, ..., $q_e(M_n)$: son las capacidades de adsorción de la biomasa para cada uno de los metales (mg ó mmol de metal/g biomasa). Indican la cantidad de centros activos de la biomasa ocupados por el metal M_1 , o el metal M_2 , ..., o el metal M_n .

q_{\max} : capacidad máxima de recuperación metálica por parte de la biomasa (mg ó mmol metal/g de biomasa). Indica la cantidad de centros activos que se encuentran en la superficie del adsorbente.

$C_e(M_1)$, $C_e(M_2)$, ..., $C_e(M_n)$: concentraciones de cada uno de los metales en el equilibrio (mg ó mmol metal/L).

1.4.6.- Desorción y reutilización de la biomasa

Una vez estudiado el proceso de adsorción, interesa también estudiar la forma de recuperar el metal previamente adsorbido, sobre todo, si se trata de un metal valioso, así como la posibilidad de reutilización de la biomasa en posteriores procesos de bioadsorción. Esta circunstancia tiene una gran importancia, para el desarrollo a nivel

industrial de la tecnología de bioadsorción (Jalal-Rad et al., 2004), al permitir reducir costes de producción y disminuir el impacto ambiental (Lister & Line, 2001).

Los procesos de desorción y, por tanto, de recuperación del metal están basados en diversos mecanismos como la complejación o quelación del metal adsorbido (Gardea-Torresdey et al., 2004), o el intercambio catiónico (Kapoor et al., 1999; Gardea-Torresdey et al., 2004). En la bibliografía, se recogen algunos estudios de desorción empleando compuestos químicos de distinta naturaleza, tales como ácidos, bases, sales o quelantes metálicos. En la Tabla 6 se presentan algunos compuestos químicos utilizados como agentes desorbentes.

Tabla 6.- Agentes desorbentes más utilizados recogidos en la bibliografía.

Agente desorbente	Concentración	Referencia	Agente desorbente	Concentración	Referencia
Ácido nítrico	0,1M	(Puranik & Paknikar, 1997)	HCl	1M	(Jalal-Rad et al., 2004)
Ácido nitrilotriacético	0,001M	(Lister & Line, 2001)	HCOOH	1M	(Jalal-Rad et al., 2004)
CaCl ₂	0,1M	(Kapoor et al., 1999)	HNO ₃	0,01M	(Jalal-Rad et al., 2004)
CaCl ₂	1M	(Jalal-Rad et al., 2004)	HNO ₃	0,01M	(Chojnacka et al., 2005)
CaCl ₂ + H ₂ O ₂	0,0005-0,002M	(Ahuja et al., 1999)	HNO ₃	0,05N	(Kapoor et al., 1999)
CaCl ₂ + HCl	pH3	(Vijayaraghavan et al., 2005)	HNO ₃	0,1M	(Jalal-Rad et al., 2004)
CaCO ₃	0,01M	(Lister & Line, 2001)	HNO ₃	0,1M	(Chojnacka et al., 2005)
CH ₃ COOH	1M	(Jalal-Rad et al., 2004)	HNO ₃	0,1M	(Sekhar et al., 2004)
CHCOOH	0,1N	(Li et al., 2004)	HNO ₃	1M	(Jalal-Rad et al., 2004)
Citrato sódico	0,1M	(Puranik & Paknikar, 1997)	HNO ₃	1M	(Chojnacka et al., 2005)
Cloruro potásico	0,1M	(Puranik & Paknikar, 1997)	KOH	0,1M	(Jalal-Rad et al., 2004)
EDTA	0,0005-0,01M	(Ahuja et al., 1999)	KOH	0,5M	(Jalal-Rad et al., 2004)
EDTA	0,001M	(Crist et al., 1994)	KOH	1M	(Jalal-Rad et al., 2004)
EDTA	0,01M	(Vijayaraghavan et al., 2005)	MgSO ₄	0,1N	(Kapoor et al., 1999)
EDTA	0,1M	(Jalal-Rad et al., 2004)	Na ₂ CO ₃	0,1M	(Puranik & Paknikar, 1997)
EDTA	0,1M	(Chojnacka et al., 2005)	Na ₂ CO ₃	0,00075-0,002M	(Ahuja et al., 1999)
EDTA	Saturada	(Liao et al., 2004)	Na ₂ CO ₃	0,01M	(Lister & Line, 2001)
H ₂ SO ₄	0,05M	(Puranik & Paknikar, 1997)	Na ₂ CO ₃	0,1M	(Sekhar et al., 2004)
H ₂ SO ₄	0,01-0,1N	(Ahuja et al., 1999)	Na ₂ CO ₃	0,1M	(Kamala et al., 2005)
H ₂ SO ₄	0,1N	(Lister & Line, 2001)	Na ₂ CO ₃	0,1N	(Kapoor et al., 1999)
H ₂ SO ₄	1M	(Jalal-Rad et al., 2004)	NaCl	0,2M	(Kamala et al., 2005)
HCl	0,1M	(Puranik & Paknikar, 1997)	NaHCO ₃	0,1M	(Puranik & Paknikar, 1997)
HCl	0,01	(Satiroglu et al., 2002)	NaHCO ₃	0,0075-0,01M	(Ahuja et al., 1999)
HCl	0,01-0,1N	(Ahuja et al., 1999)	NaHCO ₃	0,1N	(Kapoor et al., 1999)
HCl	0,1M	(Sekhar et al., 2004)	NaHCO ₃	0,1N	(Li et al., 2004)
HCl	0,1M	(Saeed et al., 2005)	NaOH	0,05M	(Kamala et al., 2005)
HCl	0,1M	(Lin & Lin, 2005)	NaOH	0,1M	(Jalal-Rad et al., 2004)
HCl	0,1N	(Li et al., 2004)	NaOH	0,1M	(Sekhar et al., 2004)
HCl	0,1N	(Rangsayatorn et al., 2004)	NaOH	0,1N	(Li et al., 2004)
HCl	0,5M	(Deng & Bai, 2004)	NaOH	0,5M	(Deng & Bai, 2004)
HCl	0,5M	(Lin & Lin, 2005)	NaOH	0,5M	(Jalal-Rad et al., 2004)
HCl	0,5M	(Deng & Ting, 2005)	NaOH	1M	(Jalal-Rad et al., 2004)
HCl	1,0M	(Lin & Lin, 2005)	NH ₄ Cl	0,1N	(Kapoor et al., 1999)
HCl	1,5M	(Lin & Lin, 2005)	Tampón citrato	0,2M pH 3-5	(Ahuja et al., 1999)

1.4.7.- Pretratamiento de la biomasa

El principal objetivo del pretratamiento de la biomasa es conseguir un aumento en la capacidad de recuperación metálica de la misma. Este proceso consiste frecuentemente en someter a la biomasa a un tratamiento químico, de forma previa a ser usada en los ensayos de bioadsorción.

En la bibliografía aparecen numerosos estudios de pretratamiento con diferentes compuestos químicos cuya finalidad es la de conocer su acción sobre la biomasa, así como su influencia en la variación de la capacidad de adsorción de ésta. Los compuestos químicos más utilizados han sido ácidos (HCl, H₂SO₄, HNO₃, HClO₄), bases (NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, NH₄OH), sales (CaCl₂, Na₂HPO₄, NaCl), detergentes (jabones, SDS, Triton x 100), compuestos orgánicos (acetona, dimetil sulfóxido, etanol, formaldehído, metanol), enzimas (lipasa, lisozima, fosfatasa alcalina), quelantes metálicos (EDTA) y agua destilada. Asimismo, se ha estudiado el efecto adicional de la temperatura como posible acción pretratante. En la Tabla 7 se recogen los reactivos más utilizados, la biomasa objeto de pretratamiento y la cita bibliográfica correspondiente.

Diferentes estudios bibliográficos muestran un gran incremento de la capacidad de recuperación metálica, inducida por la acción de diferentes bases, en bacterias, hongos y plantas. Cabe destacar los buenos resultados obtenidos con la utilización de NaOH en el pretratamiento de *Thiobacillus ferrooxidans* (Ruiz-Manríquez et al., 1998; Celaya et al., 2000), *Streptomyces rimosus* (Mameri et al., 1999), *Aspergillus niger* (Kapoor et al., 1999) y pasta de papel (Lister & Line, 2001).

Asimismo, se han obtenido incrementos considerables en la capacidad de adsorción con la utilización de compuestos orgánicos en algas, bacterias y hongos, destacándose los resultados obtenidos con *Ecklonia sp.* pretratada con benceno y acetona (Park et al., 2005), *Aspergillus niger* con formaldehído, dimetil sulfóxido y etanol (Kapoor & Viraraghavan, 1998) o *Pseudomonas aeruginosa* con acetona (Hu et al., 1996).

Tabla 7.- Tipos de pretratamientos recopilados de la bibliografía.

Agente pretratante	Biomasa	Referencia Bibliográfica
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
Acetona	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)
Acetona	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Yin et al., 1999)
Ácido acético	<i>Aspergillus niger</i>	(Chen, 1997)
Ácido O-fosfórico	<i>Aspergillus niger</i>	(Chen, 1997)
C ₂ H ₄ O ₂	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
C ₂ H ₄ O ₂	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
C ₂ H ₆ SO	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
C ₂ H ₆ SO	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
Ca(NO ₃) ₂	<i>Varias especies</i>	(Lu & Wilkins, 1996)
CaCl ₂	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
CaCl ₂	<i>Durvillaea potatorum</i>	(Galun et al., 1986)
Detergente	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
Detergente Lavadora	<i>Aspergillus niger</i>	(Chen, 1997)
Dietil ether	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)
Dimetil sulfóxido	<i>Aspergillus niger</i>	(Chen, 1997)
Dimetil sulfóxido	<i>Penicillium digitatum</i>	(Huang & Huang, 1996)
Dioxane	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)
Etanol	<i>Aspergillus niger</i>	(Chen, 1997)
Etanol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Yin et al., 1999)
Éter	<i>Aspergillus niger</i>	(Chen, 1997)
Formaldehido	<i>Ascophyllum nodosum</i>	(Puranik & Paknikar, 1999)
Formaldehido	<i>Aspergillus niger</i>	(Chen, 1997)
Fosfatasa Alcalina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)
H ₂ O	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)
H ₂ O ₂	<i>Aspergillus niger</i>	(Chen, 1997)
H ₂ O ₂	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)
H ₂ SO ₄	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
H ₂ SO ₄	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Yin et al., 1999)
H ₃ PO ₄	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
HCl	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Yin et al., 1999)
HCl	<i>Laurencia obtusa</i>	(Sung Lee & Volesky, 1999)
HClO ₄	<i>Rhizopus oryzae</i>	(Brierley & Brierley, 1993)
HClO ₄	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
HNO ₃	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)
HNO ₃	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Yin et al., 1999)
KOH	<i>Streptomyces rimosus</i>	(Ruiz-Manriquez et al., 1998)
Lipasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)
Lisozima	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Yin et al., 1999)
Metanol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)
Na ₂ CO ₃	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
Na ₂ HPO ₄	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
NaCl	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
NaHCO ₃	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
NaOH	<i>Mucor rouxii</i>	(Celaya et al., 2000)
NaOH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Chong & Volesky, 1996)
NaOH	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	(Hamdy, 2000)
NH ₄ OH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Yin et al., 1999)
Persulfato amónico	<i>Aspergillus niger</i>	(Chen, 1997)
SDS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Yin et al., 1999)
Tolueno	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Yin et al., 1999)
Triton x 100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(De Carvalho et al., 1995)

En el caso del pretratamiento con ácidos, se han obtenido resultados positivos con algas, bacterias, hongos y plantas. Pueden destacarse ciertos estudios realizados con *Aspergillus oryzae*, pretratado con HClO₄ (Huang & Huang, 1996), y pasta de papel, pretratada con H₂SO₄ (Lister & Line, 2001). No obstante, existe un número bastante

considerable de estudios en los que, por el contrario, se ha registrado una clara disminución en la capacidad de recuperación metálica de la biomasa, atribuible al pretratamiento con agentes ácidos, en algas, bacterias, hongos y plantas. Existen varias explicaciones para este efecto negativo, como la competencia por los centros activos de la biomasa, que ejercen los protones residuales del pretratamiento con los cationes metálicos (Ahuja et al., 1999), o la disminución de la electronegatividad en la superficie de la biomasa, por acción de los protones del pretratamiento ácido, dando como consecuencia una disminución de centros activos (Yan & Viraraghavan, 2000).

La utilización de determinadas sales en algas y hongos, también ha demostrado una considerable eficacia, como es el caso de los estudios realizados con *Ecklonia sp.* pretratada con NaCl y CaCl₂ (Park et al., 2005) o *Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* y *Penicillium chrysogenum* pretratados con CaCl₂ (Fourest et al., 1994).

La acción previa del calor ha mostrado también efectos positivos, como en el caso de las bacterias *Streptovorticillium cinnamoneum* (Puranik & Paknikar, 1997) y *Ocimum basilicum* (Melo & D'Souza, 2004), ambas sometidas a H₂O hirviendo.

Otros agentes químicos menos estudiados han sido los detergentes, con los que se ha reportado algún efecto positivo en el pretratamiento de *Aspergillus niger* con un detergente comercial de lavadora (Kapoor & Viraraghavan, 1998). El uso de enzimas quelantes y agua destilada han mostrado incrementos muy leves o incluso efectos negativos en la capacidad de recuperación metálica de la biomasa.

La acción de los distintos métodos de pretratamiento sobre la biomasa, referidos en la bibliografía, en general puede concretarse en una o varias de las siguientes actuaciones:

➤ **Limpieza de la biomasa** con el fin de eliminar las impurezas ajenas a ella cuya presencia bloquea o dificulta el acceso de los cationes a los centros activos. Asimismo, dichas impurezas disminuyen la cantidad de metal adsorbido por unidad de biomasa al ocupar un cierto volumen y carecer de capacidad de adsorción. Esta acción puede ser realizada por ácidos, bases, compuestos orgánicos y detergentes (Galun et al., 1986; Huang & Huang, 1996; Puranik & Paknikar, 1997; Kapoor & Viraraghavan, 1998).

➤ **Modificación química de la biomasa.** Este tipo de acción es un método más drástico ya que pretende alterar la composición propia de la biomasa modificando determinados compuestos o extrayendo materia de la misma (Chen, 1997; Satiroglu et al., 2002). Esto puede ser conseguido de dos formas diferentes:

- Por la acción de detergentes, compuestos orgánicos, bases y calor. Consiste en la extracción de materia de la biomasa eliminando aquellos compuestos de la misma que bien bloquean o dificultan el acceso del catión a los centros activos (Kuyucak & Volesky, 1989; Muraleedharan & Venkobachar, 1990; Brady et al., 1994; Puranik & Paknikar, 1997; Kapoor & Viraraghavan, 1998; Ruiz-Manríquez et al., 1998; Ddour et al., 1999; Mameri et al., 1999; Sung Lee & Volesky, 1999; Figueira et al., 2000) o bien favorecen la precipitación del metal (Chong & Volesky, 1995).

- A través de la transformación química de determinados compuestos de la biomasa, tales como proteínas, ésteres, polisacáridos o quitina, dando lugar a la generación de nuevos centros activos. Esta acción puede ser conseguida mediante la utilización de ácidos, compuestos orgánicos, detergente o calor (Kuyucak & Volesky, 1989; Muraleedharan & Venkobachar, 1990; Brady et al., 1994; Puranik & Paknikar, 1997; Kapoor & Viraraghavan, 1998; Ruiz-Manríquez et al., 1998; Ddour et al., 1999; Mameri et al., 1999; Sung Lee & Volesky, 1999; Figueira et al., 2000).

➤ Métodos encaminados a **mejorar el proceso de unión con el metal** en el centro activo. El objetivo no es el alterar el número de centros activos ni el acceso a los mismos, sino el de aumentar la eficacia de unión entre el catión metálico y el centro activo facilitando el intercambio catiónico o modificando la carga de los grupos funcionales. Dentro de este tipo de métodos, se distinguen diferentes formas de actuación tales como:

- Mejorar el proceso de intercambio catiónico, el cual se basa en la propiedad de determinados cationes, tales como el sodio o el calcio, que al estar unidos a los centros activos favorecen la adsorción de los cationes metálicos al ser intercambiados con los primeros. De esta manera, se concede una mayor ventaja a los cationes metálicos con respecto a los protones con los que compiten por el mismo centro activo. La fijación de estos cationes de intercambio en la biomasa puede ser conseguida por la acción de bases

o sales (Fourest et al., 1994; Ddour et al., 1999; Mameri et al., 1999; Yetis et al., 2000; Satiroglu et al., 2002).

- Asimismo, en la bibliografía se recogen otros efectos del pretratamiento basados en la mejora de la unión con el metal, tales como la formación de enlaces electrostáticos (Puranik & Paknikar, 1997); modificación de la carga total de superficie (Puranik & Paknikar, 1997; Yetis et al., 2000; Satiroglu et al., 2002); incremento de grupos con carga negativa tales como fosfatos, carboxilos o grupos nitrogenados (Yetis et al., 2000); y activación de centros activos adicionales en la superficie, tales como fosfatos, monoésteres, azúcares o fosfolípidos, mediante ajuste del pH (Fourest et al., 1994). Estos efectos se han conseguido mediante el pretratamiento con ácidos, bases y compuestos orgánicos.

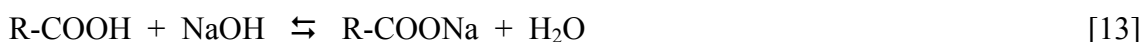
➤ Por último, es conveniente mencionar un tipo de pretratamientos cuyo objetivo no es el de aumentar la capacidad de adsorción de la biomasa, sino el de **aumentar su estabilidad estructural**. La finalidad de estas actuaciones es la de preparar la biomasa que va a ser sometida a determinados procesos de bioadsorción, especialmente abrasivos con la misma como son los llevados a cabo en reactores de flujo continuo. Esta modificación es llevada a cabo principalmente con determinados compuestos orgánicos, generalmente aldehídos (formaldehído), que provocan el entrecruzamiento de la biomasa el cual consiste en la formación de puentes covalentes entre grupos funcionales de la misma (Galun et al., 1986; Jalai-Rad et al., 2004). Otros compuestos también usados para aumentar la estabilidad de la biomasa, aunque con menor frecuencia, son determinados ácidos (Huang & Huang, 1996) y sales (Matheickal et al., 1999).

En la literatura también se mencionan las diferentes técnicas analíticas utilizadas con la finalidad de conocer la acción exacta llevada a cabo por el agente pretratante sobre la biomasa. Las más frecuentes son las siguientes:

Microscopía electrónica de barrido (SEM). Ésta técnica, aplicada al estudio del pretratamiento de la biomasa, permite identificar los cambios morfológicos de la superficie de la biomasa tras el pretratamiento con respecto a la biomasa sin pretratar. En determinados estudios, se muestra como la biomasa presenta una mayor porosidad

en su superficie tras la acción del agente pretratante lo que daría lugar a una mejor accesibilidad del metal a zonas internas de la biomasa – de otro modo inaccesibles – aumentándose, por tanto, el número de centros activos disponibles, lo cual se traduce en una mayor capacidad de adsorción metálica (Yu et al., 2001).

Espectroscopía de infrarrojos (FTIR). Mediante esta técnica es posible estudiar si se produce variación o no en los grupos funcionales de la superficie de la biomasa durante el pretratamiento. La identificación de los grupos funcionales tiene una elevada importancia ya que constituyen los centros activos de adsorción, por lo que cualquier modificación en los mismos puede implicar cambios en la capacidad para recuperar metales. En la bibliografía aparecen, con frecuencia, estudios donde se aplica esta técnica, como aquellos realizados con *Streptomyces rimosus* (Ddour et al., 1999) en los que tras el pretratamiento con NaOH se observa una modificación de los grupos funcionales carboxilo contenidos en la biomasa original, dando lugar a grupos carboxilato de sodio a través de la reacción:



La ventaja de la presencia de los grupos carboxilatos frente a la de los carboxilos es que los primeros facilitan la fijación del metal al poder intercambiarse con el Na^+ del carboxilato. Otro estudio muestra también la formación de nuevos grupos funcionales como aminos, hidroxilos o iminos, en la superficie de *Penicillium chrysogenum* tras el pretratamiento con polietilenimina (Deng & Ting, 2005).

1.5.- Justificación del trabajo

1.5.1.- Objetivo

Una vez analizado, en líneas generales, el estado actual de la investigación realizada en el área de bioadsorción, queda patente la existencia de diversos aspectos menos estudiados tales como, por ejemplo, la utilización de biomazas heterogéneas en lugar de biomazas uniespecíficas. En este caso, aunque puede haber ligeras variaciones en la composición entre diferentes tomas de muestra las cuales, a su vez, pueden dar lugar a pequeñas variaciones en los resultados, indudablemente se amplía el abanico de

biomasas que potencialmente pueden ser usadas como bioadsorbentes. Otros aspectos relativamente poco estudiados, según la bibliografía, han sido los sistemas multimetálicos a pesar de ser lo más habitual en efluentes industriales. Por último, en el caso del pretratamiento de la biomasa, a pesar que en la bibliografía se recogen múltiples estudios encaminados a aumentar la capacidad de adsorción de las biomasas, son muy escasos los estudios enfocados a conocer en profundidad la acción exacta que el agente pretratante realiza sobre la biomasa.

La presente Tesis Doctoral tiene como finalidad cubrir, en lo posible, estos aspectos menos frecuentes en las citas bibliográficas, lo que permitirá dar un paso más hacia una posible aplicación industrial del proceso de bioadsorción. En concreto los objetivos perseguidos han sido los siguientes:

➤ Selección de una biomasa con la mejor capacidad de recuperación metálica, a partir de un conjunto de biomasas residuales y heterogéneas recogidas en la Comunidad de Madrid. La importancia de que la biomasa sea de origen residual radica, por un lado, en obtener material bioadsorbente a bajo (o nulo) coste económico y, por otro lado, en contribuir a la disminución del impacto ambiental producido por este tipo de residuos en la naturaleza fomentando su reciclaje.

➤ Caracterización del comportamiento adsorbente de la biomasa elegida estudiando las condiciones óptimas de ensayo en cuanto al valor de pH, concentración de biomasa idónea y tiempo de contacto entre la biomasa y la disolución del metal. En este sentido, se cuantificará su capacidad de adsorción tanto en sistemas monometálicos como en bimetálicos, con los metales que más frecuentemente contaminan los efluentes industriales (Cd, Cu, Ni, Pb y Zn), a través del trazado de las isotermas de adsorción y del ajuste de los datos experimentales a modelos matemáticos, principalmente el de Langmuir. Se utilizarán las técnicas analíticas FTIR y valoración ácido-base con el fin de obtener toda la información posible sobre el proceso de fijación del metal en la biomasa a nivel molecular. De forma complementaria, también se estudiará una segunda partida de biomasa, con el fin de detectar posibles variaciones en la composición de la misma que pudieran influir en su comportamiento bioadsorbente, con respecto a la primera muestra. De este modo, se podría descartar la posible variabilidad de la misma.

➤ Una vez estudiado el funcionamiento de la biomasa seleccionada, con el fin de analizar en una primera aproximación su posible utilización industrial, se procederá a valorar la posibilidad de recuperación de los metales adsorbidos, así como la viabilidad de la biomasa para ser reutilizada en posteriores ensayos de bioadsorción.

➤ Por último, se pretenderá mejorar la capacidad de adsorción de la biomasa mediante su pretratamiento con diferentes agentes químicos. La posibilidad de lograr un aumento en la capacidad de adsorción otorgaría ventajas económicas en su uso industrial al reducir los costes derivados de un mejor aprovechamiento de la biomasa, así como el reducir costes en almacenaje, transporte y construcción de reactores, al necesitarse volúmenes menores de ésta para obtener la misma capacidad de recuperación metálica. En este apartado del trabajo, se pondrá un especial interés en el conocimiento de la acción de los agentes pretratantes sobre la biomasa, con el fin de determinar los cambios ocurridos en la misma que expliquen el aumento o no en la capacidad de recuperación metálica. Para esto último, se utilizarán también las técnicas analíticas FTIR, SEM y valoración ácido-base.

1.5.2.- Plan de trabajo

La planificación de la investigación fue la siguiente:

1) En primer lugar se procederá a la recopilación de varias biomásas de origen residual generadas en la Comunidad de Madrid, con el fin de analizar su capacidad bioadsorbente. Aquella biomasa que muestre una mayor capacidad de recuperación metálica será la elegida para realizar la mayor parte de la investigación incluida en esta Tesis Doctoral.

2) Una vez seleccionada la biomasa, se procederá a la determinación de las condiciones óptimas de bioadsorción para cada metal (Cd, Cu, Ni Pb y Zn). Para este fin se estudiará la influencia de los parámetros que, en mayor medida, afecten o condicionen el proceso de bioadsorción:

➤ Influencia del pH. Su importancia radica en que los protones presentes en la disolución pueden competir con los cationes metálicos por los mismos centros activos de la biomasa condicionando, por tanto, la cantidad de metal recuperado.

➤ Influencia de la concentración de biomasa con el fin de determinar la concentración que permita una mayor capacidad de recuperación metálica.

➤ Cinética de adsorción para conocer el tiempo de contacto metal-biomasa necesario para completarse el proceso de bioadsorción, esto es, alcanzar el equilibrio.

3) Aplicando estas condiciones óptimas, se determinarán las isothermas de adsorción sometiendo a la biomasa a diferentes ensayos de bioadsorción, con diferentes metales en sistemas monometálicos, lo que supondrá manejar distintas concentraciones iniciales de cada uno de ellos. La aplicación de modelos matemáticos, como el de Langmuir, permitirá cuantificar la capacidad máxima de adsorción de la biomasa así como su afinidad por los diferentes cationes metálicos. Este estudio será el que se repita con la segunda partida de biomasa, con el fin de valorar el grado de similitud de ambas.

4) Asimismo, también se procederá a la caracterización a nivel molecular de la biomasa utilizando: infrarrojos (FTIR) y valoración ácido-base, encaminados, fundamentalmente, a determinar los grupos funcionales de la biomasa que intervienen en el proceso de bioadsorción. FTIR es una técnica que también puede detectar el metal enlazado a los correspondientes grupos funcionales.

5) Posteriormente a la experimentación con sistemas monometálicos, se procederá a estudiar el comportamiento de la biomasa en sistemas bimetálicos con el objeto de analizar la posible competencia que se pueda establecer entre los metales por los centros activos de la biomasa. Este planteamiento supondrá:

➤ Estudiar la cinética de adsorción de la biomasa con el fin de verificar el tiempo necesario para que el proceso de bioadsorción alcance el equilibrio.

➤ Realizar ensayos de adsorción con disoluciones en las que estén presentes dos metales. Combinando adecuadamente los valores de concentración de ambos, se

procederá al trazado de las correspondientes isothermas de adsorción y al ajuste de los datos experimentales a los modelos matemáticos específicos de sistemas bimetálicos, con el fin de cuantificar el proceso de bioadsorción con la determinación de los correspondientes parámetros de equilibrio.

6) Una vez estudiado el proceso de adsorción de cada uno de los metales sobre la biomasa, se analizará la posibilidad de recuperación del valor metálico adsorbido, así como la reutilización de la biomasa. Esta parte del trabajo experimental supondrá acometer dos etapas de forma consecutiva:

- Estudiar el efecto de una serie de reactivos químicos sobre la biomasa previamente cargada de metal, con el fin de evaluar la capacidad de cada uno de ellos como agente desorbente, tomando como criterio compartido la cantidad de metal liberado.

- Estudiar la posibilidad de reutilizar la biomasa tras un ciclo de bioadsorción-desorción con cada agente desorbente estudiado. La capacidad de recuperación metálica de la biomasa previamente utilizada, sería directamente proporcional a la cantidad de centros activos liberados por el metal desorbido e inversamente proporcional a los daños que el proceso de desorción haya causado en dicha biomasa.

7) Por último, tras conocer la capacidad de adsorción de la biomasa, se intentará aumentar la misma a través del pretratamiento de la biomasa. Este apartado se desarrollará de acuerdo a las siguientes etapas:

- Estudio de la acción de diferentes compuestos químicos sobre la biomasa para seleccionar aquellos con los que se consiga un mayor aumento en la capacidad de adsorción.

- Optimización del proceso de pretratamiento con los compuestos químicos seleccionados. Se determinará la concentración óptima de los agentes pretratantes estudiándose, además, el efecto del lavado de la biomasa de forma posterior a la aplicación de dicho pretratamiento.

➤ Cuantificación de la biomasa perdida en el proceso de pretratamiento con el fin de determinar el rendimiento neto de la misma.

➤ Caracterización cuantitativa de la biomasa pretratada con el correspondiente trazado de las isotermas de adsorción y la aplicación del modelo matemático de Langmuir para comparar los resultados obtenidos con relación a los hallados anteriormente para la biomasa sin pretratar.

➤ Caracterización molecular de la biomasa pretratada mediante las técnicas analíticas de valoración ácido-base, SEM y FTIR con el fin de conocer la acción del agente pretratante sobre la biomasa, así como los cambios en la misma responsables del posible aumento en la capacidad de recuperación metálica.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Biomasa

La elección de la biomasa se realizó tratando de encontrar en ésta funciones de heterogeneidad, en cuanto a su composición específica, así como tener un origen residual. De acuerdo con estos dos criterios, se procedió a la selección de una serie de biomásas, potencialmente utilizables dentro de la Comunidad de Madrid, las cuales podían dividirse en dos grupos: biomásas obtenidas de ecosistemas eutrofizados y hojas procedentes de árboles caducifolios.

Los ecosistemas eutrofizados se ocasionan por un aporte masivo de nutrientes, como nitratos o fosfatos, a un ecosistema acuático. Estos nutrientes provocan un importante desarrollo de los organismos fotosintéticos promoviendo, a su vez, un crecimiento masivo de organismos herbívoros aerobios. Estos últimos organismos, al consumir rápidamente el oxígeno disuelto en el agua generan un medio anaeróbico incompatible con la vida de organismos que precisan del oxígeno para su metabolismo.

De entre los **ecosistemas eutrofizados**, se eligieron tres localizaciones diferentes de recogida de muestras:

El Pardo (Madrid)

La recogida se realizó el 28/05/1999 tomando una muestra de biomasa del río Manzanares an su paso por El Pardo. El análisis microbiológico de esta biomasa (Tabla 8) puso de manifiesto una gran abundancia del alga clorófito *Spirogyra sp.* junto con una cantidad despreciable de algas unicelulares tales como diatomeas, algas cianofíceas y algas del género *Scenedesmus sp.*

Tabla 8.- Composición de la biomasa obtenida en el río Manzanares.

Especie	Cantidad (g) en 100 g de biomasa
<i>Spirogyra sp.</i>	97,90
Cianobacterias	0,70
Diatomeas	0,70
<i>Scenedesmus sp.</i>	0,70

Casa de campo (Madrid)

La biomasa se tomó el 28/05/1999 en el arroyo Merques a su paso por la zona “Siete Hermanas” de la citada Casa de Campo. De su composición (Tabla 9) se puede apreciar una elevada proporción de las algas clorófitas *Cladophora sp.* y *Ulothrix sp.* Asimismo, se identificó, aunque en menor proporción, el alga clorófito *Spirogyra sp.*, hojas de *Platanus orientalis* y una pequeña cantidad de diatomeas y cianobacterias.

Tabla 9.- Composición de la biomasa obtenida en la Casa de campo.

Especie	Cantidad (g) en 100 g de biomasa
<i>Cladophora sp.</i>	66,70
<i>Ulothrix sp.</i>	20,00
<i>Spirogyra sp.</i>	8,00
<i>Platanus orientalis</i>	5,00
Cianobacterias	0,20
Diatomeas	0,10

Centro de Investigación Forestal (CIFOR) (Madrid)

La biomasa fue tomada del fondo de una balsa de riego ubicada en el CIFOR, en dos momentos diferentes con un año de diferencia entre ambas tomas (28/05/1999 y 12/05/2000). El motivo fue determinar posibles variaciones tanto en su composición como en los resultados experimentales de adsorción. Ambas biombras presentaron una gran heterogeneidad en su composición (Tabla 10), destacando mayoritariamente las siguientes especies:

- Algas clorófitas: *Cladophora sp.*, *Oedogonium sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Spirogyra sp.*, *Micrasterias sp.*
- Plantas caducifolias: *Acer negundo*, *Aesculus hippocastanum*, *Bambusia sp.*, *Eichhornia crassipes*, *Hedera elix*, *Ilex sp.*, *Ligustrum sp.*, *Platanus hispanica*, *Ulmus sp.* y *Vinca sp.*
- Bacterias fotosintéticas: Cianobacterias.

➤ Protistas: Diatomeas, *Euglena sp.*

La diferencia sustancial entre ambas recogidas fue que en la primera apareció una cantidad importante de especies de algas pertenecientes a los géneros *Oedogonium*, *Cladophora* y *Spirogyra*, que no fueron detectadas en la segunda recogida. La aparición de estas especies supuso un valor notablemente más elevado de la relación algas/plantas, de la primera recogida con respecto a la segunda.

Tabla 10.- Composición de la biomasa obtenida en el CIFOR.

Espece	Cantidad (g) en 100 g de biomasa (1ª Recogida)	Cantidad (g) en 100 g de biomasa (2ª Recogida)
<i>Oedogonium sp.</i>	26,93	-
<i>Eichhornia crassipes</i>	25,00	53,50
<i>Cladophora sp.</i>	20,18	-
<i>Spirogyra sp.</i>	13,52	-
<i>Aesculus hippocastanum</i>	6,94	24,70
<i>Platanus orientalis</i>	3,80	11,21
<i>Acer negundo</i>	1,27	5,40
Diatomeas	0,47	1,51
<i>Scenedesmus sp.</i>	0,47	1,51
Cianobacterias	0,31	1,01
<i>Micrasterias sp.</i>	0,31	-
<i>Hedera elix</i>	0,20	-
<i>Euglena sp.</i>	0,16	0,50
<i>Ulmus sp.</i>	0,12	0,31
<i>Ligustrum sp.</i>	0,11	0,27
<i>Vinca sp.</i>	0,10	-
<i>Bambusia sp.</i>	0,08	0,01
<i>Ilex sp.</i>	0,03	0,07

Las **hojas de árboles caducifolios** fueron recogidas el 20/11/1999, en la Ciudad Universitaria de la Universidad Complutense de Madrid, y eran pertenecientes a las especies arbóreas *Platanus hispanica* y *Populus alba*, en proporciones prácticamente idénticas. Se pensó en la posibilidad de empleo de este tipo de biomasa debido a que constituye un residuo abundante en otoño al tratarse de especies arbóreas caducifolias y, por tanto, de fácil disponibilidad y muy económica. Asimismo, se le podría dar a dicha biomasa una aplicación alternativa a la habitual del compostaje.

Todas las biomásas se sometieron al mismo procesado previo a su utilización en los experimentos de bioadsorción, consistente en un secado en estufa a 60 °C hasta peso constante, triturado mediante un molino Fritsch modelo Pulverisette 6 y tamizado con el fin de obtener un tamaño de partícula < 0,1 mm.

2.2.- Disoluciones metálicas

El desarrollo experimental se realizó utilizando como punto de partida disoluciones madre de 1000 mg/L de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} , obtenidas a partir de los siguientes reactivos químicos de calidad analítica: $\text{CdSO}_4 \times 8/3 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{ZnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, respectivamente.

Para la realización de los experimentos correspondientes a los sistemas bimetálicos, con el fin de evitar la precipitación del plomo en medio sulfato, todas las disoluciones metálicas se prepararon a partir de los correspondientes nitratos, también de calidad analítica.

El valor de pH, según el experimento a realizar, fue ajustado con H_2SO_4 diluido (0,1 % en volumen), en el caso de que las soluciones metálicas fueran preparadas a partir de las sales sulfatadas y HNO_3 diluido (0,3 % en volumen), para aquellas derivadas del empleo de nitratos. Como reactivo básico se usó NaOH a una concentración de 1 g/L, en todos los casos.

2.3.- Sistemática de experimentación

La experimentación se llevó a cabo según la metodología siguiente:

2.3.1.- Caracterización química de la biomasa

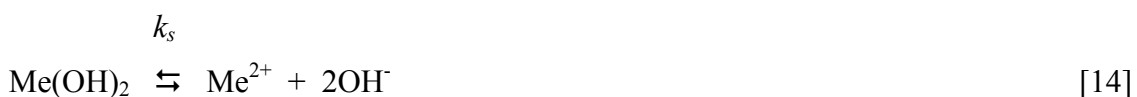
Para determinar la cantidad de cada metal que contenía la biomasa original, ésta se sometió a un tratamiento cáustico con el fin de asegurar su disolución total, haciendo posible de este modo su determinación por espectrofotometría de absorción atómica. Para ello, se preparó una disolución de 50 mL de ácido sulfúrico al 50 % en volumen, a la que se añadió 0,5 g de biomasa; de esta forma, la concentración de biomasa en el

medio fue de 10 g/L. La mezcla se mantuvo en agitación (placa magnética) durante una hora para, posteriormente, proceder a la separación de la biomasa y el sobrenadante mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 3 min.

2.3.2.- Estudio de los factores que afectan al proceso de bioadsorción

Los ensayos de bioadsorción se realizaron a temperatura constante en erlenmeyers de 100 mL, en los cuales se situó la biomasa y la disolución metálica, en volumen y proporciones adecuados a cada ensayo. Estos erlenmeyers fueron mantenidos en agitación en placa múltiple Selecta modelo Multimatic 5S, hasta la finalización del proceso de bioadsorción. Una vez concluido el ensayo se tomaron, mediante micropipeta automática, muestras de 5 mL de la mezcla resultante las cuales se centrifugaron, con una centrífuga Eppendorf modelo 5804, a 3.000 rpm durante 3 minutos, para separar la disolución metálica de la biomasa. Finalmente, se procedió a la medida del pH, con la ayuda de un pHmetro Crison, modelo 2001, y al análisis de la concentración metálica del sobrenadante mediante espectrofotometría de absorción atómica, utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo 1100B, con atomizador de llama aire-acetileno y una lámpara de cátodo hueco con argón a baja presión como fuente de radiación primaria.

Para el estudio de la **influencia del pH** en la capacidad de bioadsorción, se trabajó con distintos valores de pH, todos ellos dentro del rango de solubilidad de la especie metálica. Este rango de solubilidad se fijó mediante el siguiente cálculo matemático del pH de precipitación del correspondiente hidróxido:



siendo k_s la constante de solubilidad del hidróxido Me(OH)_2 .

Por tanto:

$$k_s = \frac{[\text{Me}^{2+}][\text{OH}^-]^2}{[\text{Me(OH)}_2]} \quad [15]$$

Al ser $\text{Me}(\text{OH})_2$ un compuesto sólido, su actividad es igual a 1, por tanto, la ecuación [15] puede simplificarse de la siguiente forma:

$$k_s = [\text{Me}^{2+}][\text{OH}^-]^2 \quad [16]$$

Sustituyendo el producto iónico del agua, $K_w = [\text{OH}][\text{H}_3\text{O}^+] = 10^{-14}$, en la ecuación anterior se llega a:

$$k_s = \frac{[\text{Me}^{2+}]10^{-28}}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2} \quad [17]$$

Tomando logaritmos se obtiene la ecuación [18] que fue la utilizada para el cálculo del pH de solubilidad del metal, en función de su concentración en la disolución:

$$pH = 14 - \frac{\log[\text{Me}^{2+}] + pk_s}{2} \quad [18]$$

En la Tabla 11 se muestran valores de k_s y de pH de precipitación para los hidróxidos de los metales con los que se ha trabajado, a concentraciones de 10 y 150 mg/L.

Tabla 11.- Valores de k_s y de pH de precipitación.

Compuesto	k_s	pH precipitación (10 mg/L)	pH precipitación (150 mg/L)
$\text{Cd}(\text{OH})_2$	$5,37 \cdot 10^{-15}$	8,89	8,30
$\text{Cu}(\text{OH})_2$	$4,90 \cdot 10^{-20}$	6,37	5,78
$\text{Ni}(\text{OH})_2$	$5,54 \cdot 10^{-16}$	8,40	7,81
$\text{Pb}(\text{OH})_2$	$1,40 \cdot 10^{-20}$	6,10	5,51
$\text{Zn}(\text{OH})_2$	$7,68 \cdot 10^{-17}$	7,97	7,38

En función de este estudio y con el fin de determinar el valor de pH óptimo de adsorción, se utilizaron cuatro valores de pH con cada metal, inferiores obviamente a los valores correspondientes de precipitación. Los valores elegidos fueron: 2, 4, 6 y 8 para el Cd ; 1,5, 3, 4 y 5 para el Cu; 1,5, 3, 5 y 7 para el Ni ; 2, 4, 5 y 6 para el Pb y 1,5, 3, 5 y 7 para el Zn;. Así pues, se prepararon para cada metal cuatro disoluciones con 50 mg/L de concentración metálica y 50 mL de volumen, ajustando previamente el pH a los valores antes indicados. La concentración de biomasa usada en estos ensayos fue de 0,5 g/L. El seguimiento de los ensayos se realizó mediante toma de alícuotas de la

suspensión a diferentes tiempos (0,5, 1,5, 3,5, 8 y 30 minutos), las cuales se analizaron como ya se indicó anteriormente.

Para determinar la **concentración de biomasa** de trabajo más adecuada, se realizaron diferentes ensayos de bioadsorción utilizando cuatro concentraciones de biomasa (0,5, 1, 2 y 3 g/L) con cada uno de los cinco metales usando, en este caso, una concentración metálica de 10 mg/L, en todos los casos. Los valores de pH inicial fueron los fijados en el estudio anterior.

También se procedió al estudio de la **cinética del proceso de bioadsorción** con el primer objetivo de determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio; dicho estudio se abordó realizando diversos ensayos de bioadsorción con concentraciones metálicas de 10, 25, 50, 100 y 150 mg/L para cada uno de los cinco metales. Se trabajó con los valores óptimos de pH y concentración de biomasa obtenidos en los estudios descritos anteriormente. En el transcurso del ensayo de bioadsorción fueron tomadas muestras de 5 ml cada una, a distintos tiempos de contacto de la disolución metálica con la biomasa: 0 (concentración metálica inicial), 0,5; 1,5; 3,5; 8; 30 y 120 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron y se determinó el pH y su concentración metálica (mediante espectrofotometría de absorción atómica).

2.3.3.- Isotermas de adsorción

El estudio del proceso de bioadsorción en sistemas monometálicos se completó con el trazado de las isotermas de adsorción, las cuales se determinaron en las condiciones experimentales fijadas a partir del estudio anterior y variando la concentración metálica entre 10 y 150 mg/L. Todo ello con el fin de cuantificar el fenómeno de adsorción con la determinación de los correspondientes parámetros de equilibrio, por lo que los resultados experimentales se procesaron mediante los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich.

2.3.4.- Sistemas bimetálicos

En sistemas con dos especies metálicas en disolución, también se realizó de forma previa el correspondiente estudio de la cinética de bioadsorción. Para ello, se estudiaron

los sistemas bimetálicos Cu-Cd, Cu-Pb y Pb-Cd, elegidos en base a la alta frecuencia con la que el Cd, Cu y Pb aparecen en efluentes industriales, así como por su elevada toxicidad para el medio ambiente. Se utilizaron concentraciones idénticas de ambos metales de 10 y de 150 mg/L, respectivamente, para cada sistema. El volumen total de disolución bimetálica fue de 50 mL, la concentración de biomasa 0,5 g/L y el pH inicial de 4 para el sistema Cu-Cd y 4.5 para los sistemas Cu-Pb y Pb-Cd. En el transcurso del proceso de bioadsorción tomaron muestras a distintos tiempos: 0, 5, 10, 30, 60, 120 y 1440 minutos, las cuales fueron clarificadas mediante centrifugación; el sobrenadante fue analizado mediante espectrofotometría de absorción atómica.

El trazado de las isothermas de adsorción fue llevado a cabo poniendo en contacto la biomasa con disoluciones que contenían dos metales, cuyas concentraciones fueron 0, 10, 25, 50, 100 y 150 mg/L, estableciéndose distintas series de tal forma que se fijaba la concentración del primer metal en uno de los valores indicados y se hacía variar la del segundo dentro del mismo intervalo. Se utilizaron los mismos valores de pH y de concentración de biomasa que en el estudio cinético previo. Los ensayos fueron llevados a cabo con agitación magnética durante 120 minutos. Las muestras, una vez tomadas y clarificadas mediante centrifugación para separar la biomasa del sobrenadante, fueron analizadas mediante espectrofotometría de absorción atómica.

La competencia establecida entre los dos metales que intervienen en cada sistema de bioadsorción, por los puntos de adsorción de la biomasa, ha podido cuantificarse gracias al ajuste de los datos experimentales al modelo de Langmuir para sistemas bimetálicos. Dichas constantes, junto con la capacidad máxima de adsorción de la biomasa, se determinaron con el software informático MATLAB 5.1.

2.3.5.- Recuperación del metal adsorbido

Con el objeto de analizar la posibilidad de reutilización de la biomasa en ciclos sucesivos de carga y descarga, se trabajó experimentalmente del modo siguiente:

Carga: En esta primera etapa, se procedió a retener sobre la biomasa una cierta cantidad de cada metal. Para ello, en cada caso, se utilizó un volumen de disolución de 400 mL con una concentración inicial de 100 mg/L y con el valor de pH óptimo de cada metal. Se añadieron 0,2 g de biomasa manteniendo el sistema en agitación durante 120

minutos con el objeto de dar tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio. A continuación, la biomasa se recuperó mediante filtrado y se secó en estufa a 60 °C durante 12 h. Por último, en el filtrado, se determinó la concentración metálica mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Descarga: Una vez obtenida la biomasa cargada, ésta se sometió a la acción del agente eluyente con objeto de romper la unión biomasa-metal, usándose para ello una disolución de HCl a pH 3, o bien otra de NaHCO₃ a una concentración 0.1 N. La concentración de la biomasa fue de 0,5 g/L, manteniéndose suspendida en la disolución eluyente con agitación magnética durante 120 min. Con el fin de estudiar la cinética del proceso de desorción, se tomaron muestras de 5 mL durante el desarrollo del experimento, a los tiempos 0 (concentración metálica inicial), 5, 30, 60 y 120; tras la centrifugación de las mismas, se determinaron en el sobrenadante los correspondientes valores de pH y concentración metálica. Finalmente, la biomasa fue recuperada mediante filtrado y se secó en estufa a 60 °C durante 12 h.

2.3.6.- Pretratamiento de la biomasa

Una de las prioridades del presente estudio fue intentar mejorar la capacidad de recuperación metálica de la biomasa, para lo cual se ensayó la acción sobre ella de distintos agentes químicos. Los reactivos seleccionados para este estudio fueron los siguientes: CaCl₂, NaHCO₃, NaOH y Na₂CO₃, todos ellos a una concentración de 0,2 M; también se usaron etanol al 95 % y formaldehído al 6 % y, por último, un detergente de nombre comercial Tween 80 a una concentración de 5 g/L. La concentración de la biomasa se fijó en un valor de 5 g/L y el volumen de la disolución en 60 mL. La reacción de pretratamiento fue llevada a cabo con agitación magnética durante un tiempo de 120 min, al cabo del cual se recuperó la biomasa de la disolución pretratante mediante centrifugación. A partir de esta recuperación y para cada agente pretratante, la biomasa se dividió en dos partes: una de ellas, se dejó tal cual procediendo a su secado en estufa a 60 °C hasta peso constante, y la otra, se sometió a 3 lavados sucesivos con 40 mL de H₂O destilada cada uno, durante 30 min y con agitación magnética. Posteriormente, la biomasa lavada se recuperó mediante centrifugación y se secó en estufa a 60 °C hasta peso constante.

Una vez realizado el pretratamiento de la biomasa con los diferentes reactivos, seguida o no de lavado, se realizaron diferentes ensayos de bioadsorción con el mismo procedimiento descrito para la biomasa sin pretratar: se experimentó con los cinco metales Cu, Cd, Ni, Pb y Zn, a una concentración de 150 mg/L, el valor de pH inicial fue el óptimo obtenido con la biomasa sin pretratar: 4 para Cd y Cu y 5 para Ni, Pb y Zn; la concentración de biomasa en estos ensayos también fue de 0,5 g/L.

Una vez seleccionados aquellos agentes capaces de incrementar la capacidad de adsorción en la biomasa, se llevó a cabo un estudio complementario procediendo, en primer lugar, a la determinación de la concentración óptima del reactivo en el pretratamiento de la biomasa. Para ello, se ensayaron cuatro concentraciones distintas: 0,075; 0,2 y 0,5 M para todos ellos, además de 1 M para el NaOH y concentraciones de saturación para los otros dos reactivos (0,82 M para el NaHCO₃ y 0,67 M para el Na₂CO₃). A su vez, los métodos de pretratamiento se llevaron a cabo con lavado posterior a la acción del agente pretratante o sin él. Los ensayos de bioadsorción posteriores fueron realizados de forma idéntica que en casos anteriores.

2.3.7.- Técnicas analíticas

a) Valoración ácido-base

Este estudio tuvo como objetivo la determinación de la constante de acidez de la biomasa (k_a) la cual, a su vez, condiciona su comportamiento en función del valor de pH. El conocimiento del valor de esta constante de acidez permite determinar el grupo o grupos funcionales más importantes que están presentes en la biomasa, los cuales son centros activos potenciales de bioadsorción.

Mediante este estudio fueron analizadas tanto las biomasas pretratadas según la metodología anterior como la biomasa sin pretratar. Para esto, se suspendieron 0,1 g de biomasa en 100 mL de H₂O destilada, manteniéndose la mezcla en agitación en placa magnética. El pH inicial se fijó en 3 mediante la adición de una disolución de HCl al 0,1 % para asegurar el estado totalmente protonado de los grupos funcionales de la biomasa. A partir de este valor inicial de pH, se procedió a valorar mediante adición de sucesivas

alícuotas de 0,1 mL de una disolución de NaOH 0,1 M, midiendo el valor de pH resultante tras cada adición.

b) Microscopía electrónica de barrido y microanálisis elemental

EL objetivo fundamental fue identificar los cambios morfológicos sufridos por la biomasa durante el pretratamiento, así como intentar identificar los puntos de su superficie en los que se hubiera podido producir el anclaje del metal. Para ello, se analizaron mediante esta técnica diferentes muestras de biomasa sin pretratar o pretratadas con NaOH 1 M según la metodología explicada anteriormente, seguidas o no de lavado con H₂O destilada y sometidas o no a procesos de bioadsorción con Cd y Pb realizados en las condiciones experimentales anteriormente indicadas. Más concretamente, se estudiaron las siguientes posibilidades:

- Biomasa sin pretratar.
- Biomasa sin pretratar + bioadsorción Pb.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M (sin lavado posterior).
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M (sin lavado posterior) + bioadsorción Pb.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M (sin lavado posterior) + bioadsorción Cd.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M + lavado posterior con H₂O destilada.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M + lavado posterior con H₂O destilada + bioadsorción Pb.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M + lavado posterior con H₂O destilada + bioadsorción Cd.

La preparación de dichas muestras de biomasa, se concretó en el recubrimiento de las mismas con una fina capa de oro, para hacerlas conductoras; posteriormente, se analizaron con un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-6400.

c) Espectroscopía de infrarrojos

Con el fin de estudiar la acción del pretratamiento químico sobre la biomasa original, se analizaron mediante esta técnica tanto la biomasa original como las pretratadas con

NaHCO₃, Na₂CO₃ y NaOH, con o sin lavado posterior y en las condiciones óptimas determinadas anteriormente.

Esta técnica también permite profundizar en el estudio del mecanismo de unión del metal a la biomasa por ser capaz de identificar los grupos funcionales responsables de dicha unión. Con este objetivo, se analizó la biomasa, pretratada y sin pretratar, tanto con metal adsorbido (obtenida a partir de ensayos de bioadsorción con Cd, Cu, Ni, Pb o Zn en las condiciones descritas) como sin metal adsorbido.

La caracterización de las biomasas mediante esta técnica fue llevada a cabo utilizando pastillas preparadas con 100 mg de bromuro potásico y 2 mg de biomasa. Se empleó un espectrofotómetro MIDAC Prospect-IR que permitió obtener los correspondientes espectros de transmitancia en función de las longitudes de onda comprendidas entre 500 y 4.000 cm⁻¹, con una resolución de 4 cm⁻¹. La corrección de la línea base así como la identificación de las bandas fueron realizadas mediante la aplicación informática OMNIC E.S.P. de Nicolet.

d) Difracción de rayos X

Finalmente, la técnica de difracción de rayos X fue utilizada con el fin de detectar la posible presencia de precipitados metálicos con estructura cristalina sobre la biomasa. Este estudio analítico se centró en el empleo de biomasas tratadas con NaOH y cargadas con Pb y Cd bajo las siguientes condiciones experimentales:

- Biomasa pretratada con NaOH 1 M + lavado posterior con H₂O destilada + bioadsorción Cd.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M + lavado posterior con H₂O destilada + bioadsorción Pb.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M (sin lavado posterior) + bioadsorción Cd.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M (sin lavado posterior) + bioadsorción Pb.

La difracción de rayos X normal (θ - 2θ) se realizó con un difractómetro Philips X'PERT MPD de alta tensión. Las fases presentes se identificaron con el programa automático *PC-PDF win*, que incluye una base de datos actualizada con fichas de multitud sustancias cristalinas.

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- Estudio comparativo de la capacidad de adsorción de cuatro biomásas residuales

La finalidad de este trabajo experimental previo fue seleccionar entre las cuatro biomásas elegidas, aquella con mejor capacidad de adsorción para así ser utilizada en los diferentes estudios que componen la presente investigación.

Con el fin de llevar a cabo esta selección, se realizaron dos ensayos de bioadsorción con cada uno de los metales (Cd, Cu, Ni, Pb y Zn) uno con una concentración metálica de 10 mg/L y otro con una concentración de 150 mg/L. El pH inicial fue 4 para Cd, Cu y Pb, y 5 para Ni y Zn; la biomasa se utilizó a una concentración de 1 g/L. Estos valores de pH y concentración de biomasa fueron los que habitualmente han venido siendo los más adecuados en este tipo de estudios con dichos metales (Hammami, 1999). La capacidad de adsorción se calculó experimentalmente mediante la ecuación [3].

En la Tabla 12 se observa como la biomasa que mayor cantidad de metal recuperó, por unidad de masa, fue la recogida en la balsa de riego del Centro de Investigación Forestal (CIFOR), seguida de la obtenida en el arroyo Meaques (Casa de Campo), después las hojas de árboles caducifolios recogidas en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y, por último, la procedente del río Manzanares (El Pardo). En base a estos resultados, se seleccionó la biomasa obtenida en el CIFOR para sucesivos estudios.

Tabla 12.- Capacidad de adsorción q (mmol metal/g biomasa) de diferentes biomásas a concentración metálica inicial de 10 mg/L y 150 mg/L.

	CIFOR		Casa de Campo		UCM		El Pardo	
	10 mg/L	150 mg/L	10 mg/L	150 mg/L	10 mg/L	150 mg/L	10 mg/L	150 mg/L
Cd	0,071	0,267	0,068	0,222	0,048	0,150	0,012	0,067
Cu	0,142	0,504	0,134	0,393	0,079	0,157	0,044	0,110
Ni	0,126	0,341	0,158	0,290	0,044	0,073	0,044	0,153
Pb	0,043	0,405	0,043	0,347	0,043	0,267	0,039	0,159
Zn	0,147	0,306	0,135	0,229	0,067	0,102	0,061	0,229

Paralelamente, se determinó el contenido metálico de la biomasa seleccionada en su estado original (natural), dado que la presencia en ella de ciertos elementos metálicos

podría causar algún tipo de interacción no deseada en posteriores estudios. Para ello se realizó un ataque cáustico de la biomasa que permitiera su disolución; se procedió experimentalmente como ya se indicó en el apartado 2.3.1.; los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13.- Análisis del contenido metálico de la biomasa original.

Elemento	mmol/g de biomasa
Ca	0,247
Fe	0,034
Zn	0,001
Cu	$6,30 \cdot 10^{-4}$
Pb	$2,41 \cdot 10^{-4}$
Ni	$1,70 \cdot 10^{-4}$
Cd	$8,90 \cdot 10^{-5}$

Los datos pusieron de manifiesto una concentración significativa de calcio, elemento que forma parte de la fase amorfa o matriz de la pared celular de las células vegetales. El calcio, desde el punto de vista de la bioadsorción, jugaría un papel importante al poder intervenir en procesos de intercambio catiónico, favoreciendo la unión del metal a la biomasa, tal y como sugieren Fourest y colaboradores (Fourest et al., 1994). También, se detectó una pequeña cantidad de hierro, elemento que, por el contrario, podría competir con los cationes metálicos por los mismos centros activos de la biomasa en el proceso de bioadsorción. Por otra parte, los elementos objeto de este estudio (Cd, Cu, Ni, Pb y Zn) también fueron detectados, aunque en cantidades prácticamente despreciables.

3.2.- Factores que influyen en la bioadsorción

De forma previa al trazado de las isotermas se determinaron las condiciones más adecuadas de bioadsorción para cada uno de los cinco metales objeto de estudio. Se evaluó la influencia de parámetros determinantes en este proceso: el pH, la concentración de biomasa y el tiempo de contacto entre el metal y la biomasa.

3.2.1.- Influencia del pH

El pH influye en los procesos de bioadsorción en dos sentidos diferentes; por un lado, alterando la solubilidad y distribución de las especies del ión metálico en disolución y, por otro, modificando el número de enlaces disponibles en la superficie de la biomasa, que se protonan o desprotonan en función del valor de pH y del pK_a de la misma (Romero-González et al., 2001; Lodeiro et al., 2005).

Para ello, se ensayaron los cuatro valores de pH para cada uno de los cinco metales indicados anteriormente, elegidos dentro del rango de solubilidad de cada especie metálica, en función de los datos mostrados en la Tabla 11 y en las condiciones ya descritas en el apartado 2.3.2.

La influencia del pH en la capacidad de adsorción de la biomasa es un factor que ha sido ampliamente estudiado por un gran número de autores como Kapoor et al., 1999; Matheickal & Yu, 1999; Sar et al., 1999; Yin et al., 1999; Yetis et al., 2000; Romero-González et al., 2001; Satiroglu et al., 2002; Cruz et al., 2004; Martins et al., 2004; Sheng et al., 2004; Chojnacka, 2005; Diniz & Volesky, 2005 y Mehta & Gaur, 2005 entre otros. De sus trabajos se deduce que a valores de pH bajos, generalmente menores de 2, la bioadsorción de cationes metálicos por parte de la biomasa es prácticamente nula. Ello es debido a que los protones presentes en el medio se unen fuertemente a los grupos funcionales de la misma, principalmente carboxilos y sulfatos, impidiendo el anclaje de los cationes por inhibición competitiva. Asimismo, los protones unidos a la biomasa le confieren una carga neta positiva provocando fuerzas de repulsión que afectarían a la unión con los cationes metálicos. Por encima de este valor de pH, la capacidad de adsorción tiende a aumentar debido a la desprotonación gradual de la superficie de la biomasa, haciéndose más elevado, por tanto, el número de grupos funcionales con carga negativa, los cuales pasarían a estar disponibles para la unión con el metal. A partir de un determinado valor de pH, la capacidad de adsorción tiende a disminuir debido a la formación de otros iones más complejos del metal ($MeOH^+$), los cuales dificultan la adsorción por su mayor volumen y su menor carga con respecto al metal en disolución.

Según la Figura 8, en donde se muestran los resultados experimentales obtenidos, se comprueba que la biomasa presentó un comportamiento similar al descrito anteriormente, ya que en todos los casos existió, partiendo de valores de pH bajos, una clara tendencia al aumento de la capacidad de adsorción (q) con el aumento de esta variable. Ello fue posiblemente debido a que a medida que aumentaba el pH de la disolución la biomasa tendía a desprotonarse con el consecuente desplazamiento hacia la derecha del equilibrio [6], provocando una mayor atracción de los cationes metálicos por los ligandos con carga negativa (Matheickal et al., 1999; Yu & Kaewsarn, 1999; Yu et al., 2001; Gulnaz et al., 2005; Han et al., 2005; Lin & Lin, 2005; Saeed et al., 2005). De la misma forma, también se observó como tras alcanzar un valor de pH de adsorción óptimo (4 para Cu y Cd y 5 para el Zn, Pb y Ni) el valor de q tendió a disminuir ligeramente debido, posiblemente, a la hidrólisis de los cationes metálicos provocando la formación de cationes básicos que son más difícilmente adsorbibles por la biomasa (Romero-González et al., 2001; Lodeiro et al., 2005). Los valores anteriores de pH fueron los utilizados en los sucesivos experimentos de bioadsorción.

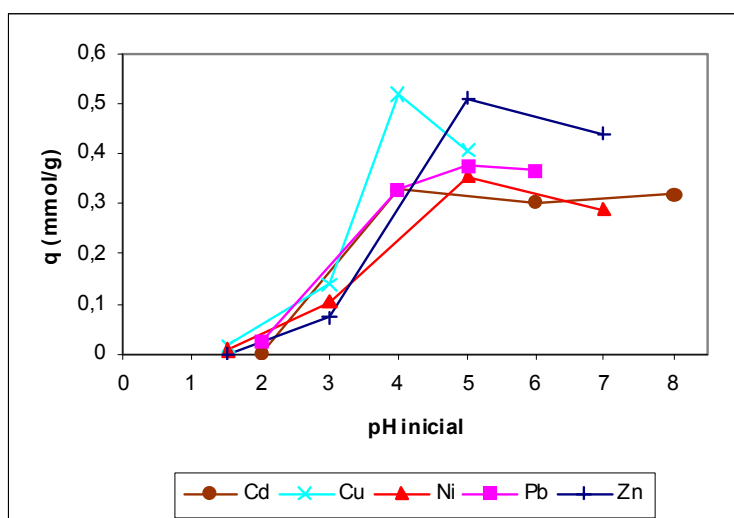


Figura 8.- Influencia del pH en la capacidad de adsorción.

La Figura 9 representa la evolución de los distintos valores de pH registrados frente al tiempo para los cinco metales y cada uno de los valores de pH inicial estudiados. En todos los casos, para valores de pH inicial menores de 2, no se observaron variaciones de pH significativas a lo largo del tiempo debido bien a la gran cantidad de protones en el medio, bien a daños producidos en la biomasa por la elevada acidez. Con valores de pH inicial comprendidos entre 3 y 5, se observó una tendencia al aumento de esta

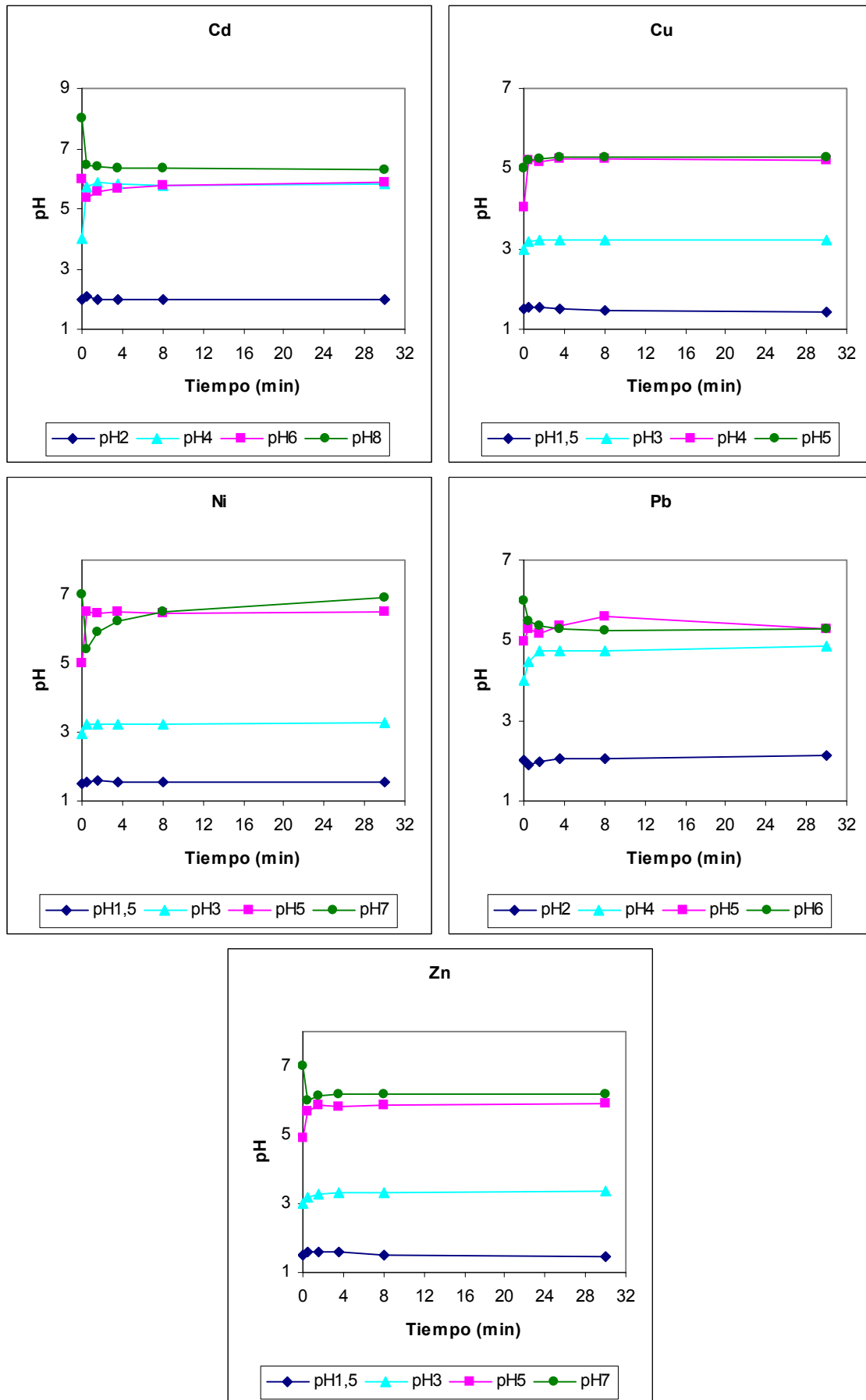


Figura 9.- Evolución del pH frente al tiempo.

variable con respecto al tiempo, con lo cual en este rango la biomasa se comportó como un aceptor de protones. A valores de pH superiores a 6, la biomasa tendió a acidificar el medio, por lo que a estos valores de pH se comportó como un donador de protones. Todo ello claramente también se justifica con el desplazamiento del equilibrio [6] motivado por los cambios de pH: si éste es bajo, el desplazamiento a la izquierda del mismo provocaría un aumento del valor de esta variable; por el contrario, si la biomasa se sitúa en un medio con un elevado valor de pH el citado equilibrio se desplazaría hacia la derecha con la consecuente acidificación del mismo (Matheickal & Yu, 1999; Veglio et al., 2002; Lodeiro et al., 2005).

3.2.2.- Influencia de la concentración de biomasa

Se analizó la influencia de la concentración de biomasa en la recuperación metálica con el fin de determinar el valor más adecuado para ser empleado en los diferentes ensayos de bioadsorción. Para llevarlo a cabo, se realizaron cuatro ensayos de bioadsorción a diferentes concentraciones de biomasa (0,5, 1, 2 y 3 g/L) para cada uno de los cinco metales empleados, a una concentración metálica de 10 mg/L.

A la hora de determinar la concentración óptima de biomasa para ser empleada en un proceso de bioadsorción es fundamental el coste económico y la disponibilidad de la misma. Si la biomasa tiene un bajo costo y gran disponibilidad, lo más razonable sería seleccionar aquella concentración con la que se consiga una mayor cantidad neta de metal recuperado del medio (Dönmez et al., 1999; Gupta et al., 2001). Mientras que si se trata de un material caro o de difícil obtención, conviene utilizar la mínima concentración que permita recuperar la mayor cantidad de metal por gramo de biomasa (q) (Holan et al., 1993; Dönmez et al., 1999; Davis et al., 2000).

La Figura 10 muestra la influencia de la concentración de biomasa sobre la cantidad de metal recuperada por unidad de dicha biomasa (q). Es posible observar una clara disminución de la capacidad de adsorción a medida que aumentaba la concentración de la biomasa. Estos resultados son acordes con los obtenidos por diversos autores tales como Ruiz-Manríquez et al., 1998; Sekhar et al., 2004; Gong et al., 2005 y Han et al., 2005. Este comportamiento se debe, principalmente, a que elevadas concentraciones de biomasa en el medio dan lugar a interacciones electrostáticas entre las células,

formándose aglomerados que por efecto pantalla disminuyen el número de centros activos disponibles para el metal (Ruiz-Manríquez et al., 1998; Gong et al., 2005; Mehta & Gaur, 2005).

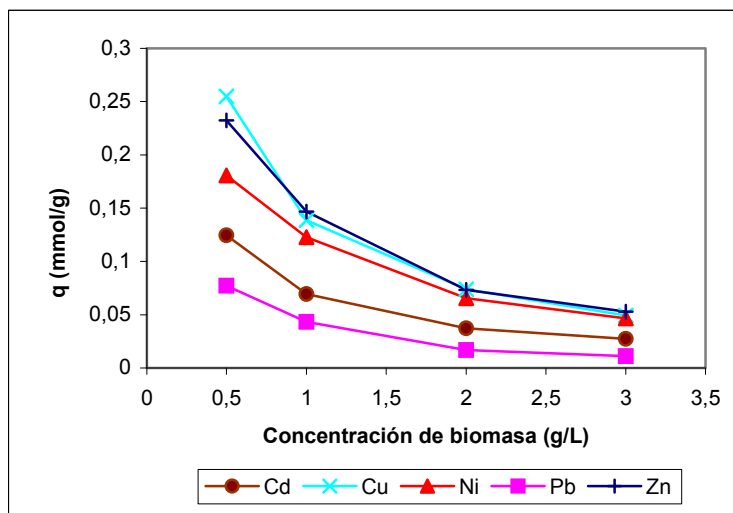


Figura 10.- Influencia de la concentración de la biomasa en la capacidad de adsorción.

En la Figura 11 se representa la influencia de la concentración de biomasa en la cantidad neta de metal recuperado, expresada en tanto por ciento de recuperación. Los resultados muestran como un aumento en la concentración de biomasa, supusieron un aumento en el porcentaje de metal recuperado. Este aumento fue menor cuanto mayor era la concentración metálica, llegando a alcanzarse un determinado valor por encima del cual no fue posible conseguir una mayor recuperación metálica. No obstante, las diferencias encontradas fueron mínimas a partir de 1 g/L. Resultados similares han sido obtenidos por diversos autores tales como Lister & Line, 2001; Kalyani et al., 2004; Sekhar et al., 2004; Gong et al., 2005 y Kamala et al., 2005.

A pesar de que la biomasa utilizada es barata y abundante, se optó por utilizar en los sucesivos experimentos la concentración de 0,5 g/L, que es con la que se logró una mayor efectividad, es decir, una mayor recuperación de metal por gramo de adsorbente. Esta elección tuvo una doble justificación: en primer lugar, los resultados indican que concentraciones mayores de 0,5 g/L no supusieron aumentos considerables en la cantidad neta de metal recuperado en relación a concentraciones más altas y, en segundo lugar, altas concentraciones de biomasa tienden a secuestrar gran cantidad de protones

del medio elevando, en gran medida, el pH lo cual comprometería la solubilidad del metal.

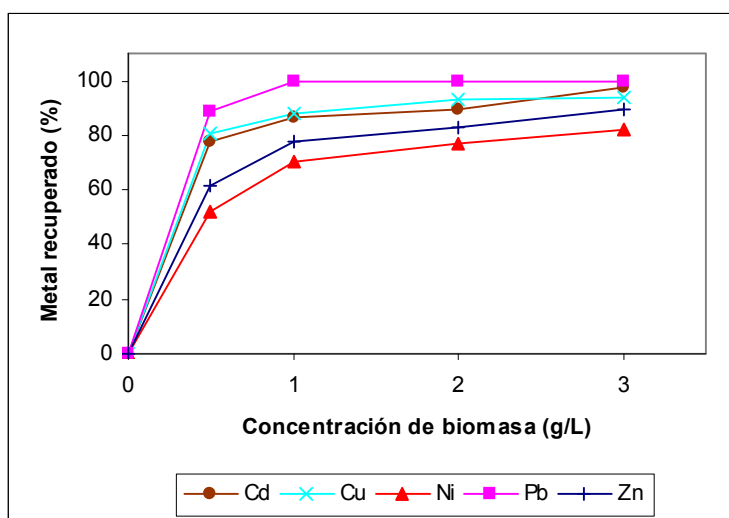


Figura 11.- Influencia de la concentración de la biomasa en el porcentaje de metal recuperado.

3.2.3.- Cinética de adsorción

El estudio de la cinética de adsorción tiene una doble finalidad. En primer lugar, permite obtener información sobre el comportamiento de la bioadsorción con respecto al tiempo a través del análisis de la variación del pH y de la concentración metálica; asimismo, también es posible calcular el tiempo necesario para que el proceso de bioadsorción se complete, es decir, se alcance el estado de equilibrio.

Para llevar a cabo dicha valoración cinética, se realizaron ensayos de bioadsorción con los parámetros de pH y concentración de biomasa fijados anteriormente. Se realizaron ensayos con cada uno de los cinco metales a concentraciones iniciales de 10, 25, 50, 100 y 150 mg/L para cada uno de ellos. En el transcurso del proceso fueron tomadas alícuotas de 5 mL, a diferentes tiempos (0, 0,5, 1,5, 3,5, 8, 30 y 120 minutos), para, seguidamente, ser sometidas a centrifugación y análisis de pH y concentración metálica mediante la metodología anteriormente descrita.

Son muchos los autores que han estudiado la cinética de adsorción de forma previa y complementaria a otros estudios relacionados con la bioadsorción metálica. En la mayoría de los casos, la bioadsorción se revela como un proceso bastante rápido que se

da en la superficie celular y de forma independiente al metabolismo (Ozturk et al., 2004; Herrero et al., 2005). La velocidad de adsorción es una cualidad importante en dicho proceso, sobre todo al trabajar con reactores de flujo continuo, lo que permite reducir el volumen de los mismos (Herrero et al., 2005). En general, la velocidad de adsorción está condicionada por los siguientes factores:

- Condiciones experimentales: principalmente la agitación (Veglio et al., 2002).
- Bioadsorbente: tipo de biomasa (cantidad y naturaleza de los centros activos), estado fisiológico (activa o inactiva, libre o inmovilizada) y propiedades estructurales (desarrollo superficial, esto es, porosidad y/o tamaño de partícula, morfología, etc) (Jalal-Rad et al., 2004; Rangsayatorn et al., 2004; Diniz & Volesky, 2005).
- Metal: difusividad del metal en el bioadsorbente, competencia con otros iones metálicos por los mismos centros activos y concentración metálica en disolución (Lu & Wilkins, 1996; Jalal-Rad et al., 2004; Rangsayatorn et al., 2004; Diniz & Volesky, 2005).

En la Figura 12 se muestra la evolución de la concentración metálica en función del tiempo. En ella es posible observar como el proceso de bioadsorción es bastante rápido y alrededor del 80 % del metal fue recuperado durante los 8 primeros minutos de experimentación, alcanzándose el equilibrio a los 30 minutos. Estos resultados son acordes a los obtenidos en diversos estudios previos (Reddad et al., 2002; Deng & Bai, 2004; Martins et al., 2004; Chojnacka et al., 2005; Goksungur et al., 2005; Seki et al., 2005) en los que se refleja como la mayor parte del proceso de bioadsorción tiene lugar en los primeros 15 minutos de contacto biomasa-disolución metálica.

La Figura 13 muestra la variación del pH con respecto al tiempo. Se comprueba como los valores aumentaron de forma simultánea a la disminución de la concentración de metal en el medio y más acentuadamente en aquellos metales en los que el pH inicial era menor. Este hecho puede ser lógico si se tiene en cuenta que los protones poseen el mismo mecanismo de unión a los centros activos de la biomasa que los cationes metálicos en disolución (Matheickal et al., 1999; Yu & Kaewsarn, 1999; Yu et al., 2001; Gulnaz et al., 2005; Han et al., 2005; Lin & Lin, 2005; Saeed et al., 2005). La

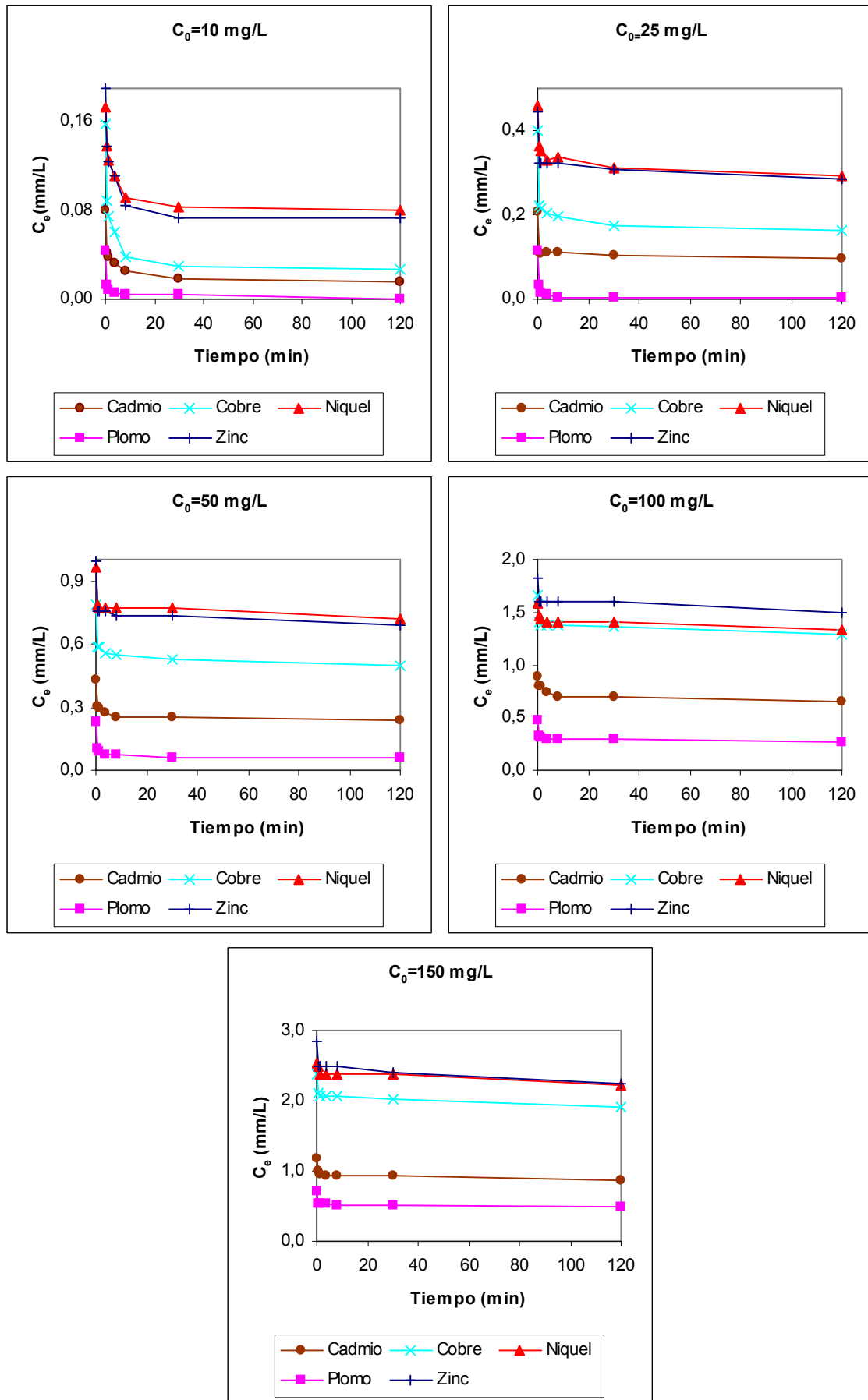


Figura 12.- Evolución de la concentración metálica respecto al tiempo.

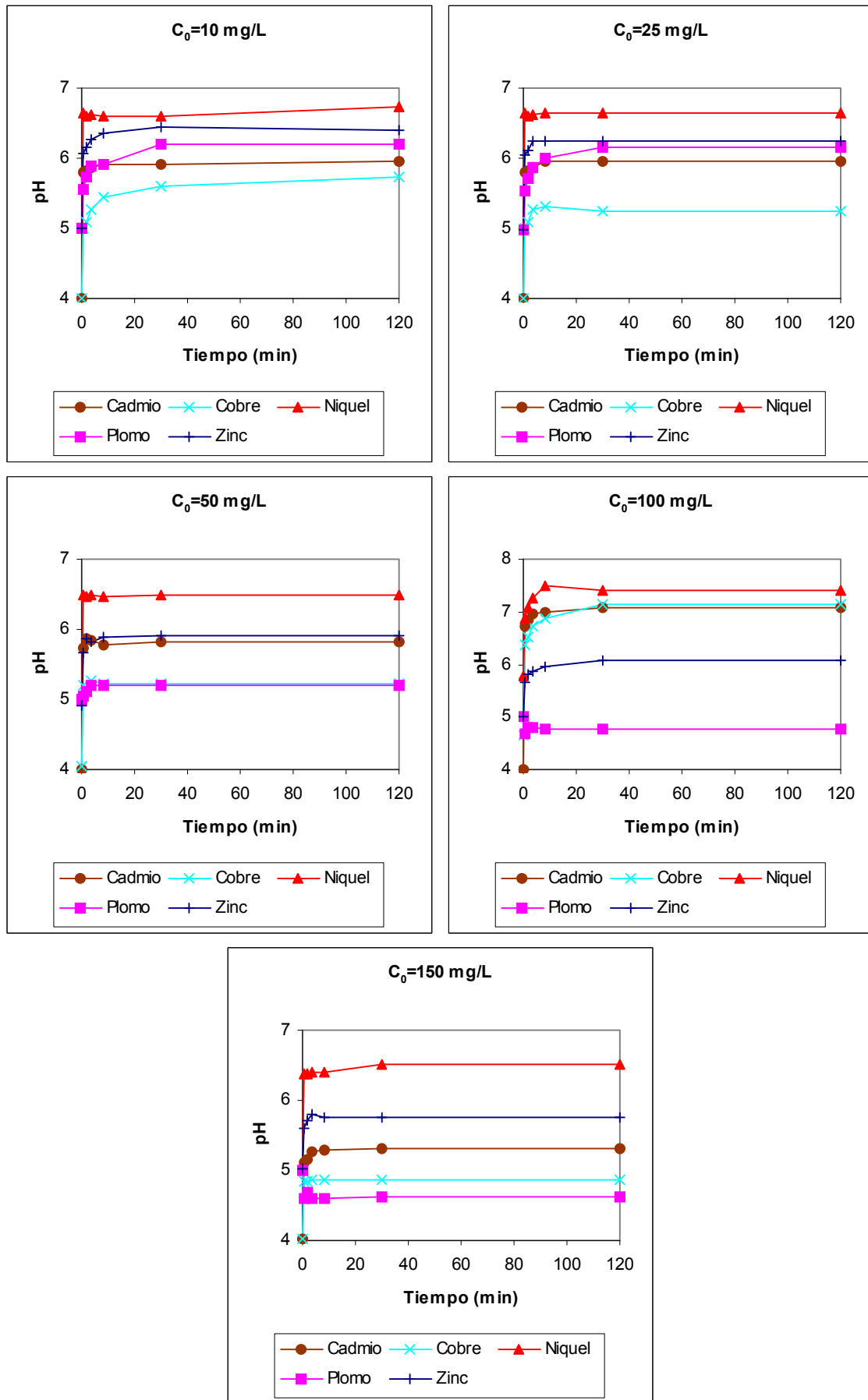


Figura 13.- Evolución del pH respecto al tiempo.

biomasa con centros activos libres incorpora, de forma paralela, los cationes metálicos y los protones, lo que hace aumentar el pH del medio.

La gran rapidez con la que se dio el proceso de bioadsorción estaría justificada porque éste ocurre principalmente en la superficie del bioadsorbente (Herrero et al., 2005; Kamala et al., 2005), además, porque la fijación del metal se lleva a cabo a través de reacciones rápidas y reversibles, que tienen lugar en ausencia del metabolismo (Cruz et al., 2004; Pagnanelli et al., 2004).

3.3.- Isotermas de adsorción

Mediante el trazado de las isotermas de adsorción se buscó, por un lado, determinar como la capacidad de adsorción de la biomasa se ve influenciada por la concentración de metal en disolución y, además, cómo cuantificar el proceso mediante la aplicación de los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich, que permiten obtener los parámetros de adsorción. Dichos modelos, como ya se dijo, han sido los más utilizados en la interpretación de este tipo procesos tal y como se refleja en numerosos trabajos bibliográficos (Chojnacka, 2005; Deng & Ting, 2005; Goksungur et al., 2005; Gulnaz et al., 2005; Han et al., 2005; Herrero et al., 2005; Kamala et al., 2005; Lodeiro et al., 2005; Mehta & Gaur, 2005 y Saeed et al., 2005).

En este apartado se estudiaron las biomásas de la balsa de riego, procedentes de la primera y segunda recogida, con el fin de comparar los resultados entre ambas y determinar el grado de similitud en su comportamiento bioadsorbente.

Con los parámetros de pH y concentración de biomasa fijados en los estudios anteriores, se realizaron cinco ensayos de bioadsorción para cada uno de los cinco metales objeto de estudio, variando su concentración metálica inicial (10, 25, 50, 100 ó 150 mg/L). El tiempo de experimentación se fijó en 120 minutos.

Para realizar el trazado de las isotermas, se calculó la capacidad de adsorción (q) correspondiente a cada uno de los ensayos mediante la ecuación [3] y los resultados se representaron frente a la concentración metálica de equilibrio C_e . En las Figuras 14 y 15 se muestran, respectivamente, las isotermas de adsorción correspondientes a la primera

y a la segunda recogida de la biomasa procedente de la balsa de riego. Se observa un aumento de la concentración de metal en equilibrio en el medio (C_e) a la vez que aumenta la capacidad de adsorción (q) hasta un valor límite, el cual corresponde a la saturación de todos los puntos de unión para el metal en la superficie de la biomasa (q_{max}). Este valor límite es la cantidad máxima de metal que puede ser recuperado por la biomasa. Es posible observar como a valores muy pequeños de C_e , pequeñas variaciones suponen grandes variaciones en el valor de q , mientras que a valores grandes de C_e , las variaciones tienen poca influencia sobre la capacidad de adsorción.

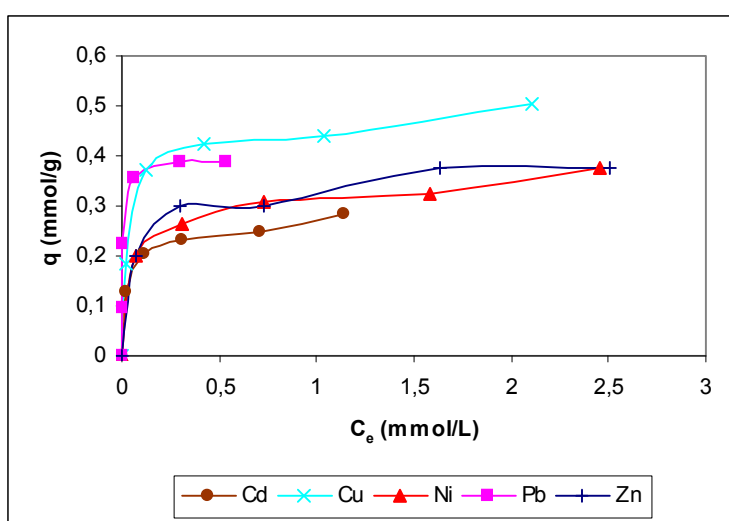


Figura 14.- Isotermas de adsorción para la primera recogida de biomasa.

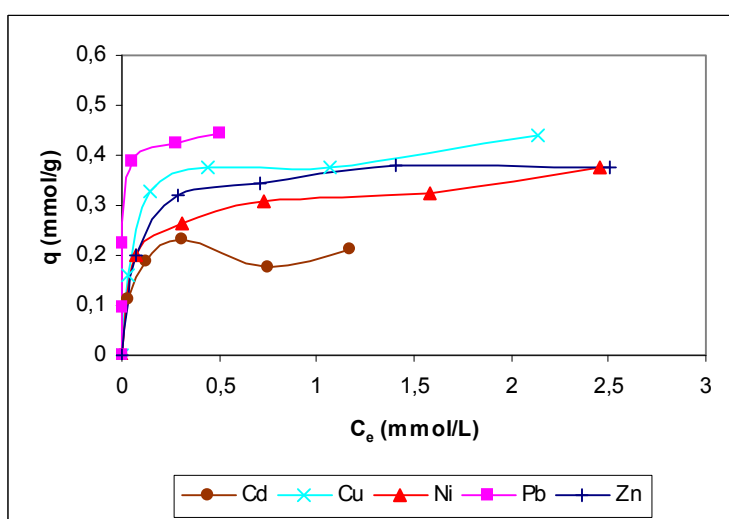


Figura 15.- Isotermas de adsorción para la segunda recogida de biomasa.

Para la determinación de los parámetros que cuantifican el proceso de adsorción, se recurrió a los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich en su forma lineal (ecuaciones [2] y [5] respectivamente). De este modo, los resultados experimentales, al representarse en forma de líneas rectas, también permitieron valorar el grado de ajuste a uno u otro modelo mediante regresión lineal.

En las Figuras 16 y 17 se muestran las isothermas de Langmuir y en las Figuras 18 y 19, aparecen las isothermas de Freundlich, correspondientes a la primera y segunda recogida de biomasa, respectivamente. Los valores de las constantes relativas a ambos modelos, así como el coeficiente de regresión lineal (R^2), que mide el grado de ajuste de los datos al modelo en cuestión, se recopilan en las Tablas 14 y 15. Los coeficientes de regresión mostrados en dichas tablas revelan siempre un valor mayor para el modelo de Langmuir lo que, a su vez, indica que los resultados experimentales correspondientes a las dos biomazas tuvieron un mayor grado de ajuste que al de Freundlich. Estos resultados parecen indicar (Puranik & Paknikar, 1997; Satiroglu et al., 2002; Goksungur et al., 2005; Saeed et al., 2005) que el proceso de bioadsorción: 1) se da en forma de monocapa; 2) existe homogeneidad en cuanto al tipo y afinidad del metal por los centros activos; 3) los iones adsorbidos no afectan al proceso de adsorción de otros iones en otros centros activos vecinos; y 4) es posible la saturación de la biomasa por parte del metal.

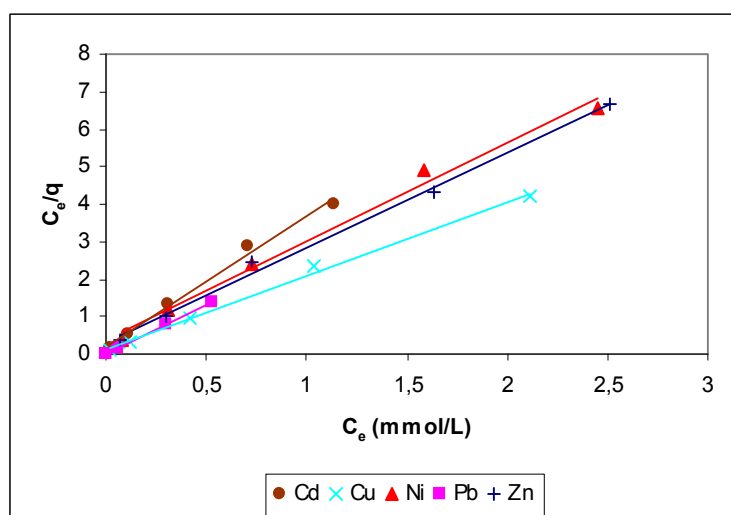


Figura 16.- Isothermas de adsorción de Langmuir para la primera recogida de biomasa.

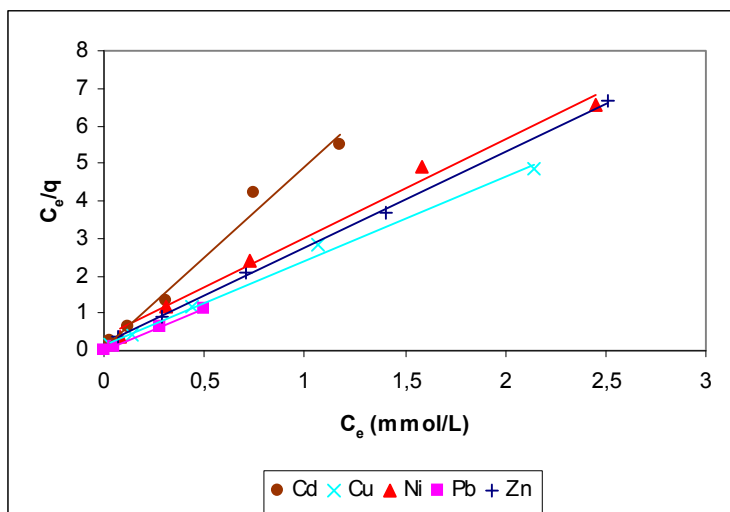


Figura 17.- Isotermas de adsorción de Langmuir para la segunda recogida de biomasa.

Tabla 14.- Constantes de Langmuir.

Elemento	Cd		Cu		Ni		Pb		Zn	
	1ª rec.	2ª rec.	1ª rec.	2ª rec.	1ª rec.	2ª rec.	1ª rec.	2ª rec.	1ª rec.	2ª rec.
q_{max} (mmol/g biomasa)	0,290	0,207	0,508	0,446	0,388	0,381	0,388	0,445	0,393	0,388
K (mmol/L)	0,055	0,019	0,067	0,079	0,141	0,141	0,003	0,005	0,116	0,067
R^2	0,993	0,982	0,996	0,994	0,991	0,991	1,000	0,999	0,996	1,000

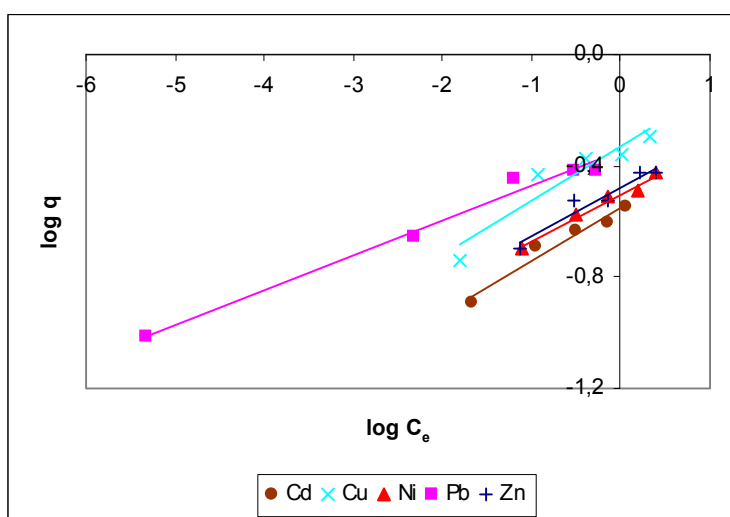


Figura 18.- Isotermas de adsorción de Freundlich para la primera recogida de biomasa.

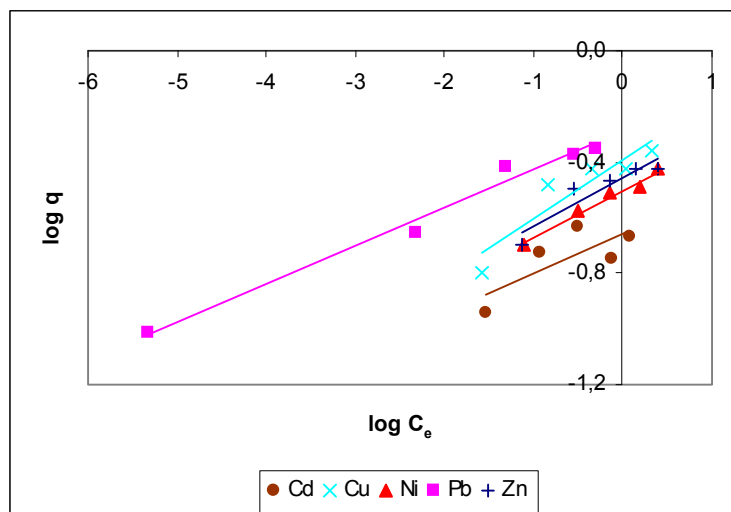


Figura 19.- Isotermas de adsorción de Freundlich para la segunda recogida de biomasa.

Tabla 15.- Constantes de Freundlich.

Elemento	Cd		Cu		Ni		Pb		Zn	
	1 ^a rec.	2 ^a rec.	1 ^a rec.	2 ^a rec.	1 ^a rec.	2 ^a rec.	1 ^a rec.	2 ^a rec.	1 ^a rec.	2 ^a rec.
K_e (mmol/g biomasa)	0,576	0,517	0,719	0,675	0,606	0,606	0,707	0,746	0,621	0,634
1/n	0,188	0,143	0,196	0,213	0,169	0,169	0,125	0,137	0,174	0,175
R²	0,955	0,602	0,897	0,859	0,979	0,979	0,986	0,981	0,929	0,868

En cualquier caso, si se comparan los parámetros que cuantifican los niveles de adsorción con ambos modelos, puede llegarse a la misma conclusión en relación a la capacidad adsorbente de la biomasa. Es decir, con respecto a los valores de q_{\max} del modelo de Langmuir, salvo pequeñas diferencias, los metales Cu y Pb fueron los que se adsorbieron en mayor medida; el que claramente se retuvo sobre la biomasa en menor cantidad fue el Cd; el Zn y el Ni tuvieron un comportamiento intermedio. Ese mismo orden es el que se establece cuando el criterio comparativo es la capacidad de adsorción dada por el parámetro K_e del modelo de Freundlich: $Pb \sim Cu > Zn \sim Ni > Cd$. En definitiva, aunque el modelo de Langmuir sea el más adecuado para la interpretación de los datos experimentales, por un mejor ajuste de éstos a aquél, el de Freundlich evalúa de forma semejante el carácter bioadsorbente de las biomásas analizadas (nótese que aunque éste último haya presentado un ajuste inferior al de Langmuir, los valores de R^2 , en cualquier caso, fueron también altos).

Para justificar la secuencia anterior en los niveles de adsorción bien podrían utilizarse los valores de electronegatividad de los diferentes cationes metálicos (Sheng et al.,

2007). De hecho, cuanto más alta es la electronegatividad de un ión mayor es la atracción por sus electrones y más fuerte va a ser la atracción por la carga negativa de los ligandos de la biomasa. De los cinco metales ensayados el Pb y el Cu son los que tienen mayor electronegatividad (2,33 y 1,91 respectivamente) y también son los que en mayor cantidad se adsorbieron. Los otros tres metales Cd, Ni y Zn, que poseen valores de electronegatividad menores (1,69, 1,7 y 1,65, respectivamente), se adsorbieron en menor medida; pero de ellos, el Cd es el más voluminoso por lo que parece lógico que haya sido con el que menores niveles de adsorción se hayan alcanzado.

Cuando se estudian los valores de K del modelo de Langmuir, es decir, la afinidad de la biomasa por el metal, se constata que existe un cierto paralelismo con los valores de q_{max} en la mayoría de los metales. Recuérdese que la biomasa manifiesta una mayor afinidad por el metal cuanto menor es este parámetro, por ser K la inversa de la constante de equilibrio en la interacción biomasa-metal. Así pues, la afinidad de la biomasa por el Cu y el Pb sería muy semejante y claramente mayor que la mostrada por el Ni y el Zn. El Cd, en este sentido, podría tener un comportamiento diferente; es decir, con este metal, a pesar de tener una elevada afinidad de la biomasa por él, los niveles de adsorción fueron bajos. La explicación para este comportamiento aparentemente anómalo puede deberse a la existencia para el cadmio de pocos sitios activos en la pared celular afines a él, pero con una baja energía de activación, de modo que el metal a bajas concentraciones es bioadsorbido con facilidad, pero llega enseguida a la concentración de saturación por lo que la biomasa ya no puede continuar bioadsorbiéndolo (Hashim & Chu, 2004). Todo ello estaría confirmando que para determinar la efectividad de un bioadsorbente no solo es necesario evaluar su capacidad de adsorción (q_{max}) sino que es conveniente tener en cuenta también el valor de K (o su inversa b). Un valor bajo de K, como en este caso ocurre con el cadmio, estaría indicando que se trata de un bioadsorbente muy eficaz para dicho metal, especialmente a concentraciones bajas del mismo en la disolución.

Otro dato a destacar es que si se analizan globalmente los parámetros de este modelo matemático de Langmuir para las biomásas de ambas recogidas puede comprobarse que tienen un comportamiento muy similar y, en general, el orden establecido tanto en la capacidad máxima de adsorción (q_{max}) como en la afinidad de ambas biomásas por los distintos metales (K) fue bastante parecido. No obstante, si se analiza su composición

(Tabla 10) parece que presentan diferencias importantes, aunque tales diferencias pueden no ser tan significativas si se evalúan globalmente las distintas especies presentes en cada biomasa desde el punto de vista de su comportamiento bioadsorbente.

Compruébese que en la biomasa de la primera recogida, el 96,37 % de su masa estaba constituida por diferentes algas verdes o clorófitas y plantas caducifolias (60,63 % y 35,74 %, respectivamente); en la segunda recogida, prácticamente el 90 % de su peso lo constituían plantas caducifolias. Por otro lado, si se analizan los constituyentes básicos de las paredes celulares de unas y otras, puede comprobarse que en ellas están presentes compuestos poliméricos bastante similares entre sí. En lo que se refiere a las algas verdes, sus paredes celulares son ricas en carbohidratos celulósicos, también son abundantes en proteínas que, a su vez, se unen a los polisacáridos formando glicoproteínas; estos compuestos contienen diversos grupos funcionales que potencialmente pueden estar implicados en procesos de bioadsorción (amino, carboxilo, sulfato, hidroxilo, etc.). En lo que se refiere a la composición de la pared celular vegetal, en la Introducción de esta Memoria, se ha puesto de manifiesto que también sus componentes mayoritarios son carbohidratos (principalmente celulosa) y proteínas estructurales. De hecho, las algas verdes son las que presentan un mayor número de caracteres comparativos con los embriófitos (plantas terrestres) y derivan del mismo linaje ancestral que los briófitos y plantas vasculares (Graham & Wilcox, 2000).

Así pues, es de esperar que no haya diferencias significativas en el comportamiento del bioadsorbente de unas y otras y, por consiguiente, parece lógico que los niveles de adsorción de la biomasa de ambas recogidas hayan sido similares. Esta circunstancia hace pensar que las biomas que se vayan generando en el Centro de Investigación Forestal (CIFOR) no son cambiantes, al menos desde el punto de vista de la bioadsorción, por lo que no se estarían cometiendo errores importantes si se generalizan los resultados a posteriores recogidas. Por esta razón se eligió, de las dos recogidas estudiadas, la primera por ser de la que mayor cantidad se disponía. Así pues, en todos los estudios realizados con posterioridad se empleó la biomasa correspondiente a dicha primera recogida.

3.4.- Caracterización de los centros activos de bioadsorción

El objetivo es profundizar en el conocimiento del proceso de unión del metal a la biomasa, el cual parte del conocimiento de sus grupos funcionales, que, a su vez, constituyen los centros activos de bioadsorción. Han sido numerosos los grupos funcionales que se han descrito como potenciales centros activos de bioadsorción; de entre ellos destacan los grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilo, sulfidrido, tioeter, sulfonatos, amina, imina, amida, imidazol, fosfonato y fosfodiéster (Volesky, 2003). Por su parte, de las diferentes técnicas analíticas que son empleadas en la identificación de estos grupos funcionales, se seleccionaron las técnicas de espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR) (Gulnaz et al., 2005; Lodeiro et al., 2005; Park et al., 2005) y la de valoración ácido-base (Deng & Ting, 2005; Herrero et al., 2005; Pagnanelli et al., 2005) debido a la amplia disponibilidad de referencias sobre las mismas, lo cual facilita enormemente la interpretación de los resultados.

3.4.1.- Análisis por espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR)

La principal aplicación de la espectroscopía infrarroja es la determinación de compuestos orgánicos debido a su capacidad de adsorber energía electromagnética en la región infrarroja del espectro, circunstancia que con otro tipo de compuestos no se da con tanta facilidad; por ejemplo, con los de naturaleza inorgánica.

La radiación infrarroja no tiene suficiente energía para ocasionar la excitación de los electrones, no obstante da lugar a que los átomos y grupos de átomos vibren como diminutos resortes alrededor de los enlaces covalentes que los conectan. Cuando los átomos vibran pueden hacerlo a ciertas frecuencias; debido a esto, los átomos unidos por este tipo de enlaces tienen niveles de energía vibratoria específicos. La excitación ocurre cuando el compuesto adsorbe radiación infrarroja en una determinada energía, o sea, de una longitud de onda o frecuencia específica, lo cual se traduce en picos o bandas de adsorción en un espectro. La frecuencia de una vibración y, por tanto, su localización en el espectro suele estar relacionada con la masa de los átomos enlazados y la relativa rigidez del enlace; los enlaces múltiples son más rígidos que los dobles y éstos, a su vez, más rígidos que los sencillos. Por su parte, la intensidad de la absorción

depende de la repetición de un grupo concreto y de la polaridad del enlace; el más polarizado da mayor intensidad en la absorción.

Para la determinación del tipo de enlace químico entre los átomos (grupos funcionales) de una molécula suele hacerse uso de una correlación entre éstos y las frecuencias en cm^{-1} a las que es previsible la aparición de las bandas de adsorción de cada uno de ellos, sin olvidar que los enlaces próximos puedan modificarlas ligeramente. Esta técnica es, por tanto, una valiosa herramienta que permite obtener una buena información estructural de la biomasa utilizada en los procesos de adsorción, permitiendo detectar los grupos funcionales presentes en la misma y responsables de la fijación metálica, así como cuáles de ellos participan directamente de la unión con el metal (Volesky, 2003).

En primer lugar, mediante este procedimiento analítico, se obtuvo el espectro de infrarrojos de la biomasa original, el cual se representa en la Figura 20, pudiendo detectarse en él los siguientes picos o bandas de adsorción:

➤ **3400 cm^{-1}** : Banda de tensión correspondiente a los grupos hidroxilo (-OH) de celulosas, proteínas y compuestos pécticos (Pretsch et al., 2001; Romero-González et al., 2001; Synytsya et al., 2003; Pagnanelli et al., 2004; Sheng et al., 2004).

➤ **2900-2800 cm^{-1}** : Banda de tensión del enlace -C-H de los grupos alcano, es frecuente su desdoblamiento en más de un pico debido al alargamiento simétrico o asimétrico del enlace C-H (Pretsch et al., 2001; Romero-González et al., 2001; Sheng et al., 2004).

➤ **1200-1700 cm^{-1}** : Grupos carboxílicos (-COOH) o derivados, como carboxilatos (-COONa, -COOCa) o metoxilos (-COOCH₃). Esta banda estaría realmente desdoblada en una serie de picos; uno de ellos, sobre los 1600 cm^{-1} el cual hace referencia a la parte -C=O y otro sobre los 1400 cm^{-1} que hace referencia al radical (-OH, -ONa, -OCa ó -OCH₃). Con un menor tamaño de este segundo pico habría una mayor relación carboxilo/carboxilato, mientras que con un tamaño mayor la proporción de carboxilatos aumentaría en relación a la de carboxilos. Estos grupos se encontrarían principalmente en los compuestos pécticos de la matriz (Mameri et al., 1999; Pretsch et al., 2001; Romero-González et al., 2001; Synytsya et al., 2003; Pagnanelli et al., 2004; Raize et al., 2004; Sheng et al., 2004).

➤ **1100 cm^{-1}** : Tensión en el enlace C-O frecuentemente del grupo éter ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$) y del C-OH. Estos grupos funcionales es frecuente encontrarlos en los enlaces de unión entre las unidades de las cadenas de celulosas o compuestos pécticos (Pretsch et al., 2001; Romero-González et al., 2001; Synytsya et al., 2003) .

➤ **876 cm^{-1}** : Débil banda de tensión asignada también a los grupos carboxilo (Pretsch et al., 2001; Raize et al., 2004).

➤ **700-500 cm^{-1}** : Grupos alqueno (C=C-H) o Ar-H, este último, sobre todo, muy abundante em las cadenas de celulosa (Pretsch er al., 1998).

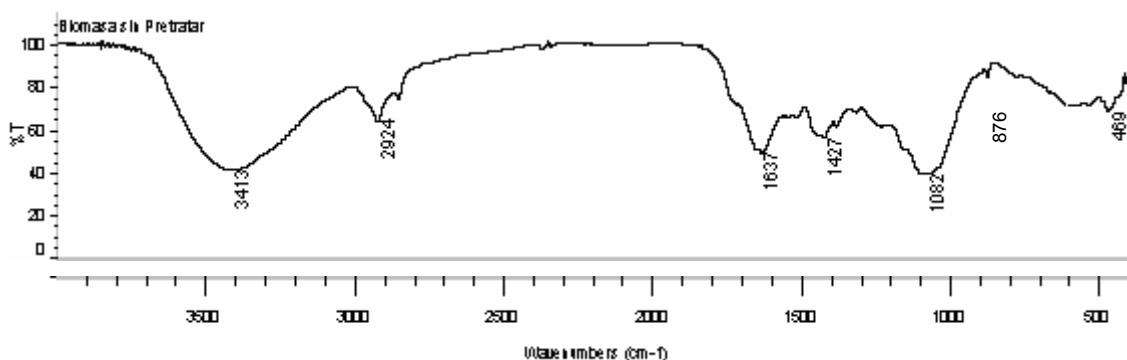


Figura 20.- Espectro de Infrarrojo de la biomasa original.

Una vez caracterizada la biomasa con la determinación de los grupos funcionales presentes en ella, se procedió a estudiar, mediante esta misma técnica, su unión con el metal con objeto de identificar cuales de los grupos funcionales pudieran estar implicados en dicha unión. Para ello, se empleó biomasa con metal adsorbido obtenida a partir de ensayos de bioadsorción en los que se adoptaron las siguientes condiciones experimentales: 150 mg/g de concentración metálica inicial (Cd, Cu, Ni, Pb y Zn), 0,5 g/L de biomasa original, es decir, sin ningún tipo de pretratamiento y un pH inicial de 4 para el Cd y el Cu y de 5 para Ni, Pb y Zn. Los ensayos se llevaron a cabo con la metodología habitual y manteniendo la biomasa suspendida en la correspondiente disolución durante 2 horas, con agitación magnética. De esta manera, se dispuso de muestras de biomasa cargadas con cada uno de los metales estudiados, las cuales se separaron de la disolución mediante filtración; posteriormente, fueron secadas en estufa a 60 °C durante 24 horas.

En el caso de que el metal se fije a la biomasa intercambiándose por protones, liberados a la disolución por parte de los grupos funcionales y, dado que el enlace que se

establece entre el metal y el grupo funcional puede ser más débil que el establecido entre el grupo funcional y el hidrógeno, la energía necesaria para excitar al primero sería menor que la necesaria para excitar al segundo. Por esta razón, el pico del espectro de infrarrojos correspondiente al grupo funcional unido al metal se presentaría desplazado a la derecha con respecto al del grupo funcional original, es decir, hacia zonas con menor longitud de onda. De este modo, con el fin de determinar que grupo funcional es el responsable de la unión con un determinado metal, bastaría con comparar el espectro de la biomasa sin el metal adsorbido con el de la biomasa con el metal adsorbido, verificando qué pico o picos han sufrido el citado desplazamiento (Fourest & Volesky, 1996; Mameri et al., 1999; Pretsch et al., 2001; Deng & Bai, 2004; Raize et al., 2004; Sheng et al., 2004).

En la Figura 21 se muestran los espectros de infrarrojos de la biomasa cargada de Cd, Cu, Ni, Pb y Zn junto con el de la biomasa original. Se observa como tras la unión del metal, existe un cierto desplazamiento hacia la derecha en los picos que corresponden a la banda de tensión de los grupos carboxilos ($-C=O$ y $-C=OH$), lo que confirmaría la participación preferente de estos grupos funcionales en la unión con el metal. De hecho, son distintos los autores que han apuntado con frecuencia la implicación de estos grupos en en la captación metálica por diversas biomásas (Foerst & Volesky, 1996; Kapoor, 1997, Dodhi et al., 2006; Pradhan et al., 2007).

En el caso de la banda correspondiente a los grupos $-OH$, también se observa una cierta modificación que pudiera estar relacionada con la implicación de este grupo funcional en fenómenos de microprecipitación del metal sobre la biomasa (Pradhan et al., 2007). Por otra parte, las ligeras diferencias detectadas en la zona del espectro relativa a los enlaces C-H no hacen pensar que sean debidas al fenómeno de bioadsorción ya que se trata de una unión mayoritaria en las moléculas orgánicas, lo que podría justificarse debido a múltiples posibles estados vibratorios en el grupo de los alcanos, por lo que estos cambios en el espectro no aportarían en sí información a este estudio. En el caso de los picos correspondientes a los grupos éster ($-C-O-C-$), no se observan desplazamientos significativos por lo que podría pensarse que no intervienen directamente en el proceso de adsorción metálica.

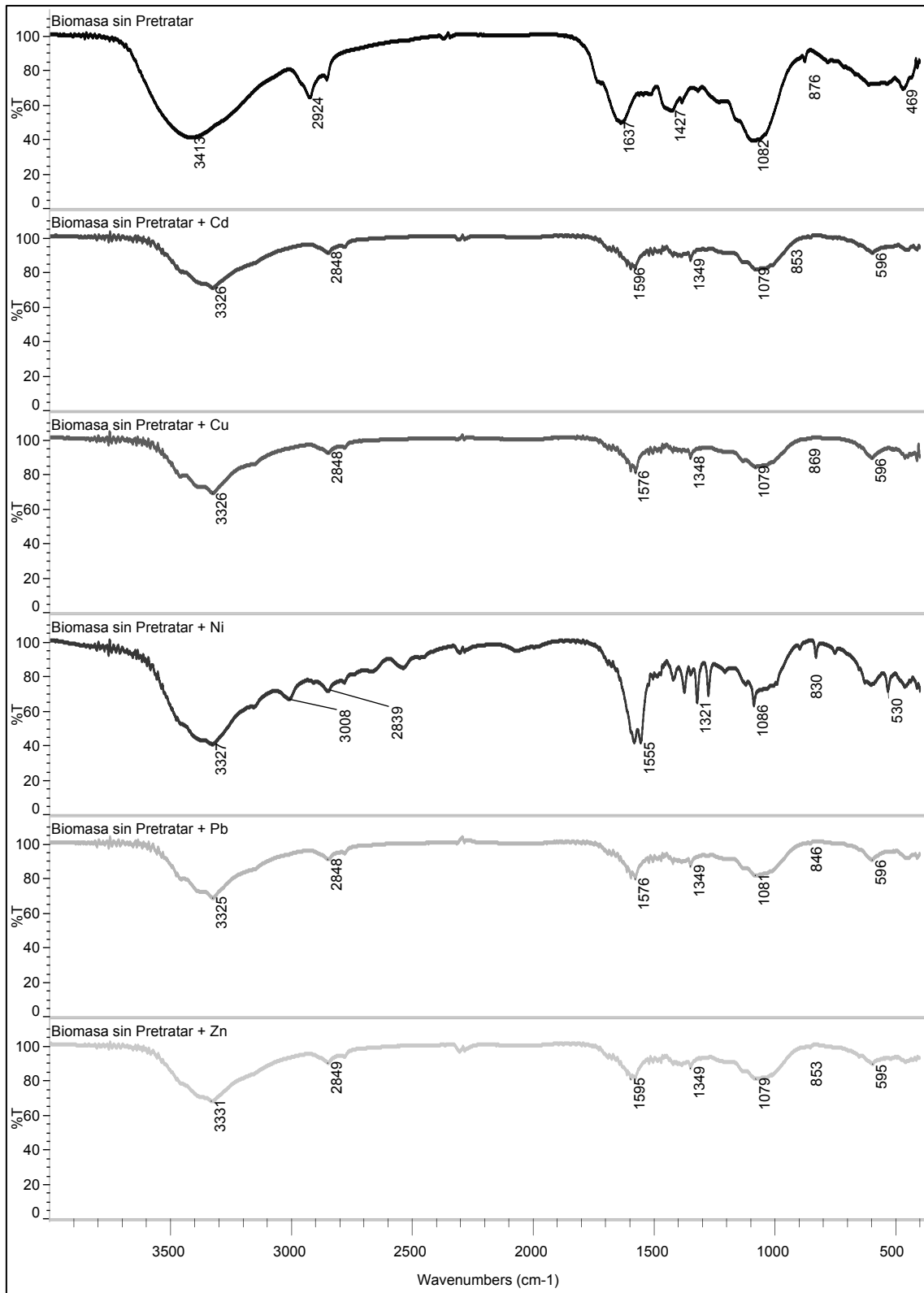


Figura 21.- Espectros de infrarrojo de la biomasa original sin metal y con metal adsorbido (Cd, Cu, Ni, Pb y Zn).

3.4.2.- Valoración ácido-base de la biomasa

Es sabido que la determinación del comportamiento ácido-base de una biomasa puede aportar información muy valiosa en relación con el mecanismo de captación de los cationes metálicos por parte de ésta, ya que permite valorar la posibilidad de intercambio entre los protones liberados por ella y los cationes metálicos presentes en disolución. Todo ello está relacionado con la disociación ácida progresiva de los grupos funcionales y, por tanto, de sus constantes de ionización. En función de éstas últimas se pueden distinguir tres tipos de comportamiento ácido (Naja & Mustin, 2005):

- Grupos ácidos fuertes: atribuidos a la presencia de una importante disociación a $\text{pH} < 4$, tales como los grupos fosfónico y sulfonato.
- Grupos ácidos débiles: entre los que puede destacarse el grupo carboxilo y algunos grupos proteínicos, disociables entre $\text{pH} 4$ y 7 , aproximadamente.
- Grupos ácidos muy débiles: tales como los grupos fenólicos y amino, disociables sólo a $\text{pH} > 7$.

A tenor de los resultados precedentes obtenidos por espectroscopía de infrarrojo, con los que se constató una participación importante de los grupos carboxilo en el carácter bioadsorbente de la biomasa, sería razonable, asociar a ésta propiedades de ácido débil, por lo que podría ser valorada mediante una base. La disociación típica de un ácido débil en disolución se puede expresar de acuerdo con la reacción [6] ya planteada anteriormente:



La constante de equilibrio de esta reacción se relaciona con el pH por la ecuación de Henderson-Hasselbach, a partir de la cual se puede calcular el $\text{p}K_a$ a través de los valores de pH , tal y como se muestra en el desarrollo siguiente:

$$k_a = \frac{[B^-][H^+]}{[HB]} \Rightarrow \log k_a = \log \frac{[B^-]}{[HB]} + \log [H^+] \quad [19]$$

$$-\log [H^+] = -\log k_a + \log \frac{[B^-]}{[HB]} \quad [20]$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[B^-]}{[HB]} \quad \text{Ecuación de Henderson-Hasselbach} \quad [21]$$

De este modo, cuando la concentración de la biomasa desprotonada (B^-) es igual a la de la protonada (HB), lo que se entiende por punto de semiequivalencia, su cociente sería igual a la unidad, por lo que es posible afirmar que el pK_a coincide con el pH en dicho punto. No obstante, habría que calcular, en primer lugar, el punto de equivalencia que se sitúa en el punto de inflexión de la curva, a partir del cual ya se puede conocer el punto de semiequivalencia, que corresponde a la posición en la curva en la cual el volumen de valorante es la mitad que el del punto de equivalencia. El pH correspondiente a este punto de semiequivalencia coincidiría en valor numérico con el del pK_a .

En la Figura 22 se recoge la curva de valoración de la biomasa en fresco, es decir sin haber realizado sobre ella ningún tipo de pretratamiento. Puede observarse como fue la evolución del pH al ir añadiendo alícuotas de NaOH 0,1 M sobre 0,1 g de biomasa suspendida en agua destilada a pH 3. En dicha figura también aparece el valor que iba teniendo la pendiente de la curva de valoración obtenida. Dado que el punto de inflexión de ésta y, por consiguiente, el punto de equivalencia de la biomasa se corresponde con el valor de máxima pendiente (conseguido, en este caso, para un volumen de valorante gastado de 2 mL), la Figura 22 deja claro que dicho punto de equivalencia se situaba en un valor de pH de 8,45. El punto de semiequivalencia se lograría, por tanto, con la mitad de volumen de valorante, que en este caso sería de 1 mL. El pH en este punto de semiequivalencia, presentó un valor aproximadamente igual a 3,75, ese sería también el valor de pK_a .

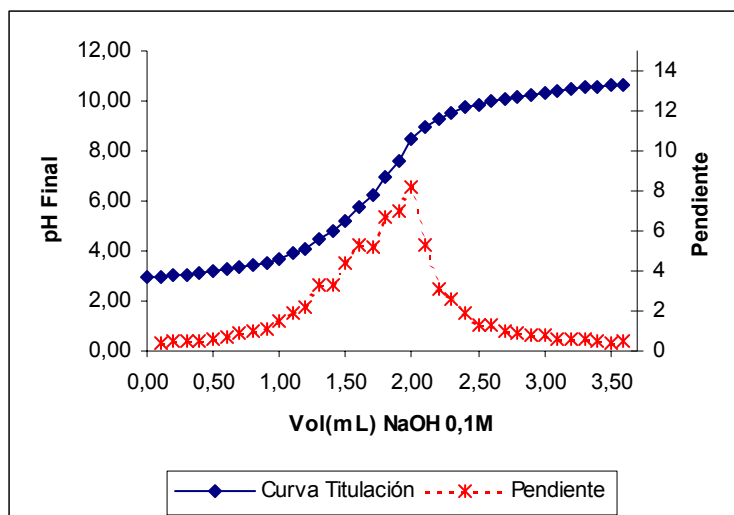


Figura 22.- Curva de valoración ácido-base de la biomasa

Diversos estudios bibliográficos (Romero-González et al., 2001; Reddad et al., 2002; Veglio et al., 2002) han reportado que el pK_a de los grupos carboxílicos se sitúa en torno a 3,7, dicho valor es totalmente coincidente con el pK_a determinado experimentalmente en este trabajo, por lo que parece lógico pensar que la biomasa utilizada contaría mayoritariamente con dicho grupo funcional. Este dato está en la línea de lo publicado frecuentemente en relación con la composición de biomasa de origen vegetal (Fourest & Volesky, 1996; Davis et al., 2000; Figueira et al., 2000), en donde se indica que la presencia de grupos carboxilos es frecuente, principalmente, como parte de las sustancias pécticas, tal y como se recoge en estudios realizados con extractos vegetales como la pulpa de remolacha azucarera (Reddad et al., 2002; Gerente et al., 2004) o los alginatos (Romero-González et al., 2001; Veglio et al., 2002).

3.5.- Sistemas bimetálicos

La mayoría de los trabajos publicados en el campo de bioadsorción recogen estudios con sistemas de una sola especie metálica (Chong & Volesky, 1996; Yu & Kaewsarn, 1999); sin embargo, las aguas residuales industriales, generalmente, contienen varias especies metálicas en disolución (Chong & Volesky, 1996; Yu & Kaewsarn, 1999; Gardea-Torresdey et al., 2004; Pagnanelli et al., 2004; Mehta & Gaur, 2005) por lo que

es importante también conocer el comportamiento de la bioadsorción en sistemas multimetálicos, con el fin de aumentar el grado de acercamiento a las condiciones reales facilitando, de este modo, futuras aplicaciones industriales. No obstante, el estudio de la evaluación, interpretación y representación de un sistema en el cual interviene más de una especie metálica es más complejo que en el caso de los sistemas monometálicos (Sung Lee & Volesky, 1999; Hammami et al., 2003; Gardea-Torresdey et al., 2004; Volesky, 2003; Mehta & Gaur, 2005) debido, principalmente, a los fenómenos de competencia que se dan entre los metales que se encuentran en disolución por los mismos centros activos de adsorción de la biomasa. Estos fenómenos de competencia, a su vez, dependen de factores tales como la química del metal, el pH de la disolución, la naturaleza de los sitios de unión, la diversidad de las especies químicas, la concentración de los iones metálicos o la selectividad de la biomasa por una especie u otra (Gardea-Torresdey et al., 2004).

En el trabajo presente se ha llevado a cabo una aproximación al estudio de este tipo de situaciones más complejas abordando la experimentación con sistemas bimetálicos. Los casos analizados han sido: Cu-Pb, resultante de combinar entre sí los dos metales que mejores niveles de adsorción presentaron en sistemas monometálicos, y Cu-Cd y Pb-Cd, al combinar cada uno de los metales anteriores con el Cd, que fue el que peor fijación tuvo sobre la biomasa aunque si manifestara buena afinidad por ella. En cualquier caso, la presencia de estos metales es frecuente en efluentes industriales, además de tratarse de metales con elevada toxicidad, especialmente Cd y Pb (Sánchez et al., 1999; Hammami et al., 2003).

El estudio se abordó en dos etapas. La primera tuvo como objetivo evaluar la cinética de bioadsorción y cuando se alcanza el equilibrio. La segunda etapa, con el fin de poder cuantificar el proceso, se centró en el trazado de las correspondientes isothermas de adsorción y en la obtención de las respectivas constantes mediante la aplicación del modelo matemático de Langmuir.

3.5.1.- Cinética de adsorción

El estudio de la cinética de adsorción se abordó empleando una concentración de biomasa de 0,5 g/L, la cual se puso en contacto con la disolución bimetálica a un pH de 4 para el sistema Cu-Cd y de 4.5 para los sistemas Cu-Pb y Pb-Cd, por ser este último un valor intermedio entre los fijados para ambos metales en sistemas monometálicos. Para cada sistema bimetálico se realizaron dos ensayos: uno con 10 mg/L y el otro con 150 mg/L de cada especie intentando cubrir tanto el rango de bajas como el de altas concentraciones. El proceso se llevó a cabo mediante agitación magnética tomándose muestras a diferentes tiempos (0, 5, 10, 30, 60, 120 y 1440 minutos). El sobrenadante en cada muestra se separó de la biomasa mediante centrifugación y en él fue analizado el pH y la concentración metálica de la forma habitual.

En las Figuras 23 y 24 se muestra la cinética de adsorción, para los tres sistemas bimetálicos estudiados, expresada como el porcentaje de cada metal recuperado a lo largo del proceso respecto al tiempo. Se observa, en general, como la bioadsorción en sistemas bimetálicos fue sensiblemente más lenta que en sistemas monometálicos necesitándose, en algunos casos, tiempos más largos para alcanzarse el equilibrio. Estos resultados son acordes a los obtenidos por Ozdemir (Ozdemir et al., 2005) con *Chryseomonas luteola* en la captación simultánea de Co y Cd, cuyos estudios de bioadsorción precisaron prolongar el proceso hasta los 120 minutos para que pudiera completarse, siendo este tiempo bastante mayor que el necesario para alcanzar el equilibrio en la adsorción de ambos metales por separado. Estas diferencias pueden ser debidas a que en el caso de disoluciones monometálicas no existen fenómenos de competencia. En cualquier caso, esto se hizo más patente para concentraciones más bajas; cuando la concentración metálica inicial era mayor (Figura 24) la cinética de adsorción parece acelerarse, posiblemente debido al mayor gradiente de concentración establecido en el sistema.

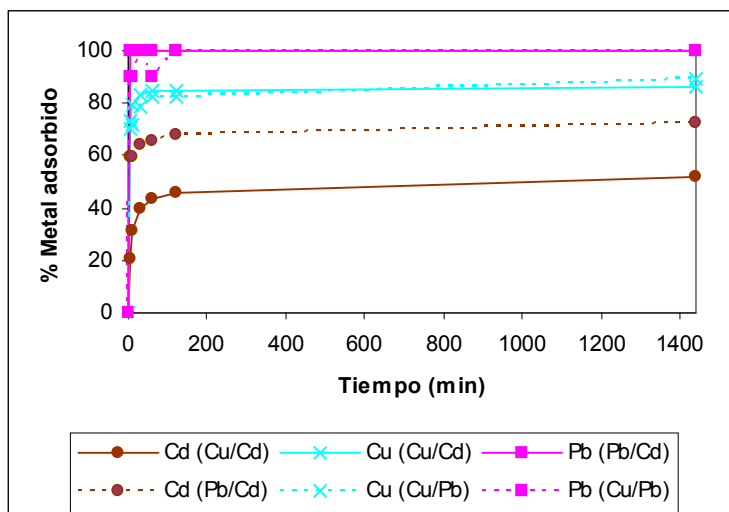


Figura 23.- Cinética de adsorción en los sistemas bimetálicos Cu-Cd, Cu-Pb y Pb-Cd.
Concentración inicial de 10 mg/L para ambos metales.

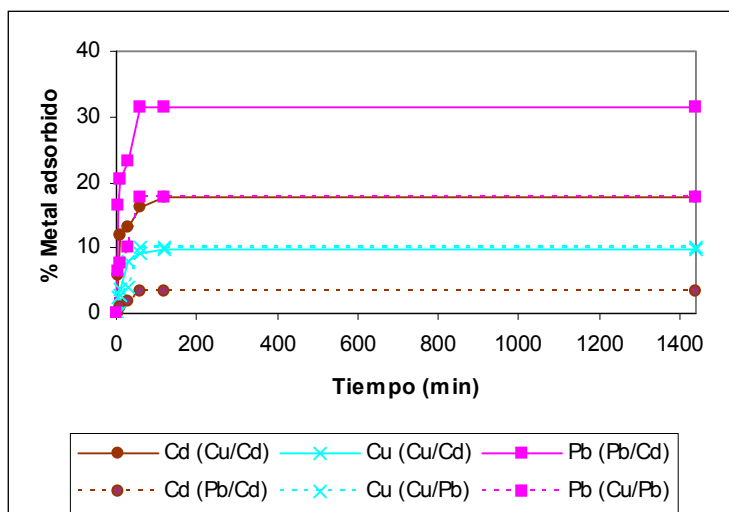


Figura 24.- Cinética de adsorción en los sistemas bimetálicos Cu-Cd, Cu-Pb y Pb-Cd.
Concentración inicial de 150 mg/L para ambos metales.

3.5.2.- Isotermas de adsorción

Tal y como se comentó anteriormente, el análisis de los sistemas bimetálicos está basado en el estudio del comportamiento competitivo entre las especies metálicas presentes en la disolución (Loaec et al., 1997; Sung Lee & Volesky, 1999; Mehta & Gaur, 2005). Con este objeto, en este apartado, se evalúa de forma tanto cualitativa como cuantitativa, el proceso de bioadsorción de los sistemas bimetálicos indicados anteriormente.

La experimentación se llevó a cabo poniendo en contacto la biomasa con disoluciones en las que las concentraciones de cada metal fueron todas las combinaciones posibles entre 0, 10, 25, 50, 100 y 150 mg/L, realizándose por tanto 30 ensayos distintos para cada sistema bimetálico. El pH inicial también fue 4 para el sistema Cu-Cd y 4,5 para los sistemas Cu-Pb y Pb-Cd, y se empleó una concentración de biomasa de 0,5 g/L. Los ensayos se llevaron a cabo mediante agitación magnética durante 120 minutos, al cabo de los cuales, se aisló el sobrenadante mediante centrifugación y, posteriormente, en las muestras se analizó el pH y la concentración metálica.

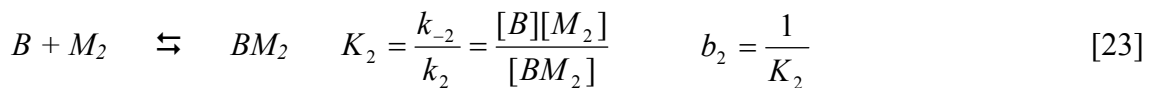
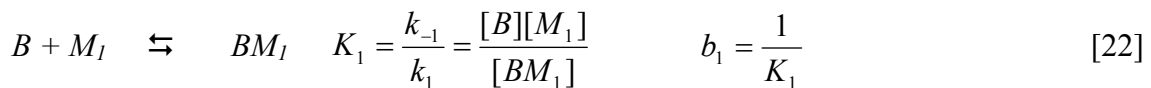
El análisis de los resultados en estudios de este tipo puede abordarse de tres formas diferentes (Chong & Volesky, 1995; Sung Lee & Volesky, 1999; Hammami et al., 2002; Hammami et al., 2003; Volesky, 2003):

➤ Ajustando los resultados experimentales a isoterma bidimensionales, como en el caso de los sistemas monometálicos, donde cada isoterma representaría las diferentes capacidades de adsorción del primer metal, en función de la concentración de equilibrio del mismo, para una concentración fija del segundo metal. De esta forma, se obtendría una isoterma por cada concentración del segundo metal. La ventaja de este método radica principalmente en su sencillez de representación permitiendo evaluar de forma cualitativa la influencia de un metal sobre el otro; no obstante, su principal inconveniente es el de no permitir un análisis cuantitativo de dicha competencia.

➤ Ajustando los datos experimentales a superficies tridimensionales, en base a un sistema de tres ejes, en el cual los ejes X e Y representan las concentraciones de equilibrio de los dos metales y el eje Z la capacidad de adsorción de uno de los dos metales o de la suma de ambos. La representación tridimensional se realizaría interpolando entre los resultados experimentales. Este método, aún siendo una forma más correcta de representación que la del caso anterior (Chong & Volesky, 1995), presenta el inconveniente de mostrar, en ocasiones, superficies irregulares, las cuales podrían no representar con veracidad el comportamiento del sistema bimetálico (Chong & Volesky, 1995; Sung Lee & Volesky, 1999); asimismo, al igual que en el caso de las representaciones bidimensionales, la información mostrada es exclusivamente cualitativa.

➤ Ajustando los datos experimentales a un modelo matemático. Este método, a diferencia de los anteriores, sí permite obtener información cuantitativa del proceso de bioadsorción en sistemas bimetálicos. De entre todos los modelos matemáticos para sistemas bimetálicos descritos en la bibliografía, el modelo de Langmuir de tipo binario ha sido el más utilizado debido a que, aún siendo el más sencillo de todos, permite obtener buenos resultados con la misma fiabilidad que los otros, además de ser el único que permite determinar la constante de equilibrio en la interacción biomasa-metal, dada por el valor de b o, en su defecto, por el de su inversa (K). Por este motivo, de las tres posibilidades de análisis planteadas, ésta fue la utilizada en este trabajo (Chong & Volesky, 1996; Sung Lee & Volesky, 1999).

Más concretamente, el modelo binario usado es una simplificación del modelo de Langmuir para sistemas multimetálicos descrito previamente con las ecuaciones [10], [11] y [12]; supone el establecimiento, en este caso, de un equilibrio entre los dos metales presentes en la disolución (M_1 y M_2) con las especies resultantes de la adsorción de los mismos (BM_1 y BM_2) por parte de la biomasa (B) (Sánchez et al., 1999; Hammami et al., 2003; Volesky, 2003):



El modelo binario de Langmuir, planteándolo en función del parámetro K , o inversa de la concentración de equilibrio, se concreta en las siguientes expresiones:

$$q_e(M_1) = \frac{\frac{q_{\max}}{K_1} Ce(M_1)}{1 + \frac{1}{K_1} Ce(M_1) + \frac{1}{K_2} Ce(M_2)} \quad [24]$$

$$q_e(M_2) = \frac{\frac{q_{\max}}{K_2} Ce(M_2)}{1 + \frac{1}{K_1} Ce(M_1) + \frac{1}{K_2} Ce(M_2)} \quad [25]$$

El parámetro K representa, por tanto, de forma inversamente proporcional, la afinidad de la biomasa por uno de los dos metales presentes en la disolución. Es decir, un valor alto de K para el metal M₂ (K₂) frente a M₁ (K₁) significaría que el bioadsorbente tiene mayor afinidad por el último que por el primero debido a que los altos valores de K están asociados con un valor también alto de la cantidad de metal desorbida en relación con la adsorbida.

En la Tabla 16 se recopilan los valores de las constantes de Langmuir correspondientes a los tres sistemas estudiados, obtenidos mediante la aplicación informática Matlab 5.1. La capacidad máxima de adsorción de la biomasa, q_{max}, permaneció prácticamente constante en los tres sistemas con un valor en torno a 0,5 milimoles de catión adsorbido por gramo de biomasa. Este hecho estaría indicando que el número total de lugares activos presentes en la biomasa, disponibles para el metal, es fijo e independiente de las disoluciones con las que se esté trabajando (Romera, 2008).

Analizando el valor de los parámetros de afinidad K₁ y K₂, se verifica que en el sistema bimetálico Cu-Cd existió una mayor afinidad de la biomasa por el Cu que la mostrada por el Cd, en una proporción aproximadamente cinco veces mayor por parte del primero con respecto al segundo. En el sistema Pb-Cu, se aprecia como la biomasa manifestó una afinidad aproximadamente tres veces mayor por el Pb que por el Cu. Por último, en el sistema Cd-Pb, la biomasa presentó una afinidad aproximadamente cinco veces mayor por el Pb que por el Cd. Analizando globalmente los resultados de K de los tres sistemas, se constata que el Pb fue el metal por el que la biomasa presentó mayor afinidad, seguido del Cu y, por último, el Cd.

Estudios realizados por otros autores (Sheng et al., 2007) con estos mismos tres metales, también en sistemas binarios, y el alga marina *Sargassum sp.* han aportado resultados muy parecidos estableciendo una secuencia de afinidades semejante. En cualquier caso, los resultados aquí obtenidos revelan un claro paralelismo con los registrados en los

sistemas monometálicos correspondientes, sobre todo en lo que se refiere al Pb, que fue el metal con el valor de K más bajo de los cinco estudiados (Tabla 14). Sin embargo, aunque en sistemas monometálicos la biomasa presentó por el Cu y el Cd una afinidad parecida, en los bimetálicos parece establecerse una cierta preferencia por el Cu frente al Cd. Este mismo hecho se ha podido poner de manifiesto al estudiar la bioadsorción con otras biomásas (Romera, 2008). Más concretamente, con *Fucus spiralis* se encontraron afinidades para Cu y Cd muy parecidas en sistemas monometálicos y, sin embargo, al pasar a bimetálicos la afinidad por el cobre fue sensiblemente mayor que por el cadmio. En este caso, por un lado, la diferente electronegatividad de ambos iones (mayor para el cobre) y, por otro, el diferente tamaño iónico (mayor para el cadmio), bien pudieran ser las causas que justificaran estos hechos.

Tabla 16.- Valores de las constantes de Langmuir para los tres sistemas bimetálicos estudiados.

Sistema	K ₁ (mmol/L)	K ₂ (mmol/L)	q _{max} (mmol/g)
Cu-Cd	Cu: 0.066	Cd: 0.340	0.474
Pb-Cu	Pb: 0.001	Cu: 0.004	0.452
Cd-Pb	Cd: 0.340	Pb: 0.066	0.474

A continuación, se discuten de forma individualizada los resultados obtenidos con cada uno de los tres sistemas bimetálicos.

Sistema Cd-Cu

La Figura 25 muestra la competencia entre los metales Cd y Cu por los centros activos de la biomasa. Estas isothermas revelan un gran descenso en la capacidad de adsorción de Cd en presencia de cantidades crecientes de Cu (Figura 25b), mientras que, por el contrario, los niveles de adsorción de Cu (Figura 25a) siguieron siendo altos incluso para altos valores de concentración de Cd. Esta mayor preferencia de la biomasa por el Cu, se corresponde con los resultados del análisis cuantitativo anteriormente planteado, los cuales revelaron una mayor afinidad de la biomasa por el Cu que por el Cd, tal y como mostraron los respectivos valores de K. En el caso de la capacidad de adsorción para los dos metales de forma simultánea (Figura 25c), ésta llegó a un valor constante de forma independiente de la concentración de uno u otro metal, como era de esperar según los valores de q_{max} obtenidos.

En la Figura 26 se representan una serie de cortes transversales de cada una de las superficies representadas en la Figura 25. Dichos cortes de isoconcentración se han realizado, en todos los casos, a dos valores diferentes. Así por ejemplo, en la Figura 26a se muestra como fue la adsorción del Cu cuando el Cd estaba también presente en la disolución a dos concentraciones distintas; la Figura 26b revela cómo variaba la adsorción de Cd al crecer la concentración de Cu; y en ambas figuras se visualizan sendos cortes a la superficie de adsorción Cd+Cu a dos concentraciones de Cd y otras dos de Cu, respectivamente. Las gráficas bidimensionales resultantes permiten evaluar con mayor rigurosidad la influencia de un metal sobre la capacidad de adsorción del otro; con ellas, se constata como la presencia de cantidades crecientes de Cu ejercen una influencia bastante negativa sobre la capacidad de adsorción del Cd (Figura 26b), mientras que la adsorción del Cu, por el contrario, no se ve tan influenciada por la presencia de Cd (Figura 26a). En el caso de la capacidad de adsorción simultánea de ambos metales, se observa claramente como ésta permanece constante de forma independiente de la concentración de cada metal.

Sistema Cu-Pb

En la isoterma correspondiente a este sistema (Figura 27), se pone de manifiesto una influencia bastante similar del Pb en la adsorción del Cu, que del Cu en la adsorción del Pb. No obstante, si se analiza con detalle, se comprueba como parece más marcado el descenso de la adsorción de Pb a concentraciones crecientes de Cu (Figura 27b) que el de la adsorción de Cu al aumentar la concentración de Pb (Figura 27a). A tenor de los valores de afinidad registrados para ambos metales ($K_{Pb} = 0.01$ y $K_{Cu} = 0.004$), sería el Pb el que habría de tener un más marcado efecto en la adsorción de Cu que al contrario aunque, en realidad, dichos valores de K , al ser tan bajos, están reflejando una buena, y no muy diferente, afinidad por ambos. La Figura 27c revela como la biomasa se saturó rápidamente con la adsorción de ambos metales de forma simultánea, al igual que ocurrió en el sistema anteriormente estudiado. Estos mismos resultados se confirman con los cortes de isoconcentración de la Figura 28.

Sistema Pb-Cd

En la Figura 29 se observa como el Pb ejerció una influencia bastante negativa sobre la capacidad de adsorción del Cd, el cual llegó a situarse en valores cercanos a cero a concentraciones moderadamente elevadas de Pb. Por el contrario, el efecto ejercido por el Cd sobre la capacidad de adsorción del Pb fue prácticamente despreciable. Este comportamiento se corrobora con los resultados del análisis cuantitativo anterior, los cuales revelaron una mucho más marcada afinidad de la biomasa por el Pb en relación al Cd al presentar éste un valor de K mucho más elevado que el del Pb. La gráfica que muestra la capacidad de adsorción simultánea de los dos metales indica, al igual que en los casos anteriores, un valor constante de ésta de forma independiente a la concentración de ambos metales.

Los cortes de isoconcentración (Figura 30) confirman nuevamente lo observado en las isotermas tridimensionales. Así, la capacidad de adsorción del Cd se ve bastante influida por la presencia del Pb, incluso a concentraciones bajas de éste, mientras que a concentraciones elevadas de Cd, la capacidad de adsorción del Pb desciende solo ligeramente.

Analizando todos estos resultados de forma global es posible plantear los siguientes comentarios adicionales:

En todos los casos, se observa como concentraciones crecientes de un metal implican, en mayor o menor medida, una menor capacidad de adsorción del otro metal presente en disolución debido a que ambos metales compiten por los mismos centros activos del bioadsorbente (Chong & Volesky, 1995; Loaec et al., 1997).

Se corrobora el orden de afinidades de la biomasa detectado para los tres metales: $Pb > Cu > Cd$. Una mayor afinidad de un metal con respecto a otro puede estar provocada por una energía de activación menor o por una mayor fuerza de anclaje al centro activo, o porque el mecanismo de anclaje sea diferente. Algunos autores como Chong y Volesky (Chong & Volesky, 1996) consideran que la afinidad puede estar relacionada con caracteres o propiedades específicas de cada metal. En este sentido, el comportamiento parece depender del radio iónico (a menor radio, mayor facilidad de acoplamiento en el

centro activo y, por tanto, mayor afinidad) o de la densidad de carga en el catión (a mayor densidad de carga, mayor atracción electrostática, por lo que habrá mayor afinidad).

La cantidad total de metal adsorbido, obtenida sumando las capacidades de adsorción de los dos metales presentes en la disolución, tiende, en los tres casos estudiados, a un valor máximo y constante, en este caso entorno a 0,5 mmol/g, lo que confirmaría la hipótesis de Langmuir que considera que el número de centros activos disponibles en la biomasa es fijo y permanece constante a lo largo de su superficie, pudiendo cada metal unirse a cualquiera de ellos (Chong & Volesky, 1995; Loaec et al., 1997).

3.6.- Desorción

Una vez caracterizado el comportamiento de una determinada biomasa como bioadsorbente es importante estudiar el modo de recuperar el metal adsorbido, así como la posibilidad de reutilizar dicha biomasa para nuevos procesos de bioadsorción. Este estudio permite realizar una aproximación a los requerimientos necesarios para posibles aplicaciones industriales, en las cuales puede requerirse o bien la recuperación del metal adsorbido, en el caso de tratarse de metales valiosos, o la reutilización de la biomasa en siguientes ciclos de adsorción y desorción, en el caso de que la biomasa sea cara, de complicada obtención o de difícil sustitución, como en el caso de reactores de flujo continuo. En definitiva, la recuperación del metal adsorbido y la capacidad de reutilización de la biomasa permiten minimizar costes en los procesos industriales disminuyendo, también, el impacto ambiental causado por los residuos generados en estos procesos (Lister & Line, 2001; Mehta & Gaur, 2005; Vijayaraghavan et al., 2005). Una alternativa para la recuperación del metal puro es la incineración de la biomasa cargada de metal.

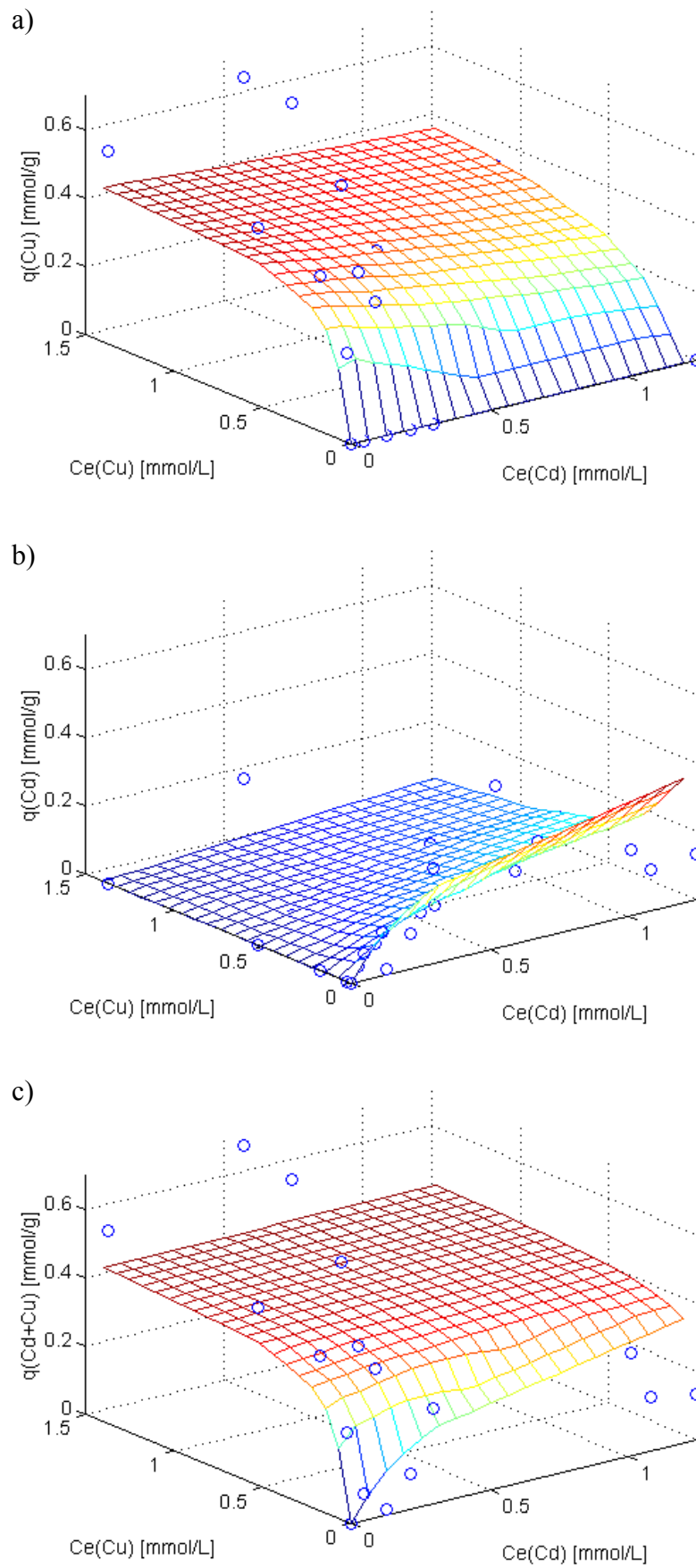


Figura 25.-Isotermas de adsorción para el sistema Cu-Cd.

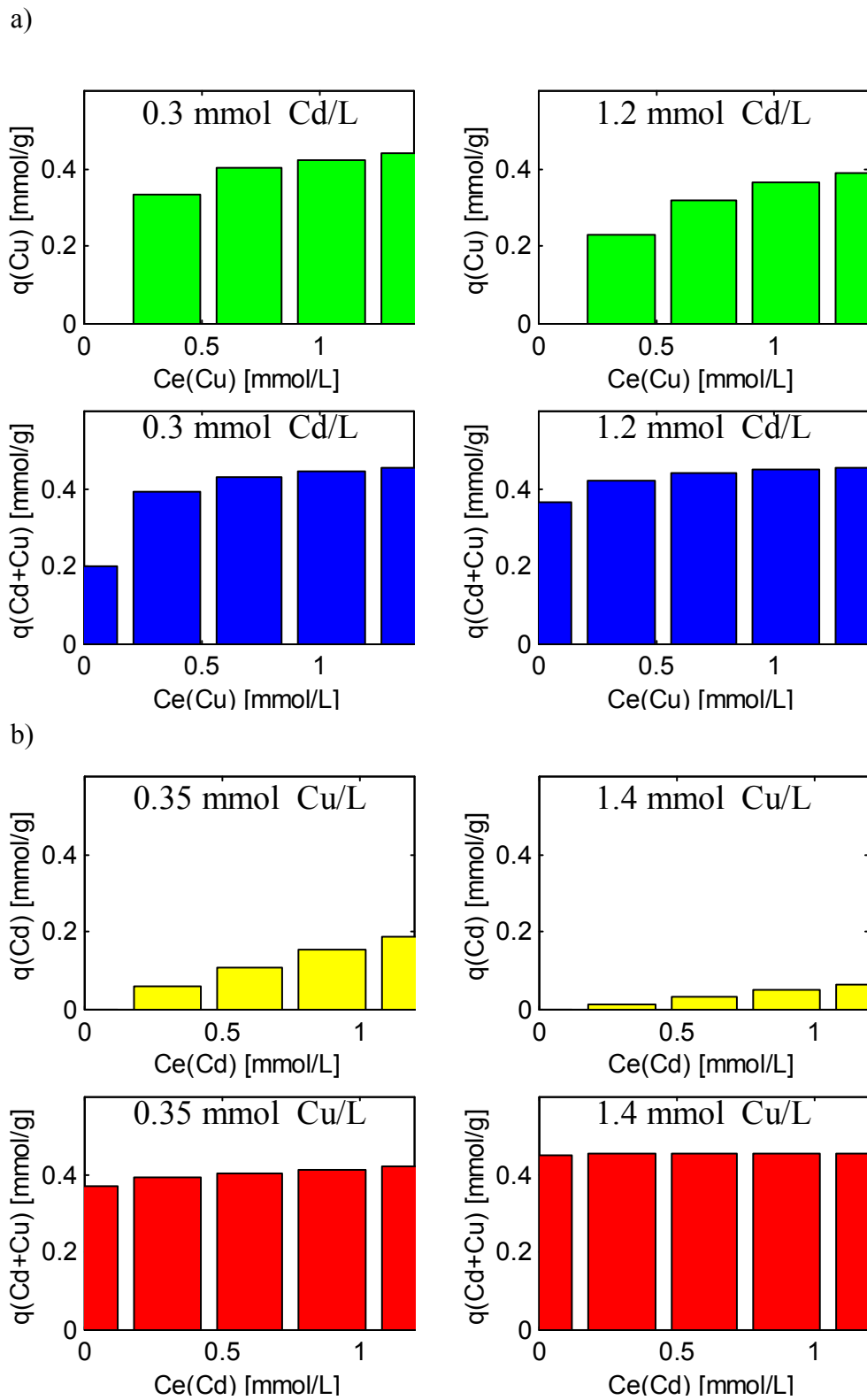


Figura 26.- Cortes de isoconcentración realizados en la Figura 25.

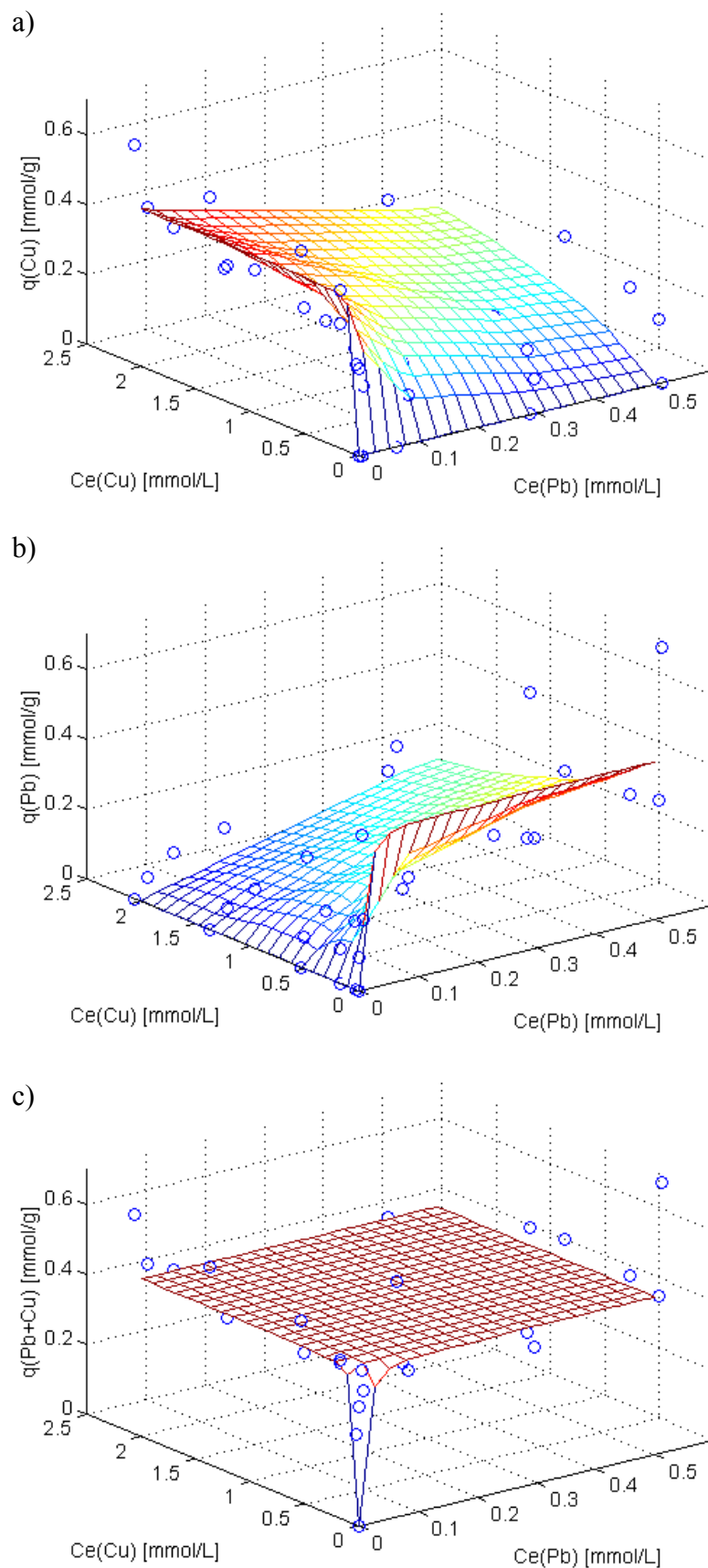


Figura 27.-Isotermas de adsorción para el sistema Cu-Pb.

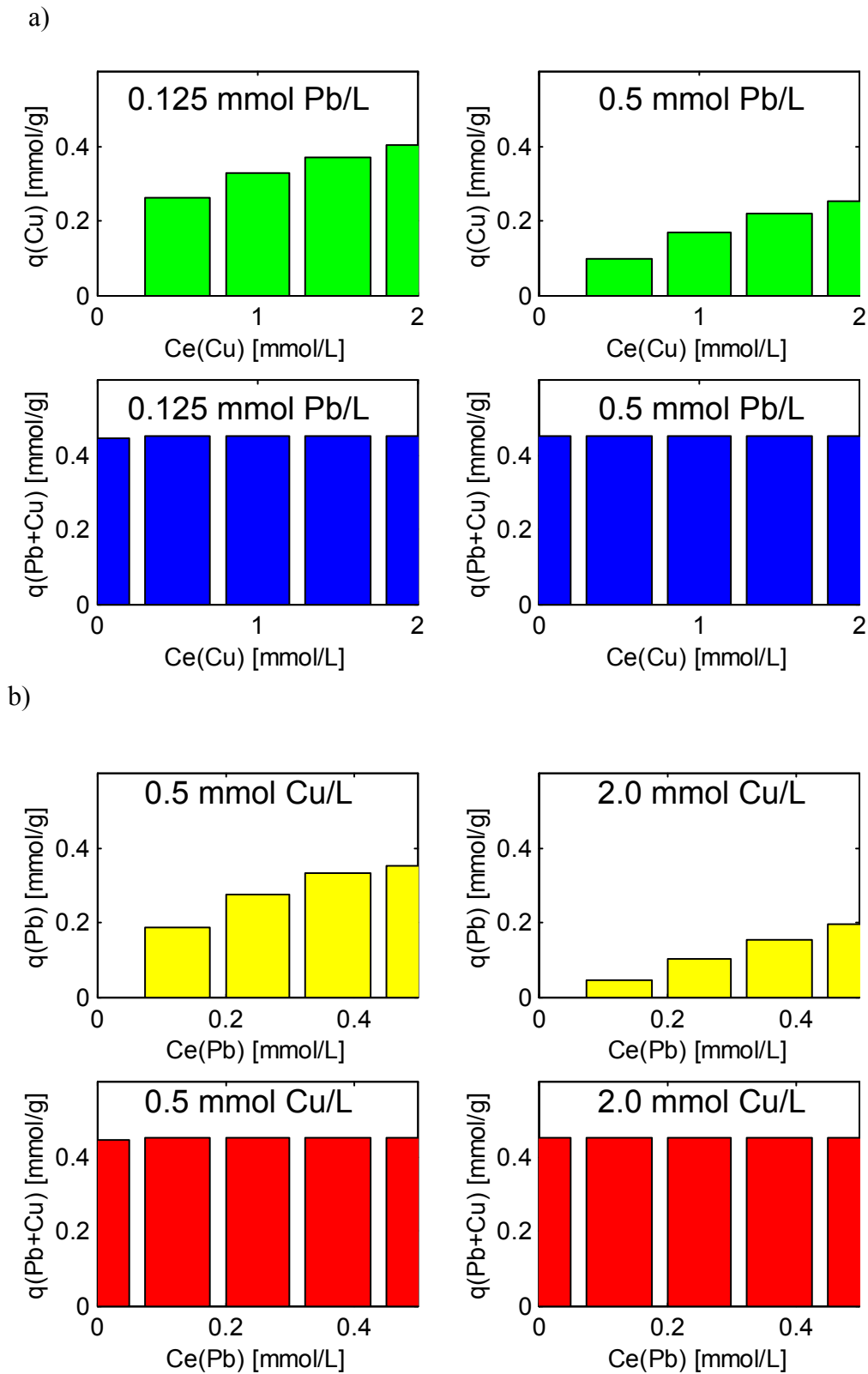


Figura 28.- Cortes de isoconcentración realizados en la Figura 27.

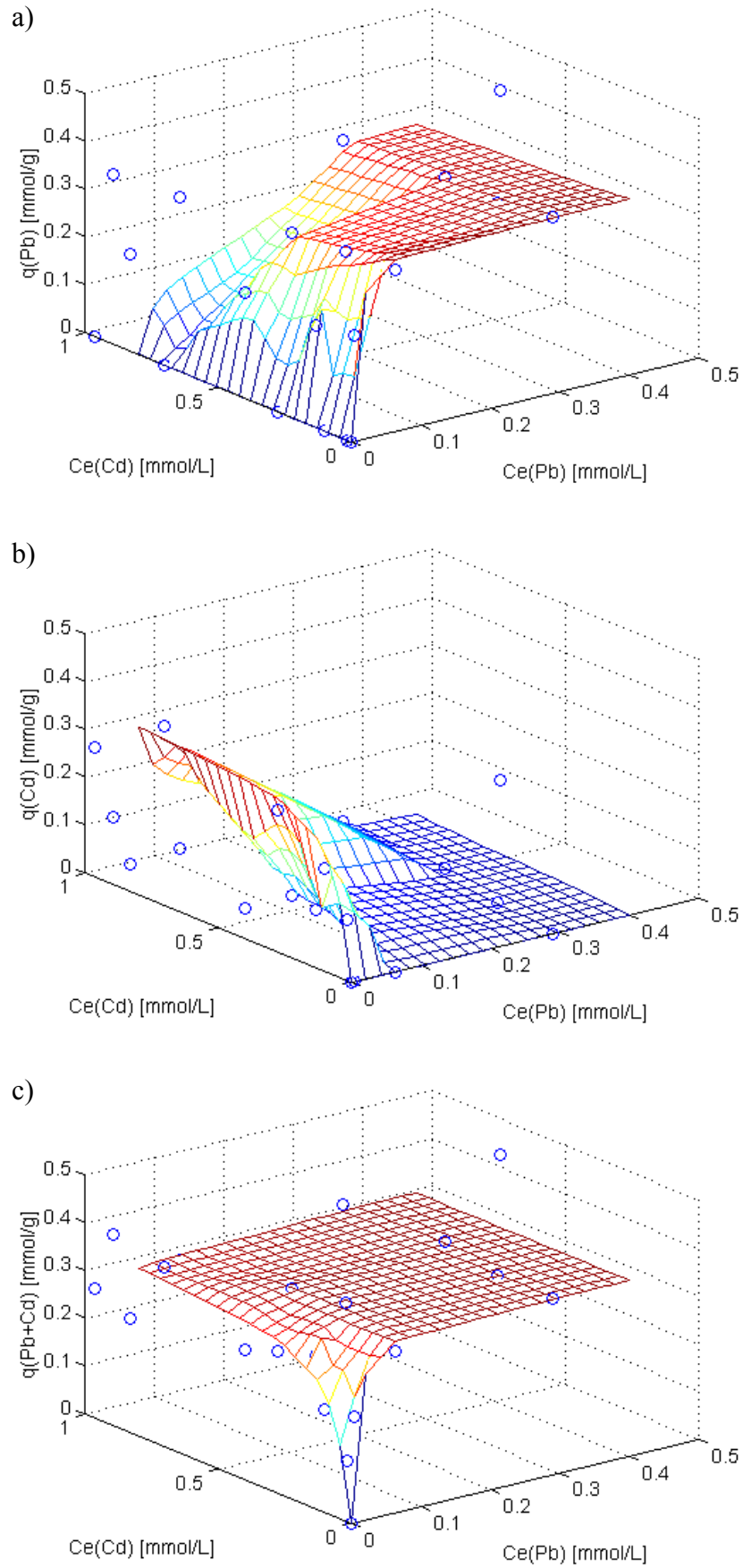


Figura 29.- Isotermas de adsorción para el sistema Pb-Cd.

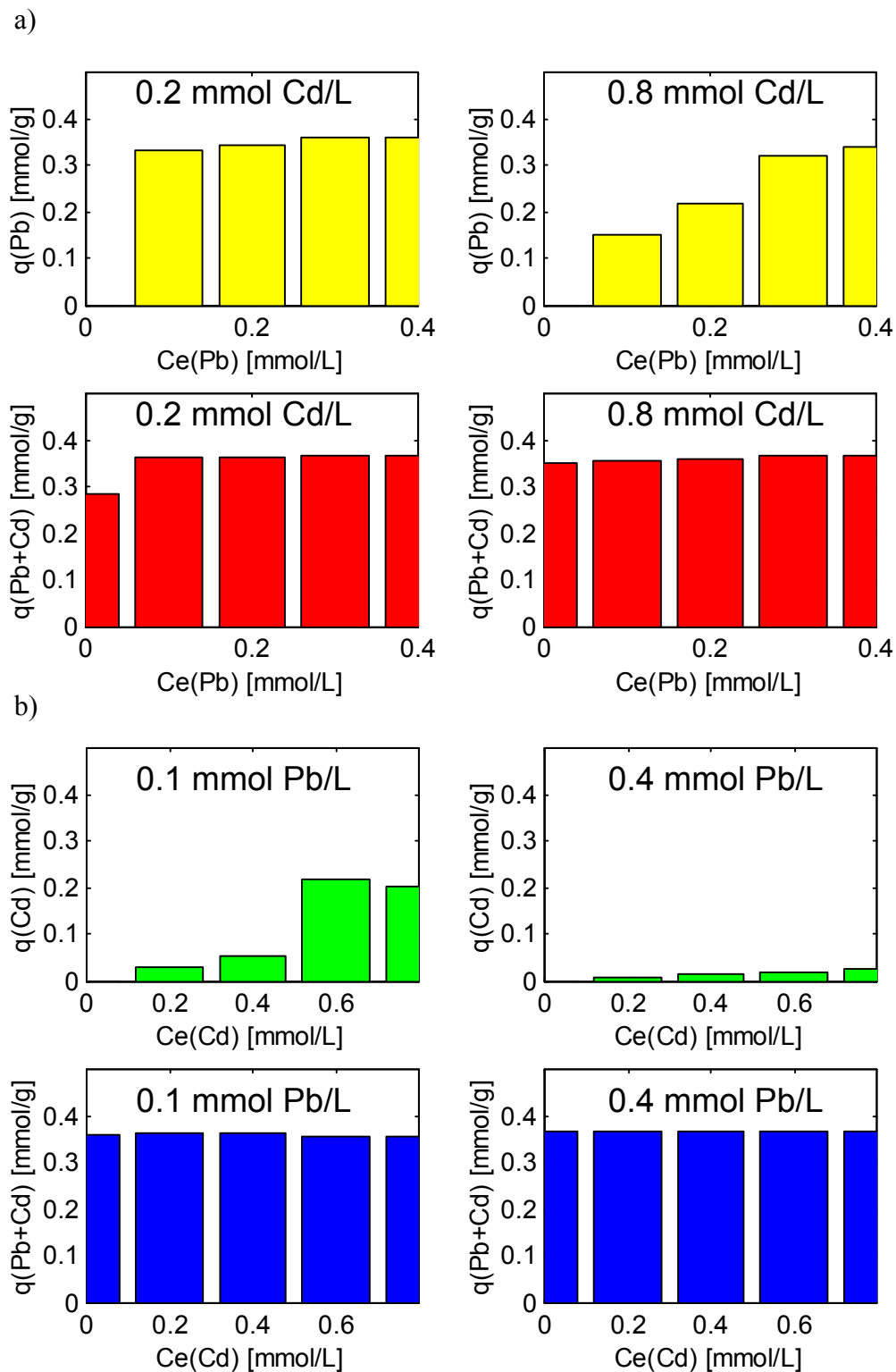


Figura 30.- Cortes de isoconcentración realizados en la Figura 29.

La bibliografía recoge un gran número de trabajos con agentes desorbentes siendo principalmente los ácidos, minerales u orgánicos, los que mayor capacidad para desorber el metal suelen presentar (Huang et al., 1998; Davis et al., 2000). No obstante, el agente desorbente debería reunir cuatro requisitos básicos con el fin de ser viable en el diseño de un sistema de depuración de aguas residuales. Estos requisitos son: 1) que posea una elevada eficacia en la elución del metal desde la biomasa; 2) que los daños que provoque a la misma sean nulos o mínimos con el fin de poder reutilizarla en sucesivos ciclos; 3) que sea poco contaminante; y, por último, 4) que sea barato (Davis et al., 2000; Gardea-Torresdey et al., 2004; Chojnacka et al., 2005; Mehta & Gaur, 2005).

Los mecanismos para lograr la desorción del metal suelen ser básicamente tres (Huang et al., 1998; Gardea-Torresdey et al., 2004):

➤ Precipitación del metal adsorbido mediante la formación de compuestos insolubles, productos de la reacción con el agente desorbente. Un ejemplo de reactivo que puede actuar de esta forma es el H_2S .

➤ Complejación del metal adsorbido mediante la reacción con compuestos que poseen pares de electrones disponibles para compartir con el catión metálico. Agentes desorbentes que siguen este mecanismo de actuación son, por ejemplo, $NaHCO_3$, Na_2CO_3 y EDTA.

➤ Intercambio catiónico. Este mecanismo suele presentar buenos rendimientos; su mecanismo de actuación consiste en intercambiar un catión, procedente del agente desorbente, por el metal adsorbido. Los agentes desorbentes más utilizados que presentan este mecanismo son HCl , H_2SO_4 y $NaOH$.

Para el presente estudio, se seleccionaron dos tipos de agentes eluyentes: uno ácido (HCl) y otro salino complejante ($NaHCO_3$), ambos ampliamente estudiados en la bibliografía y de coste relativamente bajo.

Tal como se indicó en el apartado de Materiales y métodos, la experimentación se llevó a cabo, en ambos casos, acometiendo en primer lugar la etapa de carga o de

bioadsorción con cada uno de los cinco metales en las condiciones allí indicadas. La cantidad de metal retenido por la biomasa se calculó en base a la diferencia de concentración en la disolución desde su valor inicial (100 mg/L) al valor final tras dicha etapa de carga.

Una vez obtenida la biomasa cargada con cada uno de los metales estudiados, ésta se sometió a la acción de los agentes eluyentes (HCL a pH 3 o NaHCO_3 a una concentración 0,1 N), fijándose la concentración de biomasa en 0,5 g/L. La suspensión resultante se mantuvo en agitación durante 120 min, tomando muestras a diferentes tiempos (0, 5, 30, 60 y 120 minutos) para llevar a cabo el seguimiento de la cinética de desorción mediante el análisis de la concentración metálica y del pH. Finalmente, la biomasa se recuperó por centrifugación y se secó en estufa a 60 °C durante 12 horas. Esta biomasa fue reutilizada en un nuevo ciclo de adsorción-desorción, idéntico al primero.

3.6.1.- El ácido clorhídrico como desorbente

En primer lugar, se estudió la cinética de desorción con el fin de obtener información sobre la variación de la concentración metálica y del pH, respecto al tiempo, permitiendo, asimismo, conocer el tiempo necesario para completarse el proceso, es decir, alcanzar el equilibrio lo que, a su vez, haría posible el cálculo del porcentaje de metal recuperado.

En la Figura 31 se muestra la cinética de elución con HCl cuantificada en función de la cantidad de metal liberado. Se observa como el proceso de desorción, al igual que ocurría con el de bioadsorción, se produjo de forma rápida, liberándose más del 80 % del metal retenido sobre la biomasa en los cinco primeros minutos. Durante el proceso de desorción, se observó también un aumento de pH paralelo a la liberación metálica (Figura 32); este hecho indicaría que durante el proceso se estaba produciendo un intercambio entre los cationes metálicos adsorbidos y los protones procedentes del agente desorbente tal y como la bibliografía recoge en relación al mecanismo de desorción propuesto para el HCl (Huang et al., 1998; Gardea-Torresdey et al., 2004; Mehta & Gaur, 2005).

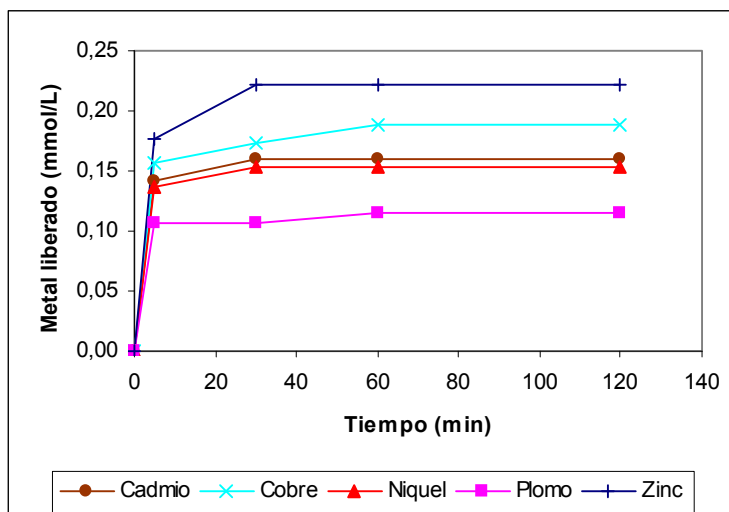


Figura 31.- Cinética del proceso de desorción con HCl para los cinco metales.

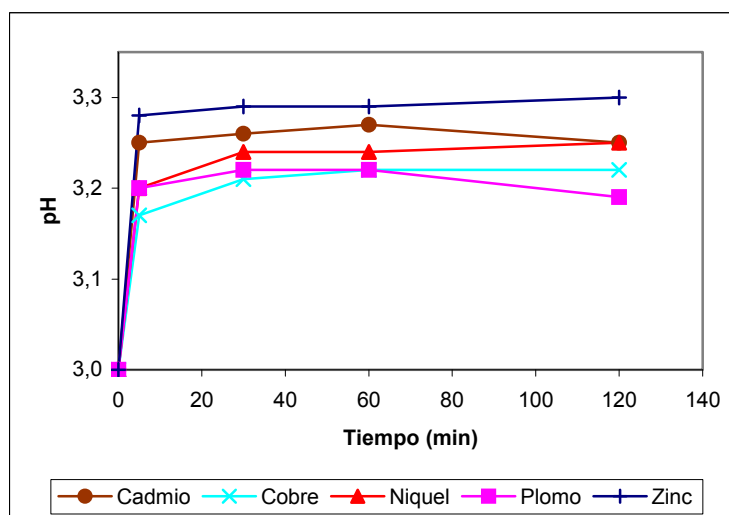


Figura 32.- Variación del pH en función del tiempo en la desorción con HCl.

Se valoró, a continuación, la posibilidad de reutilización de la biomasa en nuevos ciclos de adsorción-desorción.

En la Figura 33 se muestra la cantidad de metal que permaneció retenido en la biomasa al final de cada etapa de adsorción o desorción. Estos datos fueron calculados en función de los cambios de concentración de metal en el medio, ya sea de la disolución metálica inicial en la etapa de carga, o de la disolución ácida en la etapa de elución. En esta figura se aprecia como el HCl tuvo una marcada efectividad como agente desorbente (Desorción I), obteniéndose valores de recuperación metálica del 100 % para el Zn, del 94,7 % para el Ni, del 85,7 % para el Cd, del 66,7 % para el Cu y del 63,2 % para el Pb. Estos resultados están en la línea con los obtenidos por otros autores

(Mattuschka et al., 1993; Puranik & Paknikar, 1997; Davis et al., 2000; Lin & Lin, 2005 y Saeed et al., 2005), los cuales verificaron también la elevada eficacia del HCl como agente desorbente. No obstante, a la hora de reutilizar la biomasa en un nuevo ensayo de bioadsorción (Adsorción II), se observó una clara disminución en la eficacia de ésta puesto que en ningún caso se consiguió retener las cantidades que de cada metal se recuperaron en la etapa de adsorción del primer ciclo (Adsorción I).

El descenso de la capacidad de captación del bioadsorbente tras la desorción puede deberse a varios factores entre los que destacan daños en su estructura y en sus centros activos, provocados por la acción del agente desorbente, o bloqueo de dichos lugares de anclaje debido a que el eluyente no ha sido lo suficientemente efectivo, por lo que en la nueva etapa de adsorción se dispone de un menor número de ellos (Puranik & Paknikar, 1997; Davis et al., 2000; Rangsayatorn et al., 2004; Sekhar et al., 2004; Lin & Lin, 2005; Vijayaraghavan et al., 2005).

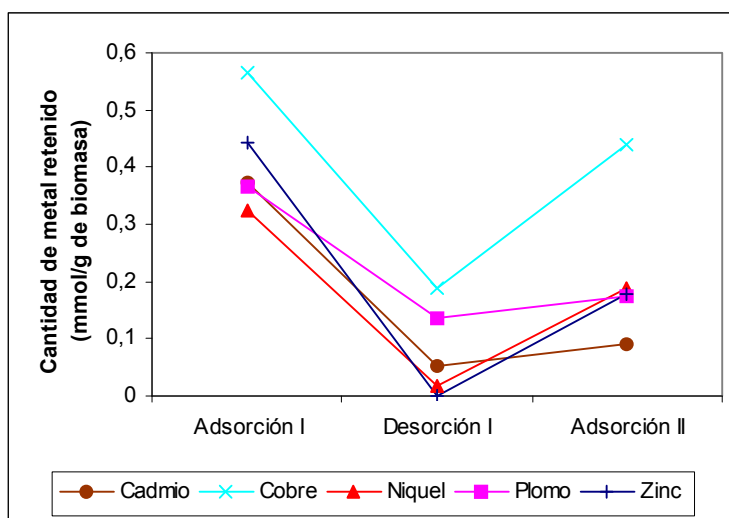
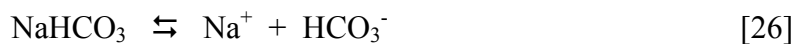


Figura 33.- Metal retenido en la biomasa tras las distintas etapas de adsorción y desorción.

3.6.2.- El bicarbonato sódico como desorbente

El estudio de la cinética de desorción con NaHCO_3 (Figura 34) puso de manifiesto que aunque se trató de un proceso relativamente rápido, consiguiéndose valores de recuperación superiores al 80 % dentro de los 30 primeros minutos, no lo fue tanto como con el empleo de HCl. Asimismo, al igual que en el caso precedente, se registró un aumento de pH en el medio de forma paralela a la desorción del metal (Figura 35) el

cual, en este caso, no parece que sea debido a un intercambio catiónico, ya que se trata de una sal de ácido débil, por lo que su disociación en medio acuoso tiene carácter básico debido a los siguientes equilibrios:



lo que implícitamente supone un cierto consumo de protones. Esto justificaría el ligero aumento del pH puesto de manifiesto en la Figura 35. Por otro lado, los aniones bicarbonato presentes en el medio, al tener pares de electrones disponibles, tienen la posibilidad de retirar los cationes metálicos adsorbidos sobre la biomasa, complejándolos (Puranik & Paknikar, 1997; Gardea-Torresdey et al., 2004).

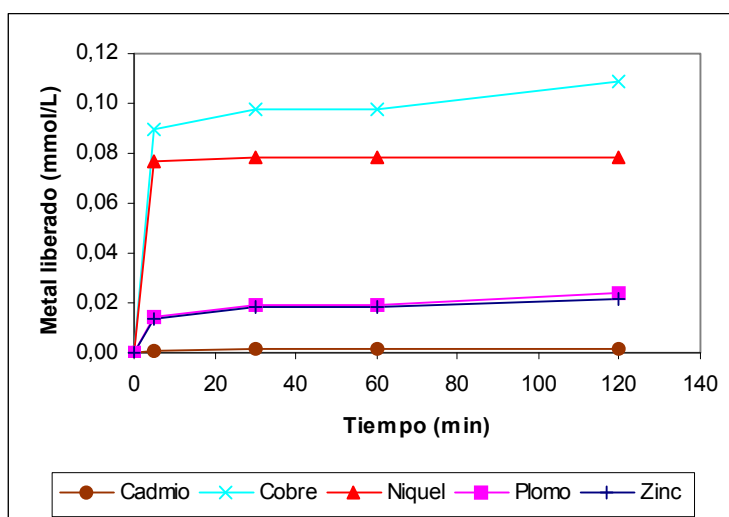


Figura 34.- Cinética del proceso de desorción con NaHCO_3 para los cinco metales.

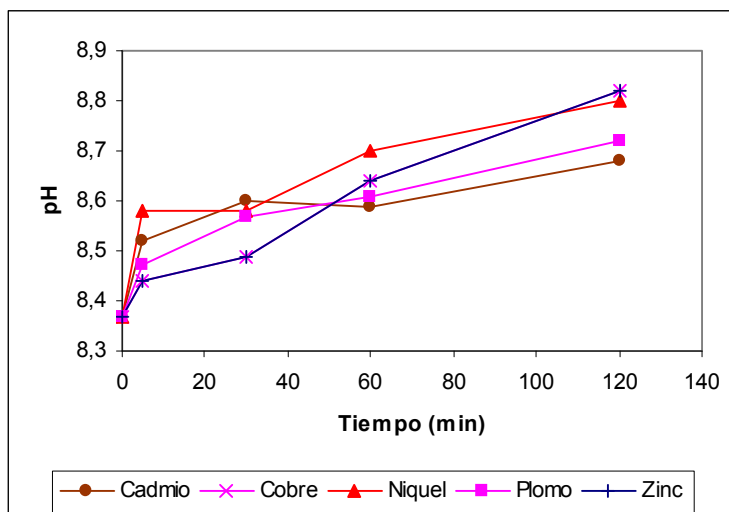


Figura 35.- Variación del pH en función del tiempo en la desorción con NaHCO_3 .

En la Figura 36 se recoge la cantidad de metal que quedó adsorbida al final de cada etapa de adsorción o desorción. La eficacia del NaHCO_3 como agente desorbente fue relativamente baja ya que, a excepción del Cu y Ni cuyas recuperaciones fueron de un 76,7 % y un 65,7 %, respectivamente, el resto de metales se desorbieron en cantidades bastante inferiores, obteniéndose unos valores de 16,7 % para el Zn, de 11,4 % para el Pb y de 1,4 % para el Cd.

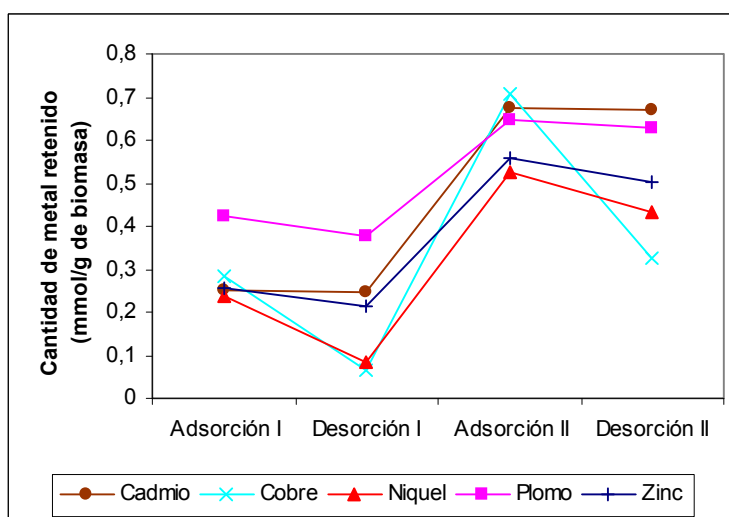


Figura 36.- Metal retenido en la biomasa tras las distintas etapas de adsorción y desorción.

No obstante, a pesar de que en este primer proceso de desorción (Desorción I), el metal fue recuperado con una no muy alta eficacia, la reutilización de la biomasa resultante (Adsorción II), en un segundo ciclo de bioadsorción, reveló que mejoraba

significativamente la capacidad adsorbente de la biomasa y como la recuperación metálica fue superior incluso a la de la etapa de carga del primer ciclo (Adsorción I) quedando, por tanto, la biomasa con mayor carga metálica. La explicación a este hecho debe ser que el NaHCO_3 ha producido determinadas modificaciones químicas en la biomasa que finalmente provocaron dicho aumento en la capacidad de adsorción de la misma. Un hecho semejante también ha sido constatado por Yan & Viraraghavan (2000) quienes comprobaron como la acción de NaHCO_3 sobre *Mucor rouxii* se tradujo en unos niveles de adsorción más altos. Dichos autores consideraron que el citado aumento podía ser atribuido a la limpieza de impurezas en la superficie de la biomasa, a la ruptura de la pared celular o a la generación de nuevos centros activos de adsorción.

Estos resultados aconsejaron que se llevara a cabo un análisis detallado de la posible modificación ejercida sobre la biomasa con este reactivo. En cualquier caso, se pensó en la posibilidad de que este mismo efecto también pudiera ejercerlo algún otro compuesto.

No obstante, retomando el análisis de la Figura 36, se comprueba que tras someter a la biomasa a una segunda etapa de desorción (Desorción II), en idénticas condiciones que las utilizadas en la primera, se observa como los rendimientos de desorción fueron incluso menores que los registrados en el primer ciclo. Los porcentajes de metal desorbido, con respecto al total existente en la biomasa, tras el segundo ciclo de bioadsorción fueron: de 53,8 % para el Cu, 17,5 % para el Ni, 9,3 % para el Zn, 3,0 % para el Pb y finalmente un 0,3 % para el Cd.

En la Figura 37 se resume como descendieron los rendimientos del proceso de desorción del primer al segundo ciclo. Ambos resultados están referidos, evidentemente, a la cantidad de metal retenido en la biomasa antes de cada etapa de desorción, de tal modo que el porcentaje de metal desorbido en el segundo ciclo haría referencia a la cantidad de metal incorporado a la biomasa en la segunda etapa de carga (Adsorción II) sumada a la que permaneció retenida tras el primer ciclo adsorción-desorción, aunque, lógicamente, las cantidades de metal sobre la biomasa al abordar las respectivas etapas de desorción fueron diferentes. Se puede apreciar como el rendimiento de desorción fue claramente superior en el primer ciclo que en el segundo debido, posiblemente, a la mayor carga metálica presente en la biomasa tras el segundo ciclo de bioadsorción.

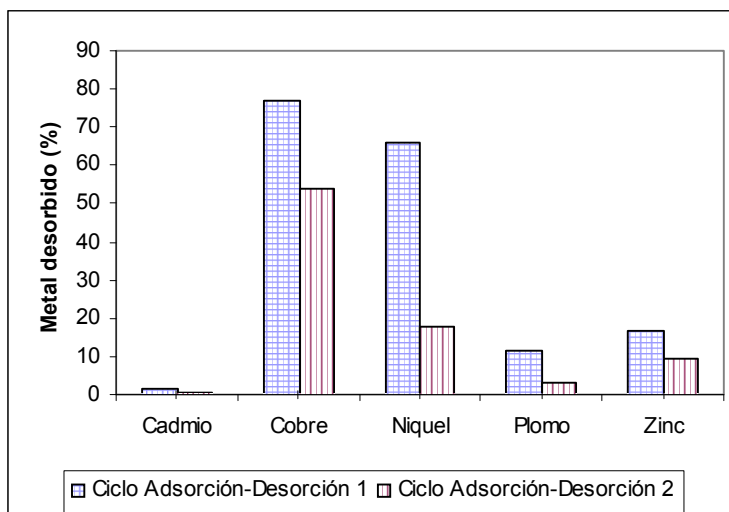


Figura 37.- Porcentaje del metal desorbido con NaHCO_3 , en cada ciclo.

Por último, en términos generales, comparando ambos agentes desorbentes, se ha comprobado como la eficacia en la desorción metálica fue claramente superior con el empleo de HCl que con el de NaHCO_3 , lo que se deduce de la Figura 38, en donde se representan las diferentes cantidades que de cada metal se desorbieron con ambos reactivos tras el primer ciclo. La justificación puede encontrarse en el diferente mecanismo de actuación de cada uno de los agentes eluyentes: intercambio iónico en el caso del HCl y complejación en el de NaHCO_3 (Gardea-Torresdey et al., 2004). No obstante, el HCl, al ser un ácido fuerte, pudo provocar una serie de daños en la biomasa que hicieron que ésta viera muy mermada su capacidad adsorbente, algo que no ocurrió con el NaHCO_3 , reactivo que, por el contrario, provocó una mejora significativa en los niveles de adsorción de la biomasa. Estas diferencias se hacen palpables con la Figura 39, comprobándose como los niveles de captación metálica de la biomasa tratada con NaHCO_3 fueron significativamente más altos. En una posible aplicación industrial, en la que se persiguiese la reutilización de la biomasa en sucesivos ciclos, sería lógico decantarse por la utilización del NaHCO_3 como agente eluyente antes que por el HCl, aunque lógicamente habría que intentar mejorar su efectividad. Mientras que si lo que se persigue es conseguir la mayor recuperación posible del metal adsorbido sin tener que reutilizar la biomasa, el agente más adecuado, de entre estos dos, sería el HCl.

Asimismo, la figura 38 permite establecer ciertas diferencias entre los niveles de desorción de los distintos metales con los dos reactivos utilizados. En el caso del HCl, aun observándose que la cantidad desorbida de cada metal no fue la misma, no se

registraron diferencias tan significativas como en el caso de la desorción con NaHCO_3 . Estos hechos también podrían justificarse de acuerdo con el diferente mecanismo de desorción de uno y otro. Mientras que el intercambio iónico que se produce empleando HCl parece ser más o menos independiente del catión metálico intercambiado, los complejos formados con cada uno de los cationes y el anión bicarbonato no parece que tengan estabilidades parecidas. En general, los complejos de cobre y níquel son bastante estables y ésta puede ser la causa por la que este metal se haya desorbido en mayor proporción. Así pues, es posible que cuanto mayor estabilidad tenga el complejo formado mayor sean los niveles de desorción alcanzados.

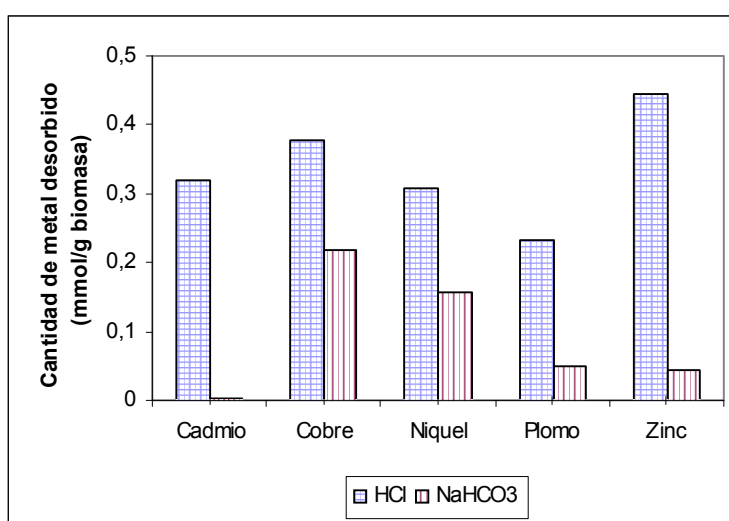


Figura 38.- Cantidad de metal desorbido en el primer ciclo.

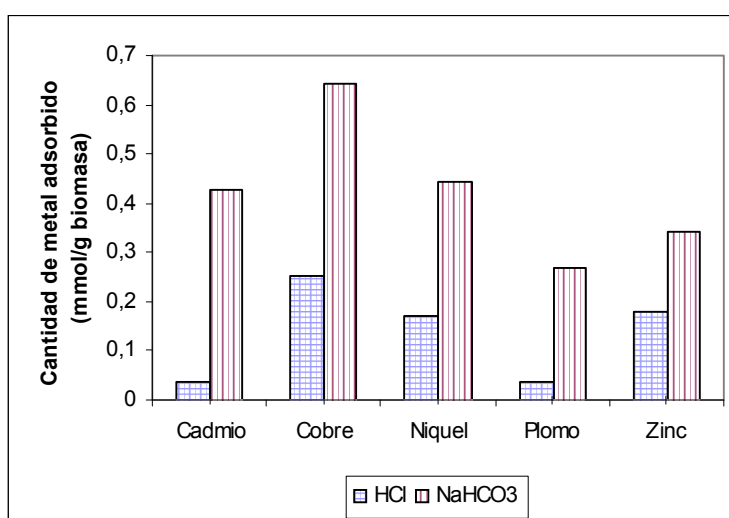


Figura 39.- Cantidad de metal adsorbido en el segundo ciclo.

3.7.- Pretratamiento de la biomasa

Una vez conocido el comportamiento como material bioadsorbente de la biomasa en su estado original, se pretendió averiguar si era posible aumentar su capacidad de adsorción tratándola con diferentes agentes químicos. Si se tuviera esta posibilidad se podría ampliar el espectro de las posibles aplicaciones industriales (Yin et al., 1999) ya que ello permitiría optimizar el proceso de adsorción y por consiguiente un mayor aprovechamiento de la biomasa al poder alcanzar una mayor recuperación metálica con un menor volumen de aquella.

La bibliografía ofrece una gran diversidad de trabajos en los cuales se informa que, a veces, es posible conseguir un aumento significativo de la capacidad de adsorción de diferentes biomazas, al ser sometidas a diversos tratamientos con ciertos agentes químicos (Brierley & Brierley, 1993; Hu et al., 1996; Huang & Huang, 1996; Kapoor & Viraraghavan, 1998; Ddour et al., 1999; Kapoor et al., 1999; Celaya et al., 2000; Lister & Line, 2001). Además, en un gran porcentaje de estos trabajos, se somete a la biomasa a lavados con agua destilada de forma previa o posterior al pretratamiento con el agente químico. La finalidad de este lavado es, por un lado, la de eliminar de la biomasa el exceso del reactivo pretratante que pudiera haber quedado retenido, el cual podría interferir en el posterior proceso de bioadsorción al bloquear los centros activos; esto es frecuente en el caso de ciertos cationes que quedan anclados a dichos centros activos estableciéndose una competencia entre ellos y los cationes metálicos (Matheickal & Yu, 1999; Kaewsarn, 2002; Diniz & Volesky, 2005; Pagnanelli et al., 2005). Por otro lado, también se pretende, a veces, eliminar de la biomasa el exceso de iones OH^- cuando en el pretratamiento se han utilizado agentes alcalinos minimizando, de este modo, el riesgo de precipitación metálica por efecto del aumento del pH en los procesos de bioadsorción. Por último, en ocasiones, lo que se pretende es eliminar restos de otros compuestos que simplemente bloquean físicamente los centros activos de la biomasa (Kapoor & Viraraghavan, 1998; Ruiz-Manríquez et al., 1998; Celaya et al., 2000; Yan & Viraraghavan, 2000; Yetis et al., 2000).

El primer objetivo de la investigación realizada fue elegir, de entre una serie de agentes químicos que la literatura presenta como efectivos, él o los más adecuados para la biomasa con la que se estaba trabajando estudiando, también, las mejores condiciones

para su aplicación; es decir, aquellos con los que el rendimiento del proceso de bioadsorción fuera el más favorable. Posteriormente, mediante la aplicación de diferentes técnicas analíticas, se procedió a la valoración de los diferentes cambios que pudieran haberse producido en la biomasa por acción del pretratamiento, con el fin de profundizar en el estudio del mecanismo del proceso.

3.7.1.- Elección de los agentes pretratantes

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva que ayudara en la selección de los agentes pretratantes que mostraran una mayor efectividad en la mejora de la capacidad de adsorción de la biomasa. Los seleccionados fueron los siguientes: CaCl_2 , NaHCO_3 , etanol, NaOH , Na_2CO_3 , formaldehído y un aceite hidrogenado, es decir dispersable en agua, conocido comercialmente como Tween 80.

Con el fin de valorar la efectividad de cada uno de ellos y conocer, en una primera aproximación, su posible efecto, se acondicionó la biomasa utilizándolos en las condiciones más habitualmente reportadas por la bibliografía: CaCl_2 , NaHCO_3 , NaOH y Na_2CO_3 en concentraciones de 0,2 M; el etanol fue usado al 95 %, el formaldehído al 6 % y el Tween 80 a una concentración de 5 g/L, según el protocolo de tratamiento descrito en el apartado 2.3.6. de la presente Memoria.

Por otro lado, también se pretendió analizar el posible efecto que pudiera tener el exceso de reactivo pretratante, una vez acondicionada la biomasa; para ello, ésta se sometió, o no, a una serie de lavados sucesivos siguiendo la secuencia que también se indica en dicho apartado. Posteriormente, se realizaron diversos ensayos de bioadsorción en las siguientes condiciones de trabajo: 0,5 g/L de biomasa, 150 mg/L de concentración metálica y un valor de pH de 4, para Cu y Cd, y de 5, para Ni, Pb y Zn, con agitación magnética durante 120 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se recuperó mediante centrifugación y en él se analizó el pH y la concentración metálica con el fin de conocer los correspondientes valores de equilibrio.

La Tabla 17 y la Figura 40 muestran las variaciones encontradas en la capacidad de adsorción de la biomasa pretratada con respecto a la original. En el caso de la biomasa sin lavado posterior, los resultados revelan que fueron tres los reactivos que claramente

produjeron una mejora significativa en el comportamiento biadsorbente de la biomasa: Na_2CO_3 , NaHCO_3 y NaOH . En el caso del primero, el porcentaje de aumento en la capacidad de adsorción de todos los metales, salvo el Ni, fue superior al 100 %, llegando incluso al 195 % para el Pb. Con NaOH también se consiguieron aumentos significativos, pero fue con el Pb con el único con el que se consiguió superar el 100 % de aumento. El bicarbonato sódico fue, de los tres, el menos efectivo; salvo para el Zn, el resto de los metales fueron captados por la biomasa en mayor porcentaje, y también el Pb fue con el que se consiguió la mayor mejora. El resto de los reactivos utilizados o fueron contraproducentes o provocaron ligeras mejoras sólo para algunos metales.

Tabla 17.- Porcentaje de variación de la capacidad de adsorción de la biomasa, con respecto a la original, tras el pretratamiento con los diferentes reactivos, seguido o no de lavado.

Sin lavado posterior

	Pb	Cd	Ni	Cu	Zn
CaCl₂	5	-25	-18	-19	22
NaHCO₃	73	50	22	12,49	0
Etanol	35	-25	-10	-13	-19
NaOH	145	50	54	69	33
Na₂CO₃	195	100	54	119	133
Formaldehído	10	0	-18	-25	-19
Tween 80	11	25	6	-25	22

Con lavado posterior

	Pb	Cd	Ni	Cu	Zn
CaCl₂	20	0	-18	-19	22
NaHCO₃	31	25	-25	-38	0
Etanol	16	0	-18	-25	-19
NaOH	60	25	36	0	0
Na₂CO₃	55	25	-9	6	33
Formaldehído	12	0	-35	-31	-19
Tween 80	17	25	-26	-31	-19
Lavado H₂O	16	0	-9	-25	0

En los resultados obtenidos con las biomásas sometidas a lavado posterior al pretratamiento, se apreció, al igual que en el caso anterior, como los mayores incrementos en la capacidad de adsorción fueron obtenidos con Na_2CO_3 , NaOH y NaHCO_3 , aunque estos incrementos fueron más moderados que en el caso de la biomasa sin lavar. Con el resto de agentes pretratantes, o bien no se mejoró o, por el contrario, se produjo un descenso moderado en la capacidad de adsorción. Sin embargo, en algunos casos hubo ligeras mejoras en el rendimiento de recuperación con relación a las conseguidas con biomasa sin lavado posterior al pretratamiento, aunque en otros la biomasa vió mermada su capacidad de adsorción.

Nótese que tanto en la Tabla 17 como en las representaciones de la Figura 40 se han incorporado los datos relativos a la biomasa que, sin haber realizado con ella ningún tipo de pretratamiento, fue también sometida al mismo protocolo de lavado. Puede comprobarse como, en este caso, el Pb fue el único con el que se consiguió un nivel de adsorción más elevado que el obtenido con la biomasa original.

En base a estos resultados, se seleccionaron Na_2CO_3 , NaHCO_3 y NaOH como reactivos de pretratamiento para seguir profundizando en su estudio al ser con los que se obtuvieron los aumentos más significativos en la capacidad de adsorción de la biomasa. Estos resultados están en la línea con los obtenidos en anteriores estudios realizados por Yan & Viraraghavan (2000), quienes lograron incrementos significativos en la capacidad para recuperar metales, por parte del hongo *Mucor rouxii* al ser pretratado con estos mismos tres reactivos.

3.7.2.- Optimización del pretratamiento

Una vez efectuada la selección de los agentes pretratantes, el siguiente paso fue determinar la influencia de algunas variables que pudieran contribuir a que dicha mejora fuera más notoria. Se comenzó estudiando el efecto de la concentración del reactivo utilizado.

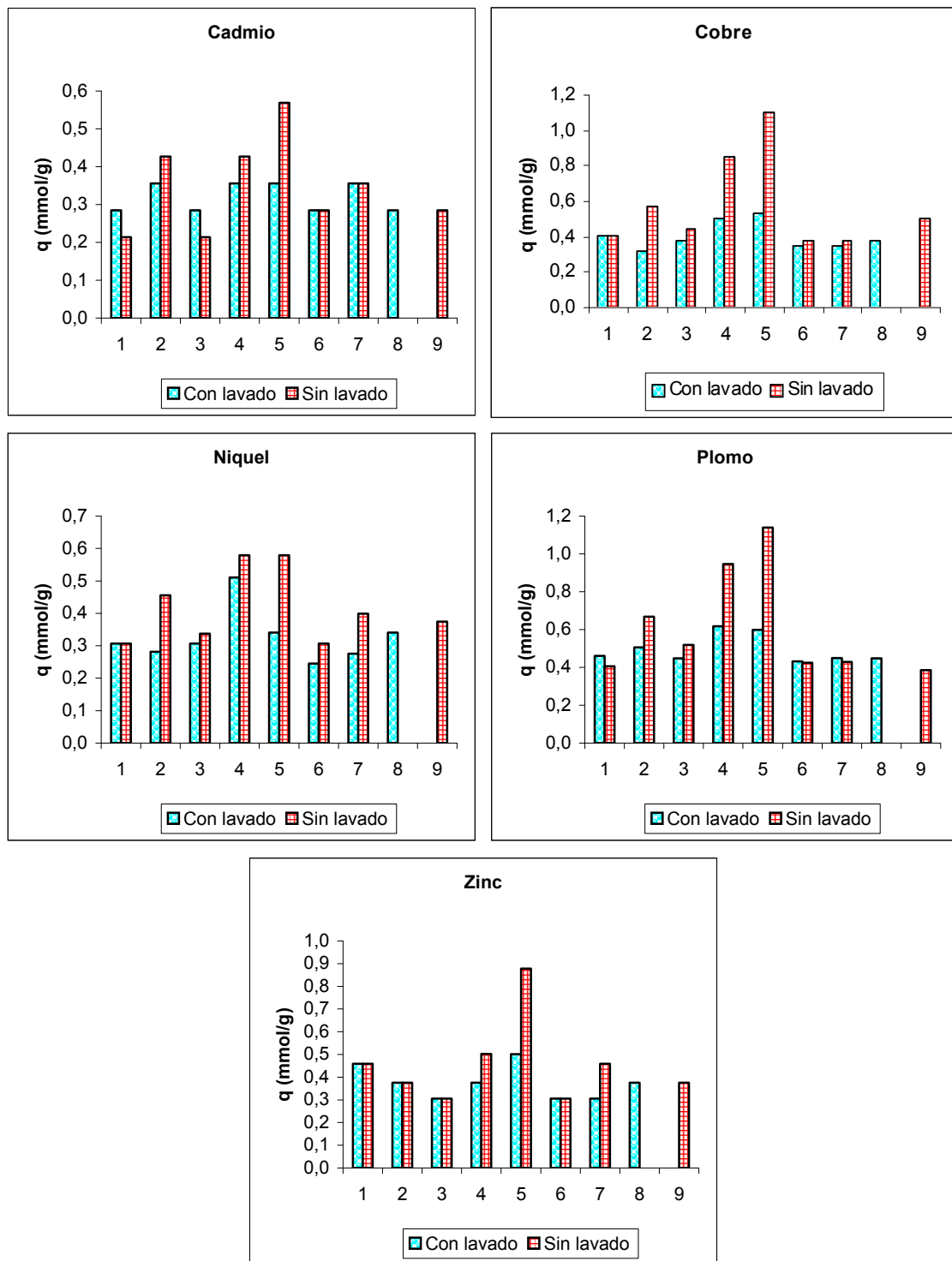


Figura 40.- Estudio comparativo de la capacidad de adsorción de Cd, Ni, Cu, Zn y Pb entre las biomásas pretratadas con o sin lavado posterior: CaCl_2 (1), NaHCO_3 (2), etanol (3), NaOH (4), Na_2CO_3 (5), formaldehído (6), tween 80 (7), lavado H_2O (8) y biomasa sin pretratar (9).

Para ello, la biomasa se acondicionó según la metodología indicada anteriormente, utilizándose cuatro concentraciones diferentes de cada reactivo: 0,075 M; 0,2 M; 0,5 M para todos ellos, además de 1 M para el NaOH y concentraciones de saturación para los otros dos (0,82 M en el caso de NaHCO_3 y 0,67 M para el Na_2CO_3). En esta ocasión, también, para cada biomasa pretratada con cada uno de estos agentes y con cada concentración de los mismos, se separó una fracción para someterla a lavado posterior según el mismo protocolo seguido anteriormente por lo que, también, se trabajó con lavado y sin lavado posterior al pretratamiento. El resto de las condiciones experimentales fueron idénticas a las empleadas en el apartado anterior.

En las Figuras 41, 42 y 43 se representan los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad de adsorción (q) de las biomásas resultantes del pretratamiento, seguidas o no de lavado, con NaHCO_3 , Na_2CO_3 y NaOH respectivamente, y en las diferentes concentraciones estudiadas. Asimismo, en estas figuras aparece, a modo de referencia, la capacidad de adsorción de la biomasa sin pretratar (Sin Pret.) y la de la biomasa que sin haber sido pretratada fue sometida al mismo protocolo de lavado (0 N). Del análisis de estas figuras se desprende lo siguiente.

En los resultados correspondientes a la biomasa sin lavado posterior al pretratamiento se aprecia, en general, un aumento paulatino en la capacidad de adsorción a medida que aumentaba la concentración del reactivo pretratante, obteniéndose los valores más altos de recuperación metálica con las concentraciones más altas estudiadas. La única excepción se dió en el caso de la recuperación del Pb por parte de la biomasa pretratada con NaOH (Figura 43), con la cual el valor máximo de adsorción se consiguió utilizando una concentración de 0,5 M.

Si ahora se analizan los resultados obtenidos con la biomasa sometida a lavado posterior al pretratamiento, se comprueba que, en líneas generales, aunque el valor de q se vió afectado de diferente forma según el metal y el tipo y concentración del agente pretratante, los niveles de adsorción fueron significativamente más reducidos que los obtenidos cuando no se hizo el lavado con posterioridad al pretratamiento de la biomasa. Del mismo modo, aunque en algunos casos los aumentos de la capacidad de adsorción registrados fueron más o menos proporcionales al aumento de la

concentración del agente pretratante, en general, el lavado condujo a que los niveles de adsorción obtenidos fueran muy parecidos, independientemente de la concentración del reactivo de pretratamiento utilizado.

Si se fija la atención en los resultados conseguidos con la biomasa pretratada con NaHCO_3 y lavada (Figura 41), se observa como en el caso de Cd, Cu, Ni y Pb, salvo algunas ligeras fluctuaciones, sobre todo con Cu y Ni, hubo sólo ligeros incrementos en la capacidad de adsorción con el aumento de la concentración del pretratante, obteniéndose, generalmente, el valor más elevado con las concentraciones más altas. En el caso del Zn, la capacidad de adsorción permaneció invariable, con respecto a la biomasa sin pretratar, de forma independiente a la concentración de pretratamiento.

En el caso de la biomasa pretratada con Na_2CO_3 y lavada (Figura 42), se comprueba como para los metales Cd, Cu, Pb y Zn existió un incremento mas o menos regular en el valor de q a medida que aumentaba la concentración del reactivo, aunque con Pb se apreció un ligero descenso en el nivel de captación por parte de la biomasa para el valor mas alto de concentración del pretratante. La capacidad de adsorción en el caso del Ni no experimentó variación significativa con las diferentes concentraciones de Na_2CO_3 .

Por último, para la biomasa pretratada con NaOH y también lavada posteriormente (Figura 43), se obtuvieron resultados en la línea de los hallados con NaHCO_3 : para el Cd, Cu, Ni y Pb los aumentos de la capacidad de adsorción fueron creciendo al aumentar también la concentración del reactivo de pretratamiento. Del mismo modo, en el caso del Zn, su capacidad de adsorción no se vió afectada por este tipo de pretratamiento.

El valor de pH es una variable que puede ayudar mucho en la interpretación de los datos obtenidos con el pretratamiento de la biomasa. Por este motivo, también se hizo un seguimiento completo del valor de esta variable en cada uno de los experimentos realizados. Los resultados obtenidos aparecen en las Figuras 44, 45 y 46, en donde se muestran los valores de pH de equilibrio y, por tanto, medidos al final de cada ensayo de bioadsorción. En estas gráficas, se representan también los valores de pH de precipitación de cada especie metálica; dichos valores estarían indicando la posibilidad

de que los metales estudiados hayan podido hidrolizarse y, por tanto, permanecer o no en disolución según las condiciones de equilibrio alcanzadas. Estos valores fueron obtenidos con la ayuda de la concentración metálica de equilibrio conseguida en cada ensayo, medida experimentalmente, y de la constante de solubilidad de cada especie metálica, empleando la ecuación [18]. La finalidad de este estudio fue determinar si, en los distintos ensayos de bioadsorción, los diferentes valores de pH de equilibrio hubieron superado el pH máximo de solubilidad metálica, lo que estaría indicando que el metal pudo haber precipitado en forma de hidróxido.

Analizando, en primer lugar, las gráficas correspondientes a la biomasa pretratada sin lavado posterior (Figuras 44 a 46), se observa como con todos los metales el pH de equilibrio aumentó de forma paralela a la concentración del agente pretratante, llegando a igualar al de solubilidad con Cu, Zn y Ni y superándolo ampliamente en el caso del Pb, especialmente con las concentraciones más altas del reactivo pretratante. Únicamente con el Cd y para todas las concentraciones del reactivo pretratante, se obtuvieron valores de pH de equilibrio situados dentro del rango de solubilidad, es decir, sensiblemente inferiores a los de precipitación del metal.

Por otro lado, los valores de pH de equilibrio que se registraron en el caso del Cd, Cu, Ni y Zn fueron muy semejantes con los tres agentes pretratantes utilizados. Estos resultados parecen indicar que el motivo que provocó el aumento de pH en los ensayos de bioadsorción no se debería al aumento en la densidad de grupos OH⁻, que procedentes del agente pretratante permanecieron asociados a la biomasa tras el pretratamiento; de haber sido así, de acuerdo con la gran diferencia de alcalinidad que presentan los tres agentes pretratantes, lo esperable habría sido también una diferencia en el pH de equilibrio, acorde a dicha alcalinidad, esto es, mayor en el caso del reactivo más alcalino. La justificación, por tanto, podría encontrarse en las propiedades ácido-base de la biomasa estudiadas en el apartado 3.4. Allí se constató que la biomasa se comportaba como un ácido débil situándose su pK_a en torno a 3,75, por lo que, de este modo, a valores de pH superiores a dicho valor, la biomasa liberaría protones al medio (Romero-González et al., 2001; Lodeiro et al., 2005). Esto hace pensar que, con los valores de pH alcanzados en los procesos de pretratamiento con estos agentes (8,4; 11 y 13 para NaHCO₃, Na₂CO₃ y NaOH, respectivamente), a pesar de ser diferentes entre sí,

habrían sido en los tres casos suficientemente básicos para desprotonar totalmente los centros activos de la biomasa. Estos centros activos desprotonados podrían haber sido los responsables de la subida del pH en los procesos de bioadsorción al incorporar, de forma paralela a los cationes metálicos, la misma cantidad de protones del medio.

En el caso del Pb, el valor de pH de equilibrio en ensayos de bioadsorción con biombras pretratadas con Na_2CO_3 y NaOH fueron similares entre sí y superiores al obtenido con biombras pretratadas con NaHCO_3 . Estos resultados inducen a pensar en una posible precipitación del metal, más favorable en el caso de los dos primeros, al superar más claramente el pH de solubilidad. En este caso, los protones, al tener una competencia menor con el Pb, debido a la posible precipitación del mismo, habrían sido captados en mayor proporción por la biomasa aumentando así el pH de equilibrio de forma más significativa.

En las gráficas de pH correspondientes a la biomasa pretratada con lavado posterior, se observa como los valores de pH de equilibrio fueron, en todos los casos, menores que los obtenidos con las biombras sin lavado posterior al pretratamiento debido, posiblemente, a una protonación parcial de la biomasa durante las etapas de lavado, permaneciendo también por debajo del pH de precipitación metálica y reflejando, al igual que en el caso anterior, los mismos valores de pH con independencia del agente pretratante utilizado. En el caso del Pb recuperado por la biomasa cuando ésta se acondicionó con Na_2CO_3 (Figura 45) y NaOH (Figura 46), se observa como los valores del pH de equilibrio se aproximaron mucho a los correspondientes de precipitación.

Valorando globalmente los resultados obtenidos, sería posible plantear las siguientes ideas:

➤ Los ensayos de bioadsorción, utilizando biombras pretratadas con NaHCO_3 , Na_2CO_3 y NaOH, permiten obtener un aumento significativo en la capacidad de bioadsorción metálica con respecto a la biomasa sin pretratar. Este aumento es más acentuado con biombras sin lavado posterior al pretratamiento, que con aquellas a las

que se les aplicó dicho lavado. En la Tabla 18 se recopila el porcentaje de incremento máximo logrado para cada metal y con cada tipo de pretratamiento indicándose, asimismo, la concentración de reactivo pretratante con la que se consiguió dicho incremento.

➤ Son de destacar, en el caso de la biomasa sin lavado posterior al pretratamiento, los notorios incrementos en la capacidad de adsorción logrados con Na_2CO_3 saturado para el Cu (469 %), Cd (450 %) y Zn (433 %). En el caso del Pb y el Ni también se lograron incrementos considerables en la capacidad de adsorción con los tres agentes pretratantes estudiados, aunque estos incrementos fueron de menor magnitud que en los anteriores. Conviene recordar que, de acuerdo con el estudio previo relativo a la influencia del pH (apartado 3.2.1.), en los ensayos de bioadsorción llevados a cabo, tanto con el Cd como con el Cu, el pH inicial se fijó en un valor de 4, en lugar de 5 como con el resto de los metales. En ese mismo apartado también se dejó constancia del efecto negativo que los valores bajos de pH del medio ejercen sobre la bioadsorción de los cationes metálicos debido a fenómenos de competencia entre éstos y los protones por los mismos centros activos de la biomasa. En base a estas cuestiones, parece lógico pensar que cualquier mecanismo influido por el pretratamiento, encaminado a favorecer la unión del metal a los centros activos, favoreciera, de forma más marcada, a aquellos cationes cuyos procesos de bioadsorción hayan sido llevados a cabo con un menor pH inicial, como fue el caso del Cd y del Cu.

Por otro lado, diversos autores (Ddour et al., 1999; Mameri et al., 1999 y Satiroglu et al., 2002) defienden que una de las actuaciones posibles del pretratamiento con compuestos alcalinos como los aquí utilizados, la cual podría dar una explicación lógica a estos resultados, sería la de fijar cationes sodio en los centros activos de la biomasa susceptibles al intercambio catiónico, los cuales favorecerían la unión de los iones metálicos. Esta misma razón explicaría también el hecho de que estos tres metales (Cd, Cu y Zn) se hayan adsorbido mejor sobre biomásas pretratadas con Na_2CO_3 , al haber un mayor aporte de sodio que con los otros reactivos pretratantes.

En el caso del Zn, a pesar de que su pH inicial fue fijado en un valor de 5, al igual que con Ni y Pb, la razón por la que mostró un incremento en los niveles de adsorción tan

alto, similar al de los dos primeros (Cd y Cu), pudo deberse a que, al poseer un menor valor de electronegatividad, estaría en desventaja con relación al resto de cationes metálicos, frente a la competencia ejercida por la misma concentración de protones, viéndose sensiblemente favorecido, al igual que en los dos casos anteriores, por el efecto del pretratamiento.

Por otro lado, la mejora sustancial en la capacidad de adsorción que, en general, fue conseguida con el pretratamiento podría ser debida, también, a otras modificaciones químicas en moléculas de la superficie de la biomasa, que darían como resultado un aumento en la porosidad permitiendo, de este modo, el acceso del metal a zonas internas o bien la generación de nuevos centros activos (Mameri et al., 1999; Sung Lee & Volesky, 1999).

➤ Con la biomasa sometida a lavado tras el pretratamiento, se obtuvieron incrementos en la capacidad de adsorción considerablemente menores que en el caso de la biomasa sin lavado lo cual, posiblemente, sea debido a una cierta reversión de la acción del pretratamiento. Por un lado, debida a la nueva protonación de algunos grupos funcionales que tras el pretratamiento conservaron su forma de ácido conjugado. O bien, por la liberación de iones sodio que, anclados en grupos funcionales con carga negativa, hayan sido sustituidos por protones en el lavado. De cualquier manera, con este tipo de biomasa, se obtuvieron, en algunos casos, incrementos significativos en la capacidad de adsorción superándose el 60 % para el Zn y el Pb, aunque no parece que se haya puesto de manifiesto un efecto claro ni en cuanto al agente pretratante ni en cuanto al metal adsorbido. La justificación a este hecho, muy previsiblemete, haya que encontrarla en la idea anteriormente planteada, es decir, en que con el lavado se haya perdido el efecto positivo conseguido con el pretratamiento previo.

➤ El análisis de los valores de pH de equilibrio, principalmente con el empleo de biomazas pretratadas sin lavado posterior, puso de manifiesto que hubo una gran proximidad con los de precipitación metálica, incluso, en algunos casos, éstos superaron ampliamente el valor máximo de solubilidad. Este hecho hizo necesario un estudio complementario que, apoyado en el empleo de determinadas técnicas analíticas, ayudara a comprobar la existencia, o no, de precipitados metálicos sobre la biomasa.

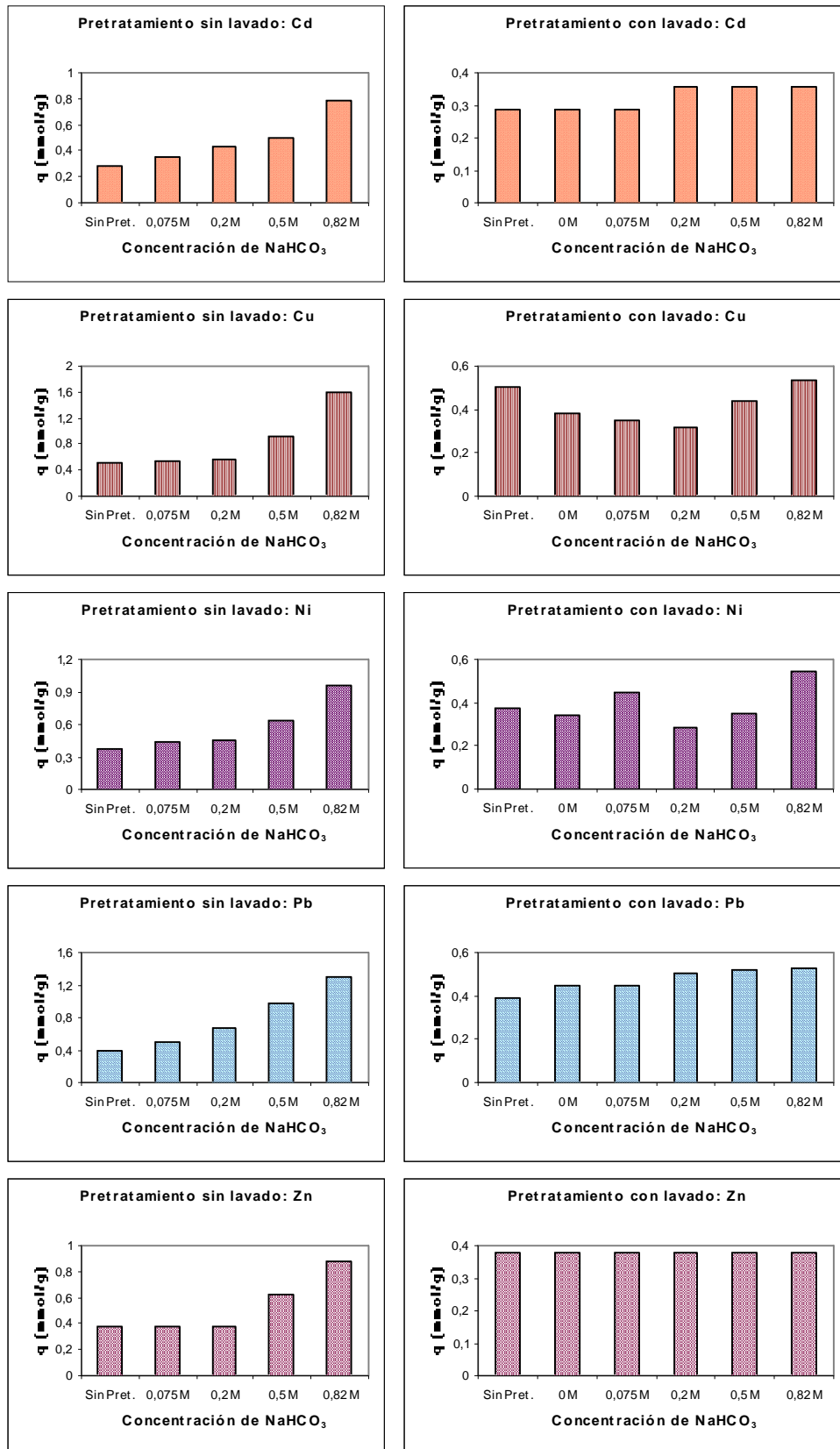


Figura 41.- Capacidad de adsorción de la biomasa pretratada con diferentes concentraciones de NaHCO₃, seguida o no de lavado.

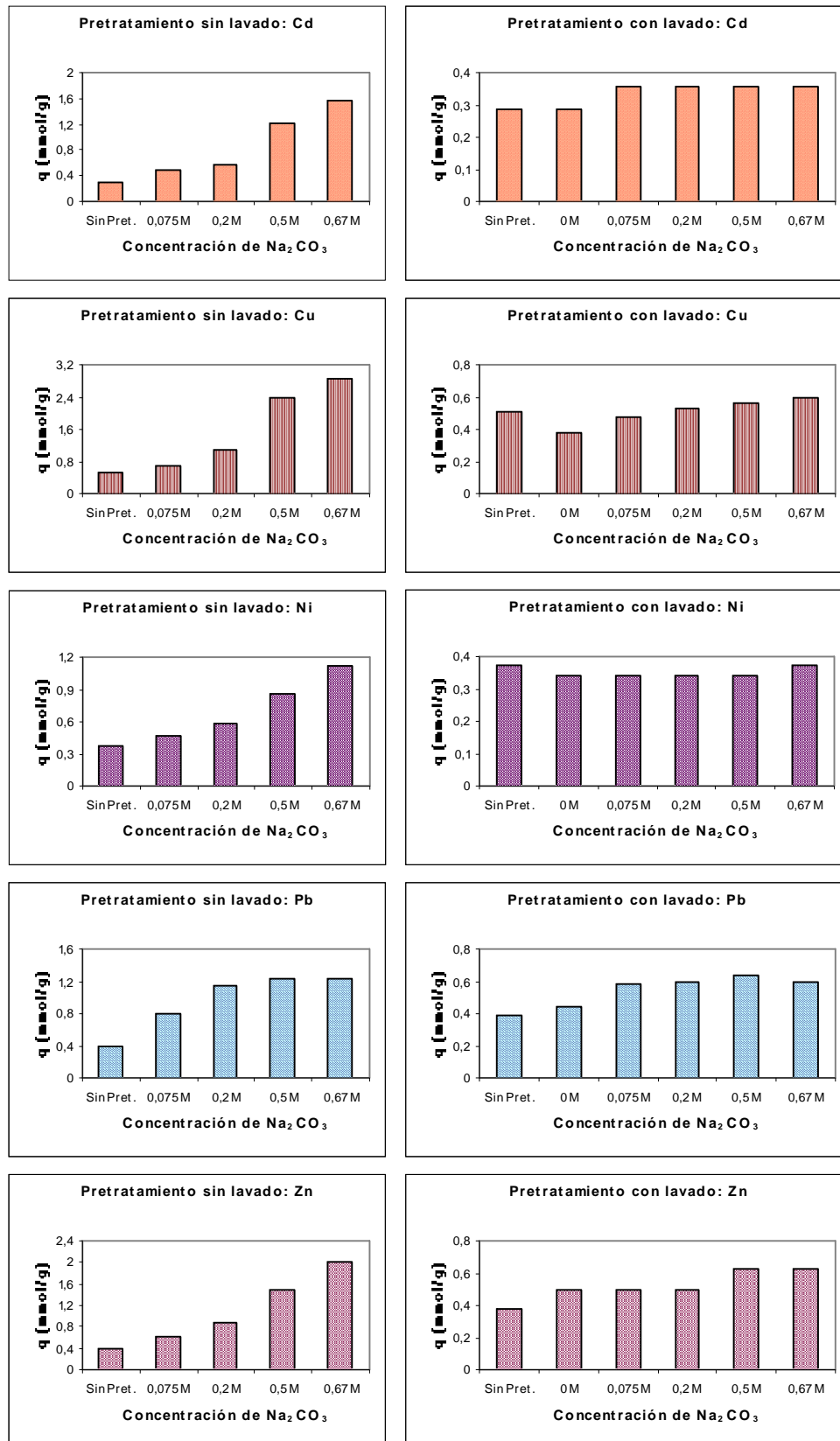


Figura 42.- Capacidad de adsorción de la biomasa pretratada con diferentes concentraciones de Na_2CO_3 , seguida o no de lavado.

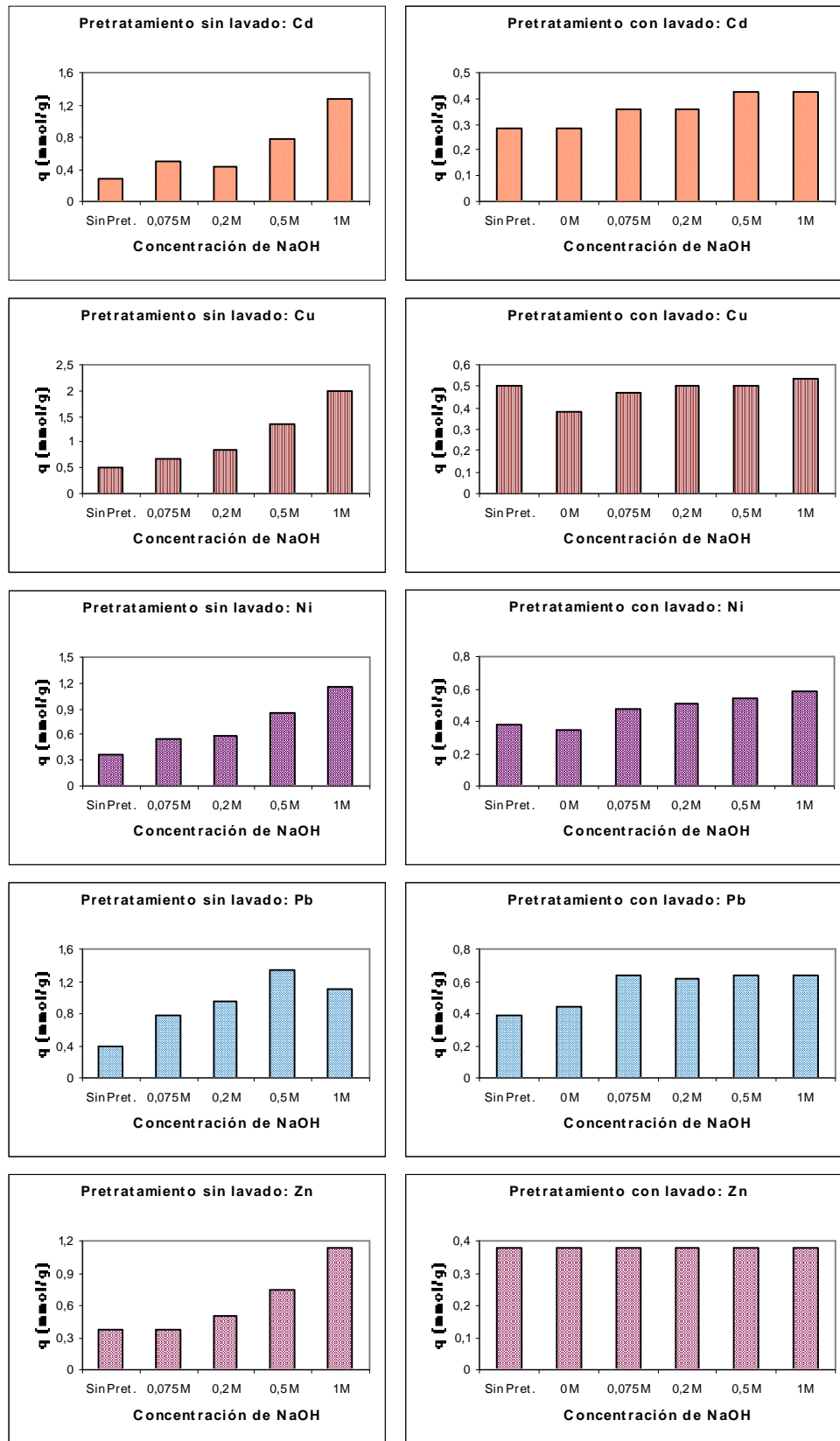


Figura 43.- Capacidad de adsorción de la biomasa pretratada con diferentes concentraciones de NaOH, seguida o no de lavado.

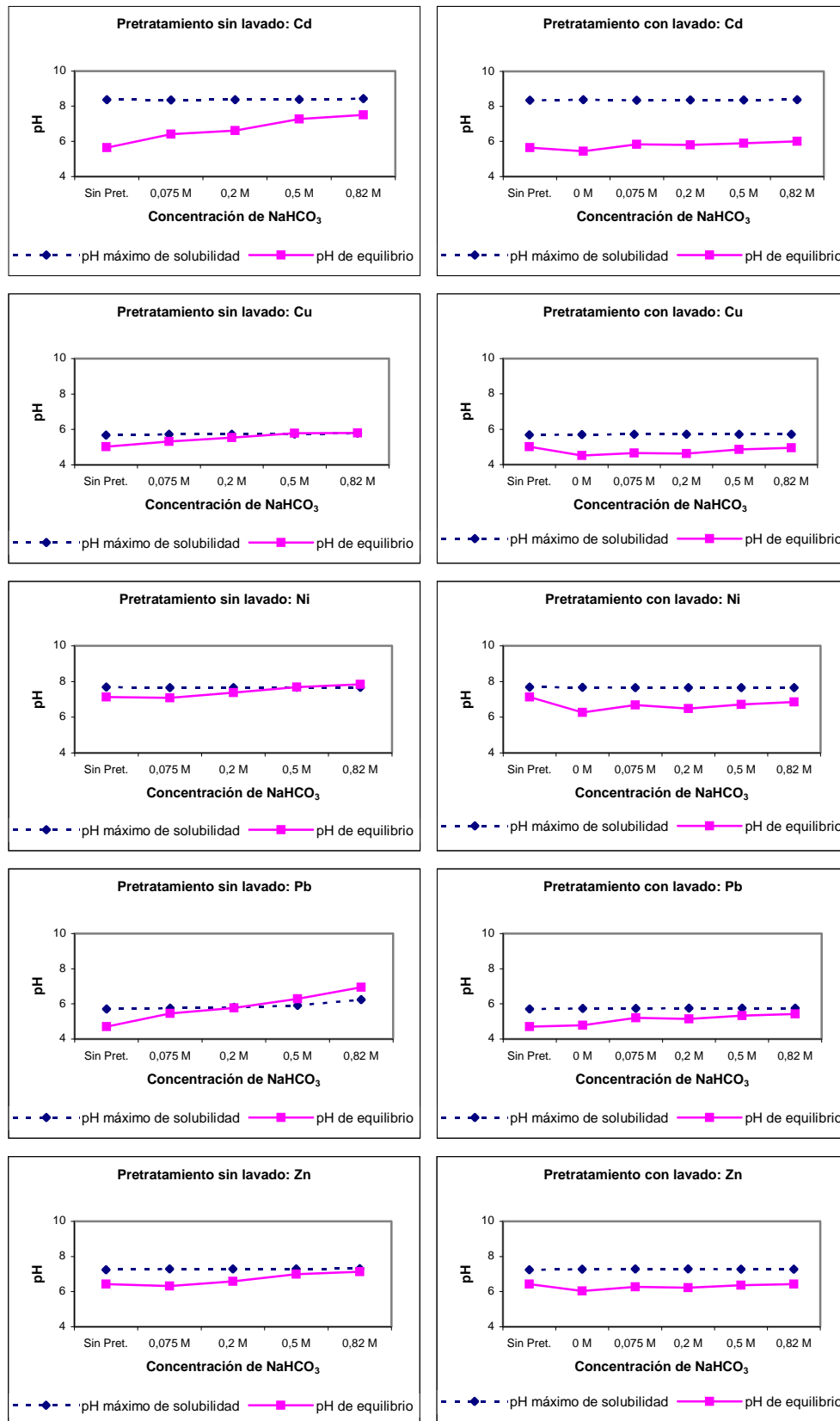


Figura 44.- pH de equilibrio en los ensayos de bioadsorción, en función de la concentración de pretratamiento con NaHCO₃. Comparativa con el pH de solubilidad metálica.

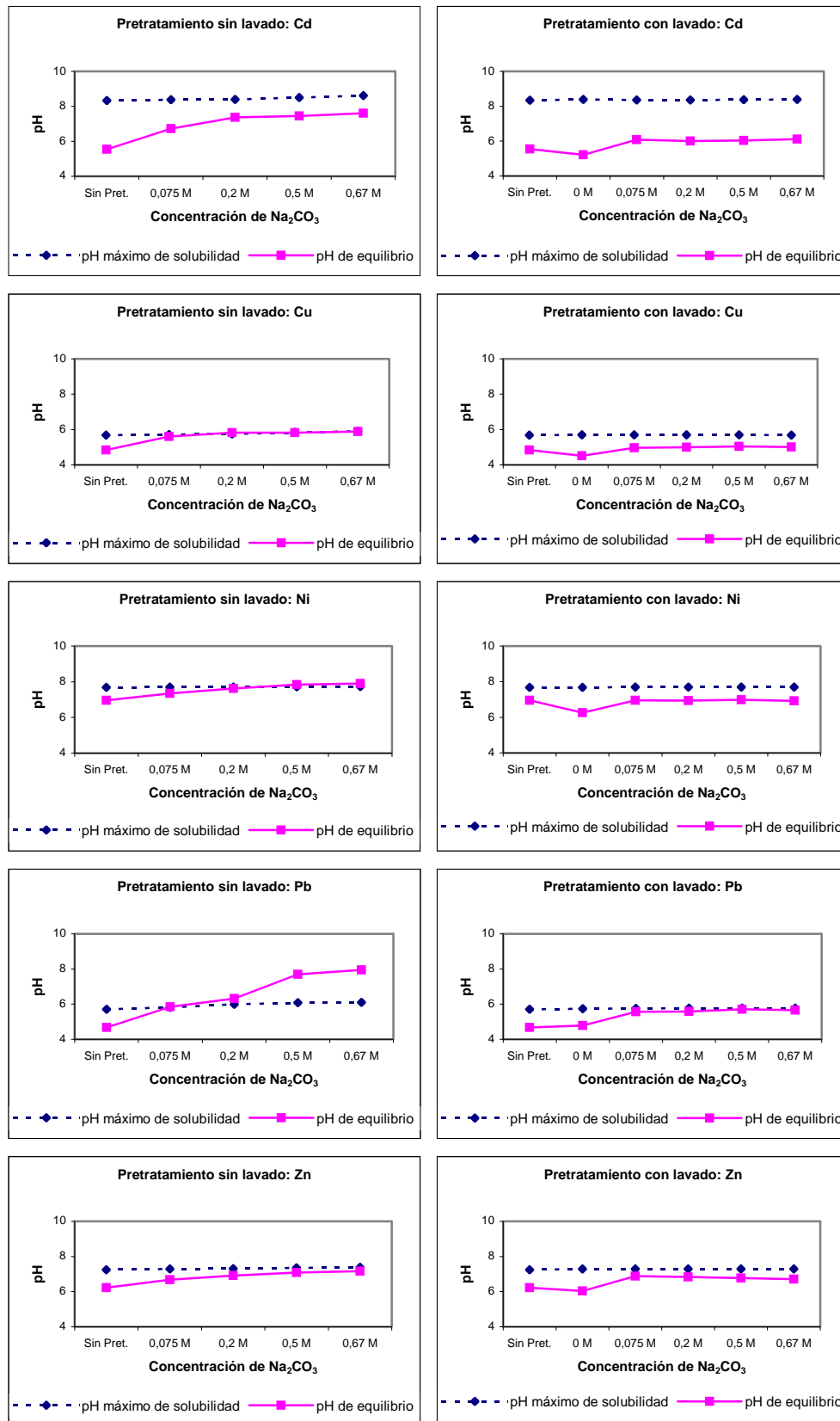


Figura 45.- pH de equilibrio en los ensayos de bioadsorción, en función de la concentración de pretratamiento con Na₂CO₃. Comparativa con el pH de solubilidad metálica.

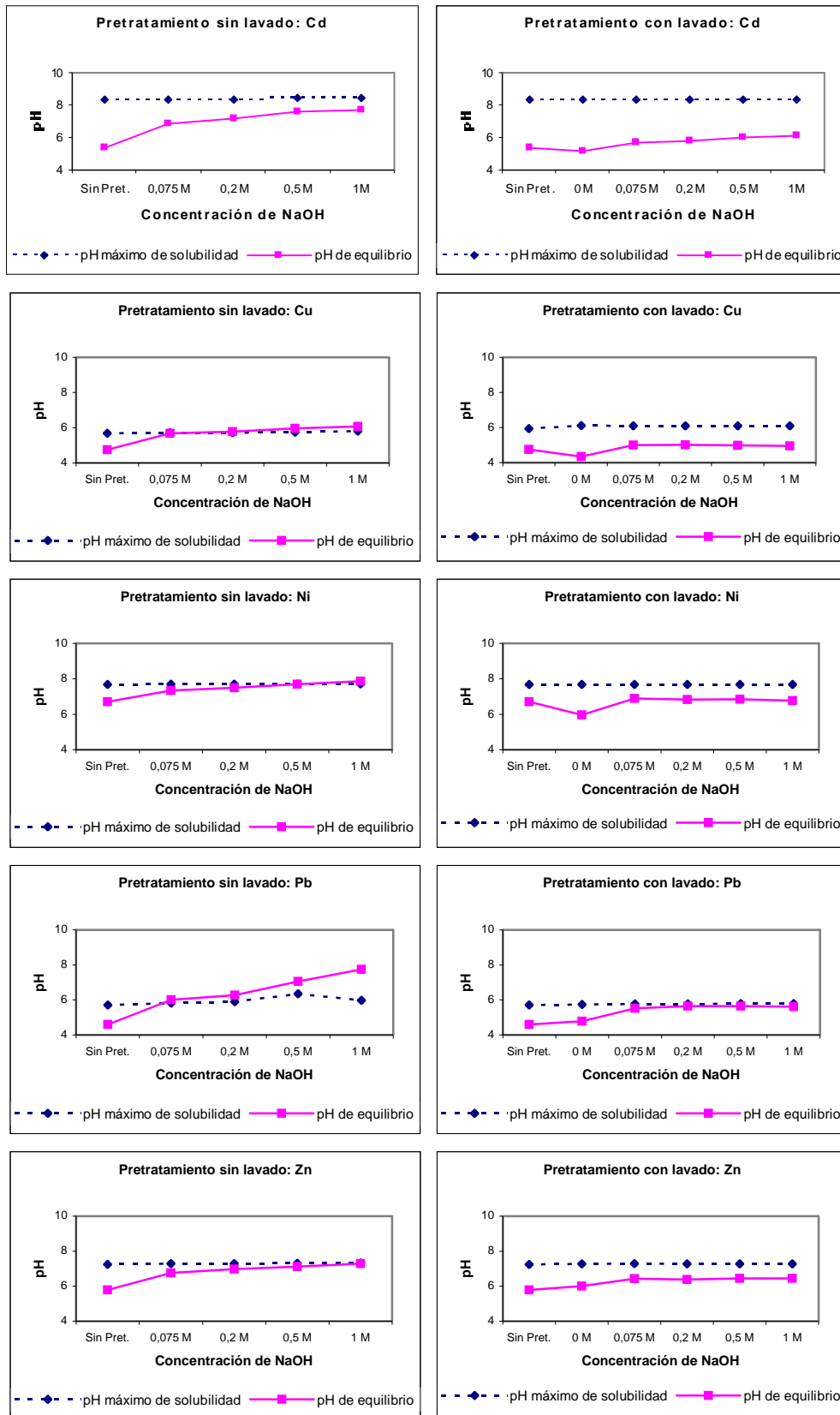


Figura 46.- pH de equilibrio en los ensayos de bioadsorción, en función de la concentración de pretratamiento con NaOH. Comparativa con el pH de solubilidad metálica.

Tabla 18.- Aumento, en %, de la capacidad de adsorción de la biomasa, con respecto a la original, tras el pretratamiento con NaHCO_3 , Na_2CO_3 ó NaOH , seguido o no de lavado. Entre paréntesis se indica la concentración mínima del agente necesaria para lograr dicha variación.

Sin lavado posterior

	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni
NaHCO₃	219 % (Sat.)	133 % (Sat.)	175 % (Sat.)	234 % (Sat.)	156 % (Sat.)
Na₂CO₃	469 % (Sat.)	433 % (Sat.)	450 % (Sat.)	220 % (0,5 M)	200 % (Sat.)
NaOH	294 % (1 M)	200 % (1 M)	350 % (1 M)	250 % (0,5 M)	209 % (1 M)

Con lavado posterior

	Cu	Zn	Cd	Pb	Ni
NaHCO₃	6 % (Sat.)	0 % (0,075 M)	25 % (0,2 M)	38 % (Sat.)	45 % (Sat.)
Na₂CO₃	19 % (Sat.)	67 % (0,5 M)	25 % (0,075 M)	65 % (0,5 M)	0 % (Sat.)
NaOH	6 % (1 M)	0 % (0,075 M)	50 % (0,5 M)	65 % (0,075 M)	55 % (1 M)

3.7.3.- Detección de posibles precipitados metálicos originados por el pretratamiento

Tras verificar, en el apartado anterior, una notable mejora en la capacidad de adsorción metálica por parte de la biomasa al ser sometida a diversos métodos de pretratamiento, todos ellos de naturaleza alcalina, se hizo necesaria la aplicación de la técnica analítica que permitiera comprobar si la eliminación del metal de la disolución por parte de la biomasa hubiera podido transcurrir inducida por fenómenos de microprecipitación motivados, asu vez, por un aumento de la alcalinidad en la superficie de ésta. Para ello, se recurrió al análisis por difracción de rayos X, que al permitir detectar compuestos cristalinos presentes en la muestra podría contribuir a localizar posibles productos de precipitación del metal.

Se seleccionaron las siguientes muestras:

- Biomasa pretratada con NaOH 1 M, sin lavado posterior y Cd 150 mg/L.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M, con lavado posterior y Cd 150 mg/L.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M, sin lavado posterior y Pb 150 mg/L.
- Biomasa pretratada con NaOH 1 M, con lavado posterior y Pb 150 mg/L.

La razón por la cual se eligieron muestras procedentes de ensayos de bioadsorción con biombras pretratadas con NaOH fue porque con estas biombras se registraron mayores valores de pH y, por tanto, la precipitación metálica podría haber estado más favorecida. A su vez, los metales seleccionados para estos ensayos fueron: por un lado el Pb, debido a que con este metal se registraron, en los ensayos de bioadsorción, los valores de pH de equilibrio más altos con respecto al pH máximo de solubilidad; por otro lado, se eligió el Cd debido a que, al contrario que en el caso del Pb, con este metal se registraron los valores de pH de equilibrio más bajos y, por tanto, nunca llegaron ni siquiera a aproximarse al valor de pH máximo de solubilidad. De esta forma, los resultados obtenidos con estos dos metales podrían ser extrapolables al resto. Asimismo, se tuvo en cuenta la posibilidad de analizar biombras que hubieran sido, o no, lavadas tras el pretratamiento. Por último, la concentración metálica utilizada para la preparación de las muestras fue de 150 mg/L, la más alta de todas las ensayadas con el objeto de favorecer la posible precipitación metálica en el caso de que ésta hubiera de producirse. Las muestras de biombrsa se tomaron al final de cada experimento de bioadsorción, mediante filtración, para retener junto con la biombrsa todos los precipitados existentes.

En las Figuras 47 y 48 se muestran los difractogramas correspondientes a las biombras que no fueron lavadas posteriormente al pretratamiento seguidas de adsorción de Pb y Cd, respectivamente. El difractograma de la primera, puso de manifiesto la existencia de SiO_2 y de los siguientes carbonatos de plomo: $2\text{PbCO}_3\text{Pb(OH)}_2$, PbCO_3 y $\text{Pb}_3(\text{CO}_2)_2(\text{OH})_2$; mientras que en la segunda, además del correspondiente carbonato metálico (CdCO_3), también se registró la presencia de cuarzo (SiO_2).

En las Figuras 49 y 50 se muestran los difractogramas correspondientes a las biombras pretratadas con NaOH 1 M, seguidas de lavado posterior, con adsorción de Pb y Cd, respectivamente. El difractograma correspondiente a la primera de las dos indica que los

elementos cristalinos que estaban presentes en la misma fueron cuarzo (SiO_2) y albita ($\text{Na}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$). En la biomasa con Cd también fue identificada en el difractograma la presencia de cuarzo; además, en este caso, se detectó otro silicoaluminato que, como la albita, pertenece a la familia de los feldespatos sódico-cálcicos, también conocidos como plagioclasas, con la siguiente estequiometría: $(\text{Na,Ca})\text{Al}(\text{Si,Al})_3\text{O}_8$. Estos silicatos son muy comunes entre las rocas ígneas.

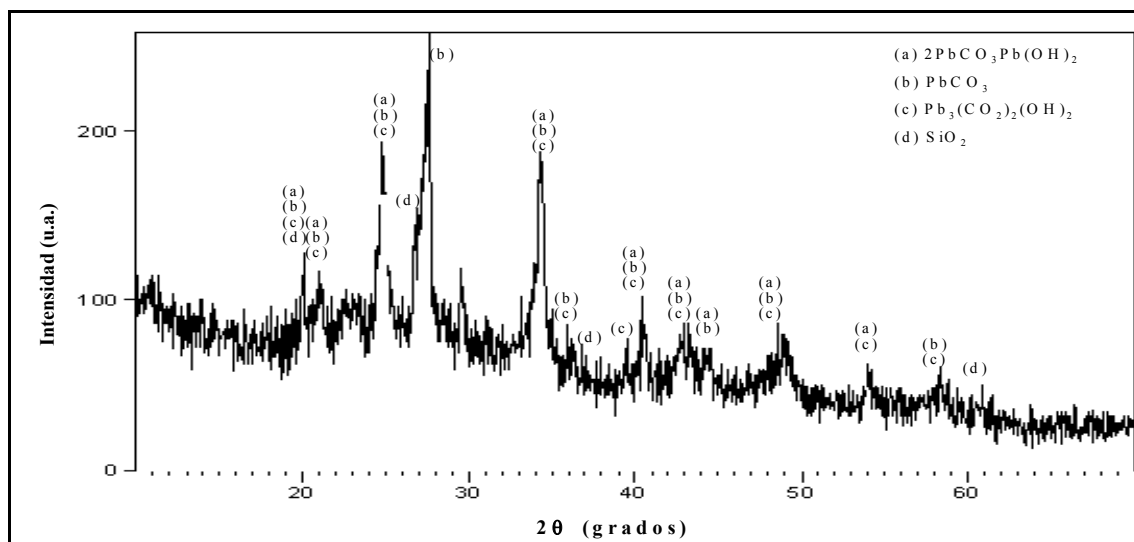


Figura 47.- Difractograma correspondiente a la biomasa pretratada con NaOH IM, sin lavado posterior y adsorción de Pb.

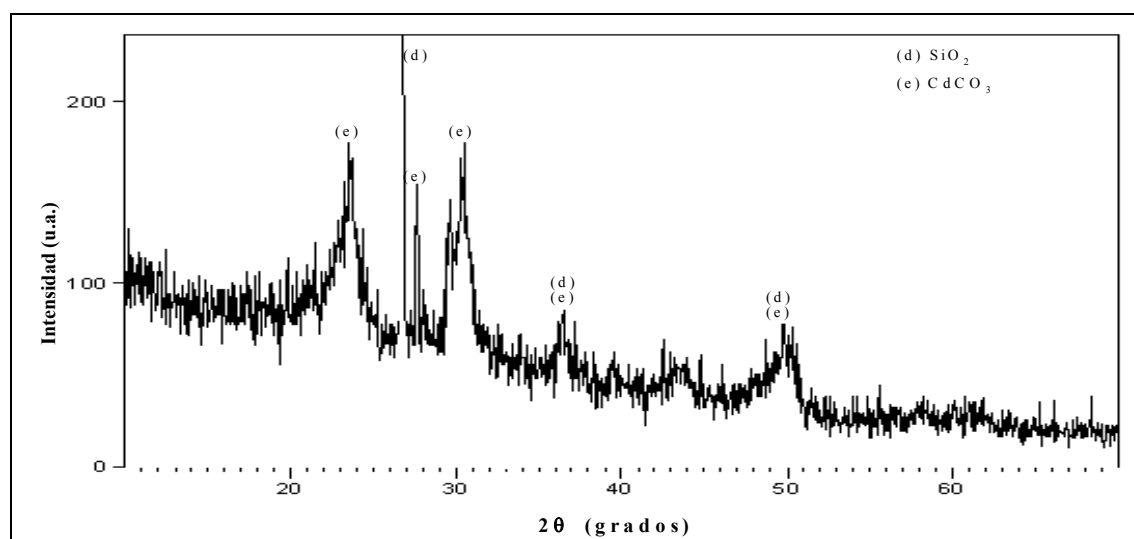


Figura 48.- Difractograma correspondiente a la biomasa pretratada con NaOH IM, sin lavado posterior y adsorción de Cd.

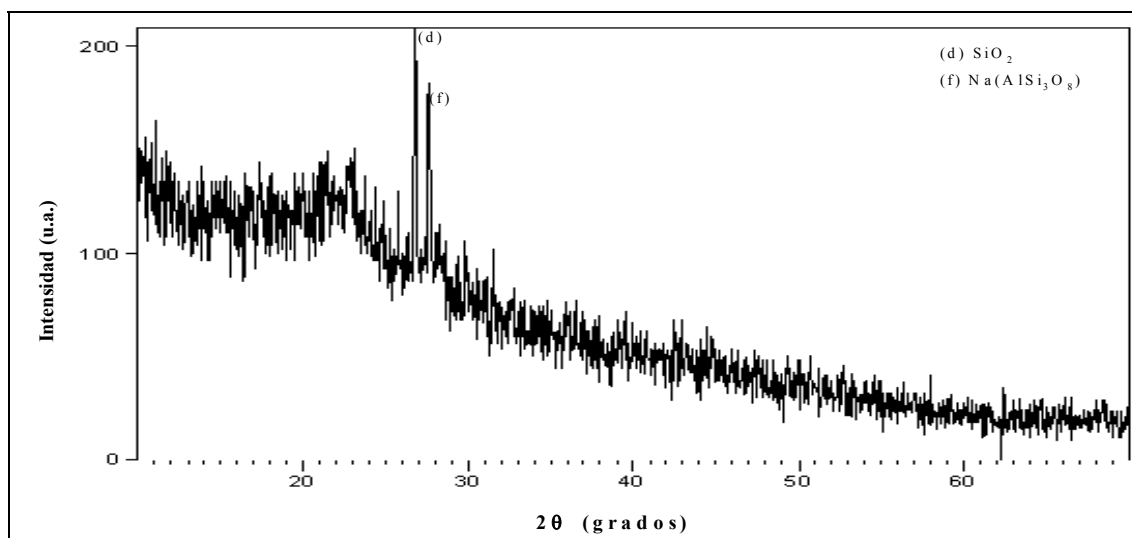


Figura 49.- Difractograma correspondiente a la biomasa pretratada con NaOH 1M, con lavado posterior y adsorción de Pb.

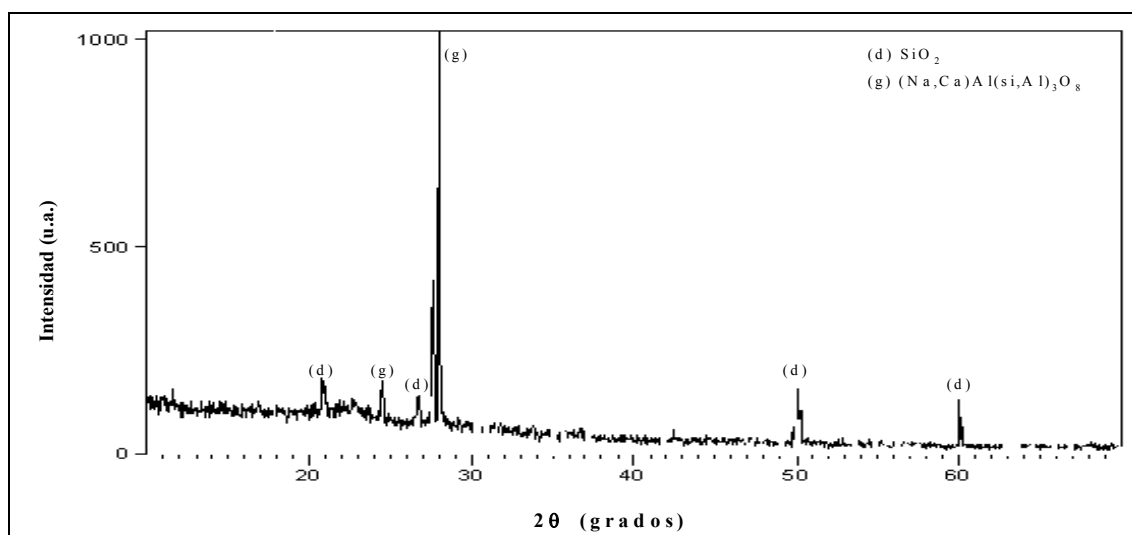


Figura 50.- Difractograma correspondiente a la biomasa pretratada con NaOH 1M, con lavado posterior y adsorción de Cd.

Del análisis global de los registros de difracción de rayos X anteriores, se pueden realizar los siguientes comentarios.

En primer lugar, la presencia de los compuestos silicatados detectados en las muestras analizadas (cuarzo y feldespatos) podría deberse, simplemente, al arrastre de partículas de este tipo en la recogida de la biomasa. Como se ha indicado anteriormente, se trata de formas minerales muy frecuentes por pertenecer a las rocas ígneas que, a su vez, suponen más del 90 % en la composición de la corteza terrestre, por lo que son muy

comunes en habitats naturales como la balsa de riego en donde se recogió la biomasa. Estos compuestos serían meros contaminantes que, al ser muy insolubles y totalmente inertes en las disoluciones metálicas con las que se ha trabajado, es lógico pensar que su presencia no haya interferido en los procesos de bioadsorción.

Por otro lado, la presencia de compuestos carbonatados, derivados del metal utilizado en cada caso, únicamente fue detectada en las muestras de biomasa sin lavado posterior al pretratamiento; por el contrario, en las biomásas sometidas a lavado dichos compuestos no aparecieron. Esto estaría indicando que, de alguna manera, la alcalinidad remanente en la superficie de la biomasa, cuando ésta no fue sometida a lavado posterior al pretratamiento, habría inducido a la formación de microprecipitados del metal. Por el contrario, esta circunstancia no se produjo al lavar la biomasa. Algunos autores (Volesky, 2003) defienden esta hipótesis indicando que el aumento del pH no tiene porqué implicar una precipitación masiva en el seno de la disolución metálica; sería, por el contrario, la alcalinidad de la superficie de la biomasa la que actuaría como centro de nucleación de microprecipitados; de hecho, éste es uno de los mecanismos propuesto con frecuencia para justificar los posibles métodos de anclaje del metal sobre la biomasa en los procesos de bioadsorción. Además, siempre la nucleación de precipitados en el seno de una disolución transcurre con una cinética más favorable si ésta se produce sobre la superficie de un sólido. En este caso, la propia biomasa podría haber actuado como centro preferente para dicha nucleación, muy previsiblemente debido a un descenso en la energía de activación que siempre es necesario vencer para que el precipitado comience a formarse. Por otro lado, el mayor gradiente de alcalinidad hacia la biomasa habría contribuido también favorablemente en la formación del precipitado. Sin embargo, la biomasa que fue sometida al protocolo de lavados tras el pretratamiento no conservó la citada alcalinidad superficial, lo que justifica que, en dichas circunstancias, no se detectaran tales microprecipitados. Evidentemente, en este último caso, debieron de prevalecer otros mecanismos de bioadsorción como, por ejemplo, el intercambio iónico, circunstancia que más adelante se analizará.

En definitiva, los análisis de difracción de rayos X permitieron justificar el comportamiento tan diferente, puesto de manifiesto en el apartado anterior, que tuvo la biomasa de ser lavada, o no, después de aplicado el pretratamiento.

Asimismo, también los resultados del análisis por difracción de rayos X fueron diferentes al trabajar con Pb o con Cd y biomasa no lavada. Recuérdese que en el caso del primero el valor de pH a lo largo del proceso de bioadsorción superó al de precipitación del metal, sin embargo, en el caso del segundo este fenómeno no se produjo. Esta circunstancia también se ha visto reflejada en la naturaleza de los compuestos que de ambos metales se han detectado sobre la biomasa (Figuras 47 y 48). Mientras que en el caso del plomo fueron carbonatos básicos o hidrox-carbonatos del metal, en el del cadmio el único compuesto que apareció fue el carbonato simple. Estos resultados se corresponden con los respectivos valores de pH de equilibrio alcanzados en los correspondientes ensayos de bioadsorción y, como es lógico deducir, con el plomo se produjo la formación de hidróxidos y con el cadmio ésta no ocurrió.

Resultados similares han sido publicados por Zhou y colaboradores (Zhou et al., 2005), quienes, también mediante el empleo de la técnica de difracción de rayos X, detectaron sobre la biomasa la presencia de precipitados de plomo en forma de hidróxidos y carbonatos. Dichos autores justificaron este hecho debido al aumento del pH del medio en el proceso de bioadsorción. En ese mismo trabajo, además, se sugiere que los carbonatos metálicos pudieron haberse formado mediante reacción entre los hidróxidos metálicos - forma habitual de precipitación metálica debido al aumento de la alcalinidad del medio - y el CO₂ que procedente de la atmósfera se haya solubilizado en la disolución. En cualquier caso, estos carbonatos metálicos presentan una insolubilidad incluso mayor que la de los hidróxidos correspondientes. Este mismo fenómeno podría justificar los resultados obtenidos en el presente trabajo con el plomo. En el caso del cadmio, al no haberse producido su correspondiente hidróxido por microprecipitación sobre la biomasa, por no haberse superado el correspondiente valor de pH, el único compuesto que en tales circunstancias pudo generarse fue el carbonato simple.

3.7.4.- Cuantificación de la biomasa perdida en el pretratamiento

Cuando se lleva a cabo el pretratamiento de una biomasa es frecuente que se produzcan pérdidas de ésta ocasionadas, frecuentemente, por la ruptura de determinadas moléculas de la misma, generalmente polímeros de celulosa, debido a la acción del propio agente pretratante (Park et al., 2005). Estos cambios ocasionados en la biomasa podrían tener,

por un lado, un efecto positivo ya que al aumentar la porosidad de la superficie facilitarían la permeabilidad de la disolución hacia zonas internas de la misma, entrando en contacto el metal con nuevos centros activos que, de otro modo, estarían inaccesibles (Sung Lee & Volesky, 1999; Figueira et al., 2000). Asimismo, podrían tener un efecto negativo al poder reducir la estabilidad operacional de la biomasa (Park et al., 2005) o, incluso, dañar los centros activos existentes (Rangsayatorn et al., 2004). Por otro lado, el porcentaje de aumento en la capacidad de adsorción de la biomasa, logrado por el efecto del pretratamiento, podría verse contrarrestado por el porcentaje de biomasa perdida (Yan & Viraraghavan, 2000). En base a este planteamiento, se hizo necesario tener en cuenta también estos posibles efectos negativos del pretratamiento a la hora de valorar la efectividad del mismo.

En la Figura 51 se muestra el porcentaje en peso de biomasa recuperada, con relación a la cantidad de biomasa de partida, tras el pretratamiento con los tres agentes pretratantes estudiados y en función de la concentración de los mismos. En primer lugar, se puede apreciar como el porcentaje de biomasa recuperada con lavado posterior al pretratamiento fue inferior al de la biomasa sin lavado, posiblemente debido a la eliminación de determinadas sustancias hidrosolubles presentes en la biomasa original. Por otro lado, los resultados parecen indicar que el porcentaje de recuperación disminuyó a medida que incrementaba la concentración del agente pretratante, así como la basicidad del mismo, de tal forma que con NaOH se obtuvo una pérdida de peso máxima del 31 %, mientras que con Na₂CO₃ y NaHCO₃ las pérdidas máximas fueron del 19 % y del 15 %, respectivamente. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (Yan & Viraraghavan, 2000) trabajando con *Mucor rouxii*; en esta ocasión, la biomasa sufrió pérdidas de peso de entre el 1 y el 29 %, al ser pretratada con los mismos reactivos.

Asimismo, la Figura 51 recoge también el porcentaje de biomasa recuperado al haber sido sometida únicamente a los ciclos de lavado; puede comprobarse que, en este caso, la cantidad de biomasa perdida se situó entorno al 14 %. Este porcentaje hace referencia a la liberación de las sustancias hidrosolubles presentes en la biomasa original. Este dato podría tomarse como referencia en la valoración de las pérdidas de biomasa que se registraron con los diferentes pretratamientos lo cual, a su vez, sería un indicador de los daños producidos en la biomasa en estos procesos. De este modo, parece razonable

comprobar como tanto con NaHCO_3 como con Na_2CO_3 se hayan producido daños mínimos en la biomasa, ligeramente superiores con el segundo, por tratarse de reactivos menos agresivos que NaOH . Éste ejerció un daño más severo, principalmente a las concentraciones más altas (donde se registraron los porcentajes de recuperación de biomasa más bajos) debido, presumiblemente, a su mayor reactividad con respecto a la de los otros dos reactivos.

En el caso de la biomasa sin lavado posterior al pretratamiento, las pérdidas fueron significativamente menores. Las pérdidas del material hidrosoluble de la biomasa pudo compensarse con la fijación de los iones sodio en los centros activos de la misma y/o a la retención sobre ella de restos del agente pretratante. En algunos casos, principalmente con concentraciones altas de NaCO_3 , el peso de la biomasa recuperada fue mayor que el de la biomasa de partida, muy previsiblemente debido a que, para este reactivo, al haber habido una mayor disponibilidad de iones sodio que con los otros dos, también haya sido mayor la posibilidad de retención de dichos iones sodio.

3.7.5.- Isotermas de adsorción

Una vez seleccionados los reactivos pretratantes que más hicieron aumentar la capacidad de adsorción de la biomasa, así como, las condiciones óptimas de utilización de los mismos se pretendió caracterizar, de forma cuantitativa, a las biombras resultantes del pretratamiento con dichos reactivos, mediante el trazado de las respectivas isotermas de adsorción y la aplicación de los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich.

Para este estudio se eligieron las biombras sometidas, previamente, a la acción de NaHCO_3 , Na_2CO_3 y NaOH , con lavado posterior. En este apartado se decidió no incluir a las biombras pretratadas sin lavado posterior, dado que, aunque fueron aquellas con las que se lograron los mayores niveles de eliminación de metal del medio soluble, no se tuvo la seguridad de haber determinado cuál fue la cantidad exacta de metal realmente bioadsorbido por la biomasa, al poder haber existido fenómenos de precipitación metálica, tal y como revelaron los valores de pH de equilibrio y los resultados del análisis por difracción de rayos X.

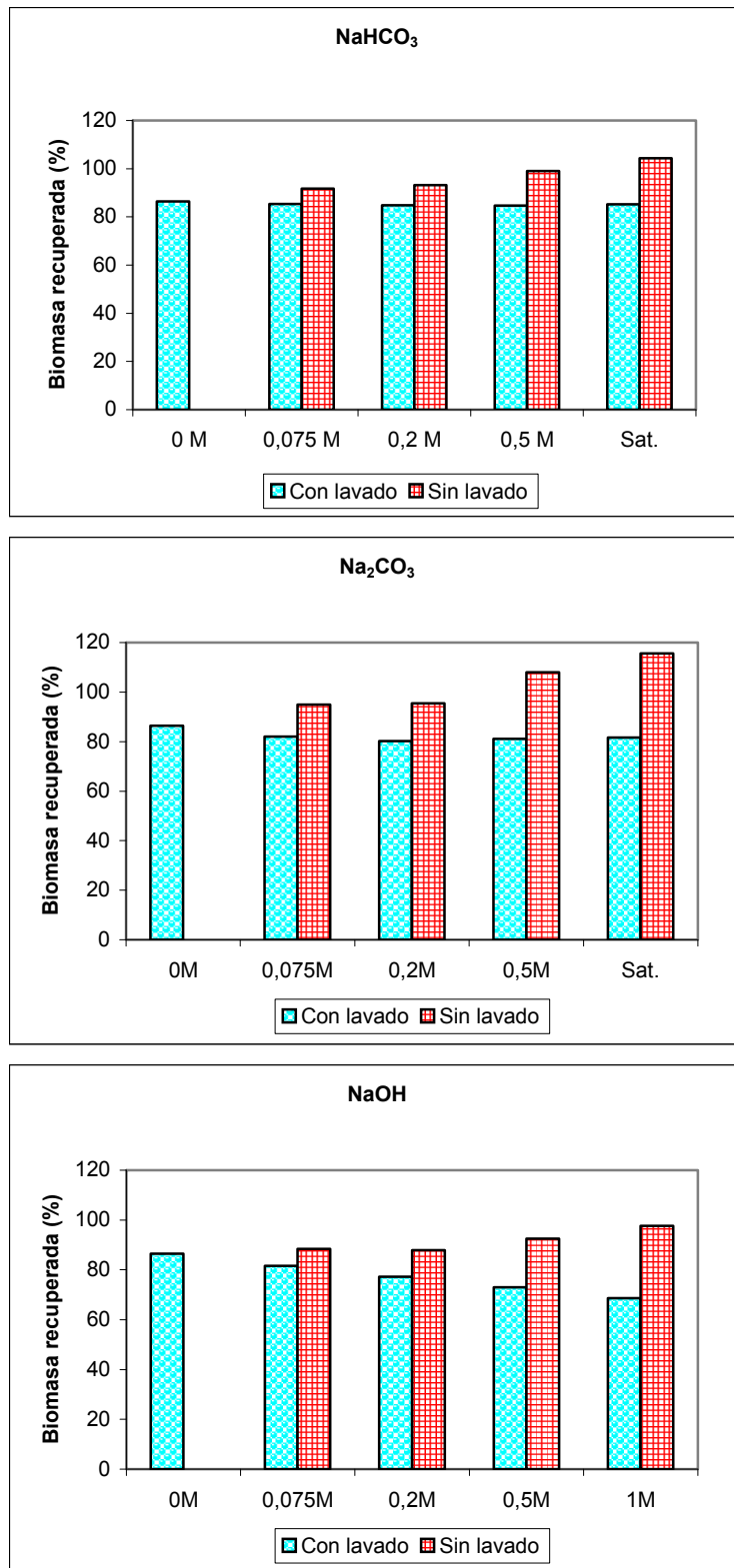


Figura 51.- Rendimiento de recuperación de biomasa tras el pretratamiento con NaHCO_3 , Na_2CO_3 y NaOH , seguido o no de lavado.

El trabajo realizado en este sentido se concretó en la realización de dos series de experimentos. En primer lugar, se obtuvieron las isothermas y se calcularon los correspondientes parámetros de adsorción según los modelos de Langmuir y de Freundlich, para las biomazas pretratadas en las condiciones con las que se alcanzaron los niveles de adsorción más altos con cada metal (determinadas en el apartado 3.7.2): Na_2CO_3 saturado y 0,5 M para Cu y Zn, respectivamente, y NaOH 0,5 M y 1 M para el Cd y Ni, respectivamente. En el caso del Pb, al haber obtenido el mismo incremento en la adsorción tanto con Na_2CO_3 0,5 M como con NaOH 0,075 M, se escogió éste último caso por requerirse una menor concentración de reactivo pretratante.

En un segundo lugar, dado que en ese mismo apartado pudo constatar una cierta tendencia general al aumento de la capacidad de adsorción con el aumento de la concentración del agente pretratante, se ensayaron, también, las biomazas obtenidas con las mayores concentraciones de los tres reactivos elegidos, con el fin de establecer las diferencias que pudiera haber en el comportamiento bioadsorbente en relación al de la biomasa sin pretratamiento y, además, tener la posibilidad de comparar los resultados obtenidos en este caso con relación a los de la serie anterior. Las biomazas analizadas, por lo tanto, fueron las pretratadas con NaOH 1 M, NaHCO_3 y Na_2CO_3 ambos a saturación, con todos los metales.

En la Figura 52, se muestran las isothermas de adsorción que se obtuvieron para cada metal con las biomazas pretratadas en las condiciones más favorables. En todos los casos, se observa como el comportamiento de estas biomazas fue similar al de la biomasa sin pretratar (Figura 14), existiendo una primera etapa, en la cual a medida que aumentaba la concentración de equilibrio de metal (C_e) la capacidad de adsorción (q) también aumentó muy rápidamente. En una segunda etapa, al empezar a saturarse la biomasa, el aumento de q se hizo menos sensible con el aumento de dicha concentración, hasta alcanzar un valor límite (q_{max}); sin embargo, y como era de esperar, dichos valores límite de la capacidad de adsorción alcanzados en este caso (Figura 52) fueron más elevados que los que se alcanzaron con la biomasa original (Figura 14).

Por otro lado, en las Figuras 53 y 54 se muestran los ajustes correspondientes de los datos experimentales a los modelos matemáticos de Langmuir y de Freundlich, respectivamente. En la Tabla 19 se recogen los valores de los parámetros respectivos a

ambos modelos. En un primer análisis de dichos valores, se aprecia que, en este caso también, los coeficientes de regresión revelaron, con todos los metales, un mayor ajuste al modelo de Langmuir que al de Freundlich, lo cual, tal y como se comentó en el apartado 3.3, implicaría que los supuestos del primer modelo son los que han prevalecido en el proceso; esto, principalmente, implica que la adsorción se restringe a la parte más superficial de la biomasa en donde hay un número limitado de centros de unión, por lo que fue posible que la biomasa llegara a saturarse alcanzando un valor límite en los niveles de captación metálica lo que, efectivamente, se constata en el trazado de las isothermas de la figura 52.

Así mismo, si se comparan los respectivos valores de q_{\max} , obtenidos mediante el modelo de Langmuir, de estas biomásas con los de la biomasa sin pretratar (Tabla 14), se puede llegar a las mismas conclusiones que las que se plantearon en el apartado 3.7.2, confirmándose, de este modo, un incremento en la capacidad de adsorción de la biomasa, al ser sometida al pretratamiento. Concretamente, los incrementos en la capacidad de adsorción registrados fueron: 52% para el Cd, 19% para el Cu, 51% para el Ni, 64% para el Pb y 70% para el Zn. No obstante, conviene recordar que en los experimentos realizados cuando se realizó el pretratamiento siempre se utilizaron disoluciones metálicas con la misma concentración (150 mg/L); en este caso, el trazado de las isothermas de adsorción con cada metal ha supuesto evaluar la influencia de dicha concentración metálica, lo que ha llevado al cálculo de q_{\max} que es el parámetro más correcto para poder comprobar la mejora que haya podido experimentar la biomasa en sus niveles de adsorción. En cualquier caso, como aquí se ha podido comprobar, los resultados que reflejaban esa mejora cuando solamente se utilizó como dato comparativo el de la concentración metálica de 150 mg/L eran perfectamente válidos, precisamente por tratarse de un valor de concentración relativamente alto y, por tanto, próximo al que conseguiría la saturación de la biomasa.

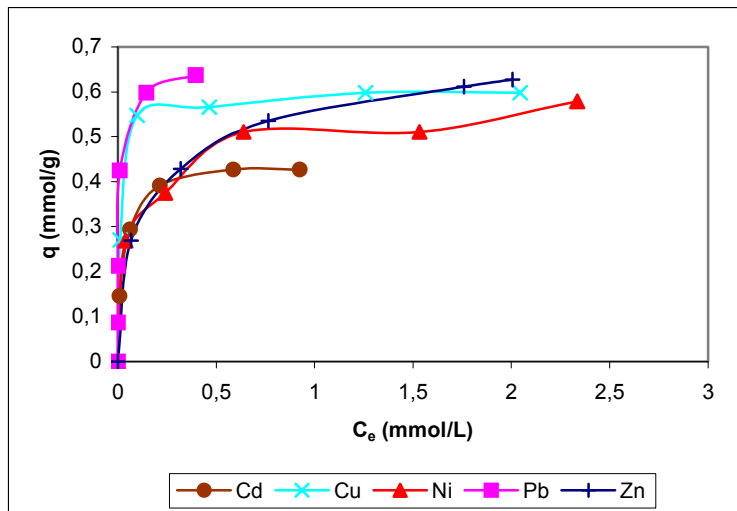


Figura 52.- Isotermas correspondientes a la biomasa pretratada en las condiciones más favorables.

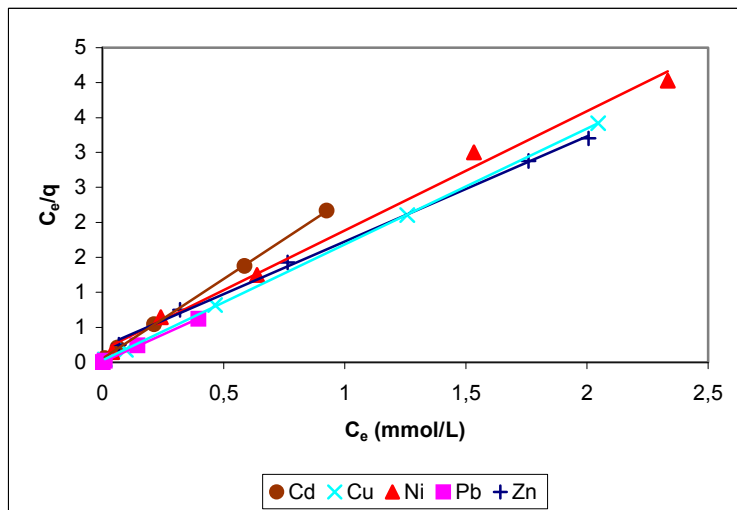


Figura 53.- Isotermas de Langmuir correspondientes a la biomasa pretratada en las condiciones más favorables

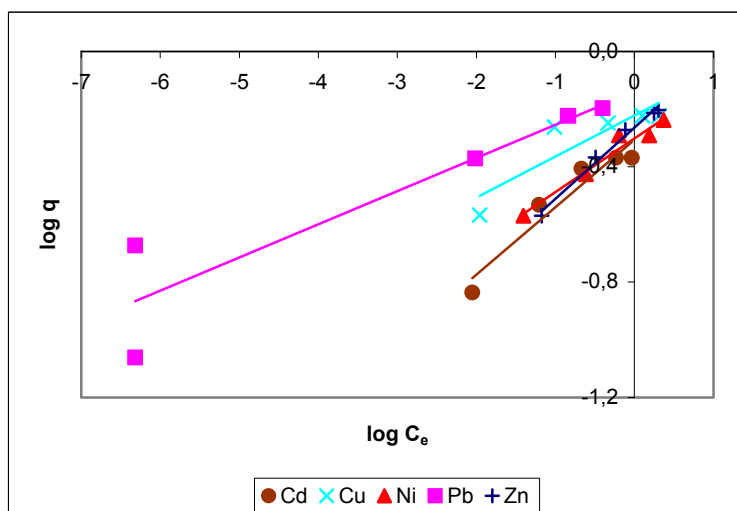


Figura 54.- Isotermas de Freundlich correspondientes a la biomasa pretratada en las condiciones más favorables.

Tabla 19.- Constantes de Langmuir y de Freundlich para las biomásas pretratadas, seguidas de lavado, en las condiciones más favorables para cada metal.

	Langmuir			Freundlich		
	q_{\max} (mmol/g)	K (mmol/L)	R^2	K_e (mmol/g)	1/n	R^2
Cd	0,440	0,024	1,000	0,736	0,234	0,924
Cu	0,603	0,016	1,000	0,801	0,143	0,792
Ni	0,586	0,106	0,993	0,740	0,187	0,960
Pb	0,638	0,003	0,999	0,871	0,115	0,857
Zn	0,666	0,150	0,998	0,768	0,248	0,986

Por otro lado, a pesar que las biomásas pretratadas presentaron una mayor capacidad de adsorción con respecto a la biomasa sin pretratar, conservaron el mismo comportamiento en cuanto a su afinidad por los diferentes metales. Según defienden algunos autores (Horsfall & Ayebaemi, 2004; Wang & Chen, 2006 y Wepener et al., 2006), la capacidad de unión de un catión a la biomasa, se ve favorecida, en gran medida, por la electronegatividad del ión metálico, de tal modo que a mayor electronegatividad, más fuerte será el anclaje del mismo en el centro activo. En este caso, los más electronegativos son Cu (1,91) y Pb (2,33), y ambos presentaron una capacidad de adsorción máxima (q_{\max}) alta y, lógicamente, mayor que la de la biomasa original (Tabla 14). Con el Ni y el Zn, a pesar de tener valores de electronegatividad relativamente bajos (1,7 y 1,65, respectivamente), se registró un mayor incremento en la capacidad de adsorción que el resto de metales, llegando a mostrar valores de q_{\max} similares a los del Cu y Pb. La justificación a este incremento, podría estar basada en el pequeño tamaño de estos dos metales, dado que, tal como algunos autores defienden (Atkinson et al., 1998 y Abia & Asuquo, 2006), cuanto menor radio iónico presenta un determinado catión, mejor será su difusión a través de los poros del bioadsorbente, favoreciéndose, de este modo, su acceso a centros activos más internos. Este comportamiento parece apoyar la hipótesis planteada en capítulos anteriores, en el sentido de que una de las posibles modificaciones sufridas por la biomasa en el pretratamiento podría ser el aumento de la porosidad en la superficie de ésta, lo que provocaría un aumento en sus niveles de adsorción al dejar accesibles nuevos centros activos.

Por otro lado, el Cd aún teniendo una electronegatividad muy parecida a la del Ni y Zn (1,69) fue el que más bajo valor de q_{\max} presentó tras el pretratamiento de la biomasa

circunstancia que, además, también se dio con la biomasa sin pretratar (Tabla 14). En este caso, también, el mayor tamaño del Cd (0.97 \AA) puede justificar que el nivel de adsorción conseguido con él fuera inferior al de los otros dos metales (0.74 \AA para ambos), a pesar de presentar valores de electronegatividad muy parecidos, por presentar más dificultades para difundir hacia los centros activos.

En lo que se refiere a los valores de las respectivas constantes de afinidad biomasa-metal (K), éstos fueron muy similares a los obtenidos con la biomasa original, lo cual parece indicar que la acción del pretratamiento, no radicaría en favorecer la unión del metal al centro activo. Recuérdese que, en esta ocasión, se trabajó únicamente con biombras lavadas tras el pretratamiento; por otro lado, también se ha indicado anteriormente que el efecto del lavado pudo invertir la acción del agente pretratante al liberar iones sodio, que favorecerían el intercambio iónico con los cationes metálicos, fijados sobre los centros activos de la biomasa. Al eliminarse éstos, la la afinidad de los centros activos por los metales sería la misma que la que mostraban antes del pretratamiento. Por lo tanto, cabría pensar que el aumento en la capacidad de adsorción verificada, sea debida, únicamente, a un aumento en el número de centros activos en la biomasa, provocado por el aumento de la porosidad de la misma. No obstante, más adelante se presentan otros resultados obtenidos mediante el empleo de diversas técnicas de análisis que ayudaron a profundizar en el estudio del mecanismo de adsorción, lo que contribuyó a esclarecer la acción que los reactivos de pretratamiento hayan podido provocar en la biomasa.

Para el modelo de Freundlich, a pesar de que los datos experimentales presentaron un peor ajuste que al de Langmuir, aquél también aportaría una información similar a la deducida con éste. Los valores del parámetro K_e obtenidos mediante este modelo (Tabla 19), también indicaron que el Pb y el Cu fueron los metales que se recuperaron en mayor cantidad por parte de la biomasa, mientras que el Cd sería el metal adsorbido en menor proporción. Ni y Zn presentaron niveles de adsorción intermedios.

En las Figuras 55, 58 y 61 se muestran las isotermas de adsorción correspondientes a las biombras pretratadas con NaHCO_3 y Na_2CO_3 , saturados y con NaOH 1 M, respectivamente. En todas ellas, es posible observar el mismo comportamiento mostrado por las biombras pretratadas en las condiciones más favorables (Figura 52) y por la biomasa sin pretratar (Figura 14), existiendo una fase de aumento rápido de la

capacidad de adsorción en función de la concentración de equilibrio seguida de una fase de saturación. En las Figuras 56, 59 y 62, se muestran las correspondientes isotermas obtenidas a partir del tratamiento de los datos experimentales con el modelo matemático de Langmuir y en las Figuras 57, 60 y 63 se muestran las obtenidas con el de Freundlich, para estas mismas biomásas. Los valores de los correspondientes parámetros, se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20.- Constantes de Langmuir y Freundlich para las biomásas pretratadas, con NaHCO₃ y Na₂CO₃ saturados y NaOH 1M, con lavado posterior.

Cd	Langmuir			Freundlich		
	q _{max} (mmol/g)	K (mmol/L)	R ²	K _e (mmol/g)	1/n	R ²
NaHCO ₃ (Sat.)	0,284	0,033	1,000	0,586	0,172	0,891
Na ₂ CO ₃ (Sat.)	0,361	0,042	0,995	0,650	0,202	0,960
NaOH (1M)	0,361	0,010	1,000	0,685	0,192	0,862
Cu	Langmuir			Freundlich		
	q _{max} (mmol/g)	K (mmol/L)	R ²	K _e (mmol/g)	1/n	R ²
NaHCO ₃ (Sat.)	0,542	0,022	1,000	0,760	0,147	0,913
Na ₂ CO ₃ (Sat.)	0,603	0,016	1,000	0,801	0,143	0,792
NaOH (1M)	0,536	0,037	0,998	0,749	0,124	0,754
Ni	Langmuir			Freundlich		
	q _{max} (mmol/g)	K (mmol/L)	R ²	K _e (mmol/g)	1/n	R ²
NaHCO ₃ (Sat.)	0,565	0,165	0,994	0,706	0,197	0,975
Na ₂ CO ₃ (Sat.)	0,422	0,028	0,996	0,670	0,121	0,882
NaOH (1M)	0,586	0,106	0,993	0,740	0,187	0,960
Pb	Langmuir			Freundlich		
	q _{max} (mmol/g)	K (mmol/L)	R ²	K _e (mmol/g)	1/n	R ²
NaHCO ₃ (Sat.)	0,538	0,003	1,000	0,926	0,260	0,766
Na ₂ CO ₃ (Sat.)	0,609	0,003	0,999	1,002	0,284	0,704
NaOH (1M)	0,633	0,010	0,993	0,955	0,262	0,895
Zn	Langmuir			Freundlich		
	q _{max} (mmol/g)	K (mmol/L)	R ²	K _e (mmol/g)	1/n	R ²
NaHCO ₃ (Sat.)	0,473	0,126	0,997	0,668	0,166	0,998
Na ₂ CO ₃ (Sat.)	0,554	0,075	1,000	0,733	0,209	0,904
NaOH (1M)	0,463	0,067	0,998	0,683	0,146	0,919

Analizando en primer lugar los coeficientes de correlación obtenidos con ambos modelos, se comprueba, al igual que en el caso anterior, como el modelo de Langmuir fue el que mejor se ajustó a los datos experimentales. A partir de los correspondientes valores de q_{\max} calculados según este modelo es posible constatar un comportamiento similar al del caso anterior, siendo el Pb y el Cu los metales que mejor se adsorbieron, mientras que el Cd fue el peor adsorbido; Ni y Zn, en este caso también, mostraron valores de adsorción intermedios. Comparando, a su vez, estos datos con los de q_{\max} de la biomasa sin pretratamiento (Tabla 14) se comprueba que existieron ciertas mejoras en los niveles de adsorción, lo cual, posiblemente, sea debido también al aumento de la porosidad de la biomasa permitiendo más fácilmente la difusión de todos los metales a los grupos funcionales más internos, inaccesibles si no hubiera sido por el pretratamiento aplicado. Por otro lado, si el estudio comparativo se hace con relación a los valores de q_{\max} obtenidos con biombras pretratadas en las condiciones más favorables (Tabla 19), se constata que en este último caso, como era de esperar, los valores de dicho parámetro, en general, fueron más altos. En concreto, para Pb y Cu los resultados obtenidos con las concentraciones de los reactivos pretratantes más altas tenderían a igualar los resultados obtenidos con las concentraciones más favorables, mientras que con otros metales la capacidad de adsorción disminuiría, sobre todo en el caso del Cd y del Zn, lo cual, posiblemente, se deba a una destrucción progresiva de los centros activos, a medida que aumentó la concentración de los agentes pretratantes.

Por su parte, las constantes de afinidad K, salvo pequeñas diferencias, sobre todo en el caso de la bioadsorción del Ni con biomasa pretratada con Na_2CO_3 , indican que el orden de afinidad establecido fue el mismo que el observado en los casos anteriores: $\text{Pb} > \text{Cu} \sim \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Ni}$.

El modelo de Freundlich, a pesar del más bajo grado de ajuste mostrado para estas biombras, también confirmaría lo indicado por el de Langmuir, comprobándose que Pb y Cu, serían los metales para los cuales las biombras mostraron una mayor capacidad de adsorción, seguidos del Ni y del Zn, y siendo el Cd el metal adsorbido en menor proporción.

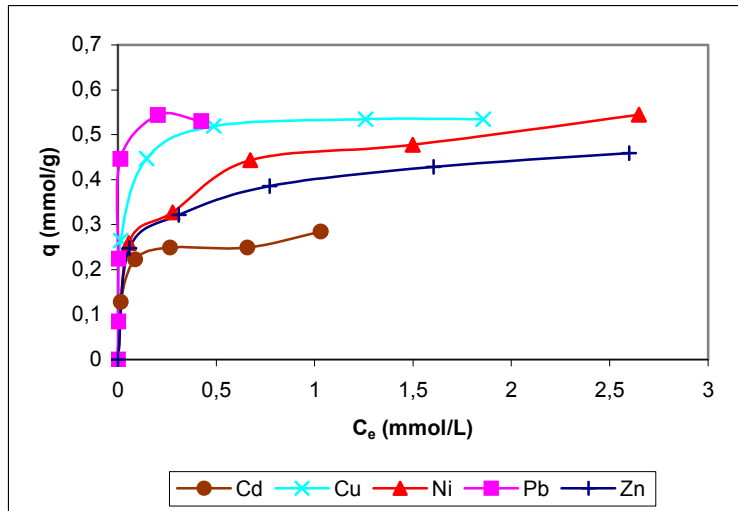


Figura 55.- Isotermas correspondientes a la biomasa pretratada con NaHCO_3 saturado, con lavado posterior.

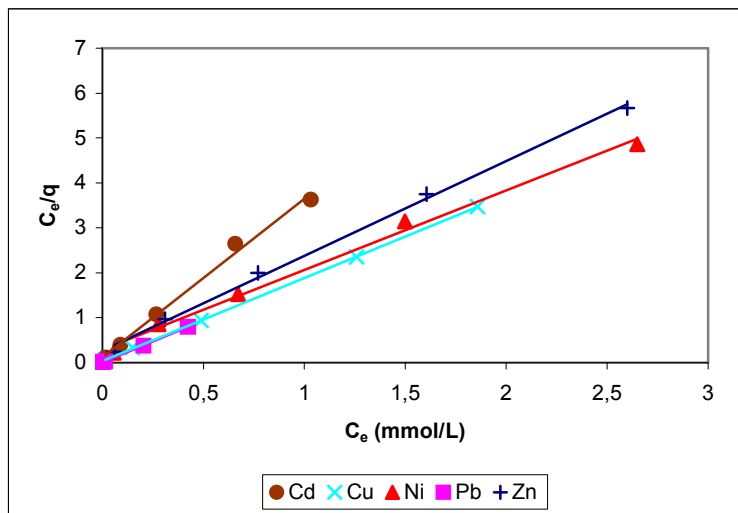


Figura 56.- Isotermas de Langmuir correspondientes a la biomasa pretratada con NaHCO_3 saturado, con lavado posterior.

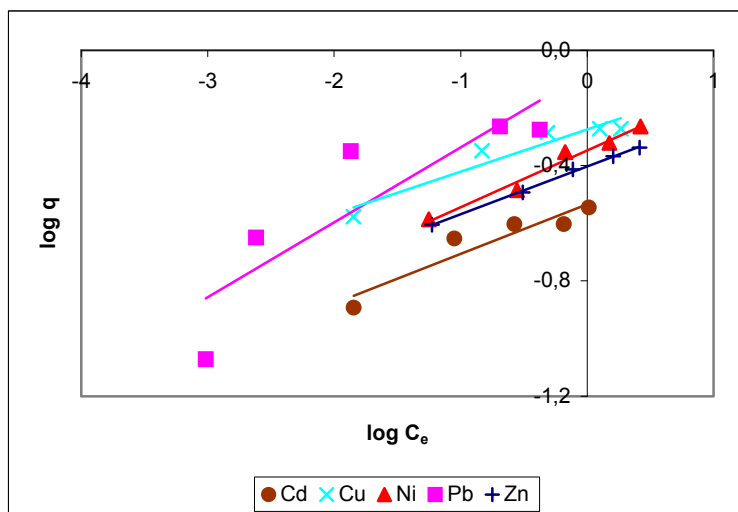


Figura 57.- Isotermas de Freundlich correspondientes a la biomasa pretratada con NaHCO_3 saturado, con lavado posterior.

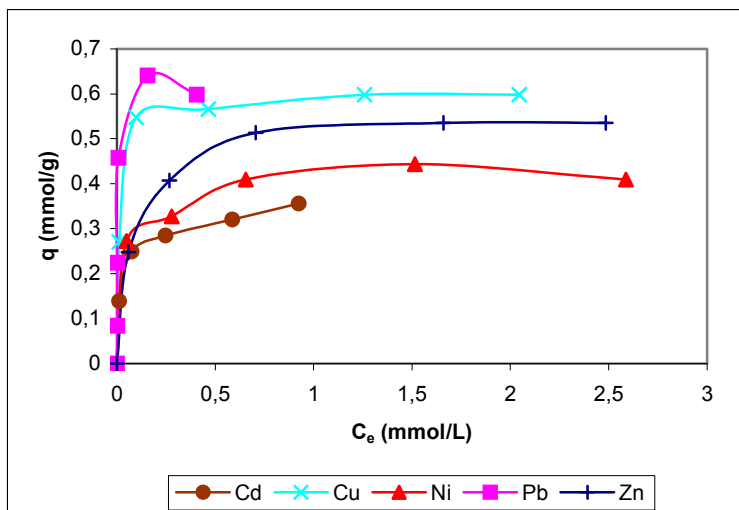


Figura 58.- Isotermas correspondientes a la biomasa pretratada con Na_2CO_3 saturado, con lavado posterior.

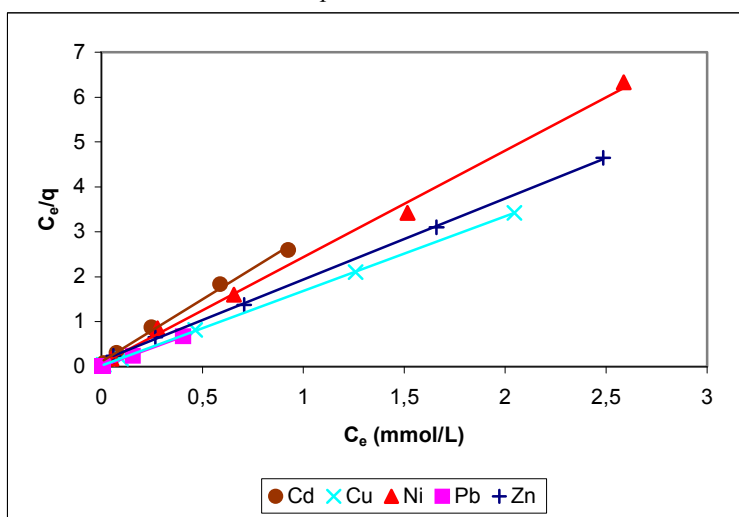


Figura 59.- Isotermas de Langmuir correspondientes a la biomasa pretratada con Na_2CO_3 saturado, con lavado posterior.

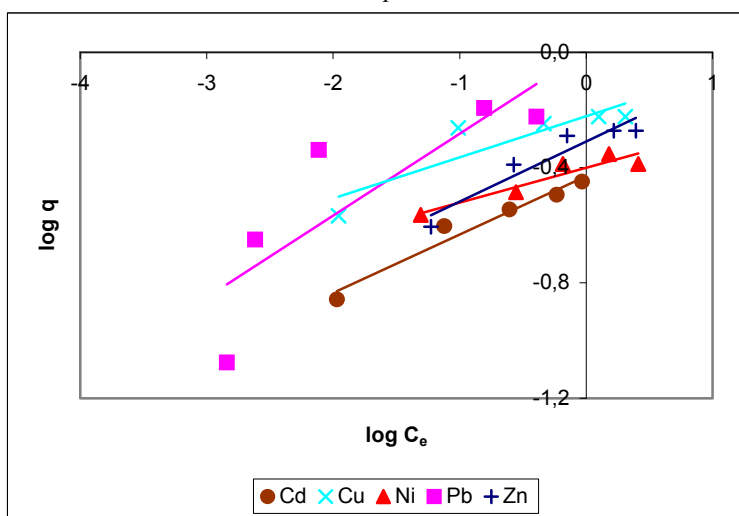


Figura 60.- Isotermas de Freundlich correspondientes a la biomasa pretratada con Na_2CO_3 saturado, con lavado posterior.

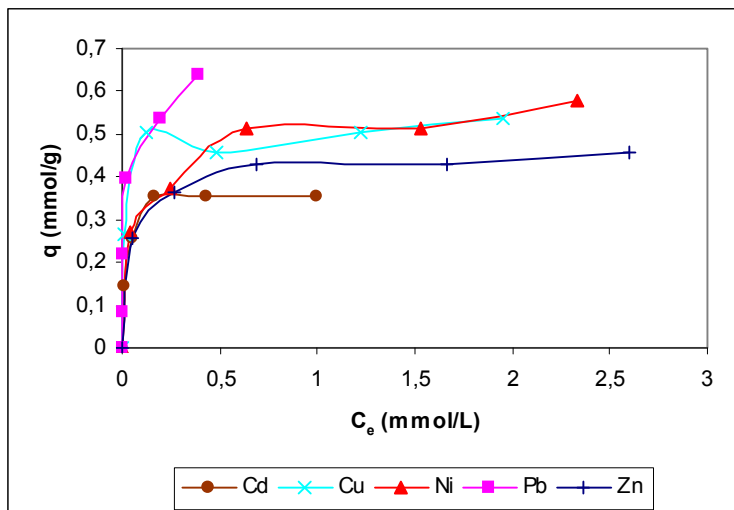


Figura 61.- Isotermas correspondientes a la biomasa pretratada con NaOH 1M, con lavado posterior.

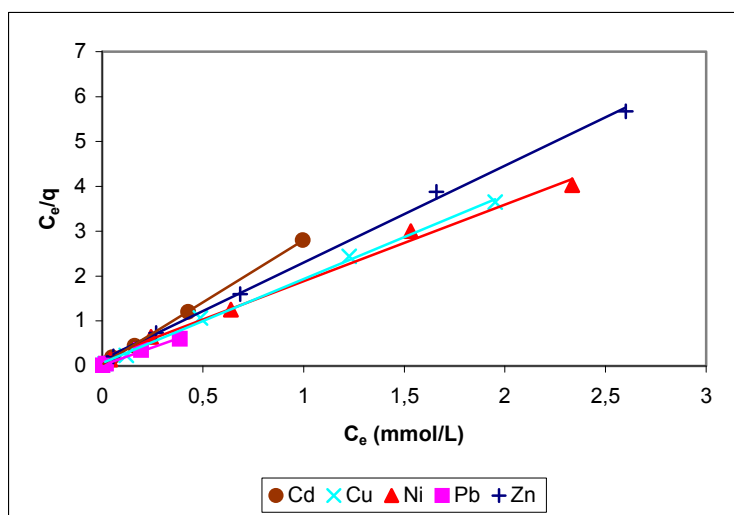


Figura 62.- Isotermas de Langmuir correspondientes a la biomasa pretratada con NaOH 1M, con lavado posterior.

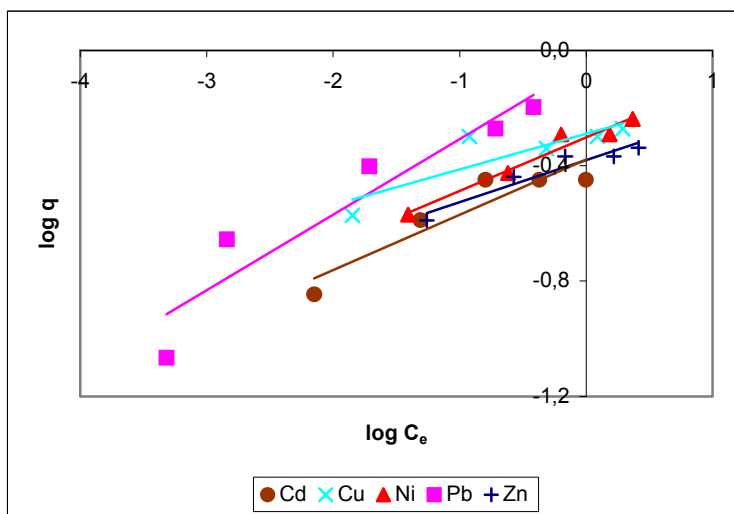


Figura 63.- Isotermas de Freundlich correspondientes a la biomasa pretratada con NaOH 1M, con lavado posterior.

3.7.6.- Caracterización de la biomasa pretratada

Se realizó un estudio, mediante la utilización de diferentes técnicas analíticas, para determinar las modificaciones producidas en la biomasa durante el pretratamiento.

Con los resultados que se han ido mostrando en apartados anteriores, también se han ido indicando distintas posibilidades en cuanto a la acción ejercida por los reactivos utilizados en el pretratamiento. Por esta razón, la investigación que se discute a continuación tuvo como finalidad esclarecer el mecanismo de fijación metálica sobre la biomasa, lo que supuso llevar a cabo una caracterización exhaustiva de la misma.

➤ En primer lugar, se trató de comprobar si, durante el pretratamiento de la biomasa, se generaron nuevos centros activos diferentes a los ya existentes que pudieran participar en la captación del metal. Para ello, se usaron, fundamentalmente, las mismas técnicas analíticas utilizadas previamente en la caracterización de la biomasa original, es decir: radiación infrarroja (FTIR) y valoración ácido-base.

➤ En segundo lugar, se estudió el papel que podrían tener los cationes sodio, incorporados al sistema por los propios agentes pretratantes, como iones de intercambio en la fijación del metal. Este trabajo se llevó a cabo en tres etapas: con la primera de ellas, se pretendió valorar la fijación de los iones sodio sobre la biomasa utilizando el análisis por radiación infrarroja y la determinación elemental; posteriormente, se intentó comprobar si realmente se producía el intercambio entre el sodio prefijado y el metal; y, por último, se valoró el efecto del lavado. En estos dos últimos casos FTIR fue la técnica utilizada fundamentalmente.

➤ Por último, también se pretendió determinar si existió variación en el comportamiento de los centros activos presentes en las biomosas pretratadas, con respecto a la biomasa original, mediante la valoración ácido-base. Una vez detectadas dichas posibles variaciones, se trató de determinar, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y FTIR, las causas de las mismas.

a) Análisis por espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR)

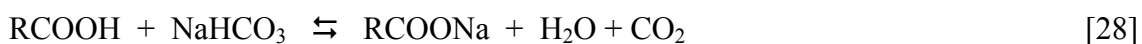
Como se planteó anteriormente, los grupos funcionales de las moléculas que constituyen la superficie de la biomasa juegan un papel primordial en la bioadsorción al ser los encargados de fijar los cationes metálicos mediante el establecimiento de distintos enlaces. Por este motivo, se hizo necesario un estudio encaminado a determinar si la acción de los diferentes tipos de pretratamiento tuvo como consecuencia la generación o no de grupos funcionales diferentes a los detectados en la biomasa original.

En la Figura 64 se muestran los espectros de infrarrojo de las biomásas pretratadas con NaHCO_3 y Na_2CO_3 saturados y NaOH 1 M, en los tres casos sin lavado posterior. En estos espectros es posible identificar los siguientes picos: 3406-3423 cm^{-1} (banda de tensión de los grupos hidroxilo, -OH), 2923-2924 cm^{-1} (tensión del enlace -C-H, grupos alcano), 1422-1638 cm^{-1} (grupos carboxílicos), 1036-1082 cm^{-1} (tensión del enlace C-O en los grupos éter), 876-879 cm^{-1} (grupos carboxilo -COOH) y 443-469 cm^{-1} (grupos alqueno o ArH). Estas mismas bandas de absorción fueron también detectadas en la biomasa sin pretratar por lo que, en principio, se podría descartar la generación con el pretratamiento de grupos funcionales de diferente naturaleza a los que aparecieron en la biomasa original. Tales resultados indicarían que fueron los mismos grupos funcionales los que tendrían la responsabilidad en la fijación de cationes metálicos.

Por otro lado, con estos espectros es posible observar como, en todos los casos, el pico situado en la zona de los 1400 cm^{-1} , correspondiente a los grupos carboxilo, presentó un aumento considerable en su intensidad con respecto al mostrado en la biomasa sin pretratar, de forma más significativa en el caso de la biomasa pretratada con Na_2CO_3 ; este aumento también se observó en el pico situado en los 879 cm^{-1} , especialmente con la biomasa pretratada con Na_2CO_3 y en menor proporción cuando el pretratamiento se realizó con NaOH ; cuando el reactivo pretratante fue NaCO_3 , no hubo alteración significativa. Tal como se comentó en el apartado 3.4, un aumento en la intensidad de adsorción de un determinado pico estaría condicionado por dos factores: por la repetición del grupo funcional responsable del mismo o por un aumento en la polaridad en el enlace. En este caso, parece lógico pensar que el aumento en la intensidad sea

debido a esto último ya que, dadas las características de los reactivos pretratantes utilizados, haya sido muy probable la fijación de iones sodio en tales grupos carboxilo debido a que el enlace formado entre el oxígeno y este metal estaría más polarizado que el establecido entre el oxígeno y el hidrógeno. En el caso de la biomasa pretratada con Na_2CO_3 , el mayor aumento detectado en ambos picos sería consecuencia de un mayor aporte de iones sodio por contener doble proporción de éstos en cada molécula. En cualquier caso, este aumento de intensidad de ambas bandas también podría deberse al primer factor, esto es, a que por efecto del pretratamiento se hayan liberado nuevos grupos carboxilo, anteriormente inaccesibles, en la biomasa. Con relación a los otros dos casos, hubo una mayor alteración de las bandas de los grupos carboxilos con la biomasa pretratada con NaOH que con la acondicionada con NaHCO_3 ; la causa también radicaría en la mayor concentración de los iones sodio en el medio pretratante, en el primer caso, debido, por un lado, a la mayor concentración del reactivo utilizada y, por otro, a la disociación total del NaOH y solamente parcial en el NaHCO_3 .

La fijación de los cationes sodio en los grupos carboxilo sería consecuencia de las propiedades de ácido débil de dichos grupos funcionales en medio acuoso, pudiendo reaccionar con diferentes bases, como es el caso de los tres reactivos pretratantes utilizados (NaHCO_3 , Na_2CO_3 y NaOH) dando lugar a las correspondientes sales o carboxilatos. Estas reacciones de neutralización se llevarían a cabo mediante sustitución nucleófila del protón del grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) por el Na^+ procedente del agente pretratante (Morrison & Boyd, 1990; Solomons & Graham, 1999) de acuerdo con las siguientes reacciones:



Una vez verificada la alteración producida en la biomasa por efecto del pretratamiento, se pretendió averiguar cual era el mecanismo de fijación del metal sobre ella. Con esta finalidad fueron analizadas, mediante la presente técnica, muestras de biomasa pretratada con NaOH 1 M, sin lavado posterior; se eligió dicho reactivo por aportar una

significativa cantidad de iones sodio y por ser el de mayor basicidad de los tres y, por lo tanto, el que pudiera tener una mayor capacidad de reacción con los centros activos de la biomasa. A su vez, los metales seleccionados para estudiar su fijación sobre la biomasa fueron el Pb y el Cd; la puesta en contacto entre ambos se llevó a cabo utilizando disoluciones con una concentración metálica de 150 mg/L. El hecho de seleccionar estos dos metales se debió a que fue con ellos con los que se obtuvo el mayor y el menor valor de la q_{\max} , respectivamente, en la mayoría de las biomásas estudiadas, con y sin pretratamiento. De esta forma, los resultados obtenidos podrían ser extrapolados al resto de los casos anteriormente estudiados.

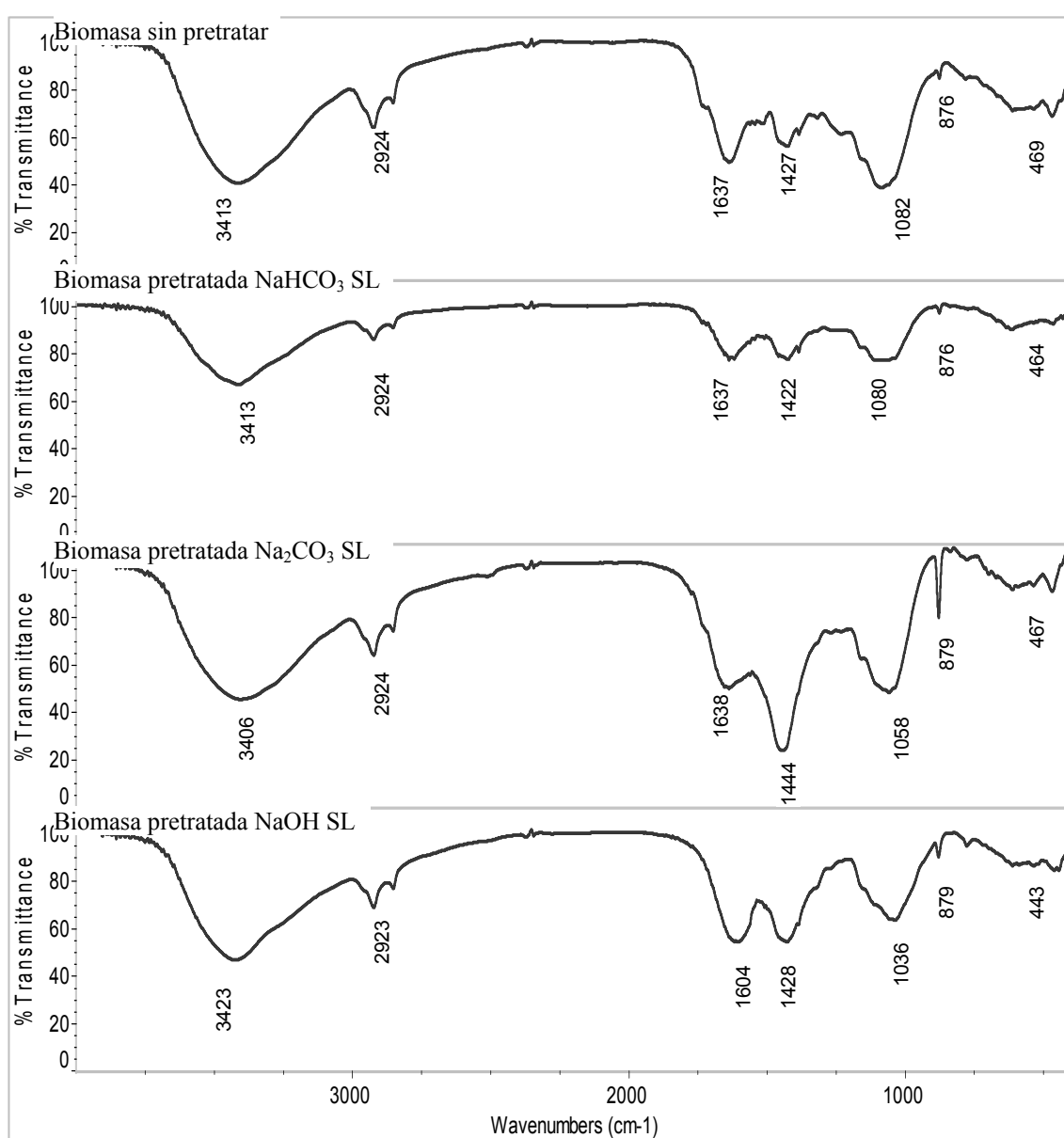


Figura 64.- Espectros de infrarrojo de la biomasa original y de la biomasa pretratada con NaHCO₃ (Sat.), Na₂CO₃ (Sat.) y NaOH 1M, sin lavado posterior.

En la Figura 65 se muestran los espectros de infrarrojo correspondientes a la biomasa sometida a dicho pretratamiento, con y sin Cd o Pb y, también, sin dichos metales. La unión del catión metálico al grupo funcional, se haría a través de un enlace más débil que el que se establece entre el grupo funcional y el hidrógeno necesitándose, por tanto, en el primer caso, una menor energía de excitación lo que, a su vez, se traduciría en un desplazamiento del pico correspondiente a dicho grupo funcional hacia zonas de menor longitud de onda del espectro de infrarrojo. En el caso de la biomasa pretratada con NaOH 1 M, con Cd y Pb adsorbidos, se comprueba un claro desplazamiento de los picos correspondientes a los grupos carboxilo (tanto en los situados en torno a los 1604-1638 cm^{-1} y 1422-1444 cm^{-1} , como en el situado en torno a los 876-879 cm^{-1}) hacia zonas de menor energía, apareciendo en longitudes de onda menores (1576 cm^{-1} , 1349 cm^{-1} y 834-850 cm^{-1} , respectivamente) lo cual indicaría la implicación de dichos grupos funcionales en la fijación de ambos metales. Otras bandas que también experimentaron un cierto desplazamiento hacia zonas de menor longitud de onda fueron, al igual que ocurrió en el caso de la biomasa original, las relativas a los grupos hidroxilo y al enlace C-H o alcano. Como ya se comentó en aquella ocasión, en el caso de los primeros, el desplazamiento podía ser debido a fenómenos de microprecipitación; pero el del enlace C-H, dada su frecuente presencia en las moléculas orgánicas, su desplazamiento pudo ser reflejo de múltiples estados vibratorios que no guardan relación con el fenómeno de adsorción. Por último, en el caso de los picos correspondientes a los grupos éter, no se observaron desplazamientos significativos que pudiesen indicar la unión del metal en los mismos.

Asimismo, en esta misma figura, es posible observar, de forma paralela al desplazamiento de los picos de los grupos responsables de la fijación del metal, una disminución en la intensidad de los mismos, lo cual podría indicar la implicación en el proceso del sodio prefijado en dichos grupos funcionales. Numerosos autores (Fourest et al., 1994; Ddour et al., 1999; Mameri et al., 1999; Yetis et al., 2000 y Satiroglu et al., 2002) han constatado la importancia que tienen determinados metales ligeros, tales como el Ca^{2+} y el Na^+ , al actuar como cationes de intercambio favoreciendo, de este modo, la fijación del metal a la biomasa. La justificación de este efecto favorecedor puede encontrarse al profundizar en el conocimiento de los factores que determinan la fijación de un determinado catión metálico en el centro activo, dado que a mayor

afinidad por el centro activo mayor capacidad tendrá para desplazar al catión de intercambio. Estos factores serían principalmente los siguientes:

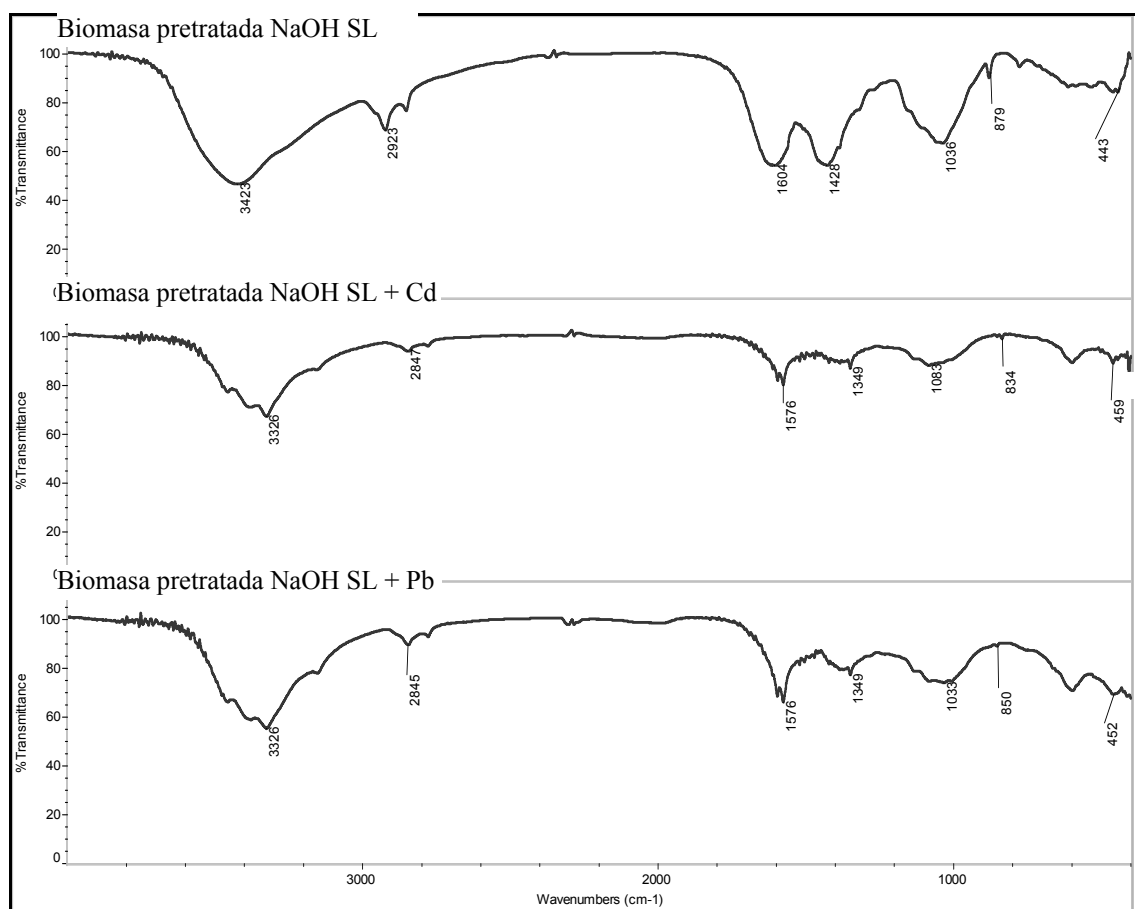


Figura 65.- Espectros de infrarrojo de la biomasa pretratada con NaOH IM sin lavado posterior, sin metal y con metal (Cd y Pb).

➤ La valencia del catión. Como norma general, el estado de oxidación del metal influye de forma positiva en la unión con el grupo funcional, de tal forma que los cationes trivalentes serían más fuertemente adsorbidos que los divalentes y éstos, a su vez, más que los monovalentes (Rodríguez & Rodríguez, 2000; Sánchez, 2004).

➤ El radio iónico. Influye tanto en la facilidad para la difusión del catión hasta el grupo funcional, como en el acoplamiento en el mismo (Wepener et al., 2004; Horsfall & Spiff, 2005; Wang & Chen, 2006; Sheng et al., 2007).

➤ La electronegatividad. Determina la fuerza de atracción que ejerce un determinado átomo sobre los electrones de otro. De esta forma, cuanto mayor sea la electronegatividad de un determinado catión, más fuerte será el enlace establecido con el grupo funcional (Wepener et al., 2004; Wang & Chen, 2006).

➤ La concentración del ión. Según la ley de acción de masas, cuanto mayor sea la concentración de un determinado catión en el medio, más alto será el gradiente de concentración y, por tanto, la tendencia a unirse al grupo funcional, y menor será su probabilidad de separarse del mismo (Rodríguez & Rodríguez, 2000).

Así pues, en general, los iones sodio de los grupos carboxilo presentes en la biomasa podrían intercambiarse, preferentemente, tanto por iones cadmio como por iones plomo, puesto que en ambos casos su valencia es mayor que la de aquel, así como su electronegatividad (1,69; 2,33 y 0,9, respectivamente). Por otro lado, los gradientes de concentración también favorecieron el acercamiento de los iones cadmio y plomo hacia la biomasa; sin embargo, la difusión del sodio lo sería en sentido inverso. Estos tres factores justificarían, en conjunto, un efecto positivo en el intercambio iónico sodio-cadmio y sodio-plomo, aunque el efecto estérico relativo al tamaño, en principio, parecería ser favorable al primero.

Sin embargo, en el campo de la hidrogeoquímica, cuando se plantea el estudio de la captación de iones presentes en un medio acuoso por parte de suelos arcillosos es sabido que, a igual carga iónica, el radio del ión hidratado determina la fuerza de adsorción, siendo más fuertemente retenidos los de menor radio. Asimismo, hay que tener en cuenta que la hidratación es directamente proporcional a la carga del ion e inversamente proporcional al radio iónico; es decir, si un ion es pequeño, se rodea de gran cantidad de moléculas de agua y su radio efectivo aumenta debido a su elevada entalpía de hidratación. Bajo este punto de vista, el sodio, cuyo radio iónico es 0,95 Å, podría tener un radio hidratado ligeramente mayor que el del cadmio (0,97 Å) y aún mayor que el del plomo (1,21 Å); por este motivo, sería también razonable que el cadmio y, sobre todo, el plomo se intercambiaran favorablemente con el sodio.

Por último, también se valoró mediante FTIR la influencia del lavado en la biomasa pretratada con NaHCO₃, Na₂CO₃ y NaOH, por lo que en las Figuras 66, 67 y 68

aparecen los correspondientes espectros de las biomazas sometidas a la acción de cada uno de los tres reactivos, con y sin lavado posterior al pretratamiento. Lo más relevante que se observó en todos los casos fue una importante disminución de la intensidad de los picos situados en la zona de los 1400 cm^{-1} y en la de $876\text{-}879\text{ cm}^{-1}$; ambas bandas de absorción, tal y como se indicó anteriormente, corresponderían a estados de tensión de los grupos carboxilo. Dicho cambio podría significar que los cationes sodio fijados en ellos durante el pretratamiento, de acuerdo con las reacciones [28], [29] y [30], fueron nuevamente sustituidos por protones durante el lavado, siendo este intercambio favorecido por la ausencia de los primeros en el medio, tal como se comentó en párrafos anteriores. De este modo, el hidrógeno fijado al formar enlaces menos polarizados que el sodio con el oxígeno, en los citados grupos funcionales de la biomasa, provocaría una disminución de la intensidad de los correspondientes picos en el espectro de infrarrojo. Por otro lado, también se observa como esta disminución en la intensidad de ambas bandas de absorción parece ser incluso menor que la detectada en la biomasa original, lo que haría suponer que el efecto del lavado podría haber provocado, de forma paralela a la eliminación del sodio, además, la eliminación de parte del calcio, que ya fue detectado en la biomasa original cuando se analizaron los metales presentes en ella (apartado 3.1), el cual podría asociarse a los compuestos pécticos de la misma (Figueira et al., 2000).

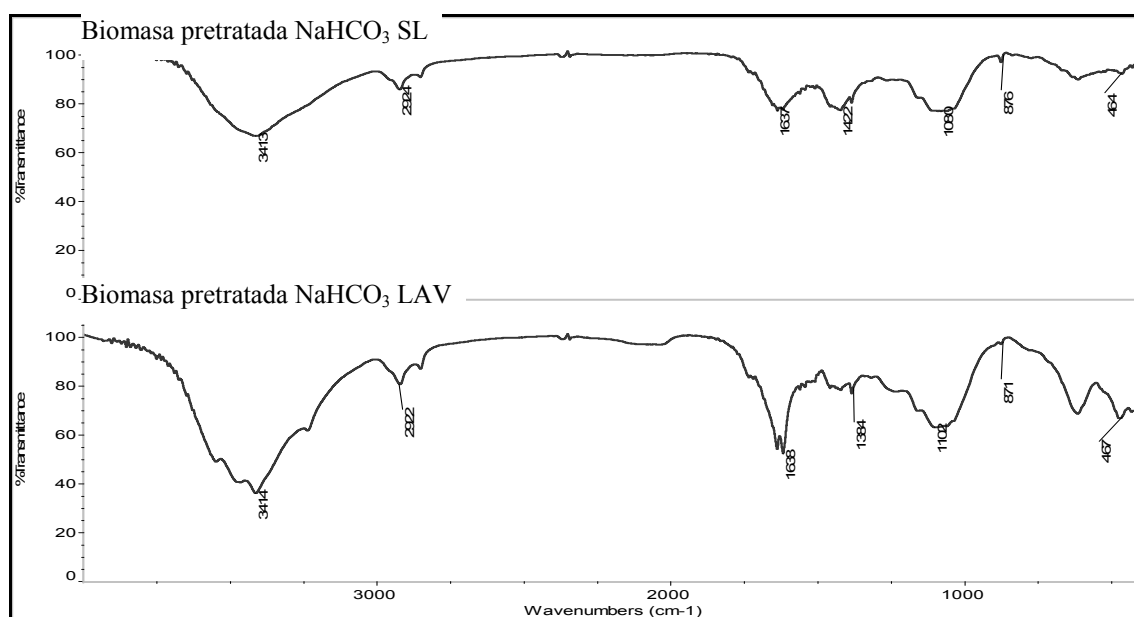


Figura 66.- Espectros de infrarrojo de la biomasa pretratada con NaHCO_3 (Sat.) sin lavado posterior y con lavado.

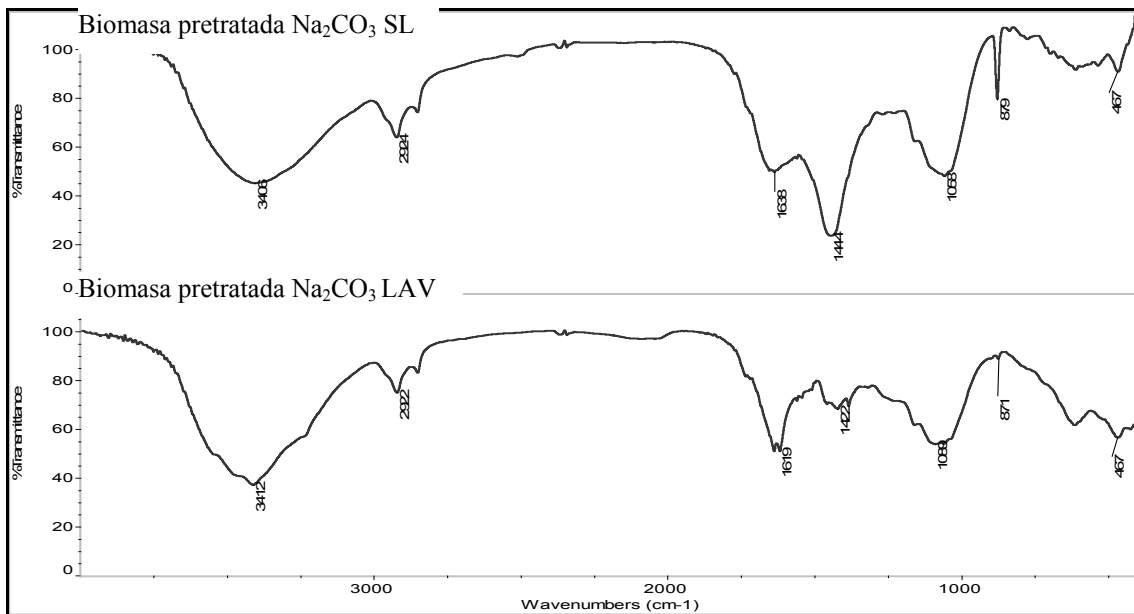


Figura 67.- Espectros de infrarrojo de la biomasa pretratada con Na₂CO₃ (Sat.) sin lavado posterior y con lavado.

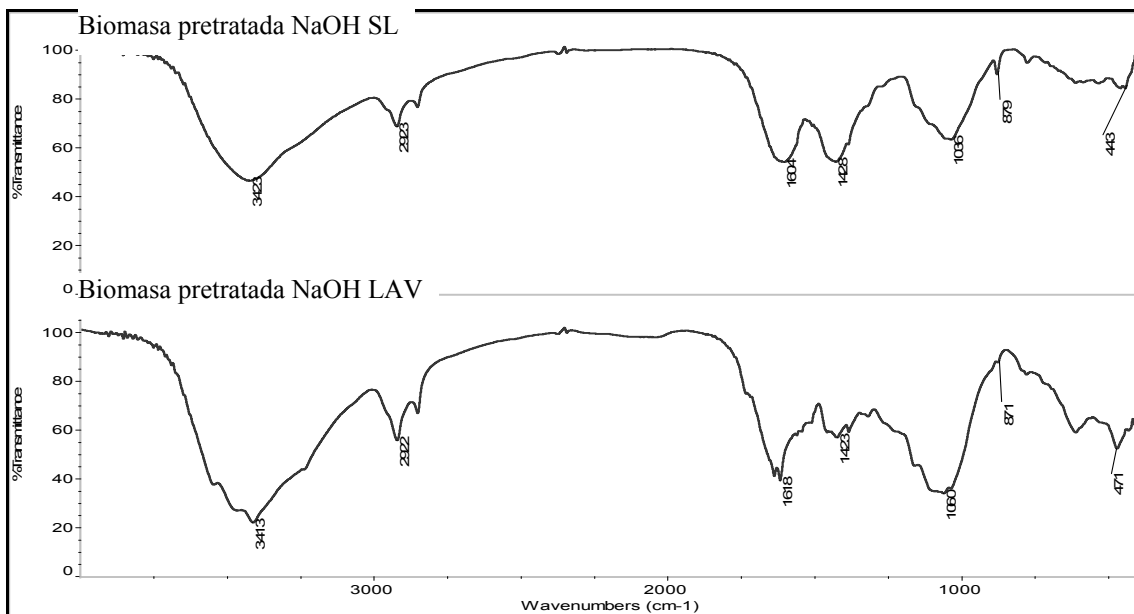


Figura 68.- Espectros de infrarrojo de la biomasa pretratada con NaOH 1 M sin lavado posterior y con lavado.

b) Valoración ácido-base

De acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior, parece claro que, al igual que ocurrió con la biomasa sin pretratar, en la pretratada los grupos funcionales que, de forma mayoritaria, podrían ser responsables de la fijación del metal serían los grupos carboxilo. Por ello, en este caso también se procedió a la realización de las correspondientes valoraciones ácido-base de la biomasa sometida al pretratamiento siguiendo el mismo protocolo que en el apartado 3.4.

En las Figuras 69, 70 y 71 se recogen, respectivamente, las curvas de valoración correspondientes a las biomásas pretratadas con NaHCO_3 , Na_2CO_3 y NaOH , a las concentraciones más altas de las estudiadas en apartados anteriores. Lo primero que parece apreciarse es la existencia de dos máximos en la representación de los valores de la pendiente, es decir, dos puntos de inflexión en las curvas de valoración lo que estaría indicando que la biomasa presentó, en los tres casos, dos puntos de equivalencia diferentes, si bien el segundo fue bastante más intenso que el primero. La Tabla 19 recoge los datos más significativos de las correspondientes curvas de valoración, es decir, el volumen de valorante y el pH de cada punto de equivalencia, además del pK_a asociado a cada uno de ellos. Recuérdese que este último se obtiene a partir de la mitad de los volúmenes anteriores.

Tabla 19.- Valores significativos de las curvas de valoración de la biomasa pretratada, sin lavado.

Reactivo	Puntos de equivalencia				pK_a	
	Volumen de valorante (mL)		pH			
NaHCO_3	1,40	2,90	4,72	8,12	3,48	4,83
Na_2CO_3	1,70	2,60	5,30	8,16	3,62	4,30
NaOH	2,40	3,80	5,20	8,73	3,63	4,40

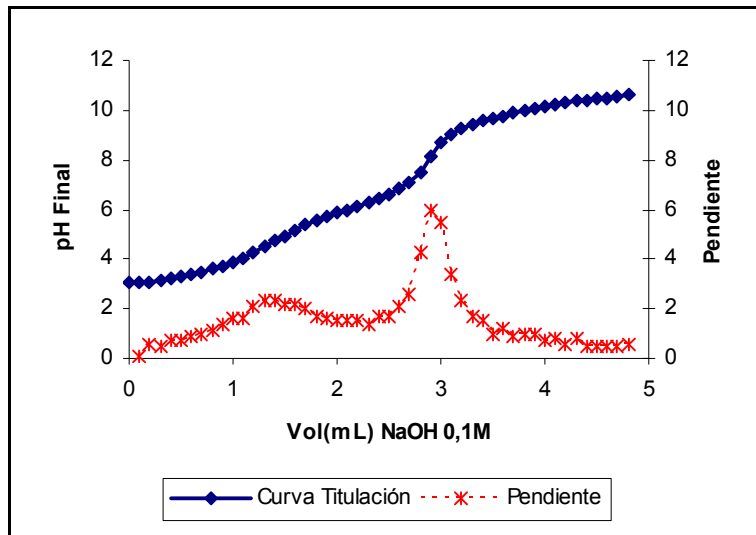


Figura 69.- Curva de valoración ácido-base de la biomasa pretratada con NaHCO_3 (sat.), sin lavado.

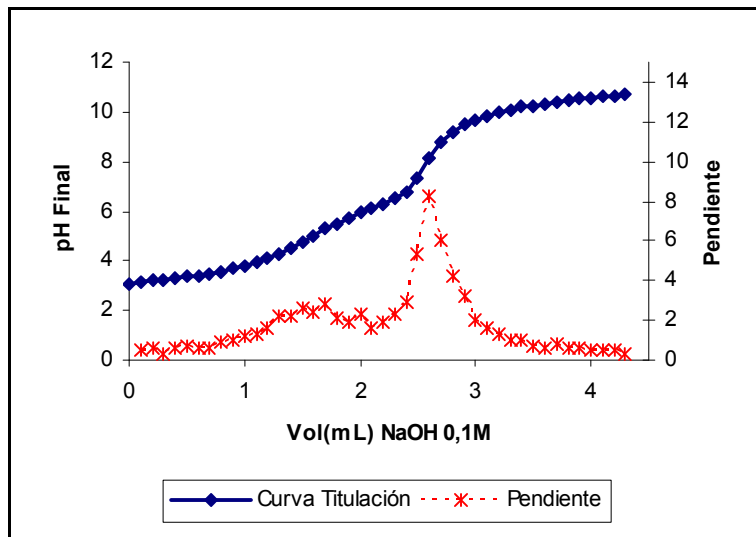


Figura 70.- Curva de valoración ácido-base de la biomasa pretratada con Na_2CO_3 (sat.), sin lavado.

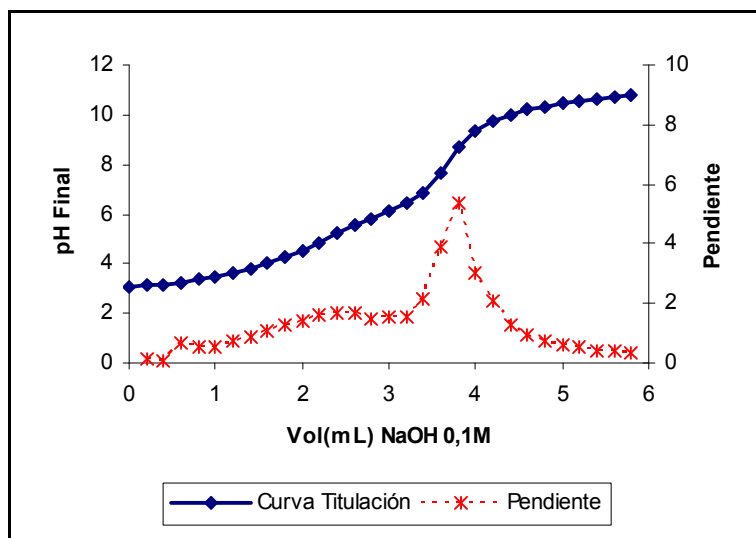


Figura 71.- Curva de valoración ácido-base de la biomasa pretratada con NaOH 1 M, sin lavado.

Si se comparan estos datos con los relativos a la curva de valoración de la biomasa sin pretratar (Figura 22), puede observarse que hubo un ligero aumento en cuanto al volumen de valorante consumido en el punto de equivalencia más significativo, lo que supuso que, en estos casos, se obtuvieran valores de pK_a superiores.

Por otro lado, podría esperarse un comportamiento diferente de la biomasa pretratada frente al reactivo valorante puesto que, de acuerdo con los resultados que han ido exponiéndose a lo largo de la presente memoria, los protones de los grupos carboxilo habrían sido sustituidos por iones sodio; en ese caso, lo que se estaría valorando ahora serían los correspondientes grupos carboxilatos que, en principio, no tendrían por qué tener características ácidas. Sin embargo, por los resultados de las valoraciones realizadas, la biomasa pretratada siguió teniendo dicho comportamiento. La justificación a esta circunstancia, aparentemente anómala, se podría encontrar en el hecho de que, cuando se comenzó cada experimento de valoración, a la biomasa se la situó en una disolución cuyo pH era de 3, por lo que los protones de la misma pudieron sustituir a los iones sodio de los carboxilatos convirtiéndolos nuevamente en carboxílicos, por lo que la biomasa tendría otra vez comportamiento de ácido débil.

En cualquier caso, el pretratamiento pudo dejar expuestos nuevos grupos funcionales, por lo que el volumen del reactivo valorante parece lógico que fuera mayor; esta misma hipótesis ha sido planteada en la literatura (Galun et al., 1986; Chen, 1997; Kapoor & Viraraghavan, 1998; Ddour et al., 1999; Satiroglu et al., 2002; Tiemann et al., 2002) lo que, a su vez, contribuiría a justificar el aumento de la capacidad de adsorción de la biomasa pretratada.

En cuanto a los puntos de equivalencia que parecen detectarse a valores de pH inferiores, también podrían corresponder a grupos carboxílicos, de acuerdo con lo postulado por algunos autores (Romero-González et al., 2001; Reddad et al., 2002 y Veglio et al., 2002) que asignaron más de un punto de equivalencia a estos grupos, lo cual sería debido a la existencia de una cierta heterogeneidad del entorno químico a lo largo de la cadena péctica en la que se encuentra distribuido dicho grupo.

En las Figuras 72, 73 y 74 se muestran, respectivamente, las curvas de valoración correspondientes a las biomásas pretratadas con NaHCO_3 , Na_2CO_3 y NaOH , también con las concentraciones más elevadas y con lavado posterior. Los datos relativos a las mismas aparecen en la Tabla 20.

Lo primero que puede comentarse de estas curvas es que nuevamente se constata la existencia de un solo punto de equivalencia, al igual que ocurría con la biomasa original (Figura 22); este hecho confirmaría lo ya apuntado en ocasiones anteriores, esto es, el lavado provocó una reversión de los cambios ocasionados en el pretratamiento y, por tanto, la eliminación total de los iones sodio. Otro dato que merece la pena resaltar es que, en el caso de las biomásas pretratadas y lavadas, los volúmenes de reactivo valorante gastados en los correspondientes puntos de equivalencia fueron menores que los encontrados con las biomásas pretratadas y sin lavado, e incluso también menores que el empleado hasta la equivalencia con la biomasa original; esto podría estar relacionado con la pérdida de peso detectada en este tipo de biomásas, que ya fue cuantificada en el apartado 3.7.4, entendiéndose, por tanto, que en la fracción de biomasa perdida por el efecto del lavado existiría una cierta cantidad de centros activos asociados, los cuales habrían sido, también, eliminados.

Tabla 20- Valores significativos de las curvas de valoración de la biomasa pretratada con lavado.

Reactivo	Punto de equivalencia		pK _a
	Volumen de valorante (mL)	PH	
NaHCO_3	1,50	8,04	3,75
Na_2CO_3	1,80	8,72	3,79
NaOH	1,30	8,32	3,88

En definitiva, estos resultados obtenidos con todas las biomásas analizadas parecen apoyar la hipótesis que se ha ido defendiendo anteriormente en el sentido de que fueron los grupos carboxilo los directamente implicados en el fenómeno de bioadsorción, tanto con la biomasa original como con la biomasa sometida a pretratamiento.

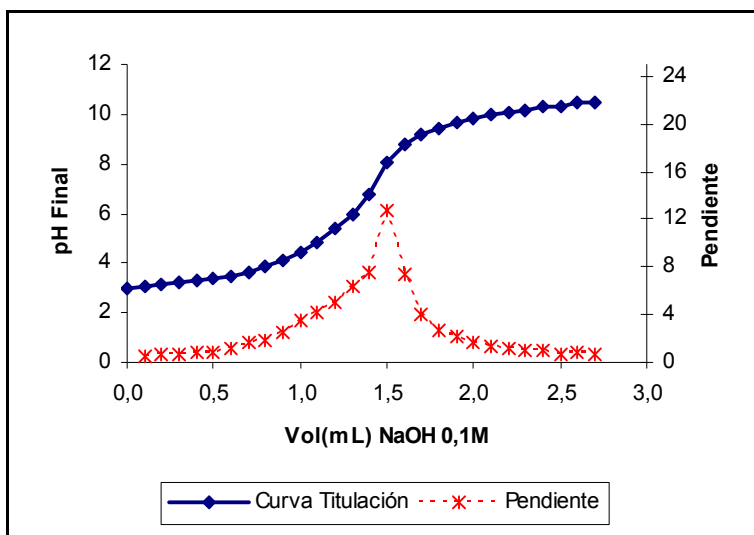


Figura 72.- Curva de valoración ácido-base de la biomasa pretratada con NaHCO_3 (sat.), con lavado.

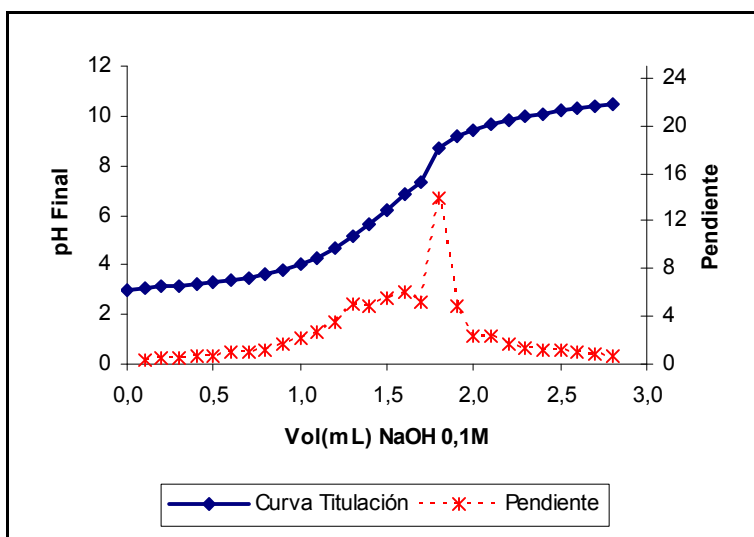


Figura 73.- Curva de valoración ácido-base de la biomasa pretratada con Na_2CO_3 (sat.), con lavado.

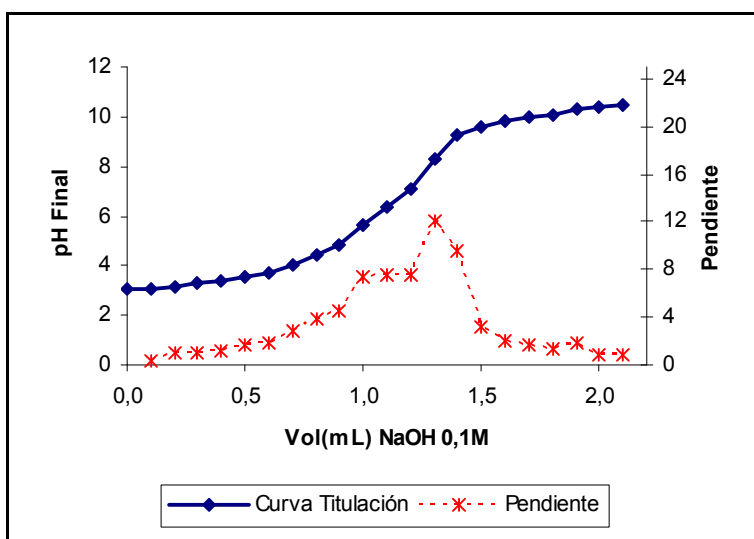


Figura 74.- Curva de valoración ácido-base de la biomasa pretratada con NaOH (1M), con lavado.

c) Determinación mediante SEM de posibles cambios morfológicos en la superficie de la biomasa

Diversos autores se han valido de imágenes, tomadas mediante SEM, para detectar cambios estructurales en las biomásas producidos por el efecto del pretratamiento. Cabe destacar los resultados obtenidos por Yu y colaboradores (Yu et al., 2001), con biomasa procedente de extractos de pulpa de Eucalipto, la cual, tras ser sometida a la acción de HCl, presentó mayor porosidad y, por tanto, una mayor área específica. Deng y Ting (Deng & Ting, 2005) analizaron también, mediante SEM, los mismos parámetros de porosidad y área específica en *Penicillium chrysogenum*, pretratado con polietilenamina y glutaraldehído, no encontrando, en este caso, variaciones significativas en ellos con respecto a la biomasa sin pretratar.

Por otro lado, la literatura también propone determinados cambios producidos en biomásas sometidas a agentes pretratantes de naturaleza alcalina. En este sentido, se ha postulado que su efecto podría radicar en la destrucción de diversas moléculas tales como polisacáridos (Ruiz-Manríquez et al., 1998; Yan & Viraraghavan, 2000; Yetis et al., 2000; Park et al., 2005), proteínas (Galun et al., 1986; Yan & Viraraghavan, 2000; Tiemann et al., 2002), compuestos pécticos (Hu et al., 1996; Park et al., 2005) y lípidos (Ddour et al., 1999; Yan & Viraraghavan, 2000). Este ataque traería como consecuencia la ruptura de la pared celular permitiendo, de este modo, la permeabilidad de los cationes metálicos hacia zonas internas de la biomasa (Mameri et al., 1999; Yan & Viraraghavan, 2000).

En el apartado 3.7.4, se pudieron cuantificar ciertas pérdidas de peso en la biomasa producidas bien por efecto del lavado sobre la biomasa original o bien a causa del pretratamiento, seguido o no de lavado. Asimismo, se comprobó como estas pérdidas aumentaban con el incremento de la concentración del reactivo pretratante y con el lavado, especialmente en el caso del empleo de NaOH. Estos hechos harían pensar que la transformación de la biomasa durante el pretratamiento transcurriría en dos etapas: en una primera, el reactivo pretratante podría haber destruido determinadas moléculas de la superficie, arrancando algunos componentes de la biomasa, los cuales serían eliminados por la acción del lavado en una segunda etapa. Es de esperar, por tanto, que todo ello

podiera dejar tras de sí un considerable aumento de la porosidad superficial y, de este modo, favorecer la permeabilidad de los cationes metálicos.

Para confirmar esta hipótesis, se recurrió al empleo de la microscopía electrónica de barrido (SEM), técnica que, al permitir obtener imágenes con gran aumento y resolución de la superficie de la biomasa, podría ratificar los posibles cambios producidos por la acción del pretratamiento en su morfología. Las muestras seleccionadas fueron tanto de biomasa original como de la pretratada con NaHCO_3 , Na_2CO_3 y NaOH , a las concentraciones más altas de las estudiadas. En todos los casos, se observaron, también, las biomásas sometidas a lavado tras el pretratamiento con el fin de determinar su contribución en las posibles transformaciones. Las imágenes fueron tomadas a 1000, 5000 y 15000 aumentos; de este modo, se podía tener una idea global del nivel de porosidad superficial, con las imágenes tomadas a menor número de aumentos, así como del detalle y tamaño de los poros, en el caso de las imágenes tomadas a mayores aumentos.

En la Figura 64 se muestran las micrografías correspondientes tanto a la biomasa original sin lavado (imágenes a, b y c) como las de la sometida al protocolo de lavado (imágenes d, e y f). Si se analizan, en primer lugar, las imágenes de la biomasa sin lavado, se observa como ésta aparece bastante fragmentada, lo cual podría ser fruto del procesado previo de secado, triturado y tamizado realizado tras la recolección. No obstante, si se observa la superficie de los distintos fragmentos, se comprueba que ésta carecía, casi por completo, de porosidad por lo que se entiende que dicha superficie constituiría, en sí misma, una barrera para la permeabilidad de los cationes hacia el interior. Por tanto, parece lógico pensar que prácticamente la totalidad de la retención metálica se concretaría en la superficie más externa. Por otro lado, en el caso de la biomasa sometida a lavado posterior (imágenes d, e y f), se puede apreciar como, al igual que en el caso anterior, la superficie apareció con un nivel mínimo de porosidad; asimismo, es posible comprobar también como sus fragmentos aparecían más limpios habiendo desaparecido, en gran medida, el detritus superficial que se apreciaba sobre la superficie de la biomasa sin lavar. Estas micrografías indicarían, por lo tanto, que el lavado de la biomasa no habría provocado daños estructurales en la misma y que la pérdida de peso detectada tras el lavado, se debería, únicamente, a la eliminación de las micropartículas depositadas sobre los fragmentos de la biomasa.

En la Figura 65 se muestran las micrografías correspondientes a la biomasa pretratada con NaHCO_3 , sin lavado posterior (imágenes a, b y c) o con él (imágenes d, e y f). En el primer caso, se aprecia un ligero ataque con relación a la biomasa original, el cual se traduciría en una mayor irregularidad superficial y en la aparición de pequeños fragmentos arrancados de la superficie, que desaparecerían mayoritariamente por el efecto del lavado dejando, tras de sí, un considerable número de microporos de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro, aproximadamente. En el caso de la biomasa pretratada con Na_2CO_3 (Figura 66) y con NaOH (Figura 67), se constata un comportamiento similar al observado en el caso de NaHCO_3 ; de igual modo, se comprueba como con el pretratamiento se erosionó la superficie de la biomasa lo que provocó el desprendimiento de ciertos fragmentos de la misma que serían eliminados por el lavado. No obstante, es posible observar como el grado de deterioro superficial provocado con los tres reactivos no fue el mismo; en este sentido, la biomasa pretratada con Na_2CO_3 parece más atacada que la acondicionada con NaHCO_3 , observándose grietas y oquedades de considerable tamaño. Del mismo modo, la biomasa sometida a la acción de NaOH parece ser la que presentó mayor número de daños estructurales; las micrografías de la Figura 67 ilustran como la irregularidad de su superficie es muy acusada, a la vez que se constata la existencia no ya de porosidad sino de grandes cavidades que penetran hacia el interior. Estas diferencias justificarían, claramente, por un lado, las diferentes pérdidas de peso registradas tras el pretratamiento y el lavado, mayores con la biomasa pretratada con Na_2CO_3 y NaOH (especialmente con esta última) que con la pretratada con NaHCO_3 y, por otro, los diferentes niveles de adsorción alcanzados.

Por otro lado, a pesar de que la porosidad generada por NaOH fue muy superior a la generada por Na_2CO_3 , conviene recordar que los incrementos en los niveles de adsorción obtenidos con biombras tratadas con ambos reactivos fueron muy similares. Esto podría deberse a que con el primero, a pesar de facilitar en mayor medida que el segundo la difusión del metal hacia zonas internas de la biomasa por la creación de un mayor número de cavidades, también produjo una mayor alteración de la superficie externa lo cual, muy probablemente, afectaría a los centros activos más externos, tal como han defendido algunos autores (Ddour et al., 1999; Park et al., 2005)

Por último, se debe comentar que sobre la superficie de las biombras pretratadas con NaHCO_3 y Na_2CO_3 , sin lavado posterior (Figuras 65-c y 66-c), se aprecian pequeñas

partículas facetadas que bien pudieran ser de naturaleza cristalina, siendo probable que se hayan formado debido a fenómenos de cristalización de ambos reactivos. Esta podría ser una de las razones por las que se registraron porcentajes de recuperación en peso de biomasa superiores al 100 % en el apartado 3.7.4. Una vez lavada la biomasa, dichas partículas podrían haberse redisolto por efecto del lavado. Esta circunstancia hizo que no pudieran visualizarse en las imágenes correspondientes a este último caso (Figuras 65 f y 66 f).

d) Microanálisis elemental

Una vez constatada la importancia del intercambio catiónico en la fijación del metal sobre la biomasa, así como, el efecto favorecedor que determinados metales ligeros podrían ejercer sobre la captación de algunos metales pesados, se pretendió profundizar más en el estudio de estos procesos con la ayuda del microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDS), lo que permitiría obtener una mejor aproximación al mecanismo de adsorción tras el pretratamiento de la biomasa.

Para llevar a cabo el estudio, en la elección de las muestras a analizar se siguió el mismo criterio que en casos anteriores; es decir, se seleccionó, una vez más, la biomasa pretratada con NaOH 1 M, con y sin lavado posterior. Del mismo modo, los metales ensayados fueron también el Cd y el Pb, y los experimentos de bioadsorción lo fueron en las condiciones habituales, con disoluciones metálicas cuya concentración fue de 150 mg/L.

Mediante el empleo de esta técnica analítica es posible la determinación de la composición elemental en una zona muy concreta de la biomasa, lo que permite detectar las posibles diferencias habidas en ésta según el proceso de pretratamiento aplicado y la posterior captación metálica producida. Todo ello se traduciría en diferentes redistribuciones de átomos, según el caso, motivadas, a su vez, por las correspondientes reacciones químicas ocurridas durante estos procesos. Asimismo, una ventaja adicional que ofrece esta técnica es que puede brindar la posibilidad de determinar, de un modo semicuantitativo, el porcentaje en peso relativo de cada elemento detectado.

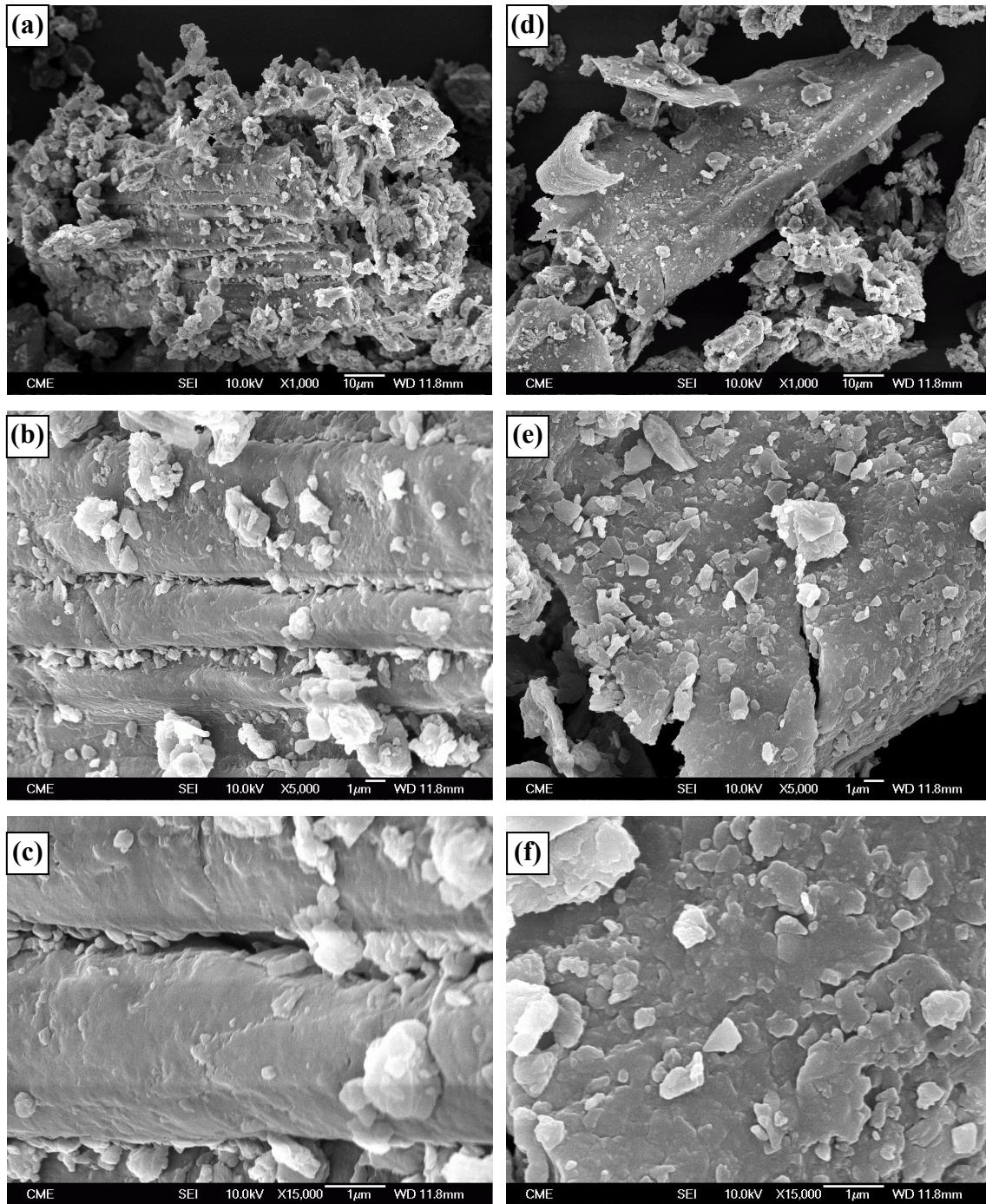


Figura 64.- Micrografías correspondientes a la biomasa sin pretratar, sin lavado (a, b, c) y con lavado (d, e, f), obtenidas a 1000, 5000 y 15000 aumentos, respectivamente.

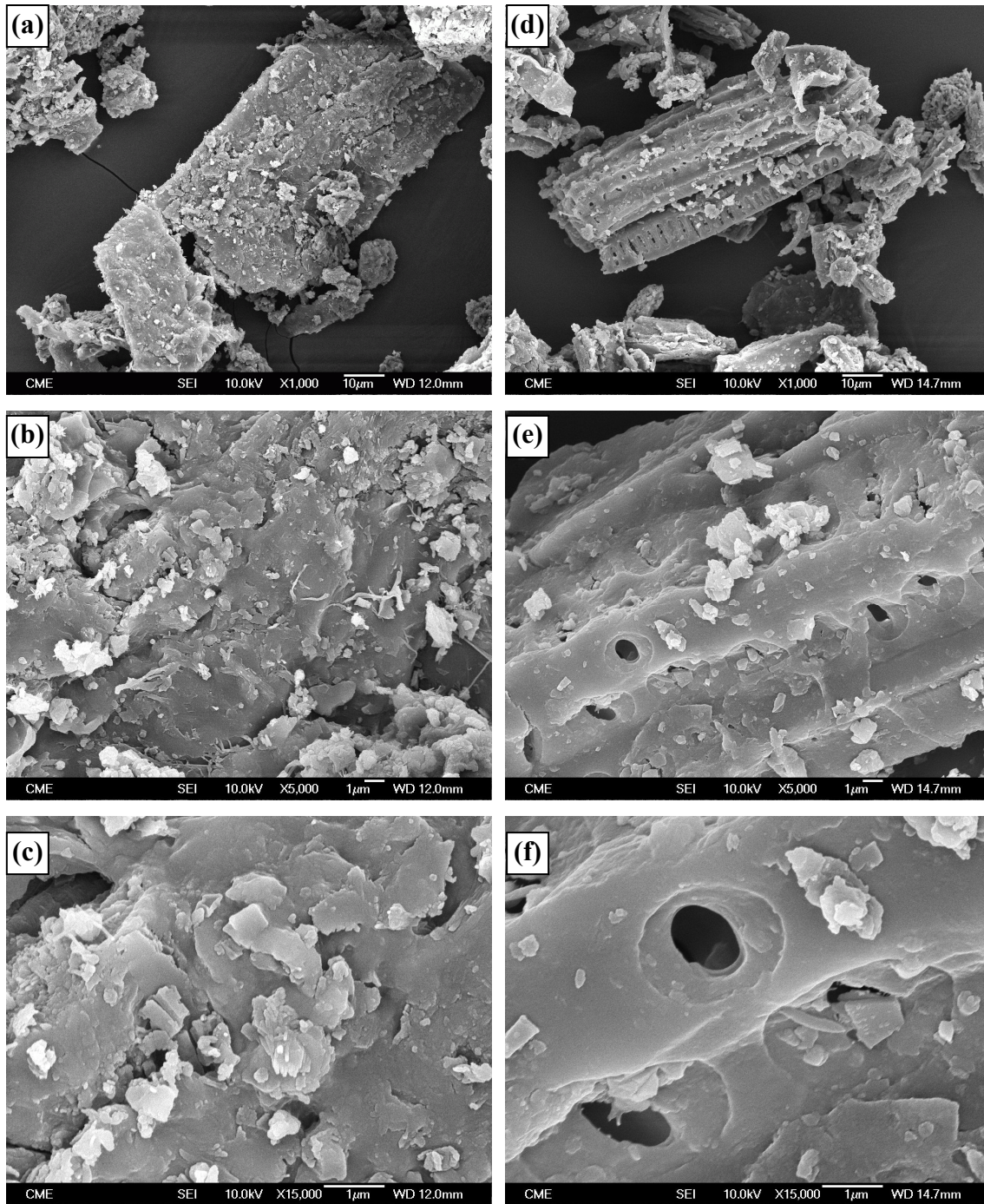


Figura 65.- Micrografías correspondientes a la biomasa pretratada con NaHCO_3 , sin lavado (a, b, c) y con lavado (d, e, f), obtenidas a 1000, 5000 y 15000 aumentos, respectivamente.

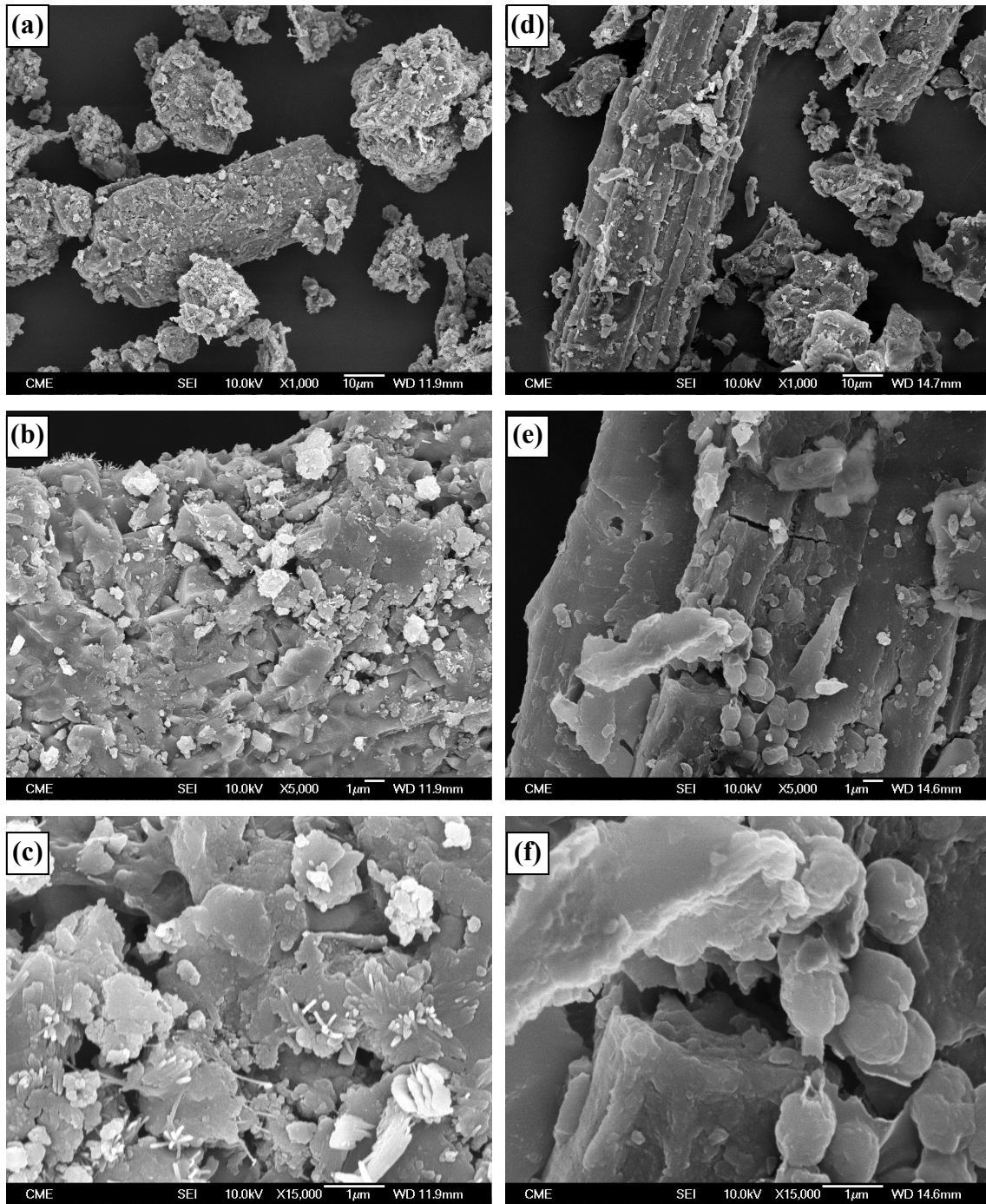


Figura 66.- Micrografías correspondientes a la biomasa pretratada con Na_2CO_3 , sin lavado (a, b, c) y con lavado (d, e, f), obtenidas a 1000, 5000 y 15000 aumentos, respectivamente.

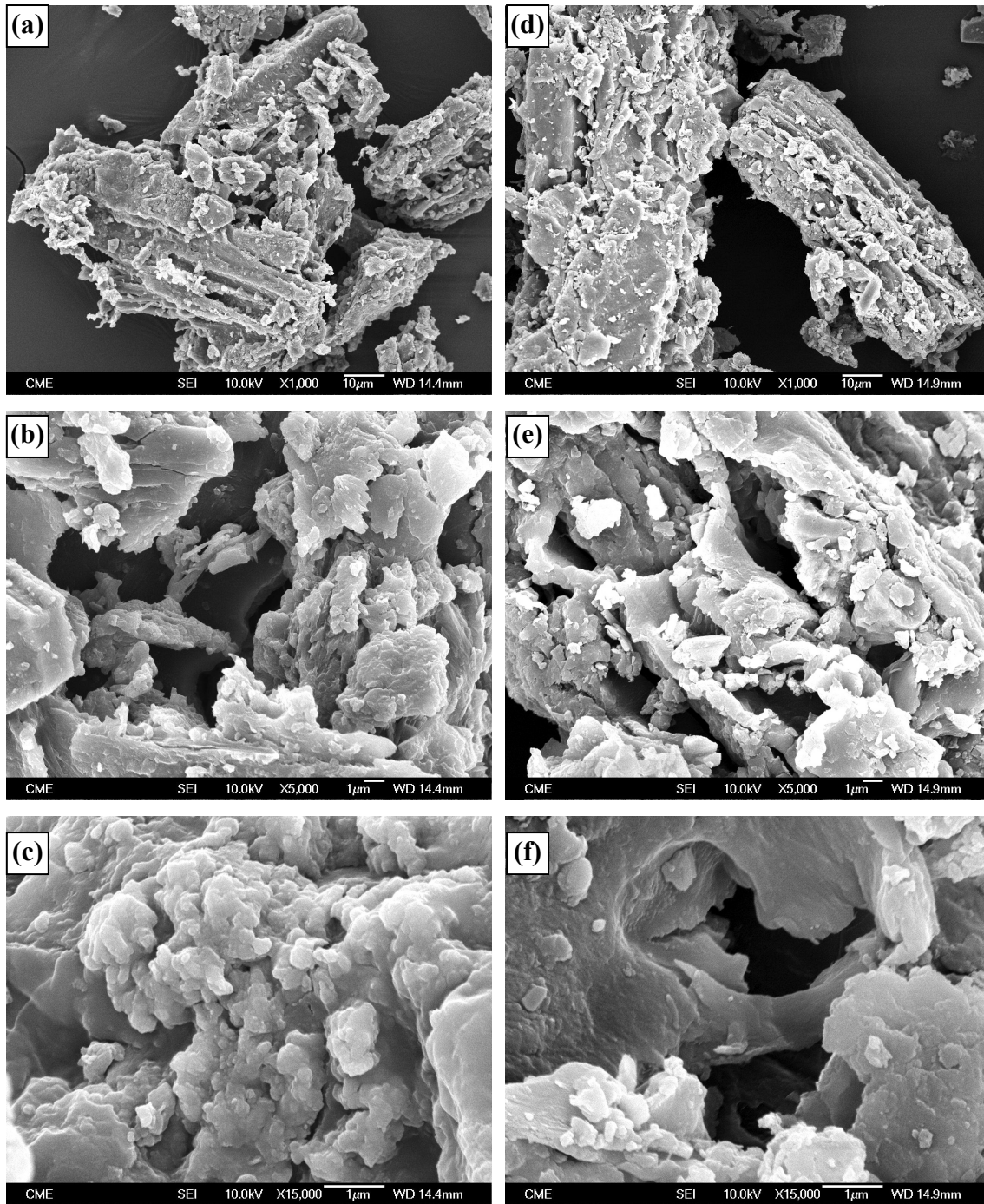


Figura 67.- Micrografías correspondientes a la biomasa pretratada con NaOH sin lavado (a, b, c) y con lavado (d, e, f), obtenidas a 1000, 5000 y 15000 aumentos, respectivamente.

Dada la gran heterogeneidad en composición de las muestras a estudiar (ver apartado 2.1) y con el fin de tener una idea global de la composición atómica de la muestra analizada, se fueron realizando varios análisis en puntos equidistantes entre sí para, definitivamente, tomar el valor medio de todos ellos.

En la Figura 68 se muestran los elementos detectados sobre la biomasa original, así como su correspondiente porcentaje en peso. De la misma forma, en las Figuras 69 y 70 se representan los respectivos porcentajes de los elementos detectados en la biomasa pretratada con NaOH 1 M sin lavado posterior y con dicho lavado, respectivamente.

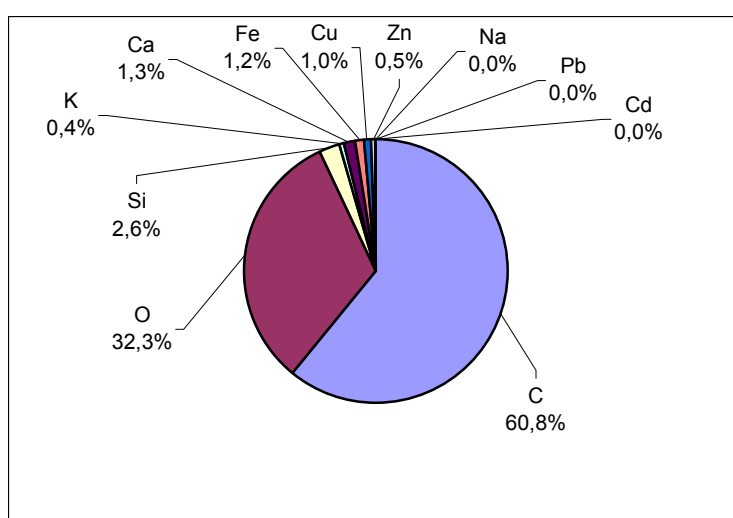


Figura 68.- Porcentaje en peso de los elementos detectados en la biomasa original.

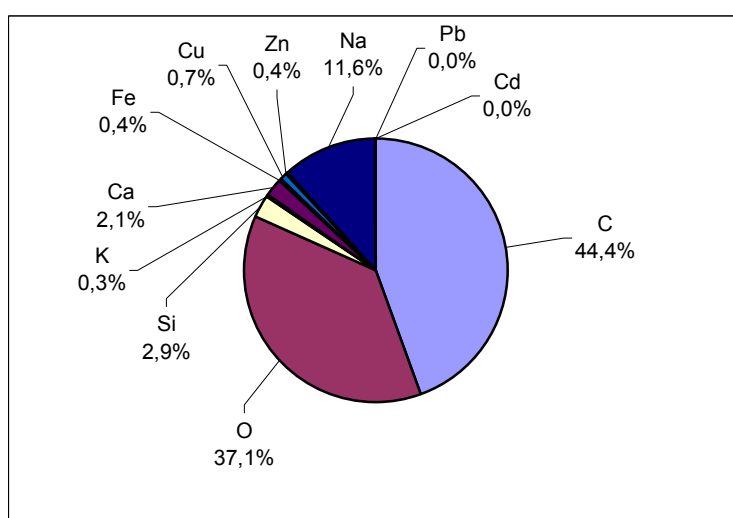


Figura 69.- Porcentaje en peso de los elementos detectados en la biomasa pretratada con NaOH 1 M, sin lavado posterior.

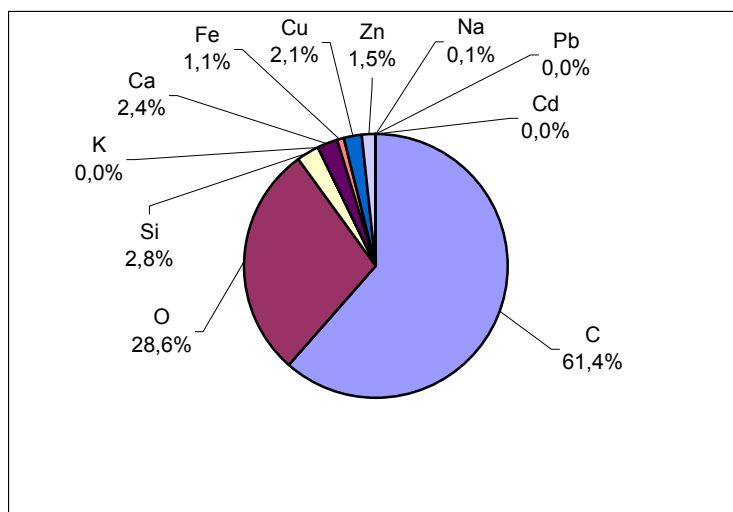


Figura 70.- Porcentaje en peso de los elementos detectados en la biomasa pretratada con NaOH 1M y lavado posterior.

Atendiendo a su posible procedencia, los elementos identificados podrían clasificarse en tres grupos diferentes:

➤ Elementos constituyentes de la biomasa. Al tener ésta un origen biológico, los elementos principales que la constituyen son el carbono, el oxígeno y el hidrógeno; no obstante, éste último elemento no pudo ser identificado mediante la técnica analítica utilizada debido a su bajo peso molecular. Asimismo, también se detectaron otros elementos, presentes en menor proporción que los anteriores, pero con un gran significado biológico; estos elementos, a su vez, es posible dividirlos en dos grupos: por un lado, se podría aludir a los elementos considerados como macronutrientes tales como Ca, Fe y K, que los organismos vegetales necesitan en cantidades elevadas (>20 mg/L) para mantenerse con vida; por otro lado, estarían los elementos micronutrientes, entre los que se encuentran Cu y Zn, los cuales son también esenciales para la vida pero en menor cantidad (< 0,5 mg/L). A continuación, se describe, de forma más detallada, la implicación de cada uno de ellos en la biomasa (Strasburguer et al., 2003):

Ca: Tiene como función principal la de ser componente estructural de las paredes celulares al formar sales con determinados componentes ácidos de la misma, generalmente, compuestos pécticos. La concentración de este elemento, en su forma libre, suele ser pequeña tanto en el citoplasma como en los cloroplastos y relativamente alta en apoplastos y vacuolas. El calcio excedente se almacena en la célula,

generalmente, en forma de fiato, oxcelato o carbonato, compuestos que, debido a su baja solubilidad, evitan la recirculación y, por consiguiente, su eliminación.

Cu: Se encuentra, habitualmente, en organismos vegetales en una concentración aproximada entre 3 y 10 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, formando parte de varias enzimas, tales como oxidasa del ácido ascórbico, superóxido dismutasa, citocromo oxidasa, fenolasa, lacasa y fenol oxidasa, así como también integrando sustancias redox como la plastocianina. En las vías conductoras de las plantas, casi siempre, aparece ligado a aminoácidos.

Fe: Forma parte de una serie de compuestos importantes de la célula tales como los citocromos y también los grupos prostéticos de enzimas, como la catalasa y la peroxidasa. Asimismo, es un componente esencial de la ferredoxina.

K: Es el único catión monovalente que es esencial para todas las plantas. Sus funciones principales son la de actuar como cofactor en reacciones enzimáticas y como agente osmótico. Al poseer una afinidad relativamente baja, debe estar presente en una concentración elevada para ejercer su acción como cofactor.

Zn: Es un componente de más de 60 enzimas, como la alcohol deshidrogenasa, anhidrasa del ácido carbónico, superóxido dismutasa y, además, es cofactor de otras enzimas. También ejerce función estructural en los ribosomas.

➤ Elementos procedentes del agente pretratante. Dado que el agente pretratante utilizado para este estudio fue el hidróxido sódico, los elementos procedentes del mismo fueron el sodio y el oxígeno.

➤ Por último, otro elemento que se detectó en la biomasa, fue el silicio. Su presencia se justificaría por una posible contaminación de la biomasa con compuestos silicatados presentes en la zona de recolección, lo que ya fue confirmado anteriormente cuando se presentaron los resultados obtenidos en el análisis por difracción de rayos X (apartado 3.7.3).

En primer lugar, si se analizan los datos recogidos en las Figuras 68 y 69, relativos a la biomasa original y a la acondicionada con NaOH, sin lavado posterior al pretratamiento, se podrían constatar los siguientes hechos:

La diferencia más importante que se observa con los resultados que aparecen en estas figuras sería, según el caso, la ausencia del sodio o su presencia en una proporción relativamente elevada. Lo cual parece confirmar, una vez más, la fijación de este elemento en los grupos funcionales de la biomasa, con el pretratamiento de ésta, de acuerdo, en este caso, con la reacción [30].

Por otro lado, se observa también un cierto aumento, una vez efectuado el pretratamiento, en la cantidad de calcio; dado que este elemento no formó parte del agente pretratante, dicho aumento podría justificarse con la ruptura de las paredes celulares por el efecto del reactivo pretratante. Esta circunstancia ya se pudo constatar en el apartado anterior, con la ayuda de las distintas micrografías obtenidas mediante SEM. La bibliografía (Puranik & Paknikar, 1997; Kapoor & Viraraghavan, 1998; Ddour et al., 1999; Park et al., 2005) apunta que una de las posibles consecuencias del pretratamiento sería la extracción de materia de la biomasa, con lo que se pondrían al descubierto nuevos centros activos que, de otro modo, serían inaccesibles. De esta forma, parece evidente que, por el efecto del pretratamiento, al romperse las paredes celulares de la biomasa se pongan al descubierto nuevos compuestos pécticos presentes en el interior de la misma los cuales, como ya se comentó anteriormente, se encontrarían asociados a una considerable cantidad de átomos de calcio fijados en sus grupos carboxilo.

Ya se dijo, también, en párrafos atrás, que el carbono y el oxígeno tendrían que ser los elementos más abundantes en la biomasa; el carbono procedería exclusivamente de la propia biomasa, mientras que el oxígeno podría proceder, además, del agente pretratante. De este modo, sería interesante estudiar la proporción relativa de estos dos elementos, antes y después del pretratamiento. Lo que claramente parece constatarse es una notoria disminución en la relación C/O de la biomasa pretratada con NaOH y sin lavado en relación a la original; considerando que la cantidad de carbono sería constante, esta diferencia podría corroborar la presencia de una cierta cantidad del agente pretratante sobre biomasa.

Por último, en el caso del Cu, Fe, K y Zn, salvo pequeñas diferencias de detalle, sus porcentajes no parecen haberse visto afectados por el efecto del pretratamiento.

En el caso de la biomasa con lavado posterior al pretratamiento (Figura 70), se observa, en primer lugar, como el K y el Na tendieron a desaparecer por el efecto del lavado, mientras que no parece que hubiera pérdidas de otros elementos como Ca, Cu, Fe y Zn. Incluso con Ca, Cu y Zn parece que hubo un cierto aumento en la proporción detectada en relación con la biomasa original. Este hecho podría estar condicionado por dos factores; en primer lugar, al tratarse éstos últimos de cationes divalentes, presentarían una afinidad por los centros activos de la biomasa relativamente más elevada que la del K y la del Na, lo que podría hacer más difícil su eliminación por el efecto del lavado (Rodríguez & Rodríguez, 2000; Sánchez, 2004). Por otro lado, el aumento en la proporción detectada con Ca, Cu y Zn podría estar relacionado, a su vez, con un aumento en la porosidad de la superficie de la biomasa, la cual pondría al descubierto zonas internas de la misma que antes se encontraban ocultas. Esta mayor permeabilidad podría estar más favorecida por el efecto del lavado, al eliminarse con éste los pequeños fragmentos de biomasa extraídos en el pretratamiento los cuales podrían bloquear los poros generados durante el mismo. El carbono y oxígeno, por su parte, volverían a tener una proporción similar a la detectada en la biomasa original, lo cual se justificaría con la eliminación de los posibles restos del reactivo presentes tras el pretratamiento.

En las Figuras 71 y 72 se muestran, respectivamente, los resultados correspondientes a las biombras pretratadas, sin lavado, con adsorción de Cd y Pb. Con estas gráficas se observaría, en relación a la de la Figura 69, una clara disminución de los contenidos de Ca, K y Na y, de forma paralela, la fijación de Cd o Pb. Este hecho podría confirmar la importancia de la participación de estos elementos en la fijación del metal al actuar como cationes de intercambio (Ddour et al., 1999; Figueira et al., 2000). La proporción del resto de elementos no pareció alterarse significativamente tras la fijación del metal, lo cual haría suponer que no jugarían un papel importante en el proceso de bioadsorción.

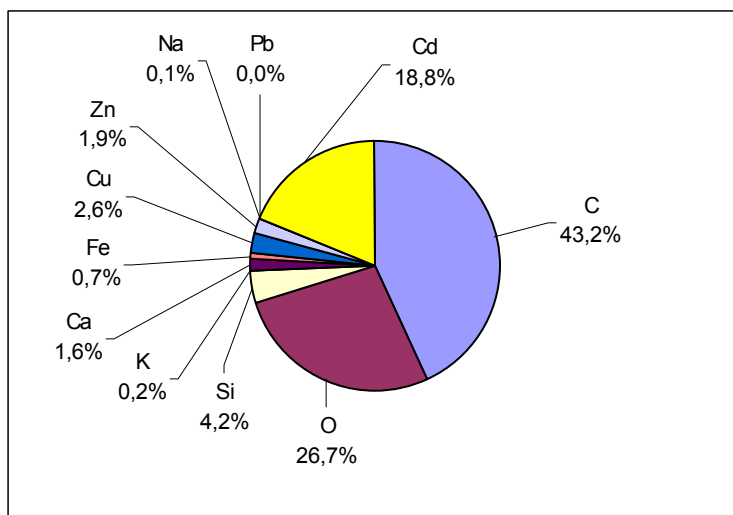


Figura 71.- Porcentaje en peso de los elementos detectados en la biomasa pretratada con NaOH IM sin lavado posterior y con Cd.

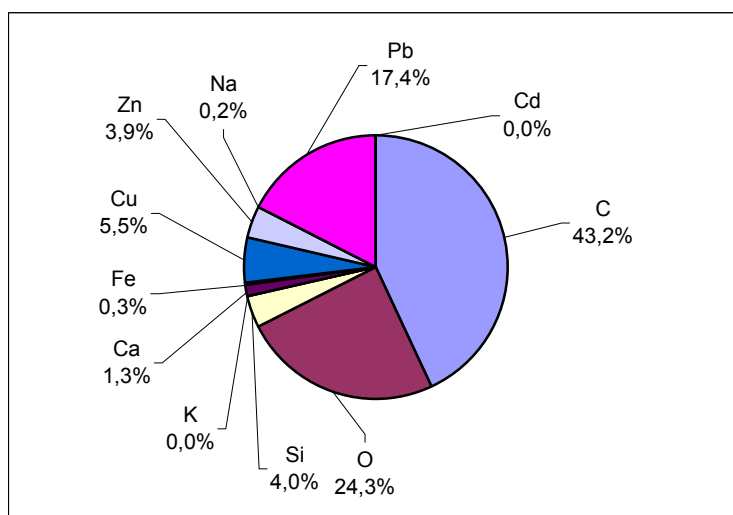


Figura 72.- Porcentaje en peso de los elementos detectados en la biomasa pretratada con NaOH IM sin lavado posterior y con Pb.

En el caso de la biomasa que fue lavada tras el pretratamiento, con adsorción de Cd y Pb (Figuras 73 y 74, respectivamente), cuando se comparan sus resultados con los de la correspondiente sin metal bioadsorbido (Figura 70), lo que primero se aprecia es una clara disminución de la proporción de Ca. Conviene recordar que en la biomasa sometida a lavado tras el pretratamiento (Figura 70), el K y Na habrían sido eliminados por el efecto de dicho lavado, por lo que parece lógico suponer que, en este caso, sea el Ca el que haya participado mayoritariamente en el intercambio catiónico. Del mismo modo, se constata que al haber menor cantidad de cationes ligeros para ser intercambiados en la biomasa, la proporción de metal fijado haya sido también menor que en el caso de la biomasa sin pretratar (Figuras 71 y 72). Por otro lado, el aumento

en la capacidad de adsorción que fue detectado en la biomasa pretratada, con lavado posterior, sobre la biomasa sin pretratar pudo ser debido a la exposición de nuevos grupos carboxilos pertenecientes a compuestos pécticos procedentes del interior de la pared celular, tal como se mencionó en párrafos anteriores. Estos grupos carboxilo liberados se encontrarían más saturados de cationes calcio que los presentes en el exterior de la misma. Por otro lado, el calcio presente en estas moléculas, al tener mayor afinidad por los centros activos que el sodio, debido, principalmente, a su doble valencia, sería peor desplazado por los protones del medio que este último, pudiendo otorgar así una mayor ventaja al metal en la fijación sobre el centro activo. De este modo, a pesar de existir sobre la biomasa una cantidad de centros activos ligeramente menor que sobre la biomasa original, tal como se constató mediante las respectivas valoraciones ácido-base, los centros activos presentes en la primera, al estar más saturados de iones calcio, podrían fijar una cantidad neta de metal superior a los de la biomasa sin pretratar.

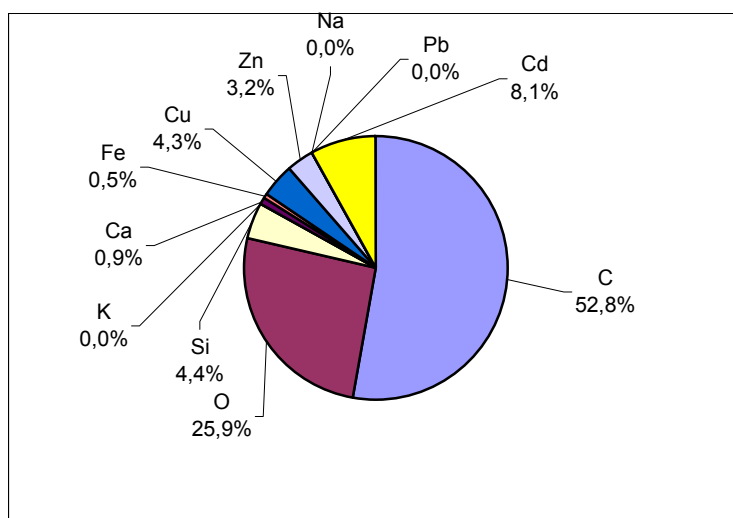


Figura 73.- Porcentaje en peso de los elementos detectados en la biomasa pretratada con NaOH 1M con lavado posterior y con Cd.

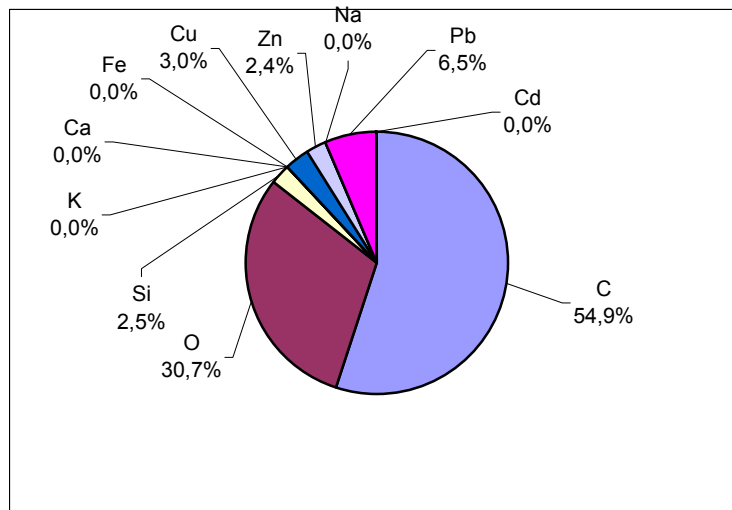


Figura 74.- Porcentaje en peso de los elementos detectados en la biomasa pretratada con NaOH 1M con lavado posterior y con Pb.

4.- CONCLUSIONES

➤ La biomasa que mayor cantidad de metal recuperó y, por tanto, la seleccionada para la experimentación posterior fue la recogida en la balsa de riego del Centro de Investigación Forestal (CIFOR) formada, esencialmente, por diferentes algas verdes o clorófitas y plantas caducifolias (60,63 % y 35,74 %, respectivamente). Le siguieron en efectividad la obtenida en el arroyo Meaques (Casa de Campo), las hojas de árboles caducifolios recogidas en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y, por último, la procedente del río Manzanares (El Pardo).

➤ El ataque cáustico de la biomasa, puso de manifiesto una concentración significativa de calcio, elemento que forma parte de la fase amorfa o matriz de la pared celular de las células vegetales. También, se detectó una pequeña cantidad de hierro, elemento que, por el contrario, podría competir con los cationes metálicos por los mismos centros activos de la biomasa. Los elementos objeto de este estudio (Cd, Cu, Ni, Pb y Zn) también fueron detectados, aunque en cantidades prácticamente despreciables.

➤ El pH se mostró como un factor altamente influyente en la bioadsorción, debido a la competencia establecida entre los protones y los cationes metálicos por los mismos centros activos de la biomasa. Por este motivo, la capacidad de adsorción tendió a aumentar conforme aumentó el valor de pH inicial hasta un valor óptimo (4 para Cu y Cd, y 5 para el Zn, Pb y Ni), a partir del cual dicha capacidad tendió a disminuir ligeramente debido a la hidrólisis de los cationes metálicos, provocando la formación de cationes básicos que son más difícilmente adsorbibles por la biomasa.

➤ Con valores de pH inicial comprendidos entre 3 y 5, se observó una tendencia al aumento de esta variable con respecto al tiempo, con lo cual en este rango la biomasa se comportó como un aceptor de protones. A valores de pH superiores a 6, la biomasa tendió a acidificar el medio por lo que se comportó como un dador de protones. Para valores de pH inicial menores de 2, no se observaron variaciones de pH significativas a lo largo del tiempo debido bien a la gran cantidad de protones en el medio o bien a daños producidos en la biomasa por la elevada acidez.

➤ El aumento de la concentración de biomasa influyó negativamente en su capacidad de adsorción debido a interacciones electrostáticas entre las células,

lográndose la mayor capacidad de adsorción con concentraciones de 0,5 g/L. Sin embargo, la concentración de biomasa influyó positivamente en la cantidad neta de metal recuperado. Atendiendo al primer criterio, la concentración de biomasa seleccionada fue de 0,5 g/L.

➤ El estudio de la cinética de adsorción puso de manifiesto la rapidez del proceso, al tener lugar, principalmente, en la superficie de la biomasa y ser, además, independiente del metabolismo, recuperándose alrededor del 80 % del metal durante los 8 primeros minutos de experimentación y alcanzándose el equilibrio a los 30 minutos. Asimismo, se verificó que los valores de pH aumentaron de forma simultánea a la disminución de la concentración de metal en el medio y más acentuadamente en aquellos metales en los que el pH inicial era menor, debido a los fenómenos de competencia entre los protones y los cationes metálicos por los mismos centros activos de la biomasa.

➤ El trazado de las isotermas de adsorción determinó un comportamiento similar para todos los metales, tendiéndose a alcanzar un valor límite en la capacidad de adsorción con el aumento de la concentración metálica en equilibrio. En todos los casos, se constató un mayor grado de ajuste al modelo matemático de Langmuir que al de Freundlich. Mediante los parámetros obtenidos con dichos modelos, se determinó el orden de los metales ensayados en cuanto a la capacidad de adsorción, el cual fue: $\text{Cu} \sim \text{Pb} > \text{Ni} \sim \text{Zn} > \text{Cd}$ y el de afinidad biomasa-metal: $\text{Pb} > \text{Cd} \sim \text{Cu} > \text{Ni} \sim \text{Zn}$. Las biomásas procedentes del CIFOR y de distintas recogidas mostraron un comportamiento similar debido a su gran similitud en cuanto a los compuestos poliméricos que forman parte de las paredes celulares de sus células.

➤ El análisis mediante FTIR de la biomasa original puso de manifiesto la presencia de los siguientes grupos funcionales: grupos hidroxilo (3400 cm^{-1}), grupos alcano ($2900\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$), grupos carboxílicos o derivados ($1200\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ y 876 cm^{-1}), grupos éter o alcoholes (1100 cm^{-1}) y grupos alqueno o aromáticos ($700\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$). Tras la adsorción del Cd, Cu, Ni, Pb y Zn, se produjo un desplazamiento significativo hacia la derecha del espectro, es decir de menor energía, de los picos correspondientes a los grupos carboxílicos, lo que indicaría la participación preferente de éstos en la unión con el metal.

➤ Mediante la valoración ácido-base de la biomasa, se determinó que su pK_a presentaba un valor aproximado de 3,75, el cual se correspondería con el de los grupos carboxílicos, lo que vendría a indicar que éstos se encontrarían presentes, de forma mayoritaria, en la misma.

➤ La cinética de bioadsorción, llevada a cabo con los sistemas bimetálicos Cu-Pb, Cu-Cd y Pb-Cd, reveló que este proceso fue sensiblemente más lento que el realizado en sistemas monometálicos, alcanzándose el equilibrio a los 120 minutos, lo cual es debido a la fuerte competencia ejercida entre los cationes metálicos por los mismos centros activos. Asimismo, esta cinética se influenció de forma positiva por la concentración metálica debido al mayor gradiente de concentración establecido en el sistema a concentraciones altas.

➤ El orden de afinidades de la biomasa por los tres metales, en sistemas bimetálicos, fue: $Pb > Cu > Cd$. Esto reveló un claro paralelismo con lo determinado en sistemas monometálicos

➤ La cantidad total de metal adsorbido tendió, en los tres casos estudiados, a un valor máximo y constante, en torno a 0,5 mmol/g, confirmando, así, la hipótesis de Langmuir que considera que el número de centros activos disponibles en la biomasa es fijo y permanece constante a lo largo de su superficie, pudiendo cada metal unirse a cualquiera de ellos.

➤ EL proceso de desorción, al igual que ocurría con el de bioadsorción, se produjo de forma rápida, liberándose más del 80 % del metal retenido sobre la biomasa en los cinco primeros minutos, mediante el uso de HCl como agente desorbente, y en los primeros 30 minutos con $NaHCO_3$.

➤ El HCl tuvo una marcada efectividad como agente desorbente obteniéndose valores de recuperación metálica, en el primer ciclo de desorción, del 100 % para el Zn, del 94,7 % para el Ni, del 85,7 % para el Cd, del 66,7 % para el Cu y del 63,2 % para el Pb. El aumento del pH, de forma paralela a la liberación del metal, puso de manifiesto que este proceso tuvo lugar mediante un intercambio con los protones procedentes del medio ácido. La reutilización de la biomasa reveló una clara disminución de su

capacidad de adsorción, debido a posibles daños en sus centros activos o a un bloqueo de los mismos.

➤ La eficacia del NaHCO_3 como agente desorbente fue menor que la del HCl , obteniéndose los siguientes porcentajes de recuperación metálica en el primer ciclo de desorción: Cd 1,4 %, Cu 76,7 %, Ni 65,7 %, Pb 11,4 % y Zn 16,7 %. El mecanismo de actuación propuesto en este caso fue la complejación de los cationes metálicos por los aniones bicarbonato procedentes del agente desorbente. La reutilización de la biomasa en un segundo ciclo de bioadsorción puso de manifiesto un incremento en la capacidad de recuperación metálica, incluso superior al mostrado en el primer ciclo, debido a ciertas modificaciones químicas provocadas en la biomasa por la acción del NaHCO_3 . Por último, al someter la biomasa a un segundo ciclo de desorción, se apreció un menor rendimiento con respecto al primero muy posiblemente debido a la mayor carga metálica presente en la biomasa.

➤ El pretratamiento de la biomasa con Na_2CO_3 , NaHCO_3 y NaOH reveló un claro aumento en su capacidad de adsorción, siendo este aumento de menor magnitud en biombras sometidas a lavado posterior a dicho pretratamiento.

➤ La concentración del agente pretratante influyó positivamente en la capacidad de adsorción de la biomasa obteniéndose, en el caso de la biomasa sin lavado posterior, los mayores incrementos con la mayor concentración de los tres reactivos pretratantes. En el caso de la biomasa sometida a lavado posterior, el incremento máximo se consiguió a menores concentraciones, permaneciendo estos valores constantes con concentraciones superiores. En este último caso, las condiciones óptimas de pretratamiento para cada metal fueron las siguientes: Na_2CO_3 saturado o 0,5 M para el Cu y Zn, respectivamente, NaOH 0,5 M y 1 M para el Cd y Ni, respectivamente, y NaOH 0,075 M para el Pb.

➤ Los mayores incrementos obtenidos con la biomasa, sin lavado posterior al pretratamiento, fueron: Cu 469 %, Cd 450 % y Zn 433 % con Na_2CO_3 y Pb 250 % y Ni 209 % con NaOH . Por su parte, mediante la utilización de la biomasa con lavado posterior al pretratamiento se lograron los siguientes incrementos máximos: Zn 67 %, Cu 167 %, Cd 114 % y Ni 65,7 %.

Pb 65 %, Ni 55 %, Cd 50 % y 19 Cu %, obtenidos con las condiciones óptimas indicadas en el párrafo anterior.

➤ Los valores de pH de equilibrio que se registraron en los procesos de bioadsorción con biomásas pretratadas, sin lavado posterior, fueron, para cada metal, muy semejantes con los tres agentes pretratantes utilizados, a pesar de la diferente alcalinidad de los mismos; esto puso de manifiesto que el pH de pretratamiento alcanzado con los tres agentes fue suficiente para desprotonar totalmente a la biomasa. Estos grupos desprotonados también fueron los causantes del aumento de pH, con respecto a la biomasa sin pretratar, al poder capturar una mayor cantidad de protones del medio. En el caso de la biomasa sometida a lavado posterior al pretratamiento, los valores de pH de equilibrio fueron menores debido a la protonación parcial de los mismos durante el lavado.

➤ Los análisis de difracción de rayos X pusieron de manifiesto la existencia de posibles precipitados metálicos, aunque únicamente en el caso de las biomásas sin lavado posterior al pretratamiento. La formación de estos precipitados podría haber sido inducida por la alcalinidad de la superficie de la biomasa la cual actuaría como centro de nucleación de microprecipitados; de hecho, éste es uno de los mecanismos habitualmente propuestos para justificar el anclaje del metal en la biomasa.

➤ El pretratamiento de la biomasa supuso pérdidas de peso de la misma, debido a la eliminación de determinadas sustancias hidrosolubles presentes en la biomasa original. Asimismo, la cantidad de biomasa recuperada disminuyó a medida que incrementaba la concentración del agente pretratante, así como la basicidad del mismo. En el caso de la biomasa sin lavado posterior al pretratamiento, el porcentaje de biomasa recuperada fue superior al de la sometida a dicho lavado, debido a que las pérdidas de material soluble fueron compensadas con la fijación de los iones sodio en los centros activos de la misma y/o a la retención sobre ella de restos del agente pretratante.

➤ La biomasa pretratada, con lavado posterior, mostró un mejor ajuste al modelo matemático de Langmuir que al de Freundlich. Mediante el primer modelo, se verificó, en el caso de las biomásas pretratadas en condiciones óptimas y lavado posterior, el

siguiente orden de adsorción: $\text{Cu} \sim \text{Ni} \sim \text{Pb} \sim \text{Zn} > \text{Cd}$. Con la biomasa pretratadas, a las concentraciones más altas de las estudiadas con los tres agentes, el orden de adsorción fue el siguiente: $\text{Pb} \sim \text{Cu} > \text{Ni} \sim \text{Zn} > \text{Cd}$. Con estas últimas biomásas, no se consiguieron niveles de adsorción superiores a los logrados con la biomasa pretratada en condiciones óptimas debido, posiblemente, a daños causados en la biomasa por el efecto del propio pretratamiento.

➤ Mediante FTIR se detectó, tras el pretratamiento de la biomasa, seguido o no de lavado, la presencia de los mismos grupos funcionales encontrados en la biomasa original, por lo que los grupos carboxilo podrían tener, también en este caso, el papel prioritario en la fijación de los cationes metálicos. Asimismo, mediante esta misma técnica analítica, se pudo constatar la fijación de sodio en los grupos carboxílicos de la biomasa sin lavado posterior al pretratamiento, así como su posterior intercambio por los correspondientes cationes metálicos. En el caso de la biomasa con lavado posterior al pretratamiento, se pudo verificar la eliminación del sodio prefijado por el efecto de dicho lavado.

➤ La valoración ácido-base de la biomasa confirmó que los grupos carboxílicos fueron los mayoritariamente presentes en la biomasa. Por otro lado, el volumen de valorante que se utilizó para lograr el punto de equivalencia fue mayor en el caso de la biomasa sin lavado posterior al pretratamiento que en la biomasa sin pretratar, lo cual indicaría la generación de nuevos grupos funcionales por la acción del pretratamiento. Por el contrario, en el caso de la biomasa con lavado posterior al pretratamiento, el volumen de valorante fue menor que el de la biomasa sin pretratar, lo que implicaría una eliminación de grupos funcionales, por la disolución de los pequeños fragmentos extraídos durante el pretratamiento.

➤ Las micrografías obtenidas mediante SEM revelaron como, tras el pretratamiento, existió una cierta destrucción de la biomasa siendo ésta de mayor magnitud cuanto mayor fue la alcalinidad del agente pretratante utilizado, dando como consecuencia un aumento en la porosidad superficial. Asimismo, se pudo observar que el lavado de la biomasa implicó, en todos los casos, la eliminación de los pequeños fragmentos extraídos por la acción del pretratamiento.

➤ Mediante microanálisis elemental se detectó, al igual que con FTIR, la aparición de sodio tras el pretratamiento de la biomasa, poniendo de manifiesto la importancia de este elemento como catión de intercambio. Asimismo, se constató también su eliminación en el caso de la biomasa lavada. Por otro lado, tras el pretratamiento, se verificó un cierto aumento en la cantidad de calcio, el cual podría provenir de compuestos pécticos, presentes en el interior de la pared celular, que habrían sido expuestos tras la ruptura de la misma por la acción del pretratamiento. El calcio, al igual que el sodio, pareció participar en los procesos de intercambio con el metal siendo su implicación más importante en el caso de la biomasa con lavado posterior al pretratamiento, debido a la alta resistencia de este elemento a dicho lavado.

5.- BIBLIOGRAFÍA

Abia, A.A., Asuquo, E.D. "Lead (II) and nickel (II) adsorption kinetics from aqueous metal solutions using chemically modified and unmodified agricultural adsorbents". *African Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 5, núm 16, p. 1475-1482.

Ahuja, P., Gupta, R., Saxena, R.K. " Zn^{2+} biosorption by *Oscillatoria angustissima*". *Process Biochemistry*. 1999, vol. 34, p. 77-85.

Aksu, Z., Acikel, Ü., Kutsal, T. "Application of Multicomponent Adsorption Isotherms to Simultaneous Biosorption of Iron(III) and Chromium(VI) on *C. vulgaris*". *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1997, vol. 70, p. 368-378.

Atkinson, B.W., Bux, F., Kassan, H.C. "Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents". *Water SA*. 1998, vol. 24, p. 129-135.

Ballester, A., Verdeja, L.F., Sancho, J. "Metalurgia Extractiva Vol I: Fundamentos". Editorial Síntesis. 2003. ISBN 9788477388036.

Barceló Coll, J., Rodrigo, G.N., Sabater García, B., Sánchez Tamés, R. "Fisiología Vegetal". Ediciones Pirámide, S.A. 1992. ISBN 8436815254.

Berg, L.R. "Introductory Botany, Plants, People and the environment". Saunders College Publishing. 1997. ISBN 9780495105091.

Bingol, A., Uzun, H., Bayhan, Y.K., Karagunduz, A., Cakici, A., Keskinler, B. "Removal of chromate anions from aqueous stream by a cationic surfactant-modified yeast". *Bioresource Technology*. 2004, vol. 94, p. 245-249.

Brady, D., Stoll, A., Duncan, J.R. "Biosorption of heavy metal cations by non-viable yeast biomass". *Environmental Technology*. 1994, vol. 15, p. 429-438.

Brierley, C.L., Brierley, J.A. "Immobilization of biomass for industrial application of biosorption". *Biohydrometallurgical Technologies*. 1993, p. 35-44.

Bux, F., Kasan, H.C. "Comparision of selected methods for relative assessment of surface charge on waste sludge biomass". Water SA. 1994, vol. 20, núm 1, p. 73-76.

Capó Martí, M.A. "Principios de Ecotoxicología". MC. Graw Hill. 2002. ISBN 8448136721.

Cassens, D.L. "Vestured pits in the New World. *Pithecellobium* (sensu lato)". IAWA Bull. 1980, vol. 1, núm 1-2, p. 59-64.

Celaya, R.J., Noriega, J.A., Yeomans, J.H., Ortega, L.J., Ruiz-Manríquez A. "Biosorption of Zn(II) by *Thiobacillus ferrooxidans*". Bioprocess Engieneering. 2000, vol. 22, p. 539-542.

Chen, J.P. "Batch and continuous adsorption of strontium by plant root tissues". Bioresource Technology. 1997, vol. 60, p. 185-189.

Chojnacka, K., Chojnacki, A., Górecka, H. "Biosorption of Cr^{3+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: Kinetics, equilibrium and the mechanism of the process". Chemosphere. 2005, vol. 59, p. 75-84.

Chojnacka, K. "Biosorption of Cr(III) ions by eggshells". Journal of Hazardous Materials. 2005, B121, p. 167-173.

Chong, K.H., Volesky, B. "Description of two-metal biosorption equilibria by Langmuir-Type Models". Biotechnology and Bioengineering. 1995, vol. 47, p. 451-460.

Chong, K.H., Volesky, B. "Metal biosorption equilibria in a ternary system". Biotechnology and Bioengineering. 1996, vol. 49, p. 629-638.

Crist, R.H., Martin, J.R., Carr, D., Watson, J.R. and Clarke, H.J. "Interaction of metals and protons with Algae. 4. Ion Exchange vs adsorption models and reassessment of scatchard plots; Ion-excahnge rates and equilibria compared with calcium alginate". Environmental science & technology. 1994, vol. 28, p. 1859-1866.

Cruz, C.C.V., Da Costa, A.C.A., Henriques, C.A., Luna, A.S. "Kinetic modeling and equilibrium studies during cadmium biosorption by dead *Sargassum* sp. Biomass". *Bioresource Technology*. 2004, vol. 91, p. 249-257.

Dajoz, R. "Tratado de Ecología". Ediciones Mundi-Prensa. 2002. ISBN 8471148285.

Daniels, F., Alberty, R.A. "Physical Chemistry". ED. John Willey and Sons. New York. 1995. ISBN 0471825778 .

Davis, T.A., Llanes, F., Volesky, B., Diaz-Pulido, G., Mc-Cook, L. and Mucci, A. "H-NMR Study of Na Alginates Extracted from *Sargassum* spp. In Relation to Metal Biosorption". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003, vol. 110, p. 75-90.

Davis, T.A., Llanes, F., Volesky, B. and Mucci, A. "Metal Selectivity of *Sargassum* spp. And Their Alginates in Relation to Their alpha-L-Guluronic Acid Content and Conformation". *Environmental Science & Technology*. 2003, vol. 37, núm 2, p. 261-267.

Davis, T.A., Volesky, B., Vieira, R.H.S.F. "Sargassum seaweed as biosorbent for heavy metals". *Water Reseach*. 2000, vol. 34, núm 17, p. 4270-4278.

Ddour, L.A., Belhocine, D., Boudries, N., Comeau, Y., Pauss, A. and Mameri, N. "Zinc updake by *Streptomyces rimosus* biomass using a packed-bed column". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1999, vol. 74, p. 1089-1095.

De Carvalho, R.P., Chong, K.H., Volesky, B. "Evaluation of the Cd, Cu, and Zn biosorption in two-metal systems using an algal biosorbent". *Biotechnol. Prog.* 1995, vol. 11, p. 39-44.

De Robertis (h.) E.M.F, Hib, J., Ponzio, R. "Biología Celular y Molecular". Ed. El Ateneo. 1996. ISBN 9500203642.

Deng, S., Bai, R. "Removal of trivalent and hexavalent chromium with aminated polyacrylonitrile fibers: performance and mechanisms". *Water Research*. 2004, vol. 38, p. 2424-2432.

Deng, S., Ting, Y.P. "Characterization of PEI-modified biomass and biosorption of Cu(II), Pb(II) and Ni(II)". *Water Research*. 2005, vol. 39, p. 2167-2177.

Diniz, V., Volesky, B. "Biosorption of La, Eu and Yb using *Sargassum* biomass". *Water Research*. 2005, vol. 39, p. 239-247.

Dönmez, G., Aksu, Z, Öztürk, A & Kutsal, T. "A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae". *Process Biochem*. 1999, vol. 34, p. 885-892.

Dow, J.M., Rubery, P.H. "Chemical fractionation of the cell walls of mycelial and Yeast-like forms of *Mucor rouxii*: a comparative study of the polysaccharide and glycoprotein components". *Journal of General Microbiology*. 1977, vol. 99, p. 29-41.

Duffus, J.H. "Heavy Metals" - a meaningless term -". *Pure Appl. Chem*. 2002, vol. 74, núm 5, p. 793-807.

Dyson, R.D. "Principios de Biología Celular". Fondo Educativo Interamericano, S.A. 1977.

Esau, K. "Anatomía de las plantas con semilla". Editorial Hemisferio Sur. 1982. ISBN 9500042339.

Esau, K. "Anatomía vegetal". Ed. Omega, S.A. 1972.

Fahn, A. "Anatomía Vegetal". H. Blume Ediciones. 1978.

Figueira, M.M., Volesky, B., Ciminelli, V.S.T. and Roddick, F.A. "Biosorption of metals in brown seaweed biomass". *Water Research*. 2000, vol. 34, núm 1, p. 196-204.

Forster, C.F., Wase, D.A.J. "Biosorbent for Metal Ions, "Biosorption of Heavy Metals: An Introduction". Taylor & Francis Ltd, Great Britain. 1997. p. 1-10. ISBN: 0748404317.

Fourest, E., Volesky, B. "Alginate Properties and Heavy Metal Biosorption by Marine Algae". Applied Biochemistry and Biotechnology. 1997, vol. 67, p. 215-226.

Fourest, E., Volesky, B. "Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of *Saragassum fluitans*". Environmental science & technology. 1996, vol. 30, núm 1, p. 277-282.

Fourest, E., Canal, C., Roux, J.C. "Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation". FEMS Microbiology Reviews. 1994, vol. 14, p. 325-332.

Gadd, G.M. "Biorremedial potencial of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization". Current Opinion in Biotechnology. 2000, vol. 11, p. 271-279.

Galun, M., Galun, E., Siegel, B.Z., Keller, P., Lehr, H. and Siegel, S.M. "Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass: Kinetic and uptake parameters". 1986, p. 359-371.

Gardea-Torresdey, J.L., Becker-Hapak, M.K., Hosea, J.M. and Darnall, D.W. "Effect of Chemical modification of algal carboxyl groups on Metal Ion Binding". Environmental science & technology. 1990, vol. 24, núm 9, p. 1372-1378.

Gardea-Torresdey, J.L., De la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R. "Use of phytofiltration technologies in the removal of heavy metals: A review". Pure and Applied Chemistry. 2004, vol. 76, p. 801-813.

Gerente, C., Reddad, Z., Andres, Y. and Cloirec, P.L. "Competitive adsorption of metals and organics onto a low cost natural polysaccharide". Environmental Technology. 2004, vol. 25, p. 219-225.

Goksungur, Y., Uren, S., Güvenç, U. "Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass". *Bioresource Technology*. 2005, vol. 96, p. 103-109.

Gong, R., Ding, Y., Liu, H., Chen, Q., Liu, Z. "Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass". *Chemosphere*. 2005, vol. 58, p. 125-130.

Graham, L.E., Wilcox, L.W. "Algae". Ed. Prentice Hall; Inc. ISBN: 0-13-660333-5, 2000.

Guibal, E., Milot, C., Eterradosi, O., Gauffier, C., Domard, A. "Study of molybdate ion sorption on chitosan gel by different spectrometric analyses". *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999, vol. 24, p. 49-59.

Gulnaz, O., Saygideger, S., Kusvuran, E. "Study of Cu(II) biosorption by dried activated sludge: effect of physico-chemical environment and kinetics study". *Journal of Hazardous Materials*. 2005, B120, p. 193-200.

Gupta, V.K., Shrivasta, A.K., Jain, N. "Biosorption of Chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species". *Water Research*. 2001, vol. 35, núm 17, p. 4079-4085.

Hamdy, A A. "Biosorption of heavy metals by marine algae". *Current Microbiology*. 2000, vol. 41, núm 4, p. 232-238.

Hammami, A., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, F., Muñoz, J.A. "Effect of presence of lead on the biosorption of copper, cadmium and zinc by activated sludge". *Hydrometallurgy*. 2002, vol. 67, p. 109-116.

Hammami, González, F., Ballester, A., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A. "Simultaneous uptake of metals by activated sludge". *Minerals Engineering*. 2003, vol. 16, p. 723-729.

Hammami, A., Ballester, A., Gonzalez, F., Blázquez, M.L, y Muñoz, J.A. "Activated sludge as biosorbent of heavy metals". En *Biohydrometallurgy and the Environment towards the mining of the 21st century. Part B*. Ed: R. Amils and A. Ballester. Elsevier Science B. U. Ámsterdam. p. 185-192. 1999.

Han, R., Zhang, J., Zou, W., Shi, J., Liu, H. "Equilibrium biosorption isotherm for lead ion on chaff". *Journal of Hazardous Materials*. 2005, B125, p. 266-271.

Hashim, M.A., Chu, K.H. "Biosorption of cadmium by brown, green and red seaweeds". *Chemical Engineerin Journal*. 2004, vol. 97, p. 249-255.

Hawkes, S.J. "What is a "Heavy Metal"?. *J. Chem. Educ.* 1997.

Herrero, R., Lodeiro, P., Rey-Castro, C., Vilariño, T., de Vicente, M.E.S. "Removal of inorganic mercury from aqueous solutions by biomass of the marine macroalga *Cystoseira baccata*". *Water Reseach*. 2005, vol. 39, p. 3199-3210.

Holan, Z.R., Volesky, B., Prasetyo, I. "Biosorption of cadmium by biomass of marine algae". *Biotechnol.* 1993, vol. 41, p. 819-825.

Horsfall Jnr, M., Spiff, A.I. "Effect of metal ion concentration on the biosorption of Pb^{2+} and Cd^{2+} by *Caladium bicolor* (wild cocoyam)". *African Journal of Biotechnology*. 2005, vol. 4, núm 2, p. 191-196.

<http://www.agua.uji.es/pdf/leccionHQ17.pdf> .

<http://www.asesorianutricional.com.ar/oligoelementos.htm>.

Hu, M.Z.-C., Norman, J.M., Faison, Brendlyn D. and Reeves, Mark E. "Biosorption of Uranium by *Pseudomonas aeruginosa* Strain CSU: Characterization and comparison studies". *Biotechnology and Bioengineering*. 1996, vol. 51, p. 237-247.

Huang, C., Huang, C.P. "Application of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* for Cu(II) removal". *Water Reseach*. 1996, vol. 30, núm 9, p. 1985-1990.

Huang, C.P., Westman, D., Quirk, K. and Huang, J.P. "The removal of cadmium (II) from dilute aqueous solutions by fungal adsorbent". *Wat. Sci. Tech.* 1998, vol. 20, núm 11, p. 369-376.

Iyer, A., Mody, K., Jha, B. "Biosorption of Heavy metals by a marine bacterium". *Marine Pollution Bulletin.* 2005, vol. 50, p. 340-343.

Jalai-Rad, R., Ghafourian, H., Asef, Y., Dalir, S.T., Sahafipour, M.H., Gharanjik, B.M. "Biosorption of cesium by native and chemically modified biomass of marine algae: introduce the new biosorbents for biotechnology applications". *Journal of Hazardous Materials.* 2004, B116, p. 125-134.

Kaewsarn, P. "Biosorption of Copper(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine algae *Padina* sp.". *Chemosphere.* 2002, vol. 47, p. 1081-1085.

Kalyani, S., Rao, P.S., Krishnaiah, A. "Removal of nickel (II) from aqueous solutions using marine macroalgae as the sorbing biomass". *Chemosphere.* 2004, vol. 57, p. 1225-1229.

Kamala, C.T., Chu, K.H., Chary, N.S., Pandey, P.K., Ramsh, S.L., Sastry, A.R.K., Sekhar, K.C. "Removal of arsenic(III) from aqueous solutions using fresh and immobilized plant biomass". *Water Reseach.* 2005, vol. 39, p. 2815-2826.

Kapoor, A., Viraraghavan, T. "Biosorption of heavy metals on *Aspergillus Niger*: Effect of pretreatment". *Bioresource Technology.* 1998, vol. 63, p. 109-113.

Kapoor, A., Viraraghavan, T., Cullimore, D.R. "Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*". *Bioresource Technology.* 1999, vol. 70, p. 95-104.

Keskinkan, O., Goksu, M.Z.L., Basibuyuk, M., Forster, C.F. "Heavy metal adsorption properties of a submerged aquatic plant (*Ceratophyllum demersum*)". *Bioresource Technology.* 2004, vol. 92, p. 197-200.

Kuyucak, N., Volesky, B. "Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions". *Biotechnology Letters*. 1988, vol. 10, núm 2, p. 137-142.

Kuyucak, N., Volesky, B. "The Mechanism of Cobalt biosorption". *Biotechnology and Bioengineering*. 1989, vol. 33, p. 823-831.

Lezcano, J.M., González, F., Pérez, I., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., Ballester, A. and Hammami, A. "Use of waste biomass for decontamination of liquid effluents by biosorption". *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development. Part B*. Edited by V. Ciminelli and O. Garcia Jr. Elsevier, Amsterdam. 2001, B, p. 217-226.

Li, P.F., Mao, Z.Y., Rao, X.J., Wang, X.M., Min, M.Z., Qiu, L.W., Liu, Z.L. "Biosorption of uranium by lake-harvested biomass from a cyanobacterium bloom". *Bioresource Technology*. 2004, vol. 94, p. 193-195.

Liao, J., Yang, Y., Luo, S., Liu, N., Jin, J., Zhang, T., Zhao, P. "Biosorption of americium-241 by immobilized *Rhizopus arrhizus*". *Applied Radiation and Isotopes*. 2004, vol. 60, p. 1-5.

Lin, C.C., Lin, H.L. "Remediation of soil contaminated with the heavy metal (Cd^{2+})". *Journal of Hazardous Materials*. 2005, A122, p. 7-15.

Lin, Z., Zhou, C., Wu, J., Zhou, J., Wang, L. "A further insight into the mechanism of Ag^+ biosorption by *Lactobacillus* sp. Strain A09". *Spectrochimica Acta Part A*. 2005, vol. 61, p. 1195-1200.

Lin, Z., Wu, J., Xue, R., Yang, Y. "Spectroscopic characterization of Au^{3+} biosorption by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*". *Spectrochimica Acta Part A*. 2005, vol. 61, p. 761-765.

Lister, S.K., Line, M.A. "potential utilisation of sewage sludge and paper mill waste for biosorption of metals from polluted waterways". *Bioresource Technology*. 2001, vol. 79, p. 35-39.

Liu, H., Fang, H.H.P. "Characterization of Electrostatic Binding Sites of Extracellular Polymers by Linear Programming Analysis of Titration Data". *Biotechnology and Bioengineering*. 2002, vol. 80, núm 7, p. 807-811.

Loaec, M., Olier, R., Guezennec, J. "Uptake of lead, cadmium and Zinc by a Novel Bacterial exopolysaccharide". *Water Reseach*. 1997, vol. 31, núm 5, p. 1171-1179.

Lodeiro, P., Cordero, B., Barriada, J.L., Herrero, R., Sastre de Vicente, M.E. "Biosorption of cadmium by biomass of brown marine macroalgae". *Bioresource Technology*. 2005, vol. 96, p. 1796-1803.

Lodeiro, P., Rey-Castro, C., Barriada, J.L., Sastre de Vicente, M.E., Herrero, R. "Biosorption of cadmium by the protonated macroalga *Saragassum muticum*: Binding analysis with a nonideal, competitive, and thermodynamically consistent adsorption (NINCCA) model". *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, vol. 298, p. 352-358.

Lovley, D.R. "Environmental Microbe-Metal Interactions". American Society for Microbiology, Washintong D.C. 2000.

Lu, Y., Wilkins, E. "Heavy metal removal by caustic-treated Yeast". *Journal of Hazardous Materials*. 1996, vol. 49, p. 165-179.

Macaskie, L.E. "An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows". *J. Chem. Biotechnol*. 1990, vol. 49, p. 357-379.

Mameri, N., Boudries, N., Addour, L. Belhocine, D., Lounici, H., Grib, H. and Paus, A. "Batch Zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass". *Water Reseach*. 1999, vol. 33, núm 6, p. 1347-1354.

Manahan, S.E. "Environmental Chemistry". Sixth Edition. Water Treatment, CRC Press LLC, Florida 33431. 1994, p. 223-262.

Margalef, R. "Ecología". Ediciones Omega. 1991.

Martins, R.J.E., Pardo, R., Boaventura, R.A.R. "Cadmium(II) and Zinc(II) adsorption by the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*: effect of temperature, pH and water hardness". *Water Research*. 2004, vol. 38, p. 693-699.

Mata Contreras, Y.N. "Efecto de la inmovilización de algas en geles de pectina sobre la bioadsorción de metales". Universidad Complutense de Madrid, Facultad de CC. Químicas, Departamento de Ciencia de los materiales e Ingeniería Metalúrgica. 2006.

Matheickal, J.T., Yu, Q. "Biosorption of lead(II) and copper(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of Australian marine algae". *Bioresource Technology*. 1999, vol. 69, p. 223-229.

Matheickal, J.T., Yu, Q., Woodburn, G.M. "Biosorption of Cadmium(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine alga *Durvillaea potatorum*". *Water Research*. 1999, vol. 33, núm 2, p. 335-342.

Mattuschka, B., Junghans, K., Straube, G. "Biosorption of metals by waste biomasses". *Biohydrometallurgical Technologies*. 1993, p. 125-132.

Mauseth, J.D. "Botany. An Introduction to Plant Biology". 3/e. Jones and Bartlett Publishers. Inc. Sudbury, Massachusetts. 2003.

Mauseth, J.D. "Plant Anatomy". The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. 1988.

Mehta, S.K., Gaur, J.P. "Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: Progress and prospects". *Critical Reviews in Biotechnology*. 2005, vol. 25, p. 113-152.

Melo, J.S., D'Souza, S.F. "Removal of chromium by mucilaginous seeds of *Ocimum basilicum*". *Bioresource Technology*. 2004, vol. 92, p. 151-155.

Merdy, P., Guillon, E., Aplincourt, M., Dumonceau, J. and Vezin, H. "Copper Sorption on a Straw Lignin: Experiments and EPR Characterization". *Journal of Colloid and interface Science*. 2002, vol. 245, p. 24-31.

Mittelman, M.W., Geesey, G.G. "Copper-Binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium". *Applied and Environmental Microbiology*. 1985, April, p. 846-851.

Mohapatra, H., Gupta, R. "Concurrent sorption of Zn(II), Cu(II) and Co(II) by *Oscillatoria angustissima* as a function of pH in binary and ternary metal solutions". *Bioresource Technology*. 2005, vol. 96, p. 1387-1398.

Moore, R., Clark, W.D., Stern, K.R. "Botany". WCB-McGraw-Hill, 2nd edition. Boston. 1998.

MOPU, Dirección General del Medio Ambiente. "Los residuos tóxicos y peligrosos". Arte gráfica sagres, S.L. Depósito legal: M-40,216-1982. 1982, p. 309-398.

Morrison, R.T., Boyd, R.N. "Química orgánica". 5ª ed Addison-Wesley Iberoamericana ISBN: 0-201-62931-1. 1990.

Muraleedharan, T.R., Venkobachar, C. "Mechanism of Biosorption of copper(II) by *Ganoderma lucidum*". *Biotechnology and Bioengineering*. 1990, vol. 35, p. 320-325.

Naja G., Mustin. C., Volesky, B., Berthelin, J. "A high-resolution titrator: a new approach to studying binding sites of microbial biosorbents". *Water Research*. 2005, vol. 39, p. 579-588.

Naja, G., Mustin, C. "Lead biosorption study with *Rhizopus arrhizus* using a metal-based titration technique". *J. Colloid Interf. sci*. 2005, vol. 292, núm 2, p. 537-543.

Neide, E., Carrilho, V.M., Ferreira, A.G. and Gilbert, T.R. "Characterization of Sorption Sites on *Pilayella littoralis* and Metal Binding Assessment Using ¹¹³Cd and ²⁷Al Nuclear Magnetic Resonance". *Environmental Science & Technology*. 2002, vol. 36, p. 2003-2007.

Nultsch, W. "Botánica General". Editorial Norma. 1966.

Ozdemir, G., Ceyhan, N., Manav, E. "Utilization of an exopolysaccharide produced by *Chryseomonas luteola* TEM05 in alginate beads for adsorption of cadmium and cobalt ions". *Bioresource Technology*. 2005, vol. 96, p. 1677-1682.

Ozturk, A., Artan, T., Ayar, A. "Biosorption of nickel(II) and copper(II) ions from aqueous solution by *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2004, vol. 34, p. 105-111.

Padilha, F.P., de França, F.P., da Costa, A.C.A. "The use of waste biomass of *Sargassum* sp. For the biosorption of copper from simulated semiconductor effluents". *Bioresource Technology*. 2005, vol. 96, p. 1511-1517.

Pagnanelli, F., Beolchini, F., Biase, A.D., Veglio, F. "Biosorption of binary heavy metal systems onto *Sphaerptilus natans* cells confined". *Water Research*. 2004, vol. 38, p. 1055-1061.

Pagnanelli, F., Mainelli, S., De Angelis, S., Toro, L. "Biosorption of protons and heavy metals onto olive pomace: Modelling of competition effects". *Water Research*. 2005, vol. 39, p. 1639-1651.

Pagnanelli, F., Veglio, F., Toro, L. "Modelling of the acid-base properties of natural and synthetic adsorbent materials used for heavy metal removal from aqueous solutions". *Chemosphere*. 2004, vol. 54, p. 905-915.

Park, D., Yun, Y.S., Park, J.M. "Studies on hexavalent chromium biosorption by chemically-treated biomass of *Ecklonia* sp.". *Chemosphere*. 2005, vol. 60, p. 1356-1364.

Poncet, J.M. "Mejores técnicas disponibles y medio ambiente en la industria primaria de los metales no féreos - Metalurgia del zinc, cobre, plomo y nickel". Centro de publicaciones, Secretaría General Técnica, Ministerio de Obras Públicas, Transporte y medio ambiente. 1996, p. 45-48.

Pretsch, E., Buhlmann, P., Affolter, C., Herrera, A., Martínez, R. "Determinación estructural de compuestos orgánicos". Springer. 2001.

Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J. and Simon, W. "Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos". Springer-Verlag Iberica. Barcelona. 1998.

Puranik, P.R., Paknikar, K.M. "Biosorption of Lead and Zinc from solutions using *Streptovorticillium cinnamoneum* waste biomass". Journal of Biotechnology. 1997, vol. 55, p. 113-124.

Puranik, P.R., Paknikar, K.M. "Influence o co-cations on biosorption of lead and zinc - a comparative evaluation in binary and multimetal systems". Bioresource Technology. 1999, vol. 70, p. 269-276.

Raize, O., Argaman, Y., Yannai, S. "Mechanisms of Biosorption of Different Heavy Metals by Brown Marine Macroalgae". Biotechnology and Bioengineering. 2004, vol. 87, núm 4, p. 451-458.

Ramírez, A. "Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos". Anales de la Facultad de Medicina. 2002, vol. 63, núm 1, p. 51-64.

Rangsayatorn, N., Pokethitiyook, P., Upatham, E.S., Lanza, G.R. "Cadmium biosorption by cells of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel". Environment International. 2004, vol. 30, p. 57-63.

Raven, P.H., Evert R.F., Eichhorn, S.E. "Biología de las Plantas". Ed. Reverté, S.A. 1991.

Raven, P.H., Evert R.F., Eichhorn, S.E. "Biology of Plants". W.H. Freeman: Worth 6th ed. New York. 1999.

Reddad, Z., Gérente, C., Andres, Y., Ralet, M.C., Thibault, J.F, Le Cloirec, P. "Ni(II) and Cu(II) binding properties of native and modified sugar beet pulp". Carbohydrate Polymers. 2002, vol. 49, p. 23-31.

Rey-Castro, C., Herrero, R., Sastre de Vicente, M.E. "Surface charge and permeable gel descriptions of the ionic strength influence on proton binding to seaweed biomass". Chemical Speciation and Bioavailability. 2004, 16(1/2), p. 61-69.

Rodríguez, F.G., Rodríguez, I.I. "Eliminación de Metales Tóxicos Mediante Zeolitas Naturales". Laboratorio de Ing. de Zeolitas, IMRE, Informe interno de la Universidad de La Habana. Inst. Superior Minero Metalúrgico, Moa, Holguín, Cuba. 2000.

Romera, E., Gonzalez, F., Ballester, A., Blázquez, M.L, and Muñoz, J.A. "Biosorption with Algae: A Statistical Review". Critical Reviews in Biotechnology. 2006, vol. 26, p. 223-235.

Romera, E., González, F., Ballester, A., Blázquez, M.L., and Muñoz, J.A. "Biosorption of heavy metals by *Fucus spiralis*". Bioresource Technology. En prensa (disponible *on line*). 2008.

Romero-González, M.E., Williams, C.J., Gardiner, P.H.E. "Study of the mechanisms of Cadmium Biosorption by Dealginated Seaweed Waste". Environmental Science & Technology. 2001, vol. 35, núm 14, p. 3025-3030.

Rossi, G. "Biohydrometallurgy". Chapter 6: "Biosorption" Mc Graw-Hill-New York. 1990.

Rossotti, F.J.C., Rosotti, H. J. Chem. Educ. 1965, vol. 42, p. 375.

Rost, T.L., Barbour, M.G., Thornton, R.M., Weier, T.E. & Stocking, C.R. "Botany. A Brief Introduction To Plant Biology". Wadsworth Publishing Company. Belmont. 1998.

Ruiz-Manríquez, A., Magaña, P.L., López, V., Guzmán, R. "Biosorption of Cu by *Thiobacillus ferrooxidans*". Bioprocess Engineering. 1998, vol. 18, p. 113-118.

Saeed, A., Lqbal, M., Akhtar, M.W. "Removal and recovery of lead(II) from single and multimetal (Cd, Cu, Ni, Zn) solutions by crop milling waste (black gram husk)". Journal of Hazardous Materials. 2005, B117, p. 65-73.

Sánchez Báscones, M.I. "Determinación de metales pesados en suelos de Medina del Campo (Valladolid): contenidos extraíbles, niveles fondo y de referencia". ISBN: 84-688-8132-5. 2004.

Sánchez, A., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, F., Muñoz, J., Hammami, A. "Biosorption of copper and zinc by *Cymodocea nodosa*". Microbiology Reviews. 1999, vol. 23, p. 527-536.

Sancho, J., Verdeja, L.F., Ballester, A. "Metalurgia Extractiva Vol II: Editorial Síntesis". 2003.

Sar, P., Kazy, S.K., Asthana, R.K., Singh, S.P. "Metal adsorption and desorption by lyophilized *Pseudomonas aeruginosa*". International Biodeterioration & Biodegradation. 1999, vol. 44, p. 101-110.

Satiroglu, N., Yalcinkaya, Y., Denizli, A., Arica, M.Y., Bektas, S., Gernc, Ö. "Application of NaOH treated *Polyporus versicolor* for removal of divalent ions of Group IIB elements from synthetic wastewater". Process Biochemistry. 2002, vol. 38, p. 65-72.

Sekhar, K.C., Kamala, C.T., Chary, N.S., Sastry, A.R.K., Rao, T.N., Vairamani, M. "Removal of lead from aqueous solutions using an immobilized biomaterial derived from a plant biomass". Journal of Hazardous Materials. 2004, B108, p. 111-117.

Seki, H., Suzuki, A., Maruyama, H. "Biosorption of chromium(VI) and arsenic(V) onto methylated yeast biomass". Journal of Colloid and interface Science. 2005, vol. 281, p. 261-266.

Sharma, P.K., Balkwill, D. L., Frenkel, A., Vairavamurthy, M.A. "A new *Klebsiella planticola* Strain (Cd-1) Grows Anaerobically at High Cadmium Concentrations and

Precipitates Cadmium Sulfide". *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, vol. 66, núm 7, p. 3083-3087.

Sheeler, P., Bianchi, D.E. "Cell Biology: Structure, Biochemistry, and Function". John Wiley & Sons. 1980.

Sheng, P.X., Ting, Y.P., Chen, J.P., and Hong, L. "Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms". *Journal of Colloid and interface Science*. 2004, vol. 275, p. 131-141.

Sheng, P.X., Ting, Y.P., Chen, J.P. "Biosorption of heavy metal ions (Pb, Cu and Cd) from aqueous solutions by the marine alga *Sargassum* sp. in single- and multiple-metal systems". *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2007, vol. 46, núm 8, p. 2438-2444.

Smith, R.L., Smith, T.M. "Ecología". Editorial Addison Wesley. 2000.

Solomons, Graham, T.W. "Química Orgánica". 2ª Edición. Ed.Limusa Wiley. 1990.

Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K. "Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria". *Chemosphere*. 2002, vol. 48, p. 427-435.

Strasburger E., Ziegler, H., Sitte, P. "Tratado de Botánica". 8ª ed. castellana. Ediciones Omega S.A. 1994.

Strasburguer, E., Noll, F., Schench, H. and Schinper, A.F.W. "Tratado de botánica". 35 ed. Omega ISBN. 84-282-1353-4. 2003.

Lee, H.S., Volesky, B. "Interference of aluminium in copper biosorption by an algal biosorbent". *Water Qual. Res. J. Canada*. 1999, vol. 34, núm 3, p. 519-533.

Synytsya, A., Copikova, J., Matejka, P., Machovic, V. "Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins". *Carbohydrate Polymers*. 2003, vol. 54, p. 97-106.

Tiemann, K.J., Gamez, G., Dokken, K., Parsons, J.G., Gardea-Torresdey, J.L. "Chemical modification and X-ray absorption studies for Lead(II) binding by *Medicago sativa* (alfalfa) biomass". *Microchemical Journal*. 2002, vol. 71, p. 287-293.

Veglio, F., Esposito, A., Reverberi, A.P. "Copper adsorption on calcium alginate beads: equilibrium pH-related models". *Hydrometallurgy*. 2002, vol. 65, p. 43-57.

Vijayaraghavan, K., Jegan, J., Palanivelu, K., Velan, M. "Biosorption of copper, cobalt and nickel by marine green alga *Ulva reticulata* in a packed column". *Chemosphere*. 2005, vol. 60, p. 419-426.

Vijayaraghavan, K., Palanivelu, K., Velan, M. "Crab shell-based biosorption technology for the treatment of nickel-bearing electroplating industrial effluents". *Journal of Hazardous Materials*. 2005, B119, p. 251-254.

Volesky, B. "Biosorption of heavy metals". CRC press, Tnc, USA. 1990, p. 7-43.

Volesky, B. "Sorption and Biosorption". BV-Sorbex, Inc., St.Lambert, Quebec. 2003. ISBN 0973298308.

Vullo, D.L. "Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente". *Química Viva*. 2003.

Wang, C.L., Michels, P.C., Dawson, S.C., Kitisakkul, S., Baross, J.A, Kreasling, J.D. And Clark, D.S. "Cadmium Removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture.". *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, vol. 63, núm 10, p. 4075-4078.

Wang, J., Chen, C. "Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review". *Biotechnol Adv.*. 2006, vol. 24, núm , p. 427-451.

Webster, E.A., Murphy, A.J., Chudek, J.A. & Gadd, G.M. "Metabolism-independent binding of toxic metals by *Ulva lactuca*: cadmium binds to oxygen-containing groups, as determined by NMR". *BioMetals*. 1997, vol. 10, p. 105-117.

Wepener, V., Van Vuren, J.H.J, Du Preez, HH. "Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*". *Water SA*. 2004, vol. 27, núm 1, p. 99-108.

Yan, G., Viraraghavan, T. "Effect of pretreatment on the bioadsorption of heavy metals on *Mucor rouxii*". *Water SA*. 2000, vol. 26, núm 1, p. 119-124.

Yetis, U., Dolek, A., Dilek, F.B. and Ozycengiz, G. "The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium*". *Water Reseach*. 2000, vol. 34, núm 16, p. 4090-4100.

Yin, P., Yu, Q., Bo Jin and Zhao Ling. "Biosorption removal of cadmium from aqueous solution by using pretreated fungal biomass cultured from starch wastewater". *Water Reseach*. 1999, vol. 33, núm 8, p. 1960-1963.

Yu, Q., Kaewsarn, P. "Binary adsorption of copper(II) and Cadmium(II) from aqueous solutions by biomass of marine alga *Durvillaea potatorum*". *Separation science and technology*. 1999, vol. 34, núm 8, p. 1595-1605.

Yu, H., Covey, G.H., O'Connor, A.J. "Silvichemicals from pulp mill wastes - biosorption of metal ions on ellagic acid". *Appital Journal*. 2001, vol. 54, núm 6, p. 511-517.

Zhou, D., Zhang, L., Guo, S. "Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads". *Water Reseach*. 2005, vol. 39, p. 3755-3762.