



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“COLORANTES USADOS EN TEXTILES ARTESANALES E INDUSTRIALES.
ANALISIS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN DE ANILINAS SINTÉTICAS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Químico Ambiental

CLAUDIA CAMPOS RUIZ

Directores del Seminario de Título: Dr. Álvaro Aliaga Cerón
Dr. Marcelo Campos Vallette
Dr. Carlos Garrido Leiva

Noviembre 2017

Santiago - Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Claudia Andrea Campos Ruiz

“COLORANTES USADOS EN TEXTILES ARTESANALES E INDUSTRIALES. ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN DE ANILINAS SINTÉTICAS”

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental.

Directores Seminario de Título:

Dr. Álvaro Aliaga Cerón _____

Dr. Marcelo Campos Vallette _____

Dr. Carlos Garrido Leiva _____

Comisión Revisora y Evaluadora:

Presidente Comisión:

Dr. Richard Toro Araya _____

Evaluador:

Dr. Ernesto Clavijo Campos _____

Santiago de Chile, Noviembre 2017

Agradecimientos

Este trabajo contó con financiamiento de los proyectos Fondecyt 3140492, 11150944 y 1140524.

A todos los habitantes del laboratorio de Espectroscopía Vibracional de la Universidad de Chile, por su paciencia. Especialmente a Álvaro Aliaga y al Profe Marcelo Campos.

A la profesora Cecilia Labbé, que -a su manera- me obliga a hacer las cosas.

Mención de amor infinito a Marisol Aravena, Secretaria de Escuela de Pregrado. El que sabe, sabe.

A la tía del kiosko sur, por alimentarme durante toda mi vida universitaria.

A todos mis compañeros de generación, donde sea que anden. A los Oblatos y las Spice Girls, con los que trasnochamos estudiando y sufriendo por llegar hasta acá.

A mi abuela, por estar siempre aunque ya no esté.

Y a Javiera, mi compañera de vida. Por convencerme que sí podía.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Antecedentes Generales	8
1.1.1. Colorantes naturales y sintéticos	8
1.1.2. Proceso de teñido textil	8
1.1.3. Detección de colorantes textiles	9
1.1.3.1. Detección de colorantes mediante espectroscopía Raman.....	10
1.1.4. Gestión ambiental de colorantes textiles	12
1.1.5. Tratamientos de efluentes en la industria textil.....	14
1.3. Objetivos Generales.....	17
1.4. Objetivos Específicos	17
II. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1. Materiales	18
2.1.1. Reactivos	18
2.2. Métodos Analíticos	18
2.2.1. Análisis de anilinas comerciales	19
2.2.1.2. Registros Uv-Vis y Raman	19
2.2.2. Preparación de coloides de plata	20
3.3. Revisión bibliográfica.....	20
III. RESULTADOS	21
3.1. Microscopía óptica.....	21
3.1.1. Anilina Roja	21
3.1.2. Anilina Negra.....	22
3.2. Espectros Uv-Vis	23
3.3. Espectros Raman	26
3.4. Muestra con adición de coloides de plata (SERS)	30
IV. DISCUSIÓN GENERAL	38
V. CONCLUSIONES	41
V.I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diluciones y solventes para registro Uv-Vis de anilinas comerciales	20
Tabla 2: Códigos de actividades industriales relacionadas con el uso de azocolorantes, definidos según D.S.609/2004.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cristales observados en la muestra de anilina roja	21
Figura 2: Secado de cristales de anilina roja en agua destilada. Imágenes bajo microscopio.....	22
Figura 3: Cristales anilina negra bajo microscopio	22
Figura 4: Separación y secado de cristales de colores amarillo, azul y rojo derivados de anilina negra comercial disuelta en agua. Imagen bajo microscopio.	23
Figura 5: Espectros Uv-Vis para anilina roja en agua, metanol y etanol.....	24
Figura 6: Espectros Uv-Vis para anilina negra en distintos solventes.	25
Figura 7: Espectros Raman de anilinas: a) roja, b) negra cristales rojos, c) negra cristales amarillos, d) negra cristales azules. Línea laser 633 nm.	27
Figura 8: Espectros Raman de anilinas: a) roja, b) negra cristales rojos, c) negra cristales amarillos, d) negra cristales azules. Línea laser 785 nm.	28
Figura 9: Espectros Raman de soluciones acuosas de anilinas negra y roja. Línea laser 785 nm.	31
Figura 10: Espectros a) Raman de cristales azules, b) SERS solución roja y c) SERS solución azul. Línea laser 785 nm.	32
Figura 11: Espectros Raman de referencia y estructura molecular para muestras rojo y amarillo. Línea láser 785nm.....	39
Figura 12: Espectro de absorción para Indigotina en (1) agua, (2) etilenglicol, (3) DMSO, (4) metanol, (5) DMF. Incluye estructura del pigmento indigotina	39

LISTA DE ABREVIATURAS

DBO: Demanda Biológica de Oxígeno

DQO: Demanda Química de Oxígeno

ETAD: Asociación Ecológica y Toxicológica de Fabricantes de Colorantes y Pigmentos Orgánicos (*The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers*)

GC: Cromatografía Gaseosa (*Gas Chromatography*)

HPLC: Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (*High-Performance Liquid Chromatography*)

OCPSF: Fibras Sintéticas Plásticos y Sustancias Químicas Orgánicas (*Organic Chemicals, Plastics and Synthetic Fibers*)

RILes: Residuos industriales Líquidos

SERS: Dispersión Raman Amplificada por Superficie (*Surface-Enhanced Raman Scattering*)

USEPA/ EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*)

Resumen

Los colorantes naturales, extraídos de hojas y raíces de plantas como el extracto de Henna, han sido utilizados desde la antigüedad para otorgar color a todo tipo de indumentarias textiles. El desarrollo de colorantes sintéticos, como las anilinas y los azocompuestos, favoreció el crecimiento de la industria textil moderna, por la gran variedad de colores que se pueden obtener y por el bajo costo de preparación. Estos colorantes podrían presentar problemas relativos a su toxicidad en humanos y animales. Los colorantes sintéticos son de difícil tratamiento, en lo referente a sus posibles efectos tóxicos para el medio ambiente, presentando gran variedad de compuestos de degradación, muchas veces de mayor toxicidad. Por esta razón es necesario analizar los colorantes sintéticos y/o los compuestos de degradación obtenidos en los residuos líquidos industriales.

Una de las técnicas que permite la identificación de los colorantes sintéticos es la espectroscopía Raman, la que adquiere un carácter de herramienta analítica si el colorante analizado se encuentra interactuando con superficies metálicas nanoestructuradas. Esto da origen a la espectroscopía Raman amplificada por superficie (SERS), permitiendo así acceder a información vibracional para analitos que se encuentran en bajas concentraciones (trazas).

El objetivo principal de este seminario de título es la identificación vibracional mediante espectroscopia Raman, de anilinas comerciales utilizadas en la industria textil. Los resultados permiten proyectar la detección de anilinas comerciales en desechos industriales líquidos, si se considera una mejora en las condiciones de análisis que permitan una interacción óptima entre la superficie metálica y el analito.

Abstract

Anilines and azo compounds are the most commonly used type of dye since their development in mid-19th century. They are used as direct dyeing agents in art, textile and cosmetic industries, as well as in other forms of production. Low manufacturing costs and the availability of extensive color palettes have favored their development and growth. One problem with these dyeing agents is that they have been suspected of causing harmful effects to both humans and the environment, particularly as carcinogenic and mutagenic agents.

Waste treatment and environmental impact assessment for azo dyes is complex, since the large variety of azo structures available in the market, and their possible degradation products, can represent varying degrees of risk. Therefore an analysis of the azo compounds used locally and their possible byproducts in wastewater is necessary.

Raman Spectroscopy is a technique that allows for identification of synthetic dyes, becoming an analytical tool when coupled with nanostructured metallic surfaces. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) allows for the identification of trace amounts of a substance by giving information on the vibrational modes of the molecule.

The main goal of this seminar is the identification of commercially available azo anilines using Raman Spectroscopy. The results allow for future work on the identification of these compounds in wastewater given that the conditions of the analysis improve the interaction between the metallic nanostructure and the azo dye. These new conditions should allow for a better identification of both the presence and the identity of the dyes in use.

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes Generales

1.1.1. Colorantes naturales y sintéticos

Los colorantes naturales son compuestos orgánicos extraídos de plantas, animales o insectos, y que otorgan color a estos organismos. Han sido utilizados desde la antigüedad como componentes en la decoración textil y otras formas de arte.

Por ejemplo, el extracto de la planta de Henna (*Lawsonia inermis*) presenta una amplia gama de colores como amarillo, naranja, café y rojo, siendo utilizado en las culturas ancestrales para teñir textiles (lanas y sedas), cueros y en decoración estética humana (cabello, uñas y piel). La lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) es el colorante extraído de la Henna y la fijación a textiles ocurre a través de la formación de enlace peptídico con la queratina presente en las fibras.

En bajas concentraciones al interactuar con sistemas biológicos, el extracto de Henna promueve la acción antioxidante y antiinflamatoria, e inhibe el crecimiento de carcinoma (Kapadiay col.2013), sin presentar genotoxicidad (Kirkland & Marzin 2003) o riesgos para la salud (Nohynek y col. 2004). En casos extremos, la ingestión del extracto de Henna conduce a daño renal con riesgo de muerte (Rund y col. 2007).

La escasez y alto costo de obtención de los colorantes naturales, en conjunto a la dificultad de obtener una amplia gama de colores, promovieron el desarrollo de compuestos orgánicos sintéticos. En el siglo XIX, se desarrollaron nuevas técnicas para obtener colorantes sintéticos al tratar químicamente derivados aromáticos (Ar-R) con sales de diazonio ($\text{Ar}'\text{-N}^+\equiv\text{N X}^-$), formando los llamados azocompuestos ($\text{Ar}'\text{-N}=\text{N-Ar-R}$). Los derivados de aminas aromáticas son ampliamente utilizados para sintetizar azocompuestos, generando una amplia gama de colores.

1.1.2. Proceso de teñido textil

En la actualidad, los colorantes más utilizados en la industria textil son las quinonas, las anilinas y los azocompuestos. El proceso de teñido textil involucra el uso de colorantes y otros compuestos, que permiten la fijación del color y modificación de las propiedades de la fibra, en cuanto a suavidad, firmeza y textura.

Existen dos factores que inhiben la fijación de los colorantes. El primero es la presencia de aceites usados para tejer la fibra, por lo cual se deben extraer previamente. El segundo factor es la alta solubilidad en agua de los colorantes, que favorece una rápida adsorción y desorción en los tejidos. Por esa razón es fundamental agregar un agente para la fijación del color a las fibras. Los compuestos capaces de fijar los colorantes a las fibras se llaman mordientes. En sus orígenes, se utilizaron como mordientes sulfato de hierro (III) y sulfato de cobre (II). El mordiente forma un complejo estable, ligándose al colorante y a las proteínas de la fibra; el color obtenido en las fibras textiles es dependiente tanto del colorante como del mordiente.

El proceso de fijación del color en las fibras textiles es altamente dependiente de la efectividad de los mordientes. Esta limitación llevó a la búsqueda de colorantes sintéticos capaces de acomplejarse directamente a las proteínas de la fibra. El rojo de Congo es el primer azocompuesto que no necesitó mordiente para fijarse a la fibra de algodón (Rappoport 2007), formando enlace peptídico con los grupos amino de la queratina presente en la fibra. Esta acción permite aumentar considerablemente la fijación a las fibras; sin embargo, esta propiedad potencia su efecto tóxico en seres humanos y animales. Los compuestos capaces de fijarse sin uso de mordientes están en desuso y tienen restricciones para ser utilizados en la industria química debido a su toxicidad para el medio ambiente y las personas.

1.1.3. Detección de colorantes textiles

El uso de colorantes sintéticos en la industria química es amplio, siendo los segmentos textil, farmacéutico, cosmetológico y alimentario, los que más utilizan los azocompuestos para dar coloración a sus productos.

La parafenilendiamina (PPD), colorante sintético utilizado comúnmente como aditivo a la Henna, permite la obtención del color negro. La PPD provoca reacciones alérgicas severas y desarrollo de hipersensibilidad a colorantes de similar estructura (Gallo y col. 1999; Le Coz y col. 2000; Saunders y col. 2004).

En Estados Unidos, los métodos estándar para la detección de azocompuestos son los establecidos por la EPA. El método EPA 8321A/B especifica la detección de compuestos orgánicos no volátiles mediante cromatografía líquida de alta resolución

con detección masa o UV, especialmente formulado para azopigmentos y compuestos organofosforados en matrices acuosas, RILes, suelos y sedimentos. El método EPA 8131 especifica la detección de anilinas y sus derivados mediante cromatografía de gases en matrices acuosas.

Las técnicas cromatográficas han sido utilizadas para la detección de anilinas y azocompuestos, empleando diversas condiciones en fase gaseosa o en fase líquida. La cromatografía gaseosa (GC) descompone la muestra en subgrupos, detectándolos en forma independiente, con diferencias en la sensibilidad según corresponda. Por otra parte, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) requiere extracciones ácidas de la muestra previa a su uso, lo que puede afectar la estructura de ciertos colorantes básicos. Finalmente, no es posible utilizar colorantes sulfurados en HPLC porque reacciona con la fase estacionaria y no discrimina especies con grupos funcionales distintos, como por ejemplo antraquinona y anilina. En esa perspectiva, la espectroscopia Raman presentaría ventajas sobre estos métodos porque se detecta directamente a un analito presente en una muestra.

1.1.3.1. Detección de colorantes mediante espectroscopía Raman.

El fundamento de la espectroscopía Raman implica que los fotones emitidos por un laser (luz monocromática) perturban la polarización de los enlaces en un compuesto. La diferencia energética entre los fotones dispersados por el compuesto y los fotones incidentes del laser es equivalente a la energía de enlaces en el compuesto, es decir, corresponden a las vibraciones moleculares de los enlaces de la muestra. Es así como el espectro Raman representa un patrón único de identificación molecular análogo al concepto de huella dactilar.

La dispersión Raman es un proceso de baja eficiencia comparado con la emisión fluorescente de algunos compuestos aromáticos, razón por la cual las señales Raman muchas veces no son observadas en un espectro cuando está presente la fluorescencia (Brosseau y col. 2009). Al poder controlarse variables experimentales como la potencia y la línea láser de excitación, la espectroscopía Raman permite el análisis no destructivo de una muestra, en este caso sin daños en la fibra o en el

colorante. El acoplamiento de la técnica Raman a microscopía óptica le otorga selectividad y especificidad a nivel micrométrico.

La microscopía Raman es aplicable a la determinación de colorantes utilizados en obras artísticas, arquitectónicas o arqueológicas, sin recurrir a una intervención o remoción de muestra. En el caso del colorante lawsona, los anillos aromáticos favorecen la emisión fluorescente de los fotones absorbidos en el rango Uv-Vis. Para evitar la fluorescencia se trabaja con una línea de excitación en el rango infrarrojo, la cual tiene una energía menor a la absorción Uv-Vis necesaria para inducir la emisión fluorescente.

Las limitaciones en cuanto a la eficiencia de la dispersión Raman, pueden resolverse mediante la adsorción del analito sobre una superficie metálica nanoestructurada (Heo y col. 2011). Cuando los fotones incidentes se encuentran en resonancia con la oscilación coherente de los electrones de conducción del metal se obtiene una gran amplificación de la señal Raman, la cual puede aumentar en varios órdenes de magnitud. El uso de nanoestructuras rugosas de plata u oro evita la reactividad con el analito e inducen la desactivación no radiativa del sistema (apagamiento de la fluorescencia). Por otra parte el disponer de superficies metálicas dotadas de rugosidad a nivel nanométrico permite dar origen a fenómenos de amplificación de la señal Raman cuando el analito interactúa con dichas superficies, dando origen a la espectroscopia SERS (Moskovits 1985). La espectroscopia SERS ha sido utilizada para identificar colorantes en una muestra a través de la creación in situ de superficies de nanopartículas de plata, sin necesidad de extraer el colorante, obteniendo sus espectros característicos (Lee & Meisel 1982; Bell y col. 1997; Leona y col. 2011).

En primera instancia, la espectroscopía SERS es capaz de determinar la presencia de colorantes en rangos de concentración 10^{-6} a 10^{-8} M. Para una cuantificación analítica, es posible desarrollar una metodología que incluya tratamientos posteriores a la muestra o al sistema; sin embargo esto se escapa de los objetivos de este seminario.

1.1.4. Gestión ambiental de colorantes textiles

Con el aumento de las restricciones ambientales, un gran número de colorantes han sido prohibidos en la industria textil, principalmente por los efectos tóxicos en seres humanos y animales. Los estudios desarrollados por la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (USEPA) han determinado que las descargas de desechos de la industria de los colorantes se clasifica como desechos peligrosos (Environmental Protection Agency 2005).

Los efluentes de las industrias que utilizan colorantes tanto en producción como en textil se caracterizan por contener altos niveles de DQO, compuestos químicos recalcitrantes orgánicos e inorgánicos, surfactantes y sólidos disueltos, además de presentar variaciones de temperatura, pH y color. Se ha detectado también presencia de metales pesados como cobre, níquel y cromo (Grau 1991).

Uno de los métodos más comunes y aplicados en el tratamiento de efluentes de la industria textil es el uso de lodos activados y sus modificaciones, donde se combinan con procesos físicos y químicos. Estos procesos dependen de caudales y características de los efluentes, y son en general ineficientes al tratar residuos líquidos coloreados (Vandevivere y col. 1998; Correia y col. 1994; Uygur & Kök 1999).

Los azocompuestos no son degradables por tratamientos convencionales de degradación oxidativa, sin embargo es posible lograr decoloración del colorante mediante digestión anaeróbica, reduciendo el enlace azo y generando aminas aromáticas que resisten mayor degradación y generan genotoxicidad (Gottlieb y col. 2003).

Se ha observado azocompuestos que se mantienen en los lodos de tratamiento y no infiltran los rellenos de disposición final. Otros colorantes no muestran permanencia en lodos y resisten degradación y decoloración, manteniéndose en solución y potencialmente en residuos líquidos y/o en descarga a cuerpos de agua. La diferencia en comportamiento radica en la naturaleza química de cada colorante (Ganesh y col. 1994). Estos compuestos presentan actividad carcinogénica (Brown & De Vito 1993) y afectan la actividad microbiana en sedimentos y columnas de agua en hábitats acuáticos (Chung & Stevens 1993).

De forma adicional a los límites de descarga para parámetros estándar (DBO, pH, sólidos disueltos), la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) establece regulaciones adicionales para plantas de manufactura y descarga de pigmentos orgánicos, en estándares y guía de descarga para sustancias orgánicas, plásticos y fibras sintéticas (OCPSF, por sus siglas en inglés). Esta normativa de código 40 CFR 414.80-85, establece límites de descarga para una gran cantidad de sustancias —entre ellas anilina y sus derivados— independiente de si éstas son o no llevadas a plantas de tratamiento (Environmental Protection Agency 2005). Estos compuestos se encuentran en los efluentes como subproductos del tratamiento de colorantes o bien como reactivos en exceso en el proceso de síntesis.

La Unión Europea cuenta con directivas específicas para azocolorantes. En particular la regulación REACH Annex VIII, en vigencia desde el año 2009, lista a todos aquellos azocolorantes que debido a su estructura puedan liberar aminas aromáticas al ser tratados. Si los productos de este tratamiento se encuentran en la regulación REACH, estos azocolorantes no pueden ser distribuidos o utilizados en fibras textiles que estén en contacto con la piel o mucosas, como tampoco pueden ser utilizados en cuero o cualquier material donde el colorante esté expuesto al consumidor final. (The Commission of the European Communities 2009).

Los azocolorantes fabricados a partir de bencidina y sus derivados son los que presentan más riesgos para la salud de los trabajadores que los manipulan. Debido a esto, en 1992 la Asociación Ecológica y Toxicológica de Fabricantes de Colorantes y Pigmentos Orgánicos (*ETAD*, por sus siglas en inglés) decidió que todos sus miembros debían voluntariamente cesar la operación y producción de azocolorantes derivados de bencidina. Diversas compañías de Estados Unidos y Europa ya habían dejado de utilizar estos compuestos debido a regulaciones anteriores. Esto provocó que países miembros de la organización de otros continentes tuviesen que aumentar sus producciones para cumplir con la demanda, por lo tanto, decidieron retirarse de la organización (Organization for Economic Cooperation and Development 2002).

De esta forma, la manufactura de estas sustancias prohibidas en general se traslada a países en vías de desarrollo, o no adscritos a tratados internacionales, en muchos casos desprovistas de sistemas adecuados de seguridad e higiene ocupacional (Woodward & Clarke 1997).

En Chile no existen normativas aplicables específicas para azocolorantes, tanto en forma de regulación de desechos como de uso comercial en textiles. Las únicas regulaciones aplicables son las correspondientes a descarga de RILes a distintos cuerpos de agua, y en particular los parámetros DBO y sólidos disueltos totales. Estos parámetros son aplicables para una gran cantidad de compuestos y no representan una regulación particular del uso de azocolorantes en el país. El uso de colorantes artificiales es común tanto a nivel industrial como a nivel artesanal, como es el caso de la tinción de fibras y textiles con anilinas.

Actualmente en Chile existen siete empresas en el rubro de anilinas y tintas, relativo a la producción, comercialización y/o teñido textil (Sociedad de Fomento Fabril 2012). En el Sistema de Evaluación Ambiental se registran dos proyectos para manejo de desechos industriales, el primero enviado a una empresa de tratamiento de residuos (Servicio de Evaluación Ambiental - Comisión de Evaluación 2014), mientras el otro fue declarado inadmisibles debido a incumplimientos administrativos (Comisión Regional del medio Ambiente 2007).

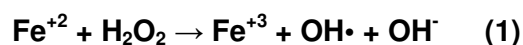
1.1.5. Tratamientos de efluentes en la industria textil

Los efectos en el ambiente provocados por descargas no tratadas de la industria textil pueden ser evidenciados en países que usan estos colorantes en forma masiva como por ejemplo en China; allí las descargas de la industria textil presentan una alta Demanda Química de Oxígeno (DQO), altas concentraciones de sales y metales pesados, y cuerpos de agua contaminados visualmente (coloreados) que afectan en parte la penetración de la luz. Estos efectos son provocados por la presencia de colorantes y mordientes en efluentes de la industria textil. Debido a la gran variabilidad química de los colorantes, su tratamiento se hace complejo y muchas veces es de alto costo para las empresas (Wang y col. 2010).

Existen métodos de tratamiento de efluentes en la industria textil. Los métodos fisicoquímicos más comunes utilizan membranas o carbón activado para extraer los colorantes; sin embargo, no los elimina completamente de los residuos de la empresa. Existen diversas experiencias a escala piloto de tratamiento de efluentes mediante adsorción en una matriz de carbón activado o biodegradación utilizando biodiscos

rotatorios (Yonar 2006). Los métodos químicos se basan en la oxidación de los colorantes, generando diversos productos en los efluentes, con diferencias en toxicidad. Los métodos oxidativos de tratamiento de efluentes más utilizados son el proceso Fenton y el tratamiento con ozono, porque son los más eficientes en términos de costo y rendimiento.

Oxidación Fenton: utiliza Fe (II) y peróxido de hidrógeno para generar radicales hidroxilo según la reacción:



donde los radicales hidroxilos pueden reaccionar iniciando la oxidación de contaminantes orgánicos:



Estas reacciones se llevan a cabo a pH < 4,0. A pH neutro y alcalino los iones ferrosos forman iones férricos con tendencia a producir complejos, mientras el peróxido es inestable y se descompone (Kuo 1992).

El proceso Fenton se lleva a cabo en 4 etapas; inicialmente, se ajusta el pH a valores bajos. Luego, las reacciones de oxidación ocurren a pH 3-5; posteriormente, se neutraliza el efluente a pH 7-8 y finalmente ocurre la precipitación.

El proceso Fenton es fácil de aplicar, económico y útil para la degradación de un rango importante de compuestos orgánicos. Es posible utilizar este proceso como pre-tratamiento para compuestos resistentes a tratamiento biológico. Su principal ventaja es que no requiere de energía para generar radicales hidroxilo, transformándose en una fuente eficiente de radicales (Bigda 1995; Lee & Shoda 2008).

Ozono/peróxido de hidrógeno: es utilizado principalmente para contaminantes cuya oxidación es difícil, consumiendo grandes cantidades de ozono como oxidante, el cual ataca enlaces dobles carbono-carbono (Stowell & Jensen 1991) o anillos aromáticos (Andreozzi y col. 1991) presentes en las moléculas de contaminante. Una dificultad es el alto costo del ozono. La combinación de ozono con peróxido de hidrógeno hace viable el método desde el punto de vista económico. La disociación del peróxido resulta en la formación del ión hidroperóxido, que ataca a la molécula de ozono formando radicales hidroxilo (Staehelin & Hoigne 1985; Forni y col. 1982). El mecanismo general de esta reacción está representado por:



Es importante controlar el pH. A pH alcalino, la adición de peróxido a la solución acuosa que contiene ozono genera mayores rendimientos de producción de radicales hidroxilo (Glaze & Kang 1989).

1.2. Hipótesis

Las técnicas espectroscópicas Uv-Visible y Raman, permitirían distinguir entre los colorantes presentes en una muestra de anilina comercial, infiriendo si éstos son de origen natural o sintético, y consecuentemente sobre su carácter inocuo o nocivo para la salud y el medio ambiente.

1.3. Objetivos Generales

- Distinguir la presencia de colorantes en muestras comerciales de anilina mediante espectroscopía vibracional Raman y Raman amplificado por superficies metálicas.

1.4 Objetivos Específicos

1. Analizar la presencia de colorantes en muestras de anilinas comerciales, por medio de sus espectros vibracionales UV-Visible y Raman, utilizando en particular la técnica de Raman amplificado por superficies metálicas.
2. Sobre la base de la información obtenida mediante los datos espectroscópicos, identificar si en la estructura molecular de las anilinas estudiadas, existen grupos azo.
3. Analizar los efectos adversos de las anilinas en la salud de las personas y su acumulación en el medio ambiente.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1 Reactivos

Las muestras utilizadas corresponden a anilinas negra y roja MontBlanc de nombres comerciales “negro” y “fuego”, respectivamente. Todos los solventes y reactivos para la preparación de nanopartículas tienen pureza analítica:

- Agua nanopura
- Etanol
- Metanol
- Hidróxido de sodio
- Nitrato de plata
- Hexano
- Cloruro de sodio

2.2. Métodos Analíticos

Las imágenes se obtuvieron con un estéreo microscopio trinocular marca AmScope equipado con cámara digital y con aumento de 7.5X y 45X. Las imágenes fueron extraídas y ajustadas en el software propietario de la marca AmScope 3.7.

Los espectros Uv-Vis fueron obtenidos en un espectrómetro Shimadzu UV-1800, configurado para barrido entre 250 y 900 nm y resolución 1 nm.

Los espectros Raman y SERS fueron obtenidos con los dispositivos micro-Raman Renishaw RM1000 equipado con un microscopio Leica LM/PM y un detector CCD (Charge-Coupled Device). Las líneas de excitación láser disponibles corresponden a 633 y 785 nm. La señal es calibrada utilizando como patrón la línea espectral a 520 cm^{-1} del silicio. La intensidad del láser sobre la muestra es cercana a 2 mW. Los espectros resultantes se obtuvieron utilizando lentes ópticos de 50X. La resolución espectral es de 4 cm^{-1} y los registros se realizaron empleando 5 barridos espectrales de 10 s. Los espectros son registrados entre 400 y 2000 cm^{-1} .

2.2.1. Análisis de anilinas comerciales

Se observaron muestras de las anilinas comerciales roja y negra con un microscopio sobre portaobjetos de vidrio y se registraron imágenes de lo observado a aumentos 7.5X y 45X con el fin de caracterizar las muestras.

2.2.1.1. Separación y secado de cristales

Anilina roja. Inicialmente con una espátula metálica se toma la menor cantidad posible de la muestra de anilina roja y se distribuye aleatoriamente sobre una placa Petri. A la muestra se le agrega una gota de agua destilada (aproximadamente 300 μ L). En la muestra se observan zonas de color rojo. Con una micropipeta se extrae muestra en cada zona de color rojo, hasta completar un volumen de 100 μ L y se guarda la solución en un tubo Eppendorf. La solución se deposita sobre un portaobjetos y se evapora el agua a temperatura ambiente con la muestra protegida de la luz solar. Finalmente, los cristales obtenidos se observan al microscopio.

Anilina negra. Se utiliza la misma metodología descrita en el párrafo anterior donde se observan zonas de color rojo, azul y amarillo. Con una micropipeta se extrae muestra en cada zona de color, hasta completar un volumen de 100 μ L y se guardan las soluciones en distintos tubos Eppendorf; se obtienen tres tubos Eppendorf correspondientes a solución roja, azul y amarilla. Cada solución se deposita en un portaobjetos y se evapora el agua a temperatura ambiente con la muestra protegida de la luz solar. Finalmente, los cristales obtenidos se observan al microscopio.

2.2.1.2. Registros Uv-Vis y Raman

Se preparó una solución patrón de anilina al 2.5% m/v. La muestra de anilina fue sonicada durante 10 minutos y centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos. Se utilizó agua, etanol, metanol y hexano como solventes. Las soluciones de trabajo (diluciones) se indican en la Tabla 1.

Las muestras preparadas presentaron sólido en el fondo del recipiente, por lo que no se disolvió completamente y luego la concentración final es menor al valor calculado. Por lo tanto los resultados a obtener son exclusivamente cualitativos.

A estas diluciones se les registran los espectros UV-Vis, tomándose como muestra el sobrenadante cuando fuese necesario.

Tabla 1: Diluciones y solventes para registro Uv-Vis de anilinas comerciales

Anilina	Agua (%m/v)	Etanol (%m/v)	Metanol (%m/v)	Hexano (%m/v)
Negro	0.2	2	0.2	2.5
Rojo	0.2	2	0.5	2.5

2.2.2 Preparación de coloides de plata

Como parte del análisis SERS de las muestras se sintetizaron coloides de plata mediante la reducción de iones Ag^+ por parte de clorhidrato de hidroxilamina, método que permite generar coloides a temperatura ambiente y con buena capacidad de amplificación de señales vibracionales de los analitos (Leopold & Lendl 2003). Las nanopartículas obtenidas por reducción con hidroxilamina presentan la ventaja de una distribución promedio homogénea en forma y tamaño, además de la ausencia de productos remanentes de oxidación que podrían interferir en las medidas SERS.

La muestra con nanopartículas de plata se preparó disolviendo 0,5 g de anilina(roja o negra) en 10 mL de agua destilada. Una alícuota de 100 μL de solución resultante se mezcló con 10 μL de solución coloidal con nanopartículas de plata.

2.3 Análisis de bibliografía

Se realizó una revisión de la literatura respecto a la detección y análisis de los azocompuestos. Se analizaron los efectos crónicos en la salud de las personas y los efectos en el medio ambiente. Estos datos fueron comparados con la realidad Chilena, en cuanto a normativas de descargas de residuos líquidos.

II. RESULTADOS

3.1. Microscopia óptica

3.1.1. Anilina Roja

En la observación al microscopio, la muestra de anilina roja presentó distintos cristales, con distinta tonalidad en colores como rojo, verde, blanco y pardo; la distribución de estos cristales es aleatoria en la muestra como se muestra en la Figura 1.

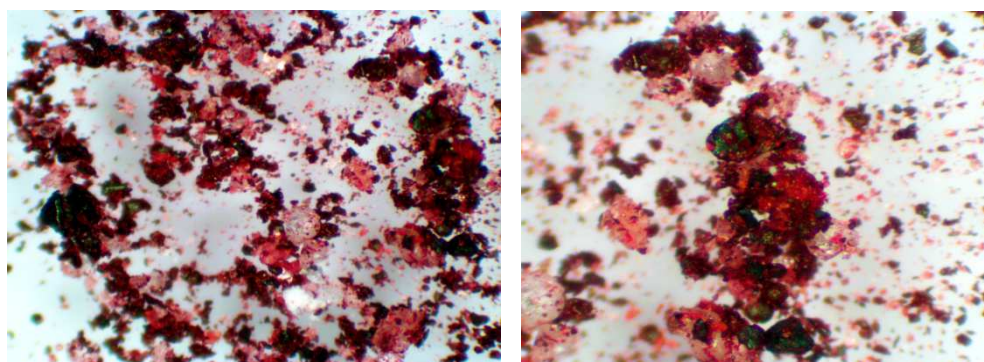


Figura 1: Cristales observados en la muestra de anilina roja. Los aumentos corresponden a 7.5X (izq.) y 45X (der.).

Se procedió con la separación de la muestra roja distribuyendo cristales de la muestra sobre una placa Petri y agregando una gota de solvente sobre cada cristal, dando origen únicamente a color rojo en el solvente. La metodología de separación y secado de cristales fue descrita en la sección 2.2.1.1. La muestra se separó mezclando con agua destilada y evaporando el líquido; la imagen resultante se observa en la Figura 2, donde al aumento 7.5X permite distinguir una mayor intensidad del color rojo en el borde. Con el aumento de 45X, es posible observar que el borde tiene un color distinto al cuerpo de la mancha resultante. No fue posible obtener resultados en solventes etanol, metanol ni hexano, pudiendo relacionarse con la insolubilidad de las muestras.

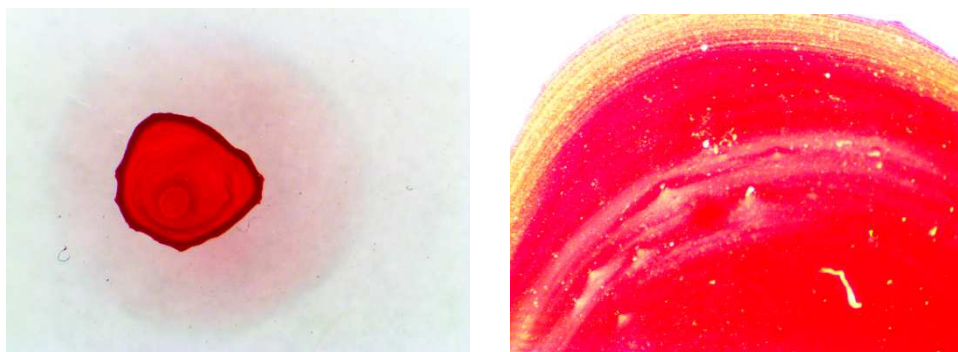


Figura 2: Secado de cristales de anilina roja en agua destilada. Imágenes bajo microscopio 7.5X (izq.); 45X (der.).

3.1.2. Anilina Negra

Bajo microscopio la anilina negra presenta sólidos de distintos colores, donde cristales de color pardo negruzcos se aglomeran en la superficie de cristales de mayor tamaño de color blanco (Figura 3).

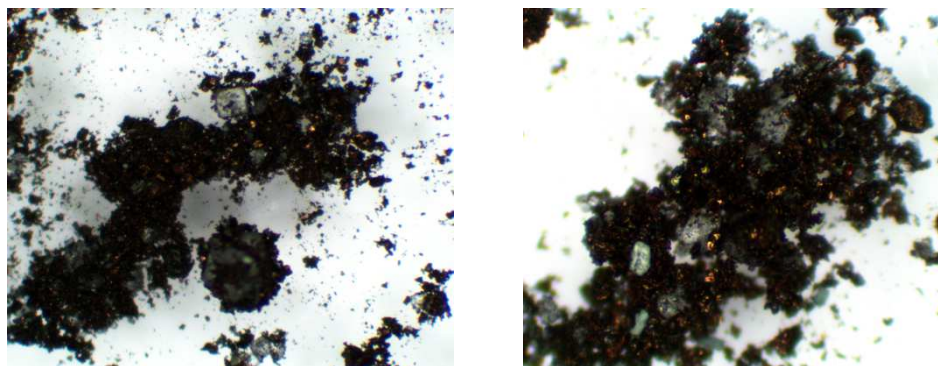


Figura 3: Cristales anilina negra bajo microscopio 7.5X (izq.); 45X (der.).

La metodología de separación y secado de cristales fue descrita en la sección 2.2.1.1. Al evaporar el agua se observan cristales coloreados en tonalidades amarilla, azul y roja, respectivamente, con borde de color oscuro, como se aprecia en la Figura 4. La cristalización a partir de soluciones en otros solventes no fue posible debido a insolubilidad de las muestras.



Figura 4: Separación y secado de cristales de colores amarillo, azul y rojo derivados de anilina negra comercial disuelta en agua. Imagen bajo microscopio (45X).

3.2. Espectros Uv-Vis

En las Figuras 5 y 6, se presentan los espectros Uv-Vis de las muestras de anilina roja y anilina negra en agua, etanol, metanol y hexano. La preparación de las soluciones fue descrita en la sección 2.2.1.1.

En la muestra de anilina roja se observan dos máximos de absorción en todos los solventes utilizados (Figura 5). En agua los máximos de absorción se observan a 305 y 501 nm, atribuibles a la transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ de los grupos aromáticos presentes en la muestra. Los máximos de absorción se observan a 302 y 489 nm en metanol y a 302 y 486 nm en etanol. Comparando los máximos de absorción en los distintos solventes, se aprecia el efecto de interacción del colorante con el agua, con un corrimiento batocrómico de alrededor de 25 nm. La estructura del colorante tendría mayor polaridad en el estado excitado, estabilizándose debido a interacciones por puente de hidrógeno con las moléculas de agua. Se observa que el compuesto presenta mayor absorbancia en agua que en etanol, con una concentración 10 veces menor en agua respecto de etanol, evidenciando su afinidad por un solvente polar.

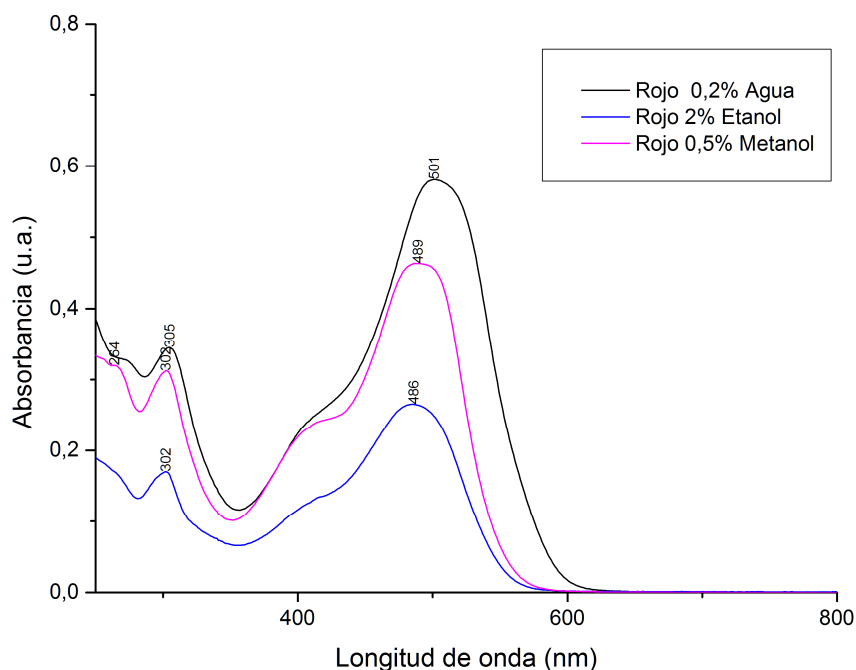


Figura 5: Espectros Uv-Vis para anilina roja en agua, metanol y etanol.

En la muestra de anilina negra se observa un máximo de absorción que depende del solvente utilizado (Figura 6). En agua presenta un máximo de absorción a 510 nm y un hombro entorno a 600 nm. En metanol y etanol presenta un máximo de absorción a 593 nm. En primera instancia se pensó en un corrimiento del máximo de absorción en los solventes utilizados; sin embargo, estamos en presencia de una mezcla de colorantes, condición que se evidencia en la afinidad en los distintos solventes, expresados en los máximos de absorción.

En la mezcla de anilina negra, la existencia de un compuesto rojo se observaría en el máximo de absorción entorno a 505 nm en agua, con absorbancias similares (0,580 y 0,599) a la misma concentración (0,2%), y un corrimiento del máximo a 490 nm en metanol, condiciones que fueron observadas en la anilina roja en agua. Esto permitiría inferir la existencia de un compuesto rojo afín al medio acuoso.

En la mezcla de anilina negra, un compuesto amarillo sería soluble en etanol y en metanol, con una longitud de onda a 440 nm y 470 nm, respectivamente. El

compuesto amarillo presenta mayor absorbancia en metanol, utilizando una concentración 10 veces menor que en etanol. El compuesto amarillo en agua no es observable en la zona entre 400 y 500 nm, interpretando que no está presente en solución acuosa o cuya contribución no es preponderante en el color de la solución.

En la mezcla de anilina negra, un compuesto azul sería soluble en etanol y en metanol, con una longitud de onda en torno a 590 nm. El compuesto azul presenta mayor absorbancia en metanol, utilizando una concentración 10 veces menor que en etanol. El compuesto azul no tendría una contribución preponderante en agua, observándose un hombro en torno a 610 nm.

Al comparar los resultados obtenidos en los espectros UV-Visible, es posible relacionarlos con la solubilidad de los distintos compuestos que conforman la muestra de color negro. El compuesto amarillo y el compuesto azul serían poco solubles en agua, en cambio, el compuesto rojo es soluble en medio acuoso. Estos resultados se condicen con los cristales obtenidos desde la separación y secado de la muestra de color negro.

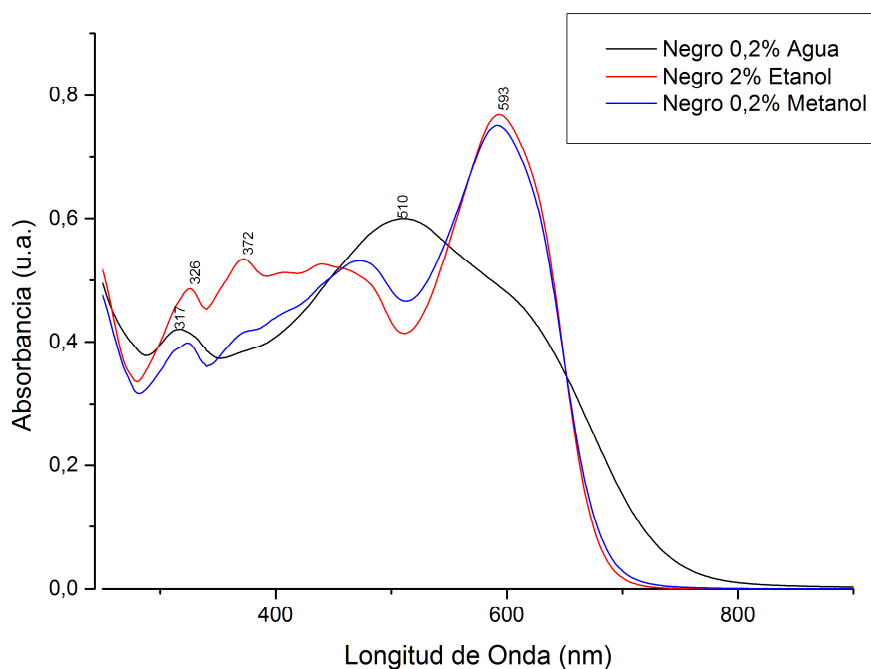


Figura 6: Espectros Uv-Vis para anilina negra en distintos solventes.

3.3. Espectros Raman

Se registraron los espectros Raman de anilinas sintéticas (roja y negra) usados en la industria textil, según la metodología descrita en la sección 2.2.1.2 y empleando líneas de excitación laser 633 y 785 nm.

Al utilizar un microscopio Renishaw, con un aumento 50X, en la muestra roja se observaron mayoritariamente cristales de color rojo, con una distribución aleatoria y minoritaria de cristales de color verde, blanco y café. El espectro Raman de la anilina roja fue medido directamente sin tratamientos previos con la línea de excitación laser de 633 nm, observándose una banda ancha correspondiente a la señal fluorescencia del compuesto rojo (Figura 7). Por otra parte, empleando la metodología de separación por colores (sección 2.2.1.1), los espectros Raman de la anilina negra se miden en los cristales azules, amarillos y rojos, observándose fluorescencia en todos los compuestos. En general, cuando la banda de absorción de un compuesto aromático coincide con la excitación del láser (en este caso láser 633 nm), puede ocurrir la emisión fluorescente, enmascarando la señal Raman. En la anilina roja y en la anilina negra es posible observar señales Raman de baja intensidad.

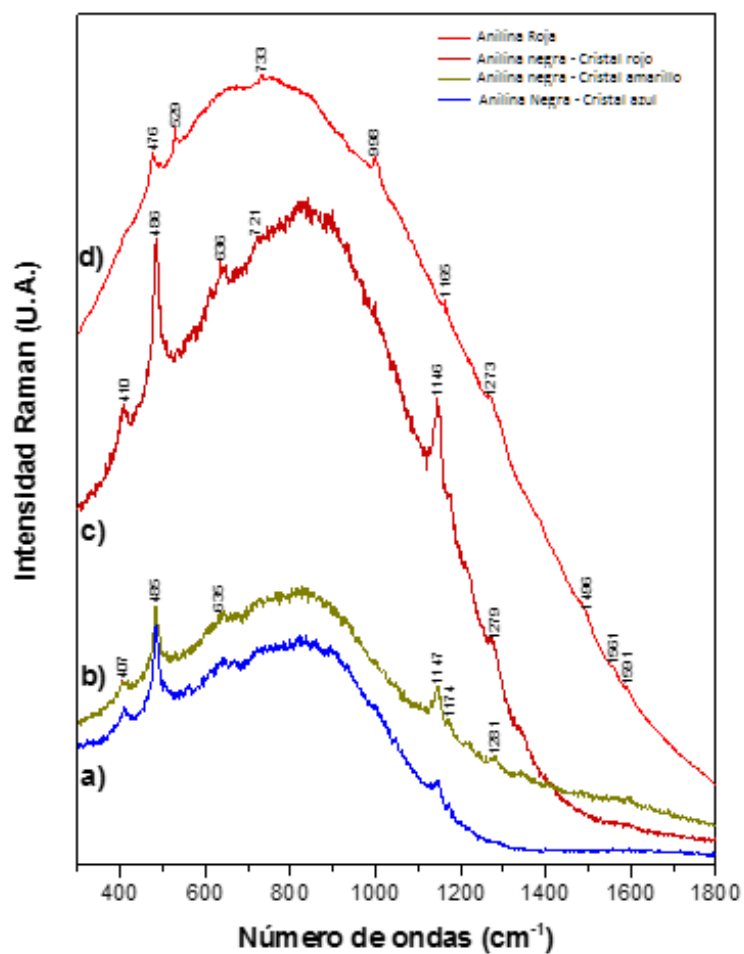


Figura 7: Espectros Raman anilinas: a) roja, b) negra, cristales rojos, c) negra, cristales amarillos, d) negra, cristales azules. Línea laser 633 nm.

Al utilizar un microscopio Raman Renishaw, con línea de excitación laser de 785 nm, son observables las señales Raman (Figura 8). En este espectro es posible observar que la fluorescencia disminuye notoriamente.

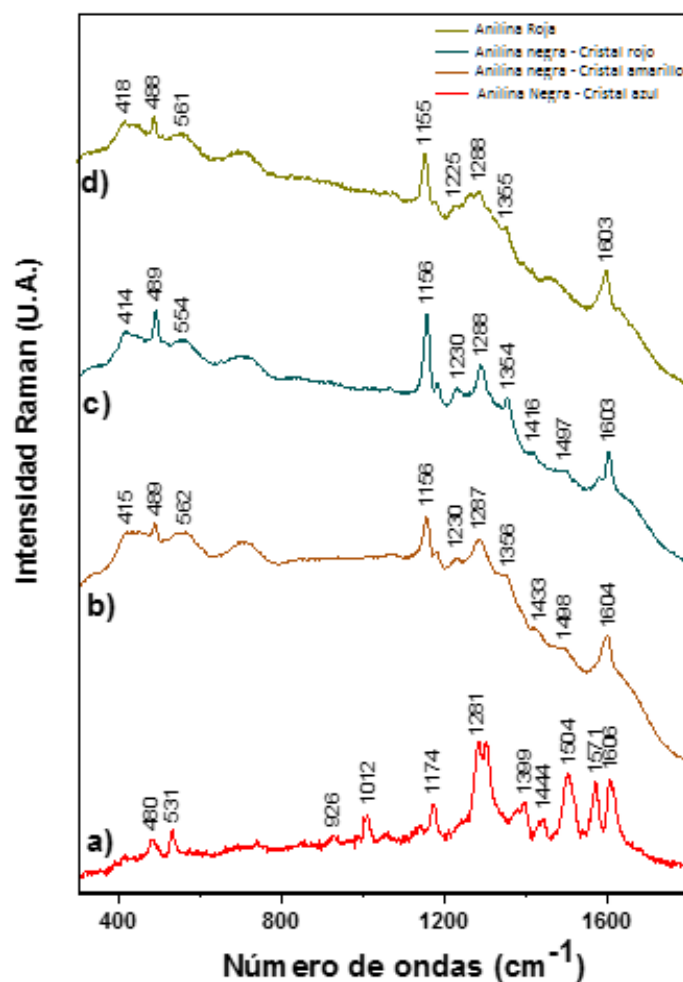


Figura 8: Espectros Raman anilinas: a) roja, b) negra cristales rojos, c) negra cristales amarillos, d) negra cristales azules. Línea laser 785 nm.

La separación de la muestra negra presenta tres especies coloreadas (azul, amarillo y rojo), que presentan un espectro Raman similar, confirmando la existencia de un compuesto común en las tres especies coloreadas. El perfil espectral de la muestra roja difiere de la especie roja extraída de la muestra negra, sugiriendo la presencia de una especie diferente.

Los espectros Raman de las anilinas roja y negra presentan algunas bandas comunes y otras diferentes. En la caracterización vibracional, los modos más intensos

se asocian a vibraciones $\nu\text{C}=\text{C}$ aromático (1606 y 1603 cm^{-1}), $\nu\text{C}-\text{C}$ acoplado a $\delta\text{C}-\text{H}$ (1571, 1504, 1498 cm^{-1}), $\nu\text{N}=\text{N}$ (1444 y 1433 cm^{-1}), $\nu\text{C}-\text{C}$ (1399 cm^{-1}), $\delta\text{C}-\text{H}$ acoplada a $\delta\text{C}-\text{N}$ (1356 cm^{-1}), $\nu\text{C}-\text{N}$ (1281 y 1287 cm^{-1}), $\nu\text{C}-\text{SO}_2-\text{O}$ (1228 cm^{-1}), $\nu\text{C}-\text{N}$ acoplada a νSO_3 (1174 y 1157 cm^{-1}), $\delta\text{C}-\text{C}$ aromático (1012 cm^{-1}), $\delta\text{C}-\text{N}$ (531 cm^{-1}) y $\delta\text{C}-\text{C}$ aromático fuera del plano (480 y 489 cm^{-1}).

Las señales Raman de azocompuestos han sido estudiadas con diferentes sustituyentes en su estructura. Scherrer y *col.* (2009) describen señales en 1600 cm^{-1} asociadas a estructuras de monoazopigmentos, cuyo origen podría deberse a la vibración $\nu\text{C}=\text{C}$ aromático.

Do Rosário Marcelino y Muralha (2012) reportan señales Raman débiles alrededor de 1444 cm^{-1} , correspondientes a vibraciones $\nu\text{N}=\text{N}$, tanto en monoazocompuesto, como en poliazocompuesto con distintos sustituyentes. Muestran señales a 1174 y 1150 cm^{-1} que caracterizan la presencia de $\nu\text{C}-\text{N}$. Otras señales características se observan a 1228 cm^{-1} para νSO_3 y $\nu\text{C}-\text{SO}_2$.

Suwaiyan y *col.* (1990) y Krishakumar y *col.* (2007) reportan resultados referenciales para caracterizar tanto el esqueleto como los grupos funcionales de azocompuestos, respecto a la orientación en el plano y la presencia de fenómenos como estiramiento y respiración.

En nuestros resultados, las anilinas presentan modos vibracionales afines a los azocompuestos según el trabajo descrito por Silverstein (2005). En el espectro Raman de la anilina roja (Figura 8, espectro a), se observa una señal relativamente intensa a 1571 cm^{-1} , la cual es consistente con la vibración de estiramiento simétrico para el grupo azo ($\nu_{\text{sim}}\text{N}=\text{N}$). Esta señal característica se observa entre 1560 y 1575 cm^{-1} en Raman, permitiendo inferir que el compuesto debe ser del tipo azo en posición trans. Si el compuesto presenta el grupo azo, correspondiendo a azobencenos p-sustituidos, donde existe un grupo dador de electrones en posición *para*, la vibración se observaría intensa en IR en torno a 1430 cm^{-1} y con baja intensidad en Raman. Este es caso de la banda débil observada en torno a 1430 cm^{-1} en los espectros Raman de anilina negra para los cristales rojos y amarillos, (Figura 8, espectro b y espectro c).

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, los compuestos presentes en las anilinas deben contener el grupo azo en su estructura molecular. Un estudio realizado por Peksa y col. (2015) para el colorante azoico azorrubina utilizó la banda observada a 1561 cm^{-1} en el espectro SERS, para cuantificar su contenido en bebidas azucaradas. La señal en cuestión es característica del grupo azo presente en la estructura molecular de azorrubina.

3.4. Muestra con adición de coloides de plata (SERS)

La solución de anilina roja presentó un espectro Raman de baja intensidad, siendo observables solo algunas bandas descritas en el espectro Raman del sólido. En cambio, la solución de anilina negra presentó un espectro definido y altamente concordante con el espectro Raman de cristales azules, amarillos o rojos (Figura 9).

En la literatura se describen diferencias Raman entre un azocompuesto neutro y otro protonado (Biswas & Umapathy 2000; Wang y col. 2010). Wang y colaboradores describen que el anaranjado de etilo protonado ve incrementada la intensidad de bandas características asociadas a modos $\nu\text{C}=\text{C}$, $\nu\text{N}=\text{N}$ y $\nu\text{N}-\text{N}$, respecto de la especie neutra donde disminuyen considerablemente. En base a esta información, podemos inferir que la anilina negra reforzaría los modos de estiramiento y respiración de un anillo aromático protonado (1630 y 1000 cm^{-1}), favoreciendo la detección Raman del compuesto en medio acuoso.

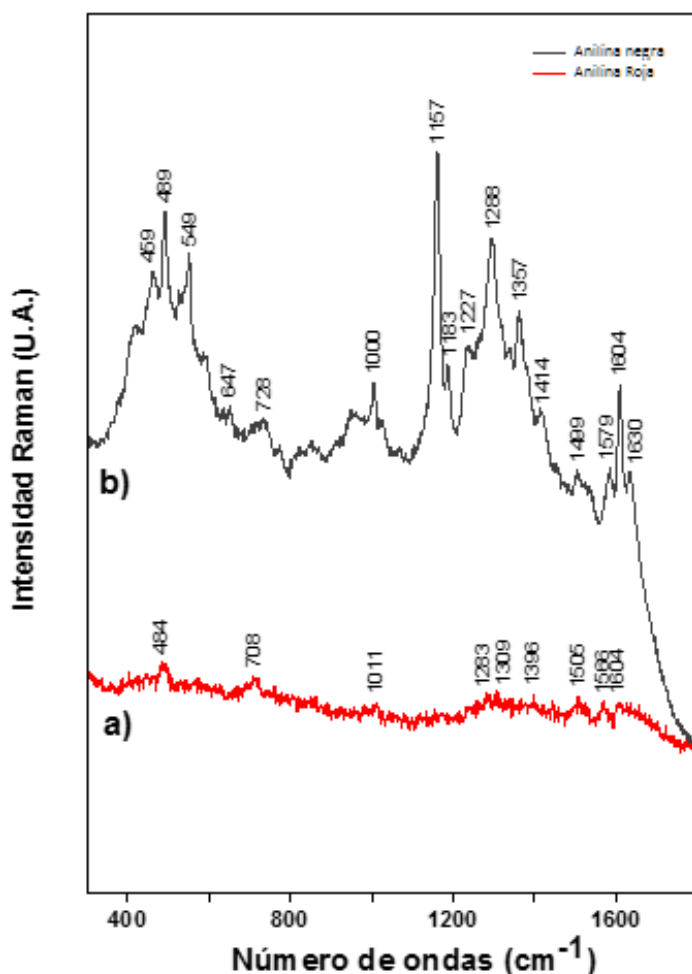


Figura 9: Espectros Raman de soluciones acuosas de anilinas negra y roja. Línea laser 785 nm.

Un objetivo de nuestro trabajo fue utilizar una metodología para detectar anilinas interactuando con nanopartículas de plata mediante espectroscopía SERS. En esa perspectiva, tomamos una alícuota de 5 μL de solución con anilina (roja, azul o amarilla) y se mezcló con 1000 μL de solución coloidal con nanopartículas de plata. La interacción entre el colorante y la superficie metálica se interpreta sobre la base de las reglas de selección SERS, las cuales estipulan que cuando la componente de la polarizabilidad α_{zz} de un modo vibracional es paralela a la línea de excitación y perpendicular a la superficie metálica, la señal Raman se intensifica.

En nuestros experimentos, los espectros SERS de anilinas tienen baja intensidad o no son observables, por lo que la afinidad del compuesto por la superficie de plata no es evidente. El compuesto rojo no presenta el perfil característico identificado anteriormente. En cambio, el compuesto azul presenta intensidad SERS con señales observadas en la muestra sólida (ver Figura 10)

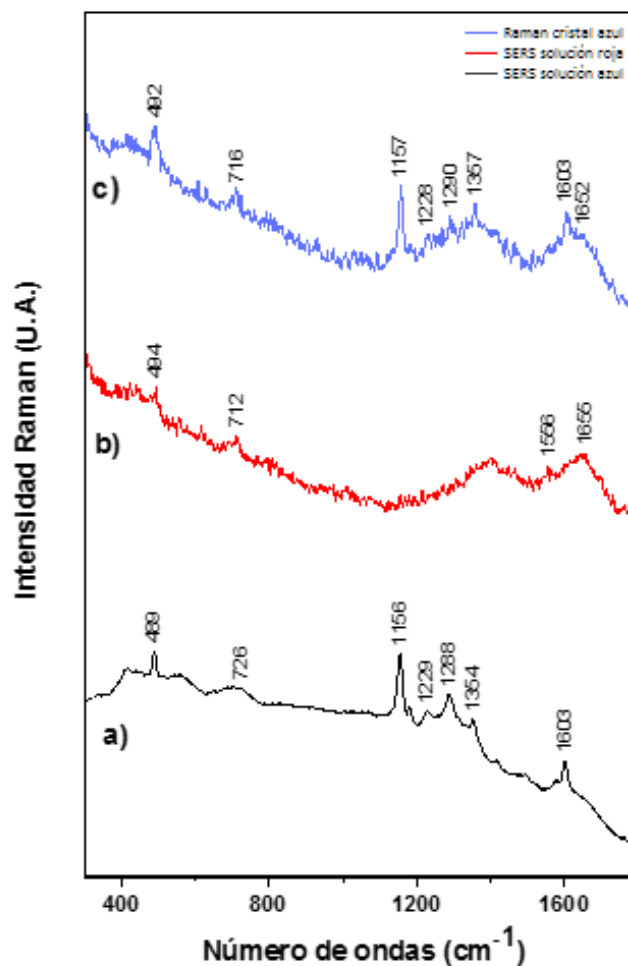


Figura 10: Espectros a) Raman cristales azules, b) SERS solución roja y c) SERS solución azul. Línea láser 785 nm.

En la solución azul con nanopartículas de plata, se observan algunas bandas SERS concordantes con la caracterización Raman. Los modos de estiramiento C-N, SO₃ y amida I son los de mayor intensidad relativa. No son observables estiramiento y respiración de anillo aromático protonado. En nuestro experimento, la muestra azul estaría a un pH entre 6 y 7, condición que desfavorecería la formación de la estructura aromática protonada. Sobre la base de las reglas de selección, se interpreta que el anillo aromático del colorante se encuentra probablemente orientado diagonalmente y cercano a la superficie metálica.

3.5. Los riesgos en la salud y el medio ambiente de los colorantes

Otro objetivo de este trabajo es identificar los riesgos en la salud o el medio ambiente de los colorantes detectados, correspondientes a azocompuestos. En esa perspectiva realizaremos un análisis de la normativa vigente y de los efectos en la salud de las personas.

Respecto a la normativa vigente en Chile, para descarga de RILes a cuerpos de agua, se analizaron los siguientes Decretos Supremos para comprender el estado actual de la regulación de azocompuestos en Chile:

- **D.S. 609/2004:** Establece norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos industriales líquidos a sistemas de alcantarillado.
- **D.S.90/2001:** Establece norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales.
- **D.S. 46/2003:** Establece norma de emisión de residuos líquidos a aguas subterráneas.

A pesar de la ausencia de regulación para este tipo de compuestos, el D.S.609/2004 individualiza las actividades industriales que utilizarían este tipo de pigmentos, detallados en la Tabla 2.

Tabla 2: Códigos de actividades industriales relacionadas con el uso de azocolorantes, definidos según D.S.609/2004.

Código	Descripción
32113	Tintorerías industriales y acabado de textiles
32132	Fabricación y acabado de tejidos de punto, cuando incluyan blanqueo y teñido
35296	Fabricación de Tintas
95201	Lavanderías y Tintorerías

Los únicos parámetros presentes en la legislación que podrían aplicarse al control de estos compuestos son DBO₅ y Sólidos Disueltos.

La medición de DBO₅ entrega la cantidad de oxígeno necesaria para que los microorganismos presentes en el efluente oxiden la materia biodegradable en un plazo de 5 días. Este parámetro puede verse alterado si en la descarga existen agentes capaces de disminuir la actividad biológica mediante toxicidad, como el cloro comercial. Una posible forma de determinar toxicidad sería mediante la inclusión del parámetro Demanda Química de Oxígeno (DQO), el cual entrega la cantidad de oxidante químico necesario para oxidar todas las sustancias oxidables presentes en el efluente. El cociente entre DQO/DBO alto podría indicar toxicidad o baja biodegradabilidad del desecho. Sin embargo este parámetro no está incluido en la normativa vigente.

Los sólidos disueltos pueden entregar información de sustancias orgánicas disueltas en el efluente, pero no es específica para azocompuestos; su presencia como sólidos disueltos está asociada a las características de solubilidad del colorante.

Al analizar la normativa en busca de referencias a azocompuestos o sus derivados, no fue posible encontrar alguna que se aplique de forma directa. No existen normas primarias o secundarias para el caso de salud humana o acumulación en el medio ambiente, ya sea en sedimentos o suelos.

En el caso de tratamientos que remueven de forma eficiente los azocompuestos del efluente mediante precipitación, como lodos activados o biopelículas, se debe considerar que el azocompuesto (o sus derivados) sigue presente en el sustrato y se debe estudiar su composición, a fin de evitar que lixivie por el suelo.

Respecto a los tratamientos industriales más utilizados, el proceso Fenton es fácil de aplicar, económico y útil para la degradación de un rango importante de compuestos orgánicos, al no requerir energía para oxidar los compuestos. Se lleva a cabo en 4 etapas; inicialmente, se ajusta el pH a valores bajos. Luego, las reacciones de oxidación ocurren a pH 3-5; posteriormente, se neutraliza el efluente a pH 7-8 y finalmente ocurre la precipitación. En esta perspectiva, sería posible utilizar el proceso Fenton como pre-tratamiento de azocompuestos, requiriendo un tratamiento posterior del precipitado obtenido. Como propuesta se podría utilizar tratamiento biológico para oxidar los productos de degradación.

En caso de tener azocompuestos cuya oxidación sea más difícil, se podría utilizar el método de oxidación con ozono-peróxido de hidrógeno. A pH alcalino, la adición de peróxido a la solución acuosa que contiene ozono genera mayores rendimientos de oxidación del compuesto. Este método es efectivo en la oxidación de dobles enlaces C=C y anillos aromáticos, por lo que sería adecuado en el tratamiento de azocompuestos. Una desventaja de este método es su elevado costo de operación.

En general, los procesos Fenton y ozono-peróxido de hidrogeno tienen como producto radicales hidroxilos, los cuales son perjudiciales porque reaccionan con los compuestos pudiendo generar especies de mayor toxicidad.

En suelos, la permanencia de los azocompuestos es variable. Características como las interacciones puente de hidrógeno en el colorante, o el contenido de materia orgánica en el suelo, son factores que afectan la persistencia de los azocompuestos (Baughman & Weber 1994).

Mathieu-Denoncourt y col.(2014) han encontrado efectos letales y subletales en ranas de la especie *Silurana tropicalis* expuestas a azocompuestos. Concentraciones de estos compuestos en agua y sedimentos provocan la disminución en la supervivencia de renacuajos y el aumento significativo de malformaciones. Concentraciones altas de azocompuestos en el sedimento provocan necrosis celular en las ranas, por modificaciones en el ácido ribonucleico mensajero (ARN_m), necesario para la replicación de proteínas.

La exposición directa a azocompuestos tiene efectos carcinogénicos. En ella ocurre la oxidación o la reducción del enlace azo, que genera aminas aromáticas o especies electrofílicas $N\equiv N^+$, respectivamente. Estos compuestos presentan actividad carcinogénica y mutagénica al unirse de forma covalente al ácido desoxirribonucleico (ADN). La oxidación y la reducción del enlace azo, ha sido encontrada de forma natural, tanto en humanos como animales y se plantea como resultado del proceso digestivo en humanos y bovinos (Brown & De Vito 1993).

Los colorantes encontrados en nuestro trabajo serían azocompuestos con grupos aromáticos, los cuales se han relacionado con el surgimiento de cáncer de vejiga en trabajadores de industrias textiles donde son utilizados. La vía principal de contacto con las sustancias en el ámbito ocupacional es la inhalación, la ingestión accidental o la absorción a través de la piel. Se ha reportado casos donde todos los trabajadores involucrados en la destilación de 2-naftilamina, como parte de la fabricación de azocolorantes, desarrollaron cáncer de vejiga (Vineis 1994). En otros estudios, ha sido encontrada en la orina de trabajadores expuestos a estos azocompuestos la presencia de bencidina y otros derivados (Lowry y col. 1980). Se han identificado aductos bencidina/anilina en la hemoglobina de trabajadores de India y China, en fábricas donde sintetizan azocompuestos (Beyerbach y col. 2006). India y China son países con problemas recurrentes en temas ambientales, no adscritos a convenios internacionales de regulación de sustancias colorantes de efecto potencialmente nocivo (World Health Organization 1982).

Las vías de ingreso al organismo son diversas. Una vía es por contacto del sudor con el textil coloreado, el cual se pone en contacto con la piel (Ahlström y col. 2005). Otra vía es por ingesta oral, poco probable, existiendo estudios que demuestran la absorción en la mucosa oral de niños que llevan los materiales coloreados a su boca (Garrigós y col. 2002). La absorción de estos compuestos a través de mucosa nasal se ha comprobado mayor que por otras vías de administración (Shinichiro y col. 1981), aunque la posibilidad de exposición directa es baja.

Sobre la base de esta información, creemos necesario realizar un plan de acción para regular el uso y el tratamiento de estos compuestos en Chile. Un punto de partida para una regulación de este tipo de compuestos podría sustentarse en las regulaciones internacionales. Inicialmente, la distribución y el uso debería ser regulado, utilizando como estándar internacional la normativa "REACH Annex VIII" de la Unión Europea. Esta normativa fue descrita en la introducción y describe a todos aquellos azocolorantes que debido a su estructura puedan liberar aminas aromáticas al realizar un tratamiento oxidativo del residuo, generando productos de mayor toxicidad. En esa perspectiva, la normativa "REACH" indica los compuestos que no pueden ser distribuidos o utilizados, indicando el material donde el colorante esté expuesto al consumidor final.

Posteriormente, una regulación para el tratamiento y descarga de RILes en empresas que utilicen estos compuestos debe ser abordada. La norma EPA-OCPSF establece los límites de descarga para una gran cantidad de sustancias, entre ellas anilina y sus derivados, independiente de si éstas tienen tratamiento oxidativo. La norma EPA-OCPSF podría servir como estándar de norma piloto en Chile, en la categorización como desecho peligroso y posterior inclusión en las normativas existentes de descarga de RILes a cuerpos de agua.

Es importante la creación de normas secundarias de protección ambiental. En particular, los sedimentos generados en los cuerpos de agua donde actualmente se produce la descarga de desechos industriales. Los azocompuestos han demostrado ser un peligro para las personas y el medio ambiente, particularmente en la exposición crónica. La falta de efectos agudos provoca que estos colorantes sean percibidos como inocuos, prolongando su uso y a su vez el efecto crónico en el medio ambiente.

IV. DISCUSIÓN GENERAL

El análisis de los espectros Uv-visible mostró afinidad del compuesto rojo por los solventes polares, tanto en la muestra de anilina roja como en la proveniente de la separación. La anilina negra muestra presencia de otros compuestos en solventes menos polares, posiblemente aquellos relacionados con azul y amarillo. Esto tendría correlación con las bandas de absorción presentes en 593 nm, para el color azul y aquellas presentes entre 400 y 490 nm, para el amarillo.

La intensidad de los espectros Raman analizados mostraron la dependencia de las señales con la protonación de los compuestos, como aquellas encontradas en 1604 y 1183 cm^{-1} en la Figura 8. Además estas bandas son más visibles cuando las muestras están más concentradas, efecto que se ve al comparar el espectro de la muestra de anilina roja en las Figuras 8 y 9.

Es posible encontrar similitudes entre las muestras analizadas y las descritas en la literatura, concordantes a la presencia del grupo azo en los compuestos analizados. No es posible identificar específicamente los compuestos analizados.

Como se muestra en la Figura 11, se buscaron similitudes entre los compuestos analizados y aquellos descritos en el trabajo de Scherrer *y col.* (2009). Para la muestra de color rojo, se encontraron señales comunes con dos colorantes comerciales, ambos monoazocompuestos. Se destaca que uno de ellos presenta el sustituyente sulfonato como parte de su estructura. Respecto a la muestra de color amarillo, Scherrer describe una molécula con modos vibracionales similares a la observada en este seminario, un compuesto diazo cuya característica principal es el enlace N=N entre las moléculas.

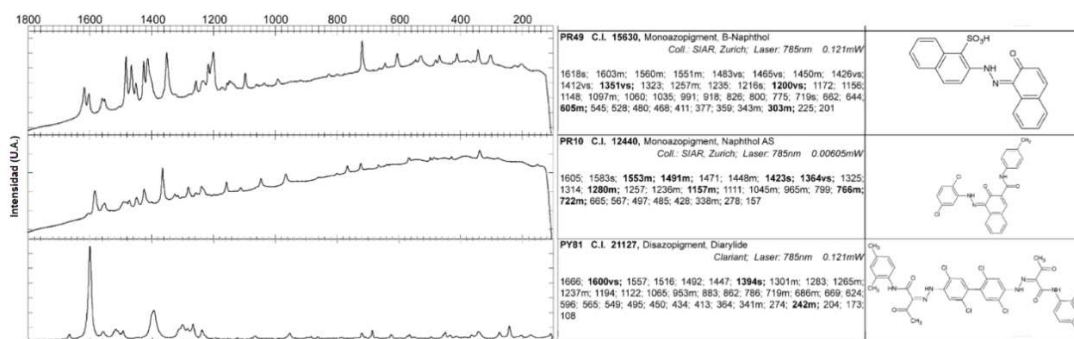


Figura 11: Espectros Raman de referencia y estructura molecular para muestras rojo y amarillo. Línea láser 785nm. Imagen de Scherrer et al. (2009).

Si se complementan los resultados obtenidos en el estudio de las muestras en Uv-Vis y Raman, es posible inferir que el azul encontrado tiene similitudes con la indigotina, ya que tiene similitud con el compuesto en medio ácido y presenta una solubilidad baja en agua (Roberts y col. 1998) (ver Figura 12).

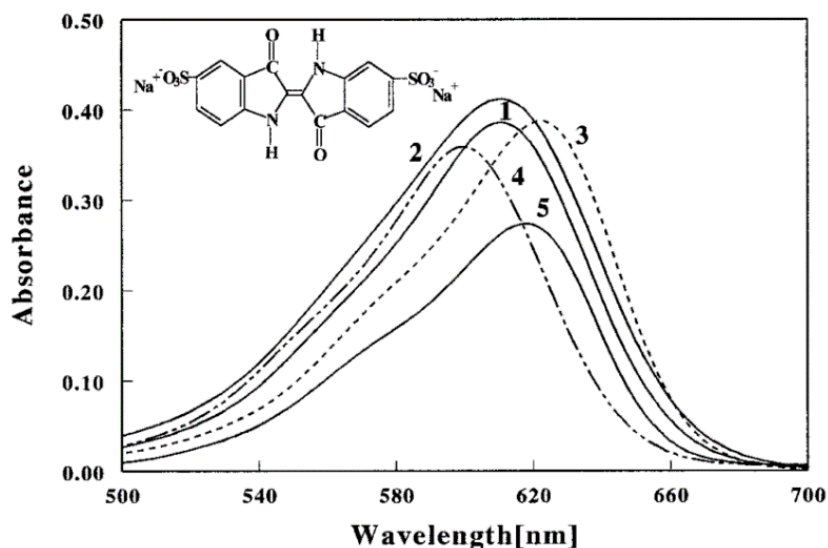


Figura 12: Espectro de absorción para Indigotina en (1) agua, (2) etilenglicol, (3) DMSO, (4) metanol, (5) DMF. Incluye estructura del pigmento indigotina. Imagen de Roberts y col. (1998).

El esqueleto y grupos funcionales de los compuestos analizados en este seminario fueron caracterizados mediante las técnicas Raman, SERS y Uv-Visible. Sin embargo, no se logró identificar su identidad, requiriendo patrones para certificar los colorantes presentes en las anilinas estudiadas.

Se propone mejorar la intensidad de las señales SERS, para obtener un espectro que permita la asignación de los modos vibracionales. Es conocido que las nanopartículas de plata presentan un potencial Z negativo acorde a una interfase de carga negativa en el entorno inmediato de la superficie metálica. Para mejorar la intensidad de las señales SERS debemos mejorar la afinidad del analito por la superficie metálica. Con estos antecedentes, proponemos a futuro trabajar a un pH ácido que favorezca la interacción del anillo aromático cargado positivamente con las nanopartículas de plata cargadas negativamente.

Creemos necesario comparar la medición de estos compuestos con otras técnicas analíticas como la cromatografía de gases. El método EPA 8131 especifica la detección de anilinas y sus derivados en matrices acuosas, el cual podría ser utilizado para apoyar la identificación de estos compuestos.

V. CONCLUSIONES

- Las técnicas espectroscópicas entregan información suficiente para establecer la presencia de azocompuestos en soluciones acuosas. Su aplicación a nivel industrial requiere control del pH en el tipo de efluente que se desee analizar.
- Este seminario permitió establecer una interacción débil entre los azocompuestos y las superficies metálicas. Es preciso optimizar y favorecer esa interacción para obtener espectros SERS que permitan la identificación de azocompuestos en forma óptima.
- El análisis de los resultados mostró que las anilinas analizadas corresponden a aquellas pertenecientes a la familia de los azocompuestos, por lo que sus efectos en la salud y el ambiente deben ser considerados al momento de utilizarlos como parte del proceso de tinción y la disposición de residuos que los contengan.
- Los azocompuestos son considerados peligrosos para el medio ambiente y la salud de las personas. En Chile no existe ninguna regulación que los considere, ni como parte del proceso de manufactura ni como desecho. Por lo tanto es necesario establecer protocolos de detección y tratamiento para este tipo de compuestos.
- Un análisis cualitativo de la presencia de azocompuestos como el planteado en este Seminario De Título puede ser de utilidad al entregar información sobre la presencia de estas sustancias previas al tratamiento estándar de RILes, ya que éste puede generar la oxidación del enlace azo, generando subproductos de toxicidad desconocida y a su vez haciendo la detección de los azocolorantes más compleja en etapas posteriores del tratamiento.

- Un punto de partida para la regulación de los azocompuestos puede tener base en las regulaciones internacionales. La EPA categoriza la descarga de RILes de la industria colorante como desechos peligrosos. Desde ahí, surge la normativa OCPSF, que establece límites de descarga para estos compuestos.

En el ámbito de utilización y distribución de estos colorantes, la Unión Europea posee normativas que regulan la presencia de los azopigmentos en el mercado, basada en sus estructuras y productos de degradación.

- Los azopigmentos han demostrado ser peligrosos en exposición crónica, tanto a la salud de las personas como al ambiente. Esta aparente inexistencia de un problema inmediato demuestra que la falta de regulación existe principalmente debido a la falta de conocimiento sobre su presencia, mecanismos de acción y tratamientos posibles.

V.I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlström, L.H., Sparr Eskilsson, C. & Björklund, E., 2005. Determination of banned azo dyes in consumer goods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(1), pp.49–56.
- Andreozzi, R. et al., 1991. Ozonation of pyridine in aqueous solution: Mechanistic and kinetic aspects. *Water Research*, 25(6), pp.655–659.
- Baughman, G.L. & Weber, E.J., 1994. Transformation of Dyes and Related Compounds in Anoxic Sediment: Kinetics and Products. *Environmental Science and Technology*, 28(2), pp.267–276.
- Bell, I.M., Clark, R.J. & Gibbs, P.J., 1997. Raman spectroscopic library of natural and synthetic pigments (pre- approximately 1850 AD). *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 53A(12), pp.2159–2179.
- Beyerbach, A. et al., 2006. Hemoglobin adducts in workers exposed to benzidine and azo dyes. *Carcinogenesis*, 27(8), pp.1600–1606.
- Bigda, R.J., 1995. Consider Fenton's chemistry for wastewater treatment. *Chemical Engineering Progress*, 91(12).
- Biswas, N. & Umapathy, S., 2000. Structures, Vibrational Frequencies, and Normal Modes of Substituted Azo Dyes: Infrared, Raman, and Density Functional Calculations. *The Journal of Physical Chemistry A*, 104(12), pp.2734–2745.
- Brosseau, C.L. et al., 2009. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a direct method to identify colorants in various artist media. *Analytical chemistry*, 81(17), pp.7443–7447.
- Brown, M.A. & De Vito, S.C., 1993. Predicting azo dye toxicity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 23(3), pp.249–324.
- Chung, K.-T. & Stevens, S.E., 1993. Degradation azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(11), pp.2121–2132.

- Comisión Regional del medio Ambiente, 2007. *Resolución de inadmisibilidad N°202/2007*,
- Correia, V., Stephenson, T. & Judd, S., 1994. Characterisation of textile wastewaters-a review. *Environmental technology*, (January 2013), pp.37–41.
- Le Coz, C.J. et al., 2000. Allergic contact dermatitis caused by skin painting (pseudotattooing) with black henna, a mixture of henna and p-phenylenediamine and its derivatives. *Archives of dermatology*, 136(12), pp.1515–1517.
- Environmental Protection Agency, 2005. *Hazardous Waste—Nonwastewaters From Productions of Dyes, Pigments, and Food, Drug, and Cosmetic Colorants; Mass Loadings-Based Listing; Final Rule*,
- Forni, L., Bahnemann, D. & Hart, E.J., 1982. Mechanism of the hydroxide ion-initiated decomposition of ozone in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(2), pp.255–259.
- Gallo, R. et al., 1999. Contact dermatitis from para-phenylenediamine used as a skin paint: A further case. *Contact Dermatitis*, 40(1), p.57.
- Ganesh, R., Boardman, G.D. & Michelsen, D., 1994. Fate of azo dyes in sludges. *Water Research*, 28(6), pp.1367–1376.
- Garrigós, M.C. et al., 2002. Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products. *Journal of Chromatography A*, 976(1–2), pp.309–317.
- Glaze, W.H. & Kang, J., 1989. Advanced Oxidation Processes . Test of a Kinetic Model for the Oxidation of Organic Compounds with Ozone and Hydrogen Peroxide in a Semibatch Reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 28, pp.1580–1587.
- Gottlieb, A. et al., 2003. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology*, 101(1), pp.49–56.
- Grau, P., 1991. Textile industry wastewaters treatment. *Water Science and Technology*, 24(1), pp.97–103.

- Heo, J.Y. et al., 2011. Enhanced Raman spectrum of lawsone on Ag surface: Vibrational analyses, frequency shifts, and molecular geometry. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 83(1), pp.425–431.
- Kapadia, G.J. et al., 2013. Chemoprevention of skin cancer: effect of Lawsonia inermis L. (Henna) leaf powder and its pigment artifact, lawsone in the Epstein- Barr virus early antigen activation assay and in two-stage mouse skin carcinogenesis models. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 13(10), pp.1500–7.
- Kirkland, D. & Marzin, D., 2003. An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of Henna. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(2), pp.183–199.
- Kuo, W.G., 1992. Decolorizing dye wastewater with Fenton's reagent. *Water Research*, 26(7), pp.881–886.
- Lee, H. & Shoda, M., 2008. Removal of COD and color from livestock wastewater by the Fenton method. *Journal of Hazardous Materials*, 153(3), pp.1314–1319.
- Lee, P.C. & Meisel, D., 1982. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J.Phys.Chem.*, 86(17), pp.3391–3395.
- Leona, M. et al., 2011. Nondestructive Identification of Natural and Synthetic Organic Colorants in Works of Art by Surface Enhanced Raman Scattering. , pp.3990–3993.
- Leopold, N. & Lendl, B., 2003. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(24), pp.5723–5727.
- Lowry, L.K. et al., 1980. Chemical monitoring of urine from workers potentially exposed to benzidine-derived azo dyes. *Toxicology Letters*, 7(1), pp.29–36.
- Mathieu-Denoncourt, J. et al., 2014. Sediment contaminated with the azo dye disperse yellow 7 alters cellular stress- and androgen-related transcription in *Silurana tropicalis* larvae. *Environmental Science and Technology*, 48(5), pp.2952–2961.

- Moskovits, M., 1985. Surface-enhanced spectroscopy. *Reviews of Modern Physics*, 57(3), pp.783–826.
- Nohynek, G.J. et al., 2004. Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology*, 42(4), pp.517–543.
- Organisation for Economic Cooperation and Development, 2002. *The Development Dimension Of Trade And Environment: Case Studies On Environmental Requirements And Market Access*, Paris, France.
- Peksa, V., Jahn, M., Štolcová, L., Schulz, V., Proška, J., Procházka, M., & Popp, J. (2015). Quantitative SERS analysis of azorubine (E 122) in sweet drinks. *Analytical chemistry*, 87(5), 2840-2844.
- Rappoport, Z. ed., 2007. The Chemistry of Anilines Part 1. En Interscience, John Wiley & Sons Ltd., pp. 5–9, 18–24.
- Roberts, E.L., Burguières, S. & Warner, I.M., 1998. Spectroscopic studies of indigo carmine dye in organized media. *Applied Spectroscopy*, 52(10), pp.1305–1313.
- Rund, D. et al., 2007. Plasma exchange as treatment for lawsone (henna) intoxication. *Journal of Clinical Apheresis*, 22(4), pp.243–245.
- Saunders, H., O'Brien, T. & Nixon, R., 2004. Textile dye allergic contact dermatitis following paraphenylenediamine sensitization from a temporary tattoo. *Australasian Journal of Dermatology*, 45(4), pp.229–231.
- Scherrer, N. C., Stefan, Z., Françoise, D., Annette, F., & Renate, K. (2009). Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints: Raman spectra reference collection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(3), 505-524.
- Servicio de Evaluación Ambiental - Comisión de Evaluación, 2014. *Resolución de Calificación Ambiental N°273/2014*,
- Shinichiro, H. et al., 1981. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *International Journal of Pharmaceutics*, 7(4), pp.317–325.

- Silverstein, R.M., Webster, F., Kiemle, D. Spectrometric identification of organic compounds, 7th Edition, Wiley & Sons, Inc. New York, 2005.
- Sociedad de Fomento Fabril, 2012. *Directorio Industrial de Chile 2012*, Santiago, Chile.
- Staehelin, J. & Hoigne, J., 1985. Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environmental Science and Technology*, 19(12), pp.1206–1213.
- Stowell, J.P. & Jensen, J.N., 1991. Dechlorination of chlorendic acid with ozone. *Water Research*, 25(1), pp.83–90.
- The Commission of the European Communities, 2009. Commission Regulation (EC) No 552/2009 of 22 June 2009 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annex XVII. *Official Journal of the European Union*, 2009(164), pp.7–31.
- Uygur, A. & Kök, E., 1999. Decolorisation treatments of azo dye waste waters including dichlorotriazinyl reactive groups by using advanced oxidation method. *Jsdc*, 115(11), pp.350–354.
- Vandevivere, P.C., Bianchi, R. & Verstraete, W., 1998. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 72(4), pp.289–302.
- Vineis, P., 1994. Epidemiology of cancer from exposure to arylamines. *Environmental Health Perspectives*, 102(SUPPL. 6), pp.7–10.
- Wang, Z. et al., 2010. Textile Dyeing Wastewater Treatment. En P. J. Hauser, ed. *Advances in Treating Textile Effluent*. InTech, pp. 91–116.
- Woodward, R. & Clarke, E., 1997. Voluntary cessation of manufacture of benzidine dyes. En *OECD Environmental Health and Safety, Series on Risk Management - No.7*. Paris, pp. 21–26.

World Health Organization, 1982. *Some industrial chemicals and dyestuffs*,

Yonar, T., 2006. Decolorisation of Textile Dyeing Effluents Using Advanced Oxidation Processes. , pp.1–26.