



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Departamento de Hidrogeología y
Química Analítica

***EVALUACIÓN ANALÍTICA DE PROCESOS DE
TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA, FOTOQUÍMICA Y
FOTOCATALÍTICA DE FÁRMACOS EN AGUA***

Carla Sirtori

TESIS DOCTORAL

Julio 2010



Ciemat Centro de Investigaciones
Energéticas, Medioambientales
y Tecnológicas



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Departamento de Hidrogeología y
Química Analítica

***EVALUACIÓN ANALÍTICA DE PROCESOS DE
TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA, FOTOQUÍMICA Y
FOTOCATALÍTICA DE FÁRMACOS EN AGUA***

**Memoria presentada para aspirar al grado de
Doctora en Ciencias Químicas por:**

CARLA SIRTORI

Fdo. Carla Sirtori

Visado en Almería a 14 de Mayo de 2010.

LOS DIRECTORES DE LA TESIS:

Dr. D. Sixto Malato Rodríguez
Investigador Titular OPI
CIEMAT
Ministerio de Ciencia e Innovación

Dra. Dña. Ana Agüera López
Profesora titular del Departamento de
Hidrogeología y Química Analítica
Universidad de Almería



Ciemat Centro de Investigaciones
Energéticas, Medioambientales
y Tecnológicas

*A mi familia, en especial a mi padre Carlos,
mi hermana Bruna, mi abuela Ana, mi tía
Isabel y a mi novio Alejandro, por todo el
inmenso cariño y apoyo incondicional que
siempre han estado presentes en mi vida, dedico
este trabajo.*

"Donde arden lámparas hay manchas de aceite; donde
arden velas, gotas de cera; únicamente la luz del sol
ilumina pura y sin mancha"

Goethe (1749-1832)

Agradecimientos

Inicialmente, quiero agradecer a mi país: Brasil, en especial al Ministerio de Educación y a la “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES” por haberme proporcionado el apoyo financiero necesario para mi formación profesional a través de la realización de esta tesis doctoral.

A mis tutores, Dr. Sixto Malato y Dra. Ana Agüera, por su aceptación y confianza en mi trabajo y por los valiosos conocimientos transmitidos a lo largo de estos cuatro años, y por su comprensión, sobre todo en la etapa de escritura de esta memoria. Muchas gracias, Sixto y Ana por enseñarme, con su ejemplo, las verdaderas virtudes de los investigadores distinguidos.

A la Plataforma Solar de Almería (PSA) y a todos sus colaboradores por la oportunidad de realizar un trabajo de calidad en tan prestigioso centro de investigación.

Quiero dar las gracias al Dr. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba por la colaboración prestada para que este trabajo progresara de forma satisfactoria durante todo el período de investigación.

A la Unidad de Aplicaciones Medioambientales de la Energía Solar de la PSA, en especial al Grupo de Destoxificación y Desinfección de Aguas, por la acogida y, en especial a mis compañeros Leo, Isa y Nick por toda la colaboración prestada para el buen desarrollo de este trabajo. Aquí hago una mención especial a mi compañera y amiga Ana Zapata por la relación tan cercana, desde el principio de mi doctorado, que permitió la realización de un verdadero trabajo en equipo, por su disposición en compartir su experiencia y conocimiento y por la ayuda constante durante el mismo; gracias Ana.

A Wolfgang por su acogida y orientación durante la primera etapa de este trabajo en la PSA y por los comentarios siempre tan pertinentes durante la elaboración de los artículos. *Danke, Wolf!!!*

A Eli y Agustín, partícipes activos y directos en la construcción de este trabajo, agradezco tan buenos momentos vividos durante la ejecución del trabajo experimental. Además, agradezco su cariño y sus palabras de ánimo cuando más lo necesitaba.

A los compañeros del Grupo de Investigación de Residuos de Plaguicidas de la UAL por la

disposición en ayudarme y facilitarme los medios necesarios para el buen desarrollo de este trabajo. En especial me gustaría dar las gracias a María José por las valiosas enseñanzas que me proporcionó al principio de mis actividades en la UAL. Además, me gustaría darles las gracias a María José y Yolanda por tan arropada acogida y por su colaboración directa durante mi período de adaptación a las costumbres del Viejo Continente.

A la Unión Europea por la financiación del proyecto Innowatech y a todos los compañeros de este proyecto, en especial a su coordinador Dr. Antonio López. Además, agradezco al Dr. Giuseppe Mascolo, Daniela y Sara (†) por la estancia tan amistosa y fructífera en su centro de investigación. *Grazie mille!!*

A los investigadores visitantes en la PSA: Alam, Jelena y Cristina Postigo, los cuales me permitieron colaborar en la realización de sus trabajos y mucho me enseñaron con su experiencia.

A mis “meninas”: María José Salmerón, Belén y Paula por su amistad sincera, cariño, respeto y apoyo constantes.

A Elena por los períodos de buena convivencia, amistad y apoyo. Muchas gracias, Elena.

A los amigos portugueses: Rui, Marco, Carmem y Vítor por los buenos momentos. *Muito obrigada!!*

A mis amigos brasileños, Elías y William que así como yo, aceptaron el desafío de una experiencia en tierras lejanas y a los amigos que en Brasil están: Profe Patricio, Elaine, Gil y Adri, les doy las gracias por tantos mensajes repletos de cariño y ánimo. *Muito obrigada!!!!*

A mi familia: a mi padre Carlos, mi hermana Bruna, mi abuela Ana y mi tía Isabel, por aceptar mis elecciones y confiar en mi capacidad. Agradezco el amor sincero y cariño que me brindan cada día y por la fuerza que me transmiten desde tan lejos.

A mi novio Ale, por su amistad, apoyo, respeto y por el afecto verdadero que me regala todos los días y por las innumerables correcciones y ayuda en la elaboración de este trabajo.

A todos los que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo y a mi formación técnica y personal durante esta gran jornada en las “tierras del Quijote”; muchas gracias.

CONTENIDO

CONTENIDO

RESUMEN.....	xi
OBJETIVOS.....	xv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Consideraciones medioambientales.....	1
1.2 Contaminantes emergentes en el medio natural.....	9
1.2.1 Compuestos con actividad farmacológica.....	11
1.2.2 Principales rutas de entrada de los fármacos en el medio ambiente.....	16
1.3 Fotodegradación de contaminantes en aguas.....	22
1.4 Degradación de contaminantes en aguas: Fotocatálisis Solar.....	26
1.4.1 Fotocatálisis Heterogénea.....	27
1.4.2 Fotocatálisis Homogénea.....	34
1.4.3 Fotorreactores Solares.....	41
1.4.4 Sistemas acoplados de tratamiento.....	48
1.5 Evaluación analítica de procesos de degradación: identificación de productos de transformación (PT).....	58
1.5.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	60
1.5.2 Técnicas e instrumentación.....	63
1.5.3 Analizadores para LC-MS.....	71
1.5.4 El uso de la LC-TOF-MS para la identificación de productos de transformación.....	83
1.6 Fármacos modelo seleccionados.....	89
2 EXPERIMENTAL.....	93
2.1 Reactivos y aguas modelo.....	93
2.2 Técnicas analíticas convencionales.....	96
2.2.1 Carbono Orgánico Disuelto (COD).....	96

2.2.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-UV).....	97
2.2.3 Cromatografía iónica. Determinación de aniones y cationes inorgánicos y ácidos carboxílicos.....	99
2.3 Técnicas analíticas avanzadas.....	102
2.3.1 Pretratamiento de las muestras: extracción en fase sólida (SPE)...	102
2.3.2 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	106
2.4 Otros métodos analíticos y procedimientos experimentales.....	108
2.4.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	108
2.4.2 Determinación del peróxido de hidrógeno mediante método espectrofotométrico (metavanadato de amonio).....	110
2.4.3 Método de adición de Catalasa para la eliminación del H ₂ O ₂	111
2.4.4 Determinación del hierro en disolución mediante método espectrofotométrico (ISO 6332).....	112
2.5 Bioensayos.....	114
2.5.1 Ensayo basado en la bioluminiscencia de la bacteria marina <i>Vibrio fischeri</i> (Biofix@Lumi) (UNE_EN_ISO-11348_1998).....	114
2.5.2 Ensayo basado en la movilidad del crustáceo <i>Daphnia magna</i>	117
2.5.3 Análisis de la Biodegradabilidad Inherente. Ensayo de Zahn- Wellens/EMPA (OCDE TG 302. Dir. 88/302/EEC).....	119
2.6 Experimentos de Fotodegradación - Estudios de Fotólisis Directa....	123
2.7 Experimentos de fotocatalisis solar.....	124
2.7.1 Planta piloto solar para fotocatalisis solar de compuestos puros disueltos en agua.....	124
2.7.2 Planta piloto solar para tratamiento fotocatalítico solar del agua residual industrial.....	127
2.7.3 Medida de la radiación UV.....	128
2.8 Reactor biológico de lecho fijo a escala planta piloto.....	130
2.8.1 Puesta en marcha y acondicionamiento del reactor biológico.....	133
3 DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN DE FLUMEQUINA Y TRIMETOPRIM EN AGUA (DESMINERALIZADA Y DE ELEVADA SALINIDAD).....	139
3.1 Fotólisis directa de flumequina.....	139

3.1.1 Estudio cinético de la fotólisis directa de flumequina.....	144
3.1.2 Identificación de los productos de transformación de flumequina mediante LC-TOF-MS.....	145
3.1.3 Toxicidad de flumequina y de sus productos de transformación.....	154
3.2 Fotólisis directa de Trimetoprim.....	156
3.2.1 Identificación de los productos de transformación de Trimetoprim mediante LC-TOF-MS.....	161
3.2.2 Toxicidad de trimetoprim y de los productos de transformación.....	169
4 DEGRADACIÓN DE TRIMETOPRIM, FLUMEQUINA Y ÁCIDO NALIDÍXICO MEDIANTE FOTOCATÁLISIS. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA TOXICIDAD.....	171
4.1 Degradación del trimetoprim mediante fotocatalisis con TiO₂.....	171
4.1.1 Identificación de los productos de transformación del trimetoprim mediante LC-TOF-MS.....	175
4.2 Degradación de flumequina mediante fotocatalisis solar.....	181
4.2.1 Fotocatálisis con TiO ₂	181
4.2.2 Foto-Fenton.....	182
4.2.3 Estudio cinético.....	185
4.2.4 Identificación de los productos de transformación de la flumequina mediante LC-TOF-MS.....	187
4.2.5 Toxicidad de la flumequina y de los productos de transformación generados.....	191
4.3 Degradación del ácido nalidíxico mediante fotocatalisis solar.....	192
4.3.1 Fotocatálisis con TiO ₂	192
4.3.1.1 Identificación mediante LC-TOF-MS de los productos de transformación del ácido nalidíxico generados durante la fotocatalisis con TiO ₂	195
4.3.1.2 Toxicidad del ácido nalidíxico y de los productos de transformación generados mediante fotocatalisis con TiO ₂	197
4.3.2 Foto-Fenton.....	198
4.3.2.1 Identificación de los productos de transformación del ácido nalidíxico generados durante el proceso foto-Fenton mediante LC-TOF-MS....	202
4.3.2.2 Toxicidad del ácido nalidíxico y de los productos de transformación generados mediante foto-Fenton.....	213

5 COMBINACIÓN DE FOTOCATÁLISIS SOLAR (FOTO-FENTON) Y TRATAMIENTO BIOLÓGICO AEROBIO PARA LA DESCONTAMINACIÓN DE AGUAS INDUSTRIALES REALES CONTENIENDO ÁCIDO NALIDÍXICO	215
5.1 Foto-Fenton solar como pre-tratamiento de un proceso biológico aerobio	215
5.1.1 Caracterización de la matriz real estudiada.....	217
5.1.2 Tratamiento mediante foto-Fenton solar.....	218
5.1.2.1 Evaluación de la toxicidad y de la biodegradabilidad a lo largo del fototratamiento.....	219
5.1.3 Combinación de foto-Fenton solar y tratamiento biológico.....	225
5.1.4 Evaluación del los productos de transformación para la combinación entre fotocátalisis solar y biotratamiento.....	227
5.2 Empleo del foto-Fenton solar como etapa final del tratamiento de un agua residual proveniente de la industria farmacéutica	231
5.2.1 Combinación de un tratamiento biológico con foto-Fenton solar para la depuración de un agua residual industrial.....	231
5.2.2 Evaluación de la exposición continua de la biomasa al ácido nalidíxico.....	234
5.2.3 Evaluación del los productos de transformación mediante LC-TOF-MS para la combinación entre biotratamiento y foto-Fenton.....	236
6 CONCLUSIONES	239
6.1 Conclusiones Generales	239
6.2 Conclusiones Específicas	241
6.2.1 Fotólisis directa de la flumequina y del trimetoprim.....	241
6.2.2 Fotocatálisis solar del trimetoprim, flumequina y ácido nalidíxico...	241
6.2.3 Estudio de procesos combinados entre fotocátalisis solar y tratamiento biológico.....	243
REFERENCIAS	245
GLOSARIO	271
ANEXO	275

Índice de Figuras

Figura 1.1:	Estimaciones de la proporción de agua salada y agua dulce que componen los recursos hídricos mundiales (adaptada de Shiklomanov, IA. y UNESCO, 1999).	3
Figura 1.2:	Estimaciones mundiales entre la explotación y el consumo de agua correspondiente a cada continente (adaptada de http://maps.grida.no/go/graphic/water-withdrawal-and-consumption-the-big-gap).....	4
Figura 1.3:	Metabolitos y PT (adaptada de Kümmerer, 2008b).....	16
Figura 1.4:	Origen y rutas de entrada de los fármacos en el medio ambiente (adaptada de Petrović y cols., 2003).....	21
Figura 1.5:	Publicaciones relacionadas con el estudio del proceso de fotólisis de fármacos entre 2000 y 2009 (Fuente: www.sciencedirect.com ; palabras clave utilizadas en la búsqueda: "photolysis" y "pharmaceuticals").....	25
Figura 1.6:	Publicaciones relacionadas con la temática de la fotocatalisis solar entre 2000 y 2009 (Fuente: www.sciencedirect.com ; palabras clave utilizadas en la búsqueda: "solar photocatalysis" y "pharmaceuticals").....	27
Figura 1.7:	Representación esquemática del proceso de fotocatalisis heterogénea en una partícula de TiO ₂ (adaptada de Herrmann, 1999).....	29
Figura 1.8:	Publicaciones relacionadas con el proceso de fotocatalisis con TiO ₂ entre 2000 y 2009 (Fuente: www.sciencedirect.com ; palabras clave utilizadas en la búsqueda: "TiO ₂ photocatalysis" y "pharmaceuticals").....	33
Figura 1.9:	Publicaciones relacionadas con el proceso de foto-Fenton entre 2000 y 2009 (Fuente: www.sciencedirect.com ; palabras clave utilizadas en la búsqueda: "photo-Fenton" y "pharmaceuticals").....	40
Figura 1.10:	Conceptos de diseño para reactores fotocatalíticos solares utilizados en el tratamiento de aguas (a) sin concentración (sistema de un sol), (b) con concentración (cilíndrico-parabólico, PTC), y (c) captador parabólico-compuesto (CPC).....	43
Figura 1.11:	Colector cilíndrico-parabólico instalado en la PSA.....	43
Figura 1.12:	Colectores sin concentración utilizados para degradación de contaminantes mediante FH (izquierda) y FF (derecha), desarrollados en la PSA.....	45
Figura 1.13:	Dibujo esquemático del recorrido de los fotones en un CPC con un semi-ángulo de la aceptación de 90°, estando el sol situado en el cenit.....	47
Figura 1.14:	Dibujo esquemático de un CPC con un semi-ángulo de la aceptación de 90°.....	47
Figura 1.15:	CPC utilizado para aplicaciones solares de fotocatalisis, instalado en la PSA....	48
Figura 1.16:	Esquema ilustrativo simplificado de las posibilidades de acople entre los distintos procesos de tratamiento.....	49
Figura 1.17:	Diagrama de decisión para definir la estrategia más conveniente para el tratamiento de aguas residuales mediante combinación de PAO y biotratamiento.....	54
Figura 1.18:	Diagrama de decisión para la determinación previa de los procedimientos que se deben aplicar para decidir una estrategia optimizada de acoplamiento mediante PAO-BIO.....	57
Figura 1.19:	Representación ilustrativa de las técnicas de ESI y APCI.....	69
Figura 1.20:	Aplicabilidad relativa de las técnicas de ionización de LC-MS.....	70
Figura 1.21:	Representación esquemática de un analizador de sector magnético (adaptado de http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html).....	74
Figura 1.22:	Representación esquemática de un analizador de cuadrupolo (adaptado de http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html).....	75
Figura 1.23:	Representación esquemática de un analizador con Trampa de Iones (adaptado de http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html).....	77
Figura 1.24:	Representación esquemática de un analizador FTMS (adaptado de http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html).....	79
Figura 1.25:	Representación esquemática de un analizador TOF (adaptado de http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html).....	80
Figura 1.26:	Ejemplo de la identificación de dos fármacos (codeína y acetaminofen), donde se obtuvieron errores menores a 1.5 ppm (0.5 mDa).....	85
Figura 1.27:	Espectros de masas obtenidos para el plaguicida imidacloprid a diferentes valores de voltaje de fragmentación.....	86
Figura 1.28:	Cromatograma de iones seleccionados de una muestra de sulfametosazol donde se observan, a la vez, señales de los PT generados.....	87
Figura 1.29:	Intensidades relativas de isótopos.....	88

Figura 1.30:	Espectros de masa exacta del ácido clofibrico y del omeprazol.....	89
Figura 2.1:	Agua residual industrial después de la sedimentación utilizada en los estudios de tratamiento combinando foto-Fenton y biodegradación.....	95
Figura 2.2:	Fotografía de un cartucho utilizado en SPE.....	103
Figura 2.3:	Sistema utilizado para la preconcentración de muestras con SPE utilizando cartuchos.....	103
Figura 2.4:	Estructura química del adsorbente Divinilbenzeno-N-vinilpirrolidona (Oasis HLB®).....	105
Figura 2.5:	Foto ilustrativa del sistema TOF-MS Agilent utilizado para la determinación de los PT generados.....	108
Figura 2.6:	Imagen de bacterias de la especie <i>Vibrio fischeri</i>	115
Figura 2.7:	Fotografías de crustáceos de la especie <i>Daphnia magna</i>	117
Figura 2.8:	Simulador solar Suntest CPS+ utilizado en los experimentos de fotólisis.....	124
Figura 2.9:	Fotografía del fotorreactor CPC con capacidad para tratar 35 L de agua (izquierda). En el detalle, fotografía de los tubos de un módulo de CPC (derecha, superior) y fotografía del tanque y bomba de recirculación (derecha, inferior).....	125
Figura 2.10:	Fotografía de un módulo del fotorreactor CPC con capacidad para tratar 450L de agua (izquierda). En el detalle, fotografía de la bomba (derecha, superior) y del tanque (derecha, inferior).....	128
Figura 2.11:	Fotografía del radiómetro de UV global empleado en los ensayos realizados en la Plataforma Solar de Almería.....	129
Figura 2.12:	Esquema ilustrativo del reactor biológico aerobio IBR utilizado en este estudio..	131
Figura 2.13:	Reactor biológico aerobio IBR utilizado en este estudio.....	133
Figura 3.1:	Espectro de absorción UV (200-400 nm) de la FLU en agua ultra pura y espectro solar UV en la superficie terrestre (Almería).....	141
Figura 3.2:	Degradación de la FLU y COD durante el proceso de fotólisis en ambas matrices estudiadas.....	143
Figura 3.3:	Espectros UV de las muestras iniciales y finales (2640 minutos para DIW y 4171 minutos para SW) durante el proceso de fotólisis.....	144
Figura 3.4:	Cromatogramas de iones totales (TIC) de muestras a lo largo del proceso de fotólisis.....	145
Figura 3.5:	Fragmentación de la FLU con sus pérdidas características.....	148
Figura 3.6:	Espectros de masas del P11 (m/z 310) a diferentes voltajes de fragmentación...	149
Figura 3.7:	Estructura química propuesta para el P1.....	149
Figura 3.8:	Fragmentación del P2 con las pérdidas características.....	150
Figura 3.9:	Estructura química propuesta para los PT generados durante la fotólisis directa de la FLU en DIW.....	151
Figura 3.10:	Espectros de masas de P4 y P5 con sus respectivos fragmentos.....	152
Figura 3.11:	Identificación de compuestos coeluyentes.....	153
Figura 3.12:	Formación y persistencia de los PT más abundantes de la FLU durante el proceso de fotólisis directa.....	154
Figura 3.13:	Espectro de absorción UV (200-400 nm) de TMP en agua ultra pura y espectro solar UV en la superficie terrestre (Almería).....	157
Figura 3.14:	Degradación del TMP y COD durante el proceso de fotólisis en ambas matrices estudiadas.....	158
Figura 3.15:	Espectros UV de las soluciones de TMP en DIW durante el proceso de fotólisis directa.....	159
Figura 3.16:	Espectros UV de las soluciones de TMP en SW durante el proceso de fotólisis directa.....	159
Figura 3.17:	Degradación de TMP en presencia y ausencia de 2-propanol y formación del P1 (véase tabla 3.3).....	160
Figura 3.18:	Cromatogramas de iones totales (TIC) de muestras del TMP en DIW a lo largo del proceso de fotólisis.....	161
Figura 3.19:	Espectro de masas del TMP obtenido por LC-TOF-MS para voltajes de fragmentación de 190V y 260V.....	163
Figura 3.20:	Estructuras químicas propuestas para los PT identificados para el proceso de fotólisis del TMP en DIW. La relación m/z es referida a la molécula protonada, tal como aparece en la tabla 3.3.....	165
Figura 3.21:	Espectros de masas de P2, P3 y P4 con las respectivas fragmentaciones de cada PT.....	166
Figura 3.22:	Abundancia de los principales PT del TMP generados para el proceso de	

	fotólisis directa en DIW.....	167
Figura 3.23:	Abundancia de los principales PT del TMP generados para el proceso de fotólisis directa en SW.....	167
Figura 3.24:	Estructuras químicas propuestas e iones protonados (m/z) de los PT identificados para el proceso de fotólisis del TMP en SW.....	168
Figura 4.1:	Degradación del TMP y COD durante el proceso de fotocatalisis con TiO ₂ en ambos tipos de agua estudiados.....	173
Figura 4.2:	Concentraciones de NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ y formación de ácidos carboxílicos durante el proceso fotocatalítico en ambas matrices estudiadas.....	174
Figura 4.3:	Cromatogramas de iones totales (TIC) para muestras iniciales e intermedias del proceso fotocatalítico en ambas matrices estudiadas.....	175
Figura 4.4:	Estructuras químicas propuestas e iones protonados (m/z) de los PT identificados para el proceso de fotocatalisis con TiO ₂ del TMP en DIW.....	179
Figura 4.5:	Abundancia de los principales PT del TMP generados para en el proceso de fotocatalisis con TiO ₂ en DIW.....	179
Figura 4.6:	Estructuras químicas propuestas e iones protonados (m/z) de los PT identificados para el proceso de fotocatalisis con TiO ₂ del TMP en SW.....	180
Figura 4.7:	Abundancia de los principales PT del TMP generados para en el proceso de fotocatalisis con TiO ₂ en SW.....	181
Figura 4.8:	Degradación de la FLU y COD durante el proceso de fotocatalisis con TiO ₂ en DIW.....	182
Figura 4.9:	Degradación de la FLU, COD y consumo de peróxido de hidrógeno durante el proceso foto-Fenton en DIW.....	183
Figura 4.10:	Concentraciones de NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ y F ⁻ durante la degradación de la FLU mediante el proceso de fotocatalisis con TiO ₂	184
Figura 4.11:	Concentraciones de NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ y F ⁻ durante la degradación de la FLU mediante el proceso foto-Fenton.....	185
Figura 4.12:	Camino de degradación propuesto para la degradación fotocatalítica con TiO ₂ de la FLU en DIW.....	189
Figura 4.13:	Estructura química de la FLU y superficie de potencial electrostático (rojo = negativo; azul = positivo).....	189
Figura 4.14:	Abundancia de los principales PT de la FLU generados durante el tratamiento mediante fotocatalisis con TiO ₂ en DIW.....	190
Figura 4.15:	Toxicidad mediante <i>Vibrio fischeri</i> para la FLU en ambos procesos fotocatalítico solares estudiados.....	191
Figura 4.16:	Degradación del NXA y COD durante el proceso de fotocatalisis con TiO ₂ en DIW.....	193
Figura 4.17:	Concentraciones de NH ₄ ⁺ y NO ₃ ⁻ durante la degradación del NXA mediante el proceso de fotocatalisis con TiO ₂	194
Figura 4.18:	Camino de degradación propuesto para la degradación fotocatalítica con TiO ₂ del NXA en DIW.....	196
Figura 4.19:	Abundancia de los principales PT del NXA generados durante el tratamiento mediante fotocatalisis con TiO ₂ en DIW.....	197
Figura 4.20:	Toxicidad mediante <i>Vibrio fischeri</i> para el NXA durante el proceso de fotocatalisis solar con TiO ₂	198
Figura 4.21:	Reducción del COD (sólidos) y consumo de H ₂ O ₂ (abiertos) durante la degradación del NXA mediante foto-Fenton en DIW y DIW _{NaCl} con el 2 mg L ⁻¹ de Fe ²⁺ y SIE con 20 mg L ⁻¹ de Fe ²⁺	200
Figura 4.22:	Degradación del NXA (sólidos) y consumo de H ₂ O ₂ (abiertos) para el proceso foto-Fenton en DIW y DIW _{NaCl} con el 2 mg L ⁻¹ de Fe ²⁺ y SIE con 20 mg L ⁻¹ de Fe ²⁺	202
Figura 4.23:	Camino de degradación determinado para el NXA mediante foto-Fenton en DIW.....	204
Figura 4.24:	Camino de degradación determinado para el NXA mediante foto-Fenton en DIW _{NaCl}	204
Figura 4.25:	Cromatograma de iones seleccionados y espectro de masas del PT clorado determinado durante el proceso de degradación del NXA en DIW _{NaCl}	207
Figura 4.26:	Abundancia de los principales PT del NXA generados durante en el proceso foto-Fenton en DIW.....	209
Figura 4.27:	Abundancia de los principales PT del NXA generados durante en el proceso foto-Fenton en DIW _{NaCl}	210
Figura 4.28:	Abundancia de los principales PT del NXA generados durante en el proceso foto-Fenton en SIE.....	213

Figura 4.29:	Toxicidad mediante <i>Vibrio fischeri</i> para el NXA durante el proceso de foto-Fenton solar en DIW.....	214
Figura 5.1:	Tests de biodegradabilidad inherente mediante ensayo de Zahn-Wellens (ZW) para muestras del agua residual diluida 1:2 y 1:8.....	218
Figura 5.2:	Evolución del COD y consumo de H ₂ O ₂ durante el proceso foto-Fenton en RIE. En el detalle, degradación del NXA durante el mismo ensayo.....	219
Figura 5.3:	Mineralización y degradación de NXA en RIE en función del consumo de peróxido de hidrógeno durante el proceso foto-Fenton solar. Mx (desde M1 hasta M17) son las muestras tomadas para los ensayos de toxicidad y biodegradabilidad.....	221
Figura 5.4:	Bioensayo de toxicidad para <i>Vibrio fischeri</i> de muestras diluidas 1:3 y evolución de COD durante el proceso foto-Fenton.....	222
Figura 5.5:	Evolución del EOM, DQO y COD en función del consumo de H ₂ O ₂ durante el proceso foto-Fenton.....	224
Figura 5.6:	Ensayo de Zahn-Wellens de la muestra inicial y para las muestras seleccionadas durante el proceso foto-Fenton.....	225
Figura 5.7:	Fotografía del IBR (izquierda) y de los anillos con la biomasa soportada una vez finalizado en proceso de inoculación.....	226
Figura 5.8:	Mineralización durante el proceso biológico del agua fototratada mediante foto-Fenton.....	227
Figura 5.9:	Comportamiento de los PT identificados durante cada etapa del tratamiento combinado.....	230
Figura 5.10:	Mineralización del agua residual real (RIE) y consumo de H ₂ O ₂ durante el proceso foto-Fenton. En el detalle, degradación del NXA.....	233
Figura 5.11:	Estudio de la estabilidad de la biomasa y adsorción de NXA durante su exposición a 45 mg L ⁻¹ de NXA disuelto en SI durante 5 ciclos. El 6° ciclo contenía solo SI.....	235
Figura 5.12:	Cromatograma de iones totales del (A) agua residual real, (B) después del tratamiento biológico y (C) después de la combinación tratamiento biológico+foto-Fenton.....	237
Figura 5.13:	Estructuras químicas propuestas para los principales PT identificados por LC-TOF-MS para la combinación de procesos estudiada (biotratamiento+foto-Fenton).....	238

Índice de Tablas

Tabla 1.1:	Lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.....	6
Tabla 1.2:	Sustancias sometidas a revisión para su posible identificación como sustancias prioritarias o como sustancias peligrosas prioritarias.....	7
Tabla 1.3:	Sustancias que deben ser eliminadas y contempladas por el CE.....	8
Tabla 1.4:	Grupos de contaminantes emergentes encontrados en el medio ambiente (Barceló, 2003).....	11
Tabla 1.5:	Concentraciones de los fármacos más detectados en el medio ambiente acuático en diferentes países del mundo.....	13
Tabla 1.6:	Concentraciones medias y máximas y porcentajes de eliminación de los fármacos en diferentes países del mundo.....	17
Tabla 1.7:	Estudios de fotodegradación de fármacos con los respectivos porcentajes de transformación obtenidos.....	23
Tabla 1.8:	Estudios de degradación fotocatalítica de fármacos con TiO ₂	30
Tabla 1.9:	Estudios de degradación fotocatalítica de fármacos vía el proceso FF.....	36
Tabla 1.10:	Comparación cualitativa entre reactores PTC y reactores sin concentración para aplicaciones fotocatalíticas, usando TiO ₂ y luz solar.....	46
Tabla 1.11:	Estudios de degradación de fármacos y/o efluentes farmacéuticos vía tratamientos combinados.....	51
Tabla 1.12:	Determinación de fármacos mediante LC-MS.....	60
Tabla 1.13:	Ventajas y desventajas de los analizadores de masa.....	72
Tabla 1.14:	Determinación de PT de fármacos mediante LC/MS.....	84
Tabla 1.15:	Principales características químico-físicas de los fármacos estudiados (adaptado de http://www.drugbank.ca/ y http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).....	90
Tabla 2.1:	Composición del agua de mar simulada.....	94
Tabla 2.2:	Composición del agua residual industrial simulada.....	94
Tabla 2.3:	Composición del agua residual industrial.....	94
Tabla 2.4:	Composición del efluente de EDAR simulado.....	95
Tabla 2.5:	Fase móvil y condiciones de detección en HPLC-UV para los fármacos estudiados.....	99
Tabla 2.6:	Fase móvil y condiciones de detección en los Cromatógrafos Iónicos.....	101
Tabla 2.7:	Componentes del medio mineral empleado en el ensayo de Zahn-Wellens/EMPA.....	121
Tabla 2.8:	Características de cada prototipo de fotorreactor CPC para aplicaciones de fotocatálisis solar.....	125
Tabla 2.9:	Componentes del medio mineral empleado en la puesta en marcha y acondicionamiento de los reactores biológicos.....	134
Tabla 3.1:	Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para la FLU y los PT generados durante el proceso de fotólisis en DIW.....	146
Tabla 3.2:	Evaluación de la toxicidad aguda frente a <i>Vibrio fischeri</i> (30min) y <i>Daphnia magna</i> (48h) de las muestras sometidas al proceso de fotólisis directa.....	155
Tabla 3.3:	Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para el TMP y los PT generados durante el proceso fotolítico en DIW.....	161
Tabla 3.4:	Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para el TMP y los PT generados durante el proceso fotolítico en SW.....	163
Tabla 4.1:	Medidas de masa exacta obtenidas mediante LC-TOF-MS para el TMP y los PT generados durante el proceso de fotocatálisis con TiO ₂ en DIW.....	176
Tabla 4.2:	Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para el TMP y los PT generados durante el proceso de fotocatálisis con TiO ₂ en SW.....	177
Tabla 4.3:	Parámetros cinéticos calculados para la degradación fotocatalítica de la FLU.....	186
Tabla 4.4:	Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para la FLU y los PT generados durante la fotocatálisis con TiO ₂ (gris) y el proceso foto-Fenton (naranja).....	187
Tabla 4.5:	Parámetros cinéticos calculados para la degradación fotocatalítica con TiO ₂ del NXA.....	194
Tabla 4.6:	Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para el NXA y los PT generados durante la fotocatálisis con TiO ₂ en DIW.....	195
Tabla 4.7:	Composición del agua residual industrial simulada (SIE).....	199
Tabla 4.8:	Medidas de masa exacta determinadas mediante LC-TOF-MS para el NXA y sus principales PT en todas las matrices de agua estudiadas.....	205
Tabla 4.9:	PT adicionales identificados por LC-TOF-MS en SIE.....	211
Tabla 5.1:	Composición del agua residual industrial (RIE).....	217

Tabla 5.2:	PT identificados por LC-TOF-MS durante el tratamiento mediante foto-Fenton de un efluente industrial real (RIE) conteniendo NXA.....	228
-------------------	--	-----

RESUMEN

El trabajo presentado en esta Memoria pretende, desde un punto de vista analítico, evaluar los procesos de fotodegradación solar de tres contaminantes, flumequina, trimetoprim y ácido nalidíxico, y su tratamiento mediante procesos avanzados de oxidación (fotocatálisis mediante TiO_2 y foto-Fenton) en distintos tipos de agua. Asimismo, este trabajo propone un procedimiento para evaluar la potencialidad de la combinación de los procesos de fotocatalisis solar, en particular foto-Fenton, a sistemas de tratamiento biológico aerobio para la depuración de un agua industrial real. Los tres fármacos seleccionados se emplean tanto en medicina humana como animal.

Los estudios de fotólisis directa de flumequina y trimetoprim, en diferentes tipos de agua (agua desmineralizada y agua de mar sintética), se realizaron en un simulador solar. Se ha demostrado que ambos fármacos pueden sufrir procesos de transformación si son sometidos a radiación solar. La composición del agua afecta a la cinética de degradación de estos dos compuestos. Los productos de transformación fotolítica generados fueron identificados a través del empleo de técnicas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS, en su acrónimo

inglés). En el caso de flumequina se identificaron 14 fotoproductos generados en agua desmineralizada. En el caso del trimetoprim, se han generado 28 productos de transformación (PT) en agua desmineralizada y 10 fotoproductos en agua de mar simulada.

A continuación, se ha estudiado el empleo de los procesos avanzados de oxidación (PAO), en especial los procesos de fotocátalisis con TiO_2 y foto-Fenton solares para la degradación de los fármacos seleccionados, también en distintas matrices de agua. Todos ellos se degradaron completamente mediante ambos procesos, generando multitud de PT. Los estudios cinéticos y analíticos demostraron que la composición del agua juega un papel fundamental en la velocidad de degradación de estos compuestos y en los PT. En particular, en la degradación fotocatalítica con TiO_2 , de trimetoprim se han identificado, mediante LC-TOF-MS, 27 PT entre ambas matrices objeto de estudio. Los estudios de degradación de la flumequina mostraron que 15 PT fueron generados mediante fotocátalisis solar. A su vez, la degradación fotocatalítica solar del ácido nalidíxico presentó 14 PT durante la fotocátalisis con TiO_2 y 19 PT durante el foto-Fenton. En general, el proceso foto-Fenton fue siempre más efectivo.

La etapa final de este trabajo consistió en estudiar la viabilidad de emplear procesos combinados fotocátalisis solar/tratamiento biológico para el tratamiento de un agua industrial proveniente de una industria farmacéutica, conteniendo ácido nalidíxico (compuesto no biodegradable). Se han realizado estudios de evolución de la biodegradabilidad y toxicidad del agua industrial durante el tratamiento mediante foto-Fenton. En atención a estos resultados, dos combinaciones distintas de estas tecnologías fueron estudiadas. En un primer caso, se empleó un pre-tratamiento con foto-Fenton seguido de un proceso de degradación biológica (reactor biológico aerobio de lecho fijo). La eficacia global de esta combinación fue del 95% de eliminación del carbono orgánico disuelto inicial, el 33% mediante foto-Fenton y el 62% en el tratamiento biológico. En el otro caso, se ha empleado inicialmente un proceso de degradación biológica y, a continuación, foto-Fenton. La eficacia global de la combinación entre el biotratamiento y tratamiento fotocatalítico solar fue del 98% de eliminación del carbono orgánico disuelto inicial. El 96% fue logrado por el tratamiento biológico y el 2% por el proceso foto-Fenton. En ambos casos se eliminó completamente el ácido nalidíxico y se concluyó que la combinación biológico/foto-Fenton era económicamente más factible. Los análisis mediante LC-TOF-MS del agua industrial permitieron identificar los contaminantes iniciales, en general derivados de la producción del ácido nalidíxico. Durante la primera combinación de procesos estudiada, que consistía en el empleo de la fotocátalisis solar seguida por un biotratamiento, se ha observado que algunos PT generados fotocatalíticamente eran persistentes y no podían ser degradados por el biotratamiento subsiguiente. En cambio, en la combinación de biotratamiento seguido por un

proceso de foto-Fenton, todos los compuestos remanentes eran totalmente eliminados, confirmando que esta combinación era la más apropiada.

OBJETIVOS

Existen numerosas evidencias de la creciente presencia de contaminantes orgánicos en aguas superficiales que enfatizan un progresivo proceso de polución. Los fármacos y en especial los antibióticos son ejemplos de sustancias orgánicas que se utilizan en grandes cantidades desde hace décadas pero sólo ahora se le ha dado la debida atención a la presencia y persistencia de esta clase de compuestos en el medio ambiente. Estudios recientes de identificación y cuantificación de fármacos en aguas naturales indican que éstos suelen encontrarse a niveles de concentración muy variables, oscilando desde los ng L^{-1} hasta niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$. La presencia de esos contaminantes en agua a medio y largo plazo puede tener consecuencias dramáticas y contribuir así de forma clara a la alteración y empobrecimiento de la biodiversidad y calidad del ecosistema en que hayan sido introducidos. No obstante, el conocimiento de los efectos tóxicos de estos contaminantes y de sus productos de transformación (PT), junto con el conocimiento de su persistencia son también elementos necesarios para una correcta valoración del riesgo e impacto ambiental provocados por ellos. Por tanto, se hace necesario tanto conocer el comportamiento de

estos contaminantes en agua como proponer técnicas de tratamiento que puedan eliminarlos.

En el ámbito de los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO) y su aplicabilidad al tratamiento de aguas, la eficacia de la fotocatalisis ha sido probada para una gran cantidad de sustancias orgánicas: fenoles, compuestos halogenados, pesticidas, colorantes, antibióticos, etc. Asimismo trabajos realizados recientemente ponen de manifiesto que el empleo de los PAO, en concreto fotocatalisis heterogénea con TiO_2 y fotocatalisis homogénea mediante foto-Fenton, llevados a cabo con el uso de radiación solar puede reducir notablemente los costes de tratamiento si se compara con otros PAO que tienen un elevado consumo energético. También, como indican muchas publicaciones actuales, la aplicabilidad de los PAO como pre-tratamiento asociado a un posterior tratamiento biológico, favorece la generación de productos de transformación más biodegradables, susceptibles de eliminación durante la etapa de biodegradación, que siempre será económica y medioambientalmente más beneficiosa.

En este contexto, los **objetivos principales** de esta Tesis Doctoral han sido:

- Evaluar procesos de fotodegradación solar de fármacos en agua, a fin de ampliar el conocimiento sobre el comportamiento e impacto de los contaminantes en el medio ambiente.
- Evaluar la aplicación de procesos de fotocatalisis solar en el tratamiento de diferentes fármacos disueltos en aguas de diferentes calidades.
- Evaluar la viabilidad de combinar procesos de fotocatalisis solar y tratamiento biológico en la depuración de un efluente real procedente de una industria farmacéutica.
- Valorar la aplicabilidad y eficiencia de los procesos estudiados a través de la identificación de productos de transformación generados, así como su eliminación.

Se ha pretendido alcanzar estos objetivos mediante la ejecución de los siguientes **objetivos parciales**:

- Evaluar la fotodegradación de fármacos en distintas disoluciones acuosas utilizando un simulador de la radiación solar, evaluando los PT generados.
- Descontaminar diferentes matrices de aguas mediante dos procesos de fotocatalisis solar, fotocatalisis heterogénea con TiO_2 y fotocatalisis homogénea con $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$ (foto-Fenton), comparando cuál es el más adecuado.

- Valorar la aplicabilidad de los tratamientos fotocatalíticos solares en plantas piloto, en condiciones experimentales semejantes a las que se utilizan en plantas industriales.
- Conocer la cinética de degradación tanto del compuesto original como de sus PT, así como del grado de mineralización alcanzado.
- Valorar la toxicidad de las aguas durante los procesos estudiados, mediante la aplicación de bioensayos de toxicidad aguda.
- Evaluar la biodegradabilidad del efluente a lo largo del proceso de oxidación fotocatalítica. Esto ha permitido determinar el momento idóneo en el que el aumento de la biodegradabilidad favorezca el empleo de un tratamiento biológico posterior con el fin de alcanzar un grado de depuración adecuado.
- Evaluar la combinación del proceso fotocatalítico y de un reactor biológico aerobio de lecho fijo colonizado por fangos activos para el tratamiento de un efluente real de la industria farmacéutica, estableciendo la secuencia de operación óptima.
- Identificar los PT generados durante los procesos de degradación y establecer sus posibles rutas de generación y transformación. Para ello se han empleado técnicas de extracción en fase sólida seguidas de análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS, en su acrónimo inglés).

Finalmente, cabe destacar que el trabajo de investigación que se recoge en esta Memoria ha sido desarrollado en colaboración entre el grupo de investigación de Destoxificación y Desinfección de Aguas de la Plataforma Solar de Almería y el grupo de investigación de Residuos de Plaguicidas en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Almería.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Consideraciones medioambientales

A lo largo de la historia, el progreso humano ha dependido del acceso a un agua limpia y de la capacidad de las sociedades para aprovechar el potencial del agua como recurso productivo. Dos de las bases para el desarrollo humano son el agua para la vida en el hogar y el agua destinada a la producción de los medios de sustento. El acceso al agua para la vida son una necesidad y un derecho humano fundamental. Sin embargo, más de 1000 millones de personas se ven privadas del derecho a una agua limpia y 2600 millones no tienen acceso a un saneamiento adecuado. Cada año mueren cerca de 1.8 millones de niños como consecuencia directa de la diarrea y otras enfermedades causadas por el agua contaminada y por un saneamiento insuficiente. Las causas de la crisis del agua radican en la pobreza, la desigualdad y las relaciones dispares de poder, así como en las políticas erróneas de gestión del agua que agravan la escasez de los recursos hídricos (PNUD, 2006).

Inicialmente, conviene realizar una precisión terminológica importante que reafirma la consonancia entre los terminos “recurso hídrico” y “agua” a lo largo de toda esta Memoria. Se comprende como “recurso hídrico” toda el “agua” que, como patrimonio natural, satisface una amplia gama de propósitos. El ciclo del agua está estrechamente relacionado con la distribución del agua y por lo tanto con la disponibilidad de la misma en las diferentes regiones del planeta. La gran disparidad en la distribución de los recursos hídricos está determinada por condiciones geográficas y climáticas singulares en cada región del mundo, lo que favorece o restringe el desarrollo de la vida en su entorno.

Otro aspecto relevante se refiere a la disponibilidad de los recursos hídricos. Como se sabe, los océanos y mares son las mayores reservas de agua de nuestro planeta, la cual presenta como principal característica un alto contenido de sales disueltas imposibilitando el uso doméstico, industrial o agrícola de la misma. La **figura 1.1** ilustra las proporciones de agua salada y de agua dulce que componen los recursos hídricos mundiales. Del volumen total global de agua, las aguas saladas constituyen el 97.5% y sólo el 2.5% restante comprende la reserva de agua dulce. De este último porcentaje, el 0.3% del agua dulce se encuentra en los lagos y ríos; el 30.8% está almacenada en forma de agua subterránea y el 68.9% está congelada en los glaciares o masas de hielo permanentes. De este modo, sólo una ínfima parte del agua dulce disponible en el planeta, constituida por ríos, lagos y aguas subterráneas, se convierte en la única fuente factible de agua para uso inmediato y pone de manifiesto la necesidad una gestión efectiva de este recurso hídrico finito y vulnerable, esencial para el sustento de la vida, el desarrollo y el medio ambiente.

En muchos casos, cuando la relación entre la población y la disponibilidad de agua excede determinados índices, se establecen niveles de *estrés hídrico* o escasez de agua. El concepto de estrés hídrico está basado en las necesidades mínimas de agua *per capita* que permite mantener la calidad de vida en regiones moderadamente desarrolladas y situadas en zonas áridas. La definición considera 100 Litros/día/persona como un dato orientativo del consumo de agua mínimo diario para que una región no padezca estrés hídrico. Indudablemente, el nivel a partir del cual se manifiesta el estrés hídrico varía geográficamente en función del clima, el grado de desarrollo económico y otros factores, pudiendo ser atenuado por programas de conservación y utilización de los recursos hídricos mediante tecnologías más eficientes (Beekman, 1997).

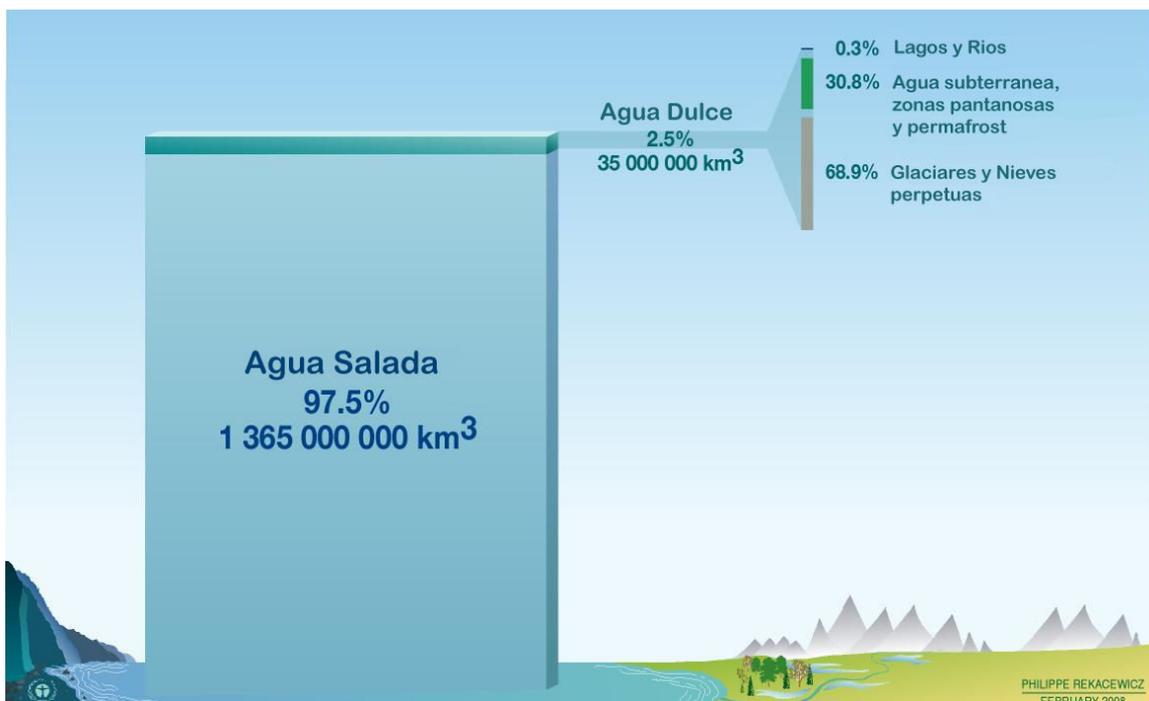


Figura 1.1 Estimaciones de la proporción de agua salada y agua dulce que componen los recursos hídricos mundiales (adaptada de Shiklomanov y UNESCO, 1999.)

Actualmente la relación entre el consumo y la explotación del agua, entendida ésta como las acciones encaminadas a usufructuar los recursos hídricos, refleja un gran desnivel. El uso del agua dulce en cada continente se basa en varios factores socioeconómicos de desarrollo, incluyendo características fisiográficas, climáticas y demográficas. El análisis indica que la explotación anual del agua dulce en todo el mundo ha crecido de 3790 km³ en 1995, a 4430 km³ en 2000. Cómo se observa en la **figura 1.2**, en el futuro se espera que la explotación global anual del agua ascienda cerca de 10-12% cada 10 años, alcanzando aproximadamente 5240 km³ antes de 2025.

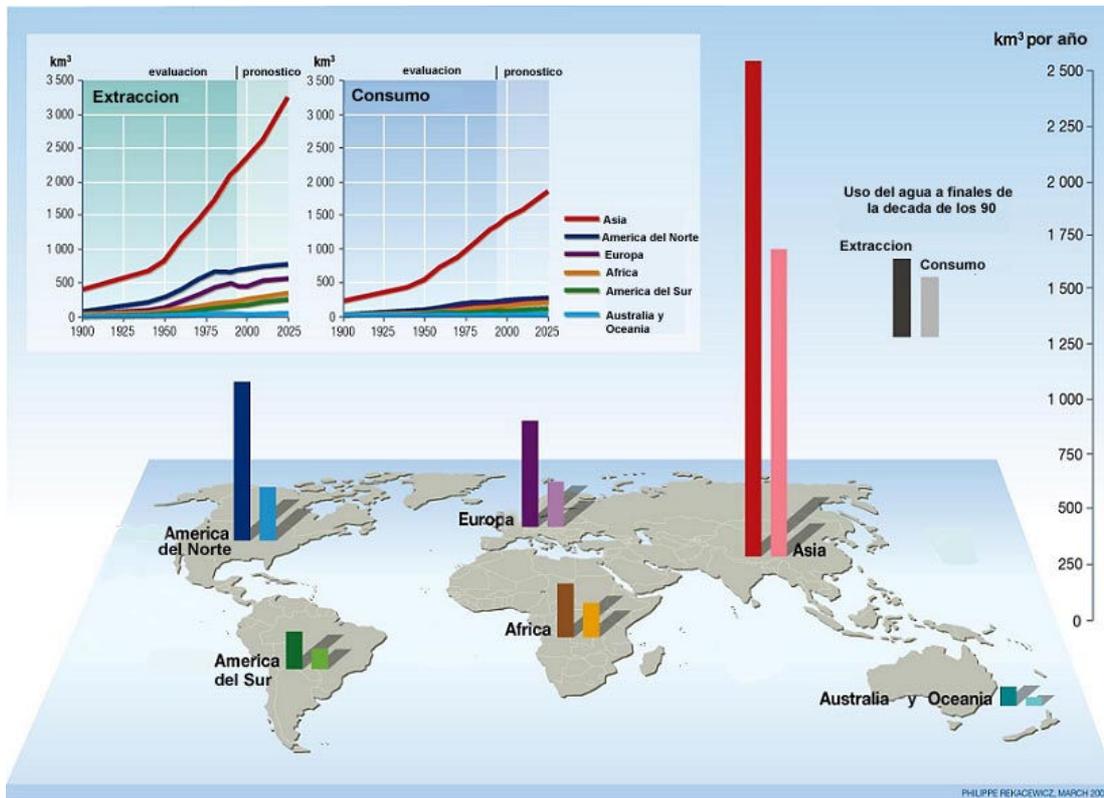


Figura 1.2 Estimaciones mundiales entre la explotación y el consumo de agua correspondiente a cada continente (adaptada de <http://maps.grida.no/go/graphic/water-withdrawal-and-consumption-the-big-gap>).

La creciente demanda de agua asociada a la reducción de los caudales en los ríos, la sobreexplotación de acuíferos a tasas superiores a la reposición natural y los problemas de contaminación y degradación de la calidad de las aguas son desafíos que requieren urgentemente estrategias que permitan resolver las numerosas tareas pendientes en cuanto a la correcta utilización de los recursos hídricos.

Actualmente, en muchas regiones del mundo donde abundan fuentes naturales de agua, muchos ríos, lagos y acuíferos están cada vez más contaminados. Se estima que el principal origen de la contaminación del agua son los residuos humanos, con más de 2 millones de toneladas al día de vertidos a los ríos, seguidos por los residuos industriales y los productos químicos, y finalmente los plaguicidas (UNESCO, 2003).

En España, de acuerdo con el Libro Blanco del Agua, la influencia negativa de determinadas acciones antrópicas ha provocado que el estado natural de las aguas se haya deteriorado gravemente, inhabilitándolas en muchos casos para el uso doméstico y agrícola. Aunque la mayoría de los ríos de la mitad norte peninsular presenten un estado óptimo de conservación, el grado de contaminación de las aguas aumenta a medida que van transcurriendo por núcleos urbanos e industriales, llegando, en algunos casos, a un estado

muy degradado en sus trechos medios y finales. En la mitad sur, si bien los problemas son similares a los de la mitad norte, la calidad del agua se empeora como consecuencia de los menores caudales presentes, lo que origina una menor dilución de los vertidos contaminantes. Actualmente, la calidad general de las aguas superficiales españolas no es del todo satisfactoria a la luz de la legislación vigente y de las aspiraciones existentes en el seno de la sociedad (Libro Blanco del Agua en España, 2000).

La calidad que ha de asegurarse depende de una serie de normas de obligado cumplimiento. Existe un gran número de Directivas comunitarias, traspuestas al ordenamiento jurídico español, que imponen unos requisitos exigentes y claros a la calidad que las aguas deben poseer en función de su uso (Libro Blanco del Agua en España, 2000).

En este contexto, la directiva marco del agua (WFD en su sigla en inglés; 2000/60/EC) establece un marco legal para la protección de las aguas subterráneas, superficiales, costeras y de estuario. Esta legislación tiene varios objetivos bien definidos: (i) proteger y aumentar la disponibilidad del agua previniendo el deterioro adicional de la misma; (ii) promover el uso sostenible del agua; (iii) aumentar la protección y mejora del ambiente acuático, con medidas específicas para la gradual disminución de las descargas; (iv) garantizar la progresiva reducción de la contaminación del agua subterránea; y (v) contribuir a la atenuación de los efectos de inundaciones y sequías. Se espera que hasta el 2015 estas medidas se concreten con éxito, conllevando así al mantenimiento y/o aumento de la calidad de los recursos hídricos en todos los países miembros de la Unión Europea (UE) (Borja, 2005).

El gran avance impulsado por la WFD está, entre otros factores, en la necesidad de poner en marcha estrategias para combatir la contaminación de las aguas, como evidencia claramente el artículo 16 de la misma. Como complemento a la WFD, la Directiva 2455/2001/EC fijó un listado de sustancias prioritarias, identificando 33 sustancias o grupos de sustancias de preocupación en las aguas de la UE debido al amplio uso y a las altas concentraciones en los ríos, los lagos y aguas costeras de estas sustancias. Esta lista deberá sufrir revisiones periódicas cada cuatro años y adecuarse cuando sea necesario. La lista original de sustancias prioritarias comprende principalmente compuestos orgánicos incluyendo diversos plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, en su acrónimo inglés), benceno, disolventes halogenados, compuestos retardadores de llama, plastificadores (ftalatos), tensioactivos, agentes anti-incrustantes y algunos metales pesados (Directive 2000/60/CE, 2000; Directive 2455/2001/CE, 2001).

Recientemente, a finales del año 2008, la Comisión Europea aprobó una nueva Directiva (2008/105/EC) relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la cual se modificaron y derogaron ulteriormente las Directivas 82/172/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE y por la que se modificó del mismo modo la WFD. La nueva directiva considera como primordial identificar las causas de la contaminación química de las aguas superficiales y tratar las emisiones preferentemente en la fuente de la misma, de la forma más eficaz en términos económicos y ambientales. En lo que concierne a las sustancias prioritarias y sustancias prioritarias peligrosas (véase **tabla 1.1**), la Directiva 2008/105/EC establece normas de calidad ambiental expresadas en medias anuales a un nivel no nocivo en la exposición a largo plazo y concentraciones máximas admisibles en la exposición a corto plazo. Además, como prevé el artículo 16, apartado 4 de la WFD, ésta considera importante el seguimiento de “otros contaminantes determinados” presentados en la **tabla 1.2**, como las dioxinas y los bifenilos policlorados (PCB, en sus siglas en inglés), los cuales pasarán por una revisión para su posible identificación como sustancias prioritarias o como sustancias peligrosas prioritarias a más tardar en principios del 2011 (Directive 2008/105/EC, 2008).

Tabla 1.1 Lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.

	Número CAS*	Número EU**	Nombre de la sustancia prioritaria	Identificado como sustancia peligrosa prioritaria
(1)	15972-60-8	240-110-8	Alaclor	
(2)	120-12-7	204-371-1	Antraceno	X
(3)	1912-24-9	217-617-8	Atrazina	
(4)	71-43-2	200-753-7	Benceno	
	n.a.	n.a.	Difenileters Brominados (DBE) (***)	X(****)
(5)	32534-81-9	n.a.	Pentabromodifenileter (congéneres nº 28, 47, 99, 100, 153 y 154)	
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cadmio y sus compuestos	X
(7)	85535-84-8	287-476-5	Cloroalcanos C ₁₀₋₁₃ (***)	X
(8)	470-90-6	207-432-0	Clorfenvinfós	
(9)	2921-88-2	220-864-4	Clorpirifós (cloropirifós-etil)	
(10)	107-06-2	203-458-1	1,2-dicloroetano	
(11)	75-09-2	200-838-9	Diclorometano	
(12)	117-81-7	204-211-0	Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)	
(13)	330-54-1	206-354-4	Diurón	
(14)	115-29-7	204-079-4	Endosulfán	X
(15)	206-44-0	205-912-4	Fluoranteno (****)	
(16)	118-74-1	204-273-9	Hexaclorobenceno	X
(17)	87-68-3	201-765-5	Hexaclorobutadieno	X
(18)	608-73-1	210-158-9	Hexaclorociclohexano	X

(19)	34123-59-6	251-835-4	Isoproturón	
(20)	7439-92-1	231-100-4	Plomo y sus compuestos	
(21)	7439-97-6	231-106-7	Mercurio y sus compuestos	X
(22)	91-20-3	202-049-5	Naftaleno	
(23)	7440-02-0	231-111-4	Niquel y sus compuestos	
(24)	25154-52-3	246-672-0	Nonilfenoles	X
	104-40-5	203-199-4	(4-Nonilfenol)	X
(25)	1806-26-4	217-302-5	Octilfenol	
	140-66-9	n.a.	(4-(1,1',3,3' tetrametilbutilfenol))	
(26)	608-93-5	210-172-5	Pentaclorobenceno	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentaclorofenol	
(28)	n.a.	n.a.	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	X
	50-32-8	200-028-5	(Benzo(a)pireno),	X
	205-99-2	205-911-9	(Benzo(b)fluoranteno),	X
	191-24-2	205-883-8	(Benzo(g,h,i)perileno),	X
	207-08-9	205-916-6	(Benzo(k)fluoranteno),	X
	193-39-5	205-893-2	(Indeno(1,2,3-cd)pireno)	X
(29)	122-34-9	204-535-2	Simazina	
(30)	n.a.	n.a.	Compuestos de tributilestaño	X
	36643-28-4	n.a.	Catión de tributilestaño	X
(31)	12002-48-1	234-413-4	Triclorobencenos	
(32)	67-66-3	200-663-8	Triclorometano (cloroformo)	
(33)	1582-09-8	216-428-8	Trifluralin	

*CAS: *Chemical Abstracts Service* en su acrónimo en inglés.

**Número EU: Número de registro del Catálogo Europeo de Sustancias Químicas Comercializadas (EINECS) o de la Lista Europea de Sustancias Químicas Notificadas (ELINCS).

***Estos grupos de sustancias incluyen normalmente un número considerable de distintos compuestos. En la actualidad, no pueden darse parámetros indicativos apropiados.

****Solo pentabromodifeniléter (nº CAS: 32534-81-9)

*****El fluoranteno figura en la lista como indicador de otros hidrocarburos aromáticos policíclicos más peligrosos.

Tabla 1.2 Sustancias sometidas a revisión para su posible identificación como sustancias prioritarias o como sustancias peligrosas prioritarias.

Número CAS	Número EU	Nombre de la sustancia
1066-51-9	—	AMPA
25057-89-0	246-585-8	Bentazon
80-05-7		Bisfenol A
115-32-2	204-082-0	Dicofol
60-00-4	200-449-4	EDTA
57-12-5		Cianuro libre
1071-83-6	213-997-4	Glifosato
7085-19-0	230-386-8	Mecoprop (MCPP)
81-15-2	201-329-4	Almizcle xileno
1763-23-1		Ácido de perfluoro-octan-sulfonato (PFOS)
124495-18-7	—	Quinoxifeno (5,7,-dicloro-4-(p-fluorofenoxi) quinolina)
		Dioxinas
		PCB

En el ámbito internacional externo a la UE, una serie de instrumentos jurídicos han sido adoptados a lo largo de los últimos 30 años con el fin de eliminar y/o limitar el uso de contaminantes orgánicos persistentes (COP). Las principales iniciativas fueron: (i) Protocolo sobre contaminantes orgánicos persistentes, del Convenio de Ginebra de 1979, adoptado en Aarhus (Dinamarca) en 1998; (ii) Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación; (iii) Convenio de Rotterdam sobre el procedimiento de consentimiento fundamentado previo aplicable a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional de 1987; (iv) Convenio de Barcelona para la protección del Mar Mediterráneo: Protocolo para la protección del mar Mediterráneo contra la contaminación causada por fuentes y actividades situadas en tierra (*Land Based Sources-LBS*) y programa de acciones estratégicas del plan de acción del Mediterráneo; (v) Convenio para la protección del medio marino del Atlántico Nordeste (Convenio OSPAR); (vi) Convenio de Londres (1972) y Protocolo de 1996 sobre la prevención de la contaminación del mar por vertidos de desechos y otras materias; (vii) Foro Intergubernamental sobre Seguridad Química (*Intergovernmental Forum on Chemical Safety-IFCS*); y (viii) Convenio de Aarhus sobre acceso a la información, participación pública en la toma de decisiones y acceso a la justicia en cuestiones ambientales.

Actualmente, se destaca la decisión 19/13 C, del 7 de febrero de 1997, del Consejo de Administración del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, para estimular actividades internacionales de protección de la salud humana y el medio ambiente, que impulsó la formulación del Convenio de Estocolmo (CE) (Convenio de Estocolmo, 2001). El CE es un tratado internacional firmado por 151 países que establece medidas para eliminar o reducir el lanzamiento de COP al medio ambiente. El CE, en el artículo 11, en sus apartados 1 y 2, considera que los países, dentro de sus capacidades, alentarán y/o efectuarán las actividades de investigación, desarrollo, vigilancia y cooperación adecuadas respecto de los COP y, cuando proceda, respecto de sus alternativas y de otros contaminantes orgánicos persistentes potenciales (COPP). En especial, el CE considera fundamentalmente importante el cese de los vertidos y, cuando no sea viable, la reducción en ellos de las sustancias destacadas en la **tabla 1.3**.

Tabla 1.3 Sustancias que deben ser eliminadas y contempladas por el CE.

Número CAS	Nombre de la sustancia
309-00-2	Aldrina
57-74-9	Clordano
60-57-1	Dieldrina
72-20-8	Endrina
76-44-8	Heptacloro

118-74-1	Hexaclorobenceno
2385-85-5	Mirex
8001-35-2	Toxafeno
	PCBs
50-29-3	DDT (1,1,1-tricloro-2, 2-bis (4-clorofenil) etano) *
	éteres de tetra-, penta-, hexa- y heptabromodifenilo
143-50-5	Clordecona
	Hexabromobifenilo
58-89-9	Lindano
1763-23-1	Ácido sulfónico de perfluorooctano y sus sales *
307-35-7	fluoruro de sulfonilo perfluorooctano *
	alfa hexaclorociclohexano y beta hexaclorociclohexano
608-93-5	pentaclorobenceno

* sustancia de liberación reducida

Además, con vistas a fomentar la aplicación de dichas acciones en todos los países signatarios, el CE considera pertinente apoyar y seguir desarrollando, según proceda, programas, redes y organizaciones internacionales que tengan por objetivo definir, realizar, evaluar y financiar actividades de investigación, compilación de datos y vigilancia, teniéndose en cuenta los problemas y necesidades, especialmente en materia de recursos financieros y técnicos, de los países en desarrollo y los países con economías en transición.

En general, se observa que todas las acciones de carácter internacional, como los convenios y acuerdos descritos anteriormente, idean, en su esencia, la gestión y el desarrollo de políticas de preservación de los recursos hídricos cada vez más eficaces. Sin embargo, la desigualdad y las políticas económicas proteccionistas adoptadas por muchas naciones y asociaciones de países aún generan un retraso en la adopción de medidas restrictivas, hecho que se refleja en el ínfimo número de contaminantes regulados.

1.2 Contaminantes Emergentes en el Medio Natural

Durante los últimos 30 años, la química medioambiental se ha centrado casi exclusivamente en los “contaminantes convencionales” (CC), principalmente plaguicidas y gran cantidad de productos químicos industriales. No obstante, en términos del gran número de productos químicos de uso comercial, los CC representan sólo un pequeño porcentaje del total de productos químicos que se pueden detectar en el medio ambiente (Daughton y Ternes, 1999).

A lo largo de las últimas décadas, sustancias biológicamente activas sintetizadas para la utilización en la agricultura, la industria y la medicina han sido vertidas al medio ambiente sin considerar las posibles consecuencias negativas que traería esta acción. El tipo de

sustancias potencialmente peligrosas y el rango de concentración de las mismas en el medio ambiente pueden ser muy variables. En la UE están registradas aproximadamente unas 100000 sustancias diferentes, si bien este número se incrementa constantemente con el desarrollo de otras nuevas. Al margen de los contaminantes prioritarios, cuyos riesgos están bien establecidos, la mayoría de estos compuestos orgánicos, están poco estudiados y para ellos no se han establecido todavía criterios de calidad ambiental.

En la actualidad, el desarrollo de las técnicas analíticas, como la cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS o GC-MS/MS) y sobre todo la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS y LC-MS/MS), han permitido la detección y análisis en el medio ambiente de muchos de estos nuevos compuestos orgánicos, antes difícilmente evaluables (Petrovic y Barceló, 2006; Hogenboom y cols., 2009; Pietrogrande y Basaglia, 2007; Gómez y cols., 2009).

Los denominados “contaminantes emergentes” se definen como un grupo de sustancias no reguladas, que pueden ser candidatas a una futura regulación dependiendo de los resultados de investigaciones sobre sus efectos en la salud humana y en la biota acuática y de datos de seguimiento con respecto a la frecuencia de su presencia en el medio ambiente. Recientemente una amplia gama de compuestos ha sido considerada como particularmente relevante, como por ejemplo: detergentes, productos farmacéuticos, productos de higiene personal, retardantes de llama, antisépticos, aditivos industriales, esteroides y hormonas. La principal característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que las altas tasas de transformación y/o remoción que son capaces de sufrir pueden ser compensadas por la continua introducción de los mismos en el medio ambiente. Para la mayoría de los contaminantes emergentes, la incidencia, la evaluación del riesgo y los datos ecotoxicológicos no están disponibles, así que es difícil predecir qué efectos pueden tener sobre la salud humana y de los organismos acuáticos (Barceló, 2003). En la **tabla 1.4** se presentan los grupos de contaminantes emergentes más relevantes con algunos ejemplos. Muchos de estos contaminantes químicos son omnipresentes y persistentes y han sido detectados en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y algunos de ellos también en aguas superficiales, subterráneas y potabilizadas.

Tabla 1.4 Grupos de contaminantes emergentes encontrados en el medio ambiente (Barceló, 2003).

Contaminantes Emergentes	
Grupos de Compuestos	Ejemplos
Productos Farmacéuticos	
Antibióticos (de uso humano y veterinario)	Trimetoprim, eritromicina, lincomicina, sulfametoxazol
Analgésicos y anti-inflamatorios	Codeína, ibuprofeno, acetaminofeno, ácido acetil salicílico, diclofenaco, fenoprofen
Fármacos psiquiátricos	Diazepan
Anti-epilépticos	Carbamazepina
Reguladores de lípidos	Bezafibrato, ácido clofibrico, ácido fenofibrico
β -bloqueadores	Metoprolol, propranolol, timolol
contraste de Rayos-X	Iopromide, iopamidol, diatrizoato
Esteroides y hormonas (anticonceptivos)	Estradiol, estrona, estriol, dietilbestrol
Productos de higiene personal	
Fragancias	Nitro, policíclic y macrocíclic almizcle
compuestos activos de cremas solares	Benzofenona
Repelentes de insectos	N,N-dietiltoluamida
Antisépticos	Triclosan, clorofeoe
Detergentes y sus metabolitos	Etoxilatos de Alquilfenol, alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol), carboxilatos de alquilfenol
Retardadores de llama	Difenil éteres polibromados (PBDEs), bisfenol A tetrabromo, Tris(2-cloroetil)fosfato
Aditivos industriales	Agentes quelantes (EDTA), sulfonatos aromáticos.
Aditivos de gasolinas	Diaquil éteres, metil-ter-butil éter (MTBE)
Subproductos de desinfectantes	Bromoácidos, bromoacetonitrilos, bromoaldehídos, cianoformaldehídos

1.2.1 Compuestos con actividad farmacológica

Los compuestos farmacéuticos son moléculas complejas con diversas funcionalidades y propiedades fisicoquímicas y biológicas, desarrollados y utilizados debido a la actividad biológica específica que presentan para el tratamiento, prevención o diagnóstico de enfermedades. La mayor parte de los fármacos son moléculas pequeñas que presentan pesos moleculares comprendidos en el rango de 200 a 1000 Da y, en general se caracterizan por su elevada polaridad. Son parte de los compuestos definidos como “microcontaminantes”, porque se encuentran en el ambiente acuático en rangos de concentración muy variables que van desde ng L^{-1} hasta $\mu\text{g L}^{-1}$ (Kümmerer, 2009a).

Los medicamentos biológicos son productos que poseen una sustancia activa, la cual es fabricada a partir de un organismo vivo, tales como microorganismos, órganos y tejidos de

origen animal o vegetal, entre otros. Son ejemplos de medicamentos biológicos el etanercept y tocilizumab, ambos utilizados en el tratamiento de la artritis reumatoide. Los fármacos biotecnológicos, por su parte, son productos que se obtienen mediante las denominadas técnicas de “ADN recombinante”, que se basan en implantar material genético a los organismos vivos, que se convertirían en productores de una proteína, conocida como “recombinante”, que es la que se administraría al ser humano para el tratamiento de una determinada enfermedad en que ésta se encuentra deficiente o alterada. El ejemplo más conocido de ese tipo de medicina es la insulina. Finalmente, los medicamentos convencionales son de origen químico, como, por ejemplo, el ácido acetil salicílico.

Los compuestos con actividad farmacológica pueden ser clasificados de acuerdo con su propósito y actividad biológica (por ejemplo: antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios, antihistamínicos, medios de contraste para radiografías, etc.). La clasificación de los ingredientes activos tiene relación con los diferentes grupos químicos “activos” presentes en la estructura de cada sustancia, como es el caso de los antibióticos que a su vez son clasificados en distintos subgrupos (β -lactamas, cefalosporinas, penicilinas y quinolonas). Otras posibles clasificaciones tienen en cuenta el modo de acción, el origen y la naturaleza de la enfermedad a la que combate.

Se considera que los fármacos representan el grupo de contaminantes emergentes más importante de la actualidad fundamentalmente por dos razones: el aumento del uso de estas sustancias debido al incremento de la esperanza de vida experimentado en la población mundial; y la mejora en los límites de detección de estos compuestos gracias al gran avance en las técnicas analíticas de detección en los últimos años.

Se puede considerar que hace relativamente poco tiempo se empezó a dar la debida atención a la continua aportación de compuestos con actividad farmacológica al medio ambiente y el efecto de los mismos. Fue en los años 70 cuando por primera vez se manifiesta el interés científico en ello a través de estudios del efecto de las hormonas en el medio ambiente. No obstante, la mayor importancia ofrecida en la década siguiente al estudio de los CC hizo que la investigación de los fármacos en el medio ambiente sufriera un considerable atraso, lo cual fue en parte atenuado a mediados de los 90 cuando esta temática volvió a ser el foco de numerosos trabajos de investigación.

Estudios recientes han detectado más de 80 compuestos con actividad farmacológica (Heberer, 2002) en aguas superficiales a niveles de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. Los niveles más altos podrían encontrarse en sitios cercanos a vertidos de aguas residuales. En la **tabla 1.5** se

identifican los compuestos farmacéuticos más utilizados y los niveles de los mismos en el medio ambiente acuático en diferentes países del mundo.

Tabla 1.5 Concentraciones de los fármacos más detectados en el medio ambiente acuático en diferentes países del mundo.

Fármacos	Concentración Media (min-max, ng L ⁻¹)	Localización	Referencias
Antiinflamatorios/ analgésicos			
Ibuprofeno	(<L.D.-80) (7-12) 200 70 (<L.D.-674) (<L.D.-34) (<L.D.-928) (<L.D.-200) 60 (L.D.-150) 28 (11-38) 13 (<L.D.-17) 113 685 1417 6.3-2784 20 (L.D.-7.5) 30 23 2383 5-100	Ríos, Suiza Lago, Suiza Corrientes, EE.UU Rios, Alemania Canales, EE. UU Rio, EE. UU Estuarios, R. Unido Pozos, Berlin Rio, España Lagos/rios, Corea del Sur Rio, Italia Río, EE.UU Río, China Rio, China Rio, España Rio, España Rios, Taiwan Rios, Corea del Sur Rios, Luxemburgo Águas superficiales, R. Unido	Tixier, 2003 Tixier, 2003 Kolpin, 2002 Ternes, 1998 Boyd, 2004 Zhang, 2007 Thomas, 2004 Heberer, 2001 Gros, 2006 Kim, 2007 Zuccato, 2005 Yu y Chu, 2009 Zhao, 2009 Peng, 2008 Fernández, 2010 Kuster, 2008 Chen, 2008 Yoon, 2010 Pailler, 2009 Kasprzyk-Hordern, 2008
Acetaminofen	110 (25-65) 20 (<L.D.-110) 42 (<L.D.-250) 33 (4-73) 13 (<L.D.-66) 0.1-43.3	Corrientes, EE.UU Rio, EE. UU Rio, Japón Rio, España Lagos, rios, Corea del Sur Rios, Alemania Río, España	Kolpin, 2002 Zhang, 2007 Nakada, 2007 Gros, 2006 Kim, 2007 Wiegel, 2004 Fernández, 2010
Naproxen	(<L.D.-50) (<L.D.-380) 4-10 70 (<L.D.-145) (<L.D.-135) 33 (L.D.-50) 11 (2-18) 5 (L.D.-32) 1.8-640.4 57 17-146	Rio, Brasil Ríos, Suiza Lago, Suiza Rios, Alemania Canales, EE. UU Rio, EE. UU Rio, España Lagos, rios, Corea del Sur Rios, Alemania Río, España Ríos, Corea del Sur Aguas superficiales, R. Unido	Stumpf, 1999 Tixier, 2003 Tixier, 2003 Ternes, 1998 Boyd, 2004 Zhang, 2007 Gros, 2006 Kim, 2007 Wiegel, 2004 Fernández, 2010 Yoon, 2010 Kasprzyk-Hordern, 2008
Diclofenaco	(<L.D.-195) 2.2 (<L.D.-3.3) (<L.D.-380) 29 (<L.D.-60) 3 (1-7) 27 (<L.D.-69) 150 0.7-156 20 (L.D.-7.5) 50 15 55 9-40	Estuarios, R. Unido Rio, Japón Pozos, Berlin Rio, España Lagos, rios, Corea del Sur Rios, Alemania Río, China Rio, España Rio, España Rios, Taiwan Rios, Corea del Sur Rios, Luxemburgo Águas superficiales, R. Unido	Thomas, 2004 Nakada, 2007 Heberer, 2001 Gros, 2006 Kim, 2007 Wiegel, 2004 Zhao, 2009 Fernández, 2010 Kuster, 2008 Chen, 2008 Yoon, 2010 Pailler, 2009 Kasprzyk-Hordern, 2008

Indometacin	11 (<L.D.-16) (<L.D.-10)	Río, Japón Río, España	Nakada, 2007 Gros, 2006
Codeína	(17-123) 40 (<L.D.-54)	Lago, EE. UU Ríos, Rumania	Snyder, 2001 Moldovan, 2006
Hidrocodone	(6-13) 2 (1-2)	Lago, EE. UU Lagos, ríos, Corea del Sur	Snyder, 2001 Kim, 2007
Reguladores lipídicos			
Bezafibrato	26 (<L.D.-170) 8 (<L.D.-10) 2 (<L.D.-3) 0.3-46	Río, Japón Río, España Río, Italia Río, España	Nakada, 2007 Gros, 2006 Zuccato, 2005 Fernández, 2010
Gemfibrozil	(<L.D.-340) 46 (<L.D.-60) 7 (2-9) 8 (<L.D.-27)	Pozos, Berlin Río, España Lagos, ríos, Corea del Sur Ríos, Alemania	Heberer, 2001 Gros, 2006 Kim, 2007 Wiegel, 2004
Betabloqueantes			
Propranolol	(<L.D.-56) 0.1-7.3	Estuarios, R. Unido Río, España	Thomas, 2004 Fernández, 2010
Atenolol	8 (<L.D.-46) 72 (<L.D.-250) 17 (<L.D.-41) 1.9-334.3 45.3 (L.D.-17) 83 42-560	Río, Japón Río, España Río, Italia Río, España Río, España Ríos, Corea del Sur Águas superficiales, R. Unido	Nakada, 2007 Gros, 2006 Zuccato, 2005 Fernández, 2010 Kuster, 2009 Yoon, 2010 Kasprzyk-Hordern, 2008
Antiepiléptico			
Carbamazepina	(10-320) (30-55) 250 (43-114) (<L.D.-570) (14-35) 30 (<L.D.-110) 25 (5-61) 0.3-104 120 44	Ríos, Suiza Lago, Suiza Ríos, Alemania Río, EE. UU Subterránea, Alemania Lago, EE. UU Río, España Lagos, ríos, Corea del Sur Río, España Ríos, Taiwán Ríos, Corea del Sur	Tixier, 2003 Tixier, 2003 Ternes, 1998 Zhang, 2007 Ternes, 2007 Snyder, 2001 Gros, 2006 Kim, 2007 Fernández, 2010 Chen, 2008 Yoon, 2010
Tranquilizante			
Diazepam	(3-62) 31 (<L.D.-34) 0.38	Lago, EE. UU Ríos, Rumania Ríos, Corea del Sur	Snyder, 2001 Moldovan, 2006 Yoon, 2010
Hormonas			
Estrona	27 (<L.D.-5) 24 4 (2-5) 0.64 (L.D.-0.24) 1.6 27	Corrientes, EE.UU Río, EE. UU Acuífero, Australia Lagos, ríos, Corea del Sur Río, España Ríos, Corea del Sur Ríos, Luxemburgo	Kolpin, 2002 Zhang, 2007 Overacre, 2006 Kim, 2007 Kuster, 2008 Yoon, 2010 Pailler, 2009
17β-estradiol	9 (<L.D.-5)	Corrientes, EE. UU Río, EE. UU	Kolpin, 2002 Zhang, 2007
17α-etinilestradiol	73	Corrientes, EE.UU	Kolpin, 2002
Antibióticos			
Trimetoprim	(<L.D.-569) 11 (<L.D.-20) 4 (3-5) 27 8.9 2-120	Estuarios, R. Unido Río, España Lagos, ríos, Corea del Sur Ríos, Francia Ríos, Corea del Sur Aguas superficiales, R. Unido	Thomas, 2004 Gros, 2006 Kim, 2007 Tamtam, 2008 Yoon, 2010 Kasprzyk-Hordern, 2008
Sulfametoxazole	38(<L.D.-160) (<L.D.-110) 20 (2-36) 0.1-23.7 69 31	Río, Japón Subterránea, Alemania Lagos, ríos, Corea del Sur Río, España Ríos, Francia Ríos, Corea del Sur	Nakada, 2007 Ternes, 2007 Kim, 2007 Fernández, 2010 Tamtam, 2008 Yoon, 2010

	22 0.5-2	Ríos, Luxemburgo Aguas superficiales, R. Unido	Pailler, 2009 Kasprzyk-Hordern, 2008
Eritromicina	17 (<L.D.-30) 3 (2-5) 3 (<L.D.-16)	Río, España Lagos, ríos, Corea del Sur Río, Italia	Gros, 2006 Kim, 2007 Zuccato, 2005
Azitromizina	7 (<L.D.-70) 8 (<L.D.-20)	Río, Japón Río, España	Nakada, 2007 Gros, 2006
Tamoxifen	(<L.D.-71)	Estuarios, R. Unido	Thomas, 2004
Flumequina	13	Ríos, Francia	Tamtam, 2008
Contrastes de radiología			
Diatrizoato	(1600-9600)	Subterránea, Alemania	Ternes, 2007
Iopromide	134 (20-361)	Lagos, ríos, Corea del Sur	Kim, 2007
Diuréticos			
Furosemida	15 (<L.D.-21) 4 (<L.D.-67)	Río, Japón Río, Italia	Nakada, 2007 Zuccato, 2005
Protector gástrico			
Ranitidina	1.3 (<L.D.-4) <3-39	Río, Italia Aguas superficiales, R. Unido	Zuccato, 2005 Kasprzyk-Hordern, 2008
Anticoagulante			
Pentoxifilina	(5-50) 1.6 239 (<L.D.-299)	Lago, EE. UU Lagos, ríos, Corea del Sur Ríos, Rumania	Snyder, 2001 Kim, 2007 Moldovan, 2006
Metabolitos			
Acido clofíbrico	(<L.D.-30) (<L.D.-19) (<L.D.-30) (6-8) 66 (3-27) (<L.D.-111) (<L.D.-7300) (<L.D.-170) 11 (10-20) 17 248 20 (L.D.-7.5)	Río, Brasil Mar del norte Ríos, Suiza Lago, Suiza Ríos, Alemania Río, EE. UU Estuarios, R. Unido Pozos, Berlin Água potable, Berlin Río, España Río, China Río, China Río, España	Stumpf, 1999 Weigel, 2002 Tixier, 2003 Tixier, 2003 Ternes, 1998 Zhang, 2007 Thomas, 2004 Heberer, 2001 Heberer, 2001 Gros, 2006 Zhao, 2009 Peng, 2008 Kuster, 2008
Ácido salicílico	(<L.D.-1225) 2098 0.1-63.1 0.3-302	Pozos, Berlin Río, China Río, España Águas superficiales, R. Unido	Heberer, 2001 Peng, 2008 Fernández, 2010 Kasprzyk-Hordern, 2008
4-Formilaminoantipirina	272 (103-510) 227 (<L.D.-707)	Ríos, Rumania Ríos, Alemania	Moldovan, 2006 Wiegel, 2004
4-Acetilaminoantipirina	992 (312-1560) 234 (64-698)	Ríos, Rumania Ríos, Alemania	Moldovan, 2006 Wiegel, 2004
Otros			
Cafeína	(2-16) 81 (<L.D.-38) 342 (<L.D.-2100) (10-47) 105 (3-194) 3480 (428-9700) 12.2-415.7 94	Mar del norte Corrientes, EE.UU Río, EE. UU Río, Japón Lago, EE. UU Lagos, ríos, Corea del Sur Ríos, Rumania Río, España Ríos. Corea del Sur	Weigel, 2002 Kolpin, 2002 Zhang, 2007 Nakada, 2007 Snyder, 2001 Kim, 2007 Moldovan, 2006 Fernández, 2010 Yoon, 2010

Los fármacos que pueden ser comercializados sin prescripción médica, como los analgésicos y antiinflamatorios, son los que se detectan más frecuentemente y a concentraciones más altas en el medio ambiente (Sim y cols., 2010). Hay que destacar la contribución de los metabolitos de los fármacos como una parte muy importante de la

contaminación farmacológica de los recursos hídricos, ya que éstos han sido detectados a elevadas concentraciones (recogidas en la **tabla 1.5**).

Se conocen como “metabolitos” los compuestos derivados de la biotransformación orgánica, es decir, todos los compuestos producto de un cambio estructural del fármaco en el cuerpo (metabolismo) de seres humanos y de animales. La conceptualización de este término se hace necesaria ya que la nomenclatura usada por diversos autores es a menudo algo confusa. Además de estos cambios que producen “metabolitos”, una sustancia química puede experimentar diversos cambios estructurales por una variedad de procesos después de su introducción en el medio ambiente. En este caso, las transformaciones estructurales pueden ser el resultado de distintos procesos, tales como oxidación, hidrólisis y fotodegradación. A los productos resultantes de estos procesos se los ha denominado “productos de transformación” (PT) (Kümmerer, 2009b). La **figura 1.3** demuestra una representación esquemática que permite diferenciar los metabolitos de los PT.

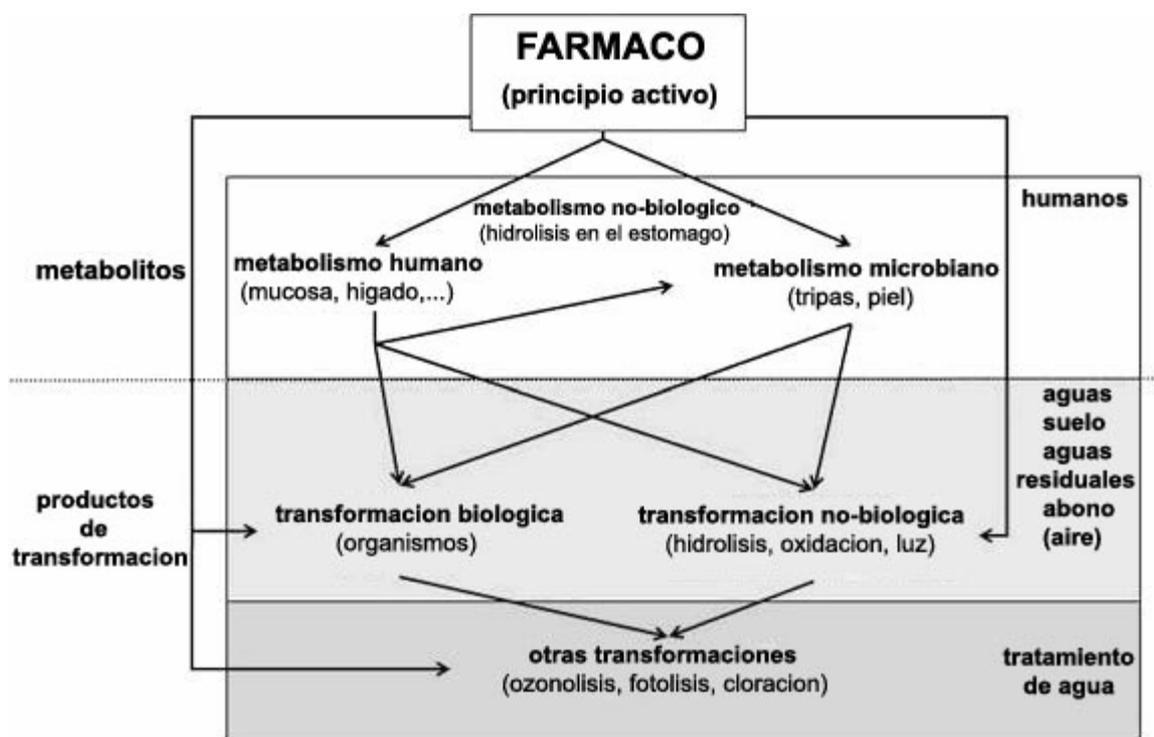


Figura 1.3 Metabolitos y PT (adaptada de Kümmerer, 2009b).

1.2.2. Principales rutas de entrada de los fármacos en el medio ambiente

Múltiples investigaciones han mostrado que la principal ruta de entrada de los compuestos con actividad farmacológica al medio ambiente ocurre a través de las aguas residuales urbanas no tratadas y los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales

(EDAR), puesto que muchas de estas EDAR no están diseñadas para tratar este tipo de compuestos y, por lo tanto, una alta proporción de los mismos y de sus metabolitos pasan al medio ambiente, como indica la **tabla 1.6**. La presencia de una amplia gama de fármacos en el rango de concentraciones que varían desde ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ en los efluentes de las EDAR de varios países del mundo confirma la ineficacia de los tratamientos convencionales empleados por las depuradoras para estos compuestos y pone de manifiesto el carácter persistente de estos microcontaminantes. Los antibióticos son los fármacos más estudiados debido a dos factores principales: por la posibilidad de que se generen fenómenos de resistencia bacteriana; y porque, como se indica en la **tabla 1.6**, el porcentaje de eliminación de estos compuestos en las plantas de tratamiento es reducido. Los antibióticos más frecuentemente detectados y más abundantes en las EDAR son el trimetoprim, ciprofloxacino, ofloxacino, sulfametoxazol, eritromicina y su metabolito.

Tabla 1.6 Concentraciones medias y máximas y porcentajes de eliminación de los fármacos en diferentes países del mundo.

Fármacos	Efluente EDAR Conc.(ng L ⁻¹) media-máxima	Porcentaje Eliminación (%)	País	Referencias
Analgésicos/ antiinflamatorios Diclofenaco	900-2200	59	España	Gómez, 2007
	270-598	72	Reino Unido	Roberts, 2006
	194-748	< 0	Canada	Lishman, 2006
	680-5500	-	F, G, I, S*	Andreozzi, 2003
	60-80	-	EE.UU	Sedlak, 2005
	23	-	Corea	Sim, 2009
	743-2478	-	Irlanda	Lacey, 2008
	318	-	China	Sui, 2010
	8.3-47.2	-	EE. UU	Spongberg, 2008
Ibuprofeno	7100-28000	95	España	Gómez, 2007
	6400-9450	91	España	Santos, 2005
	50-320	-	EE.UU	Sedlak, 2005
	348-773	95	Canada	Lishman, 2006
Naproxen	1840-4200	64	España	Bueno, 2007
	2010-2780	62	España	Santos, 2005
	300-3200	-	EE. UU	Sedlak, 2005
	452-1189	92	Canada	Lishman, 2006
	1100-5200	-	F, G, I, S*	Andreozzi, 2003
Acetaminofen	59-164	99.8	España	Bueno, 2007
	<20-<20	100	Reino Unido	Roberts, 2006
	10-19	99.9	Corea del Sur	Kim, 2007
Ketoprofen	340-1070	37	España	Santos, 2005
	318-620	29	Croacia	Gros, 2006
	125-210	23	Canada	Lishman, 2006
	38	-	Corea	Sim, 2009
4-MAA (metabolito activo dipirona)	1051-9253	66	España	Bueno, 2007
	260-360	54	Alemania	Ternes, 2001a
Acido acetil salicílico (aspirina)	220-1500	-	Alemania	Ternes, 2001b
	18	-	Corea	Sim, 2009

Acido salicílico (metabolito aspirina)	5190-13000 3600-59600 <115 25.2-47.2	- - - -	España Canada Irlanda EE. UU	Farré, 2001 Metcalfé, 2004 Lacey, 2008 Spongberg, 2008
Codeína	900-8100	46	España	Gómez, 2007
Acido mefenámico	342-396 7-10 34	< 0 < 0 -	Reino Unido Croacia Corea	Roberts, 2006 Gros, 2006 Sim, 2009
Antibióticos				
Trimetoprim	331-1264 271-322 550-1900 320-660 58-188 70-190 67-360 400	20 < 0 - - - - - -	España Reino Unido EE.UU Alemania Corea del Sur Canada Irlanda China	Bueno, 2007 Roberts, 2006 Sedlak, 2005 Ternes, 2001b Kim, 2007 Metcalfé, 2004 Lacey, 2008 Sui, 2010
Ciprofloxacino	923-3353 239-514 170-860 120-400 8.8-109.9	62 - - - -	España Italia EE.UU Canada EE. UU	Bueno, 2007 Castiglioni, 2005 Sedlak, 2005 Metcalfé, 2004 Spongberg, 2008
Ofloxacino	4422-13426 652-1081	30 -	España Italia	Bueno, 2007 Castiglioni, 2005
Eritromicina	519-973 89-353 130-294 17-30 270-300	< 0 - < 0 < 0 -	España Italia Corea del Sur Croacia EE.UU	Bueno, 2007 Castiglioni, 2005 Kim, 2007 Gros, 2006 Sedlak, 2005
Dehidrato-eritromicina (metabolito eritromicina)	2500-6000	-	Alemania	Ternes, 2001b
Sulfametoxazol	275-794 390-820 400-2000 136-407 1400-2000 240-870 166-553 141 79.4-472.4	64 34 - 30 - - - - -	España Croacia Alemania Corea del Sur EE.UU Canada Irlanda EE. UU EE. UU	Bueno 2007 Gros, 2006 Ternes, 2001b Kim, 2007 Sedlak, 2005 Metcalfé, 2004 Lacey, 2008 Bartelt-Hunt, 2009 Spongberg, 2008
Azitromicina	96-210 640	37 -	Croacia EE. UU	Gros, 2006 Bartelt-Hunt, 2009
Claritromicina	140-260 31-73 90-540	- - -	Alemania Italia Canada	Ternes, 2001b Castiglioni, 2005 Metcalfé, 2004
Roxitromicina	680-1000 10-20	- -	Alemania Canada	Ternes, 2001b Metcalfé, 2004
Betabloqueantes				
Metoprolol	61-154 730-2200 60-160 80-390	< 0 - - -	España Alemania EE.UU F, G, I, S*	Bueno, 2007 Ternes, 2001b Sedlak, 2005 Andreozzi, 2003
Propranolol	44-100 290-470 291-373 20-50	< 0 < 0 < 0 -	España Croacia Reino Unido EE.UU	Bueno, 2007 Gros, 2006 Roberts, 2006 Sedlak, 2005

Atenolol	1720-4850 400-1150	38 < 0	España Croacia	Bueno, 2007 Gros, 2006
Sotalol	185-210	< 0	Croacia	Gros, 2006
Reguladores del colesterol				
Bezafibrato	233-484 10-10 2200-4600 50-200	41 56 - -	España Croacia Alemania Canada	Bueno, 2007 Gros, 2006 Ternes, 2001b Metcalf, 2004
Gemfibrozil	2337-5428 120-320 400-1500 246-436 920-5500 840-4760	< 0 22 - 46 - -	España Croacia Alemania Canada EE. UU F, G, I, S*	Bueno, 2007 Gros, 2006 Ternes, 2001b Lishman, 2006 Sedlak, 2005 Andreozzi, 2003
Acido clofibrato (metabolito)	27-81 28-30 360-1600 30-80 21	38 61 - - -	España Croacia Alemania Canada Corea	Bueno, 2007 Gros, 2006 Ternes, 2001b Metcalf, 2004 Sim, 2009
Acido fenofibrato (metabolito)	186-349 380-1200	19 -	España Alemania	Bueno, 2007 Ternes, 2001b
Antidepresivos				
Diazepam	16-87 30-40	4 -	España Alemania	Bueno, 2007 Ternes, 2001b
Demetil diazepam (metabolito)	18-62	-	Italia	Castiglioni, 2005
Fluoxetina	398-929 50-140	90 -	España Canada	Bueno, 2007 Metcalf, 2004
Antiepiléptico				
Carbamazepina	130-230 290-550 870-1200 110-2300 2100-6300 410-630 178 113 119 33.7-111.2	20 < 0 - - - 2 - - - - -	España España F, G, I, S* Canada Alemania Croacia Corea China EE. UU EE. UU	Gómez, 2007 Santos, 2005 Andreozzi, 2003 Metcalf, 2004 Ternes, 2001b Gros, 2006 Sim, 2009 Sui, 2010 Bartelt-Hunt, 2009 Spongberg, 2008
Medios de contraste rayos-X				
Iopamidol	660-15000	-	Alemania	Ternes, 2001b
Iopromide	750-11000 2630-4030	- -	Alemania Corea del Sur	Ternes, 2001b Kim, 2007
Diatrizoate	80-8700	-	Alemania	Ternes, 2001b
Iomeprol	370-3800	-	Alemania	Ternes, 2001b
Hormonas				
Estrona	30-80 13-38 42-48 14-36 21-70	75 57 - - -	España Canada Italia Corea del Sur Alemania	Gómez, 2006 Lishman, 2006 Castiglioni, 2005 Kim, 2007 Ternes, 2001b
Dietilstilboestrol	9-30	82	España	Gómez, 2006

Estriol	16-25	95	Corea del Sur	Kim, 2007
Protectores gástricos				
Ranitidina	684-2722 135-200 298-610	17 28 -	España Croacia Italia	Bueno, 2007 Gros, 2006 Castiglioni, 2005
Omeprazol	247-922	26	España	Bueno, 2007
Broncodilatadores				
Salbutamol	15-60 8.5-18 72-170	< 0 - -	España Italia Alemania	Bueno, 2007 Castiglioni, 2005 Ternes, 2001b
Terbutalin	15-30 87-120	68 -	España Alemania	Bueno, 2007 Ternes, 2001b
Diuréticos				
Furosemida	1050-2957 749-2102	2 -	España Italia	Bueno, 2007 Castiglioni, 2005
Hidroclorotiazida	3683-14857 598-1253	< 0 -	España Italia	Bueno, 2007 Castiglioni, 2005
Antisépticos				
Triclosan	200-400 106-324 12-32 250-no datos	88 94 - 69	España Canada Corea del Sur EE.UU	Gómez, 2007 Lishman, 2006 Kim, 2007 Yu, 2006
Clorofeno	1279-2850 200	< 0 73	España EE.UU	Bueno, 2007 Yu, 2006
Bifenilol	7662-18900 100	25 80	España EE.UU	Bueno, 2007 Yu, 2006

Generalmente, el grado de reducción de los contaminantes en las EDAR depende de las propiedades físico-químicas de cada compuesto y del tratamiento aplicado en la planta depuradora. Como se observa en la **tabla 1.6**, los porcentajes de eliminación varían desde valores próximos al 100% hasta valores menores de cero, es decir, un incremento de la concentración media de los contaminantes en los efluentes con respecto a los influentes. Algunos autores sostienen que este hecho puede ser debido a que los fármacos excretados en forma de metabolitos conjugados con ácidos glucurónidos u otros compuestos polares, podrían ser convertidos otra vez en sus formas libres, mediante la escisión de estas conjugaciones por los microorganismos durante el proceso de tratamiento (Ternes, 2001b; Miao y cols., 2002). Por el contrario, otros autores opinan que el incremento de concentración de los fármacos en los efluentes, podría ser debido a los conocidos efectos de supresión iónica de la señal observados en los instrumentos de medida (LC-MS), debido a que la alta concentración de materia orgánica presente en los influentes produciría una mayor supresión iónica de la señal que en las muestras de efluentes (Antignac y cols., 2005; Roberts y Thomas, 2006).

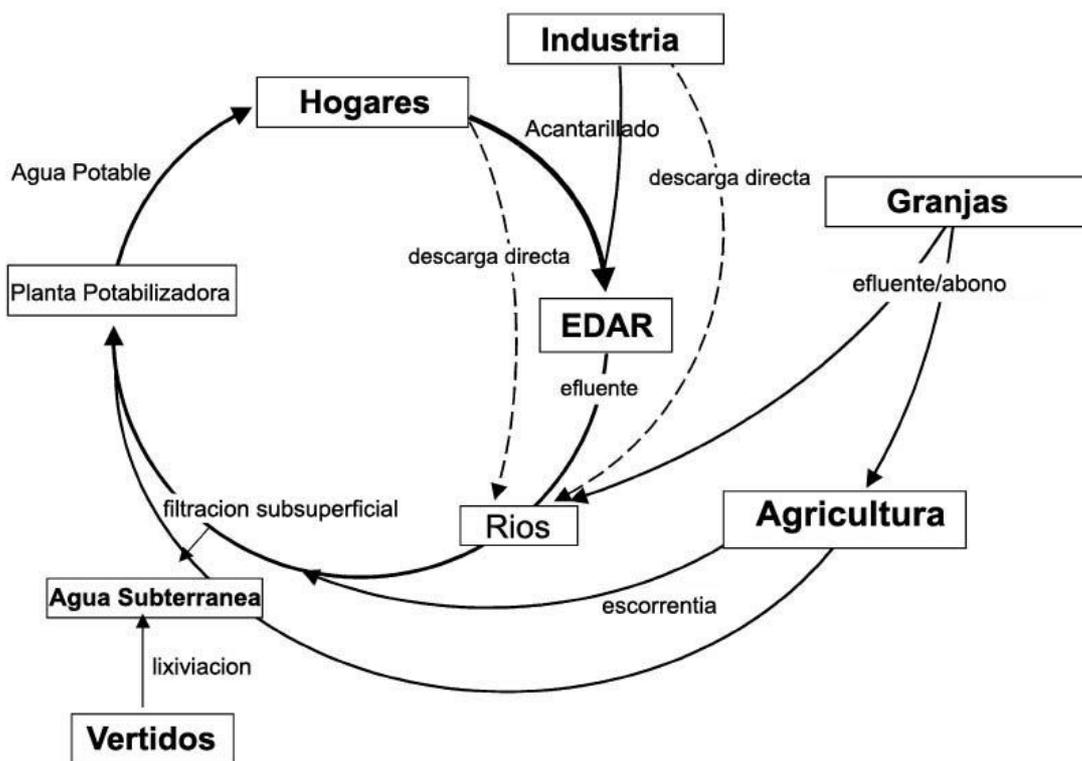


Figura 1.4 Origen y rutas de entrada de los fármacos en el medio ambiente (adaptada de Petrović y cols., 2003).

Como se ha podido observar en la **tabla 1.6**, las aguas residuales municipales representan la principal ruta de vertido al medio ambiente de los productos farmacéuticos consumidos en hogares, hospitales e industria y de sus metabolitos. En la **figura 1.4** se muestran esquemáticamente las posibles rutas de entrada de los fármacos en el medio ambiente. La liberación directa de los compuestos farmacéuticos a través del desagüe representa otra posible ruta de entrada de los mismos al medioambiente. Además, las medicinas de uso veterinario, ampliamente empleadas en la industria acuícola, representan una fuente directa de contaminación de las aguas superficiales. En el caso de la industria ganadera donde, en general, los fármacos se suministran en dosis elevadas, se produce la contaminación del suelo por la excreción directa, de forma que los compuestos y sus metabolitos percolan en el suelo y alcanzan las aguas subterráneas.

Otra vía de contaminación puede tener lugar con la escorrentía superficial por la cual el transporte de los contaminantes y/o metabolitos acarrea la contaminación directa de las aguas superficiales; o bien por la escorrentía subterránea, donde la disolución o arrastre de los contaminantes ocasiona la contaminación de las aguas subterráneas. En este último caso, el grado de lixiviación está influido por las características físicoquímicas del suelo, solubilidad del compuesto, frecuencia e intensidad de la lluvia, entre otros factores.

1.3 Fotodegradación de contaminantes en aguas

Una vez que los fármacos alcanzan el medio ambiente acuático, son susceptibles de sufrir procesos bióticos o abióticos de degradación. Para los fármacos, las transformaciones abióticas pueden tener lugar mediante hidrólisis o fotólisis. Los fármacos, en general, están diseñados para su ingesta vía oral y suelen ser resistentes a la hidrólisis, por lo que la fotólisis, tanto directa como indirecta, puede considerarse como la principal ruta de degradación de estos compuestos en las aguas superficiales.

La fotólisis directa tiene lugar por la absorción directa de la radiación solar (Braun y cols., 1991; Zepp y Cline, 1977) Por el contrario, en la fotólisis indirecta están involucrados compuestos naturales fotosensibles tales como nitratos y ácidos húmicos que bajo el efecto de la radiación solar pueden generar especies que reaccionan a su vez con los fármacos (Zepp y cols., 1981).

En especial para los fármacos que presentan baja biodegradabilidad, la fotólisis se convierte en el principal camino de degradación natural de los mismos. Para las quinolonas, por ejemplo, que son medicamentos con conocida actividad antibacteriana, se conoce desde hace tiempo su capacidad de degradarse fotoquímicamente bajo luz solar (Burhenne y cols. 1999).

La materia orgánica disuelta (MOD) desempeña un papel importante en los procesos fotoquímicos inducidos por la luz solar en las aguas superficiales. La MOD puede actuar como filtro interno, consumidora de radicales o precursora de especies reactivas. Un componente fundamental de la MOD son los ácidos húmicos, de composición muy variable. Desde el punto de vista estructural, su molécula parece estar constituida por un núcleo de naturaleza aromática más o menos condensado, y de una región cortical con mayor predominio de radicales alifáticos, presentando en conjunto el carácter de heteropolímeros condensados. Una característica importante de las sustancias húmicas es su capacidad de inducir transformaciones fotoquímicas de compuestos orgánicos, contribuyendo en muchos casos a la eventual degradación de los mismos. Este proceso ocurre cuando son activadas por los fotones UV solares, produciendo especies reactivas, tal como los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) u oxígeno singlete, electrones solvatados, anión superóxido y otros, las cuales pueden degradar los contaminantes. Además, la MOD activada fotoquímicamente puede reaccionar directamente con los contaminantes presentes en el medio acuático (Doll y Frimmel, 2003)

Así, es evidente que los procesos de fotólisis dependen directamente de la intensidad y frecuencia de la luz a la cual está sometido un compuesto orgánico. La fotodegradación

puede no ocurrir cuando los compuestos están presentes en un agua turbia o si se encuentran en situaciones que tienen una baja exposición a la luz, como por ejemplo en un río o lago sombreado por los árboles. La frecuencia se relaciona con el espectro de absorción del compuesto, que a su vez puede ser afectado por procesos de complejación. Por lo tanto, la eficacia de los procesos de fototransformación puede variar de acuerdo con condiciones ambientales tales como el pH y la dureza del agua. Y depender del tipo de agua, de su ubicación, de la estación del año y de la latitud. Se observa que la fototransformación y la fotodegradación incompletas pueden propiciar también la aparición de compuestos más estables.

Evidentemente, no todos los compuestos son fotodegradables. El grado de la fotodegradación directa e indirecta de los fármacos en el ambiente acuático es diferente para cada compuesto en particular. Los estudios que tienen en cuenta la fotodegradación indirecta a través de la interacción con la MOD, tal como ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, son raros (Kümmerer, 2009c). Esta consideración se refleja claramente en la **tabla 1.7**, donde se presentan algunos de los principales estudios de fotodegradación de fármacos realizados en los últimos 10 años. En general, se observa que estos trabajos contemplan la evaluación del proceso de fotólisis directa y que, mayoritariamente, utilizan el agua destilada como matriz. Además, variables geográficas, tales como la latitud o el período estacional, son tenidas en cuenta y revelan significativos cambios en el comportamiento de un mismo fármaco (por ejemplo para la carbamazepina, entre otros). De la misma forma, factores físicos como la intensidad de la radiación y parámetros químicos de composición de la matriz de agua evidencian que el cambio de estas variables afecta directamente al resultado del proceso de fotodegradación.

Tabla 1.7 Estudios de fotodegradación de fármacos con los respectivos porcentajes de transformación obtenidos.

Fármacos	Proceso estudiado	matriz	% transformación	Referencias
Antiinflamatorios/analgésicos				
Ibuprofeno	FD / RSN	Agua destilada	0 (70 h)	Yamamoto, 2009
Acetaminofen	FD / RSN	Agua destilada	80 (50 h)	Yamamoto, 2009
	FD / RSN	Agua destilada	0 (10 h)	Radjenovic, 2009
Diclofenaco	FD / RSN (verano)	Agua destilada	50 (158.9 min)	Bartels, 2007
	FD / RSN (invierno)	Agua destilada	50 (835.5 min)	Bartels, 2007
Indometacin	FD / RSN	Agua destilada	80 (50 h)	Yamamoto, 2009
Ácido mefenámico	FD / RSN	Agua destilada	<40 (50 h)	Yamamoto, 2009
	FD / RSN	Agua MilliQ	50 (33 h)	Werner, 2005
4-MAA (metabolito activo dipirona)	FD / RSS(250 W m ⁻²)	Agua MilliQ	50 (0.3 h)	Gómez, 2008
	FD / RSS (765 W m ⁻²)	Agua MilliQ	50 (0.12 h)	Gómez, 2008
	FD / RSS (250 W m ⁻²)	Agua de mar	50 (0.25 h)	Gómez, 2008

	FD / RSS (250 W m ⁻²)	Agua dulce	50 (0.31 h)	Gómez, 2008
	FI (NO ₃ ⁻)/RSS (250 W m ⁻²)	Agua dulce	50 (0.3 h)	Gómez, 2008
	FI (ácido húmico)/RSS (250 W m ⁻²)	Agua dulce	50 (0.31 h)	Gómez, 2008
Betabloqueantes				
Propranolol	FD / RSN	Agua destilada	99 (30 h)	Yamamoto, 2009
	FD / RSN (40°lat; verano)	Agua destilada	50 (~ 1 día)	Andreozzi, 2003
	FD / RSN (40°lat; invierno)	Agua destilada	50 (~ 6 días)	Andreozzi, 2003
Atenolol	FD / RSN	Agua destilada	<40(50 h)	Yamamoto, 2009
	FD / RSN	Agua destilada	0 (10 h)	Radjenovic, 2009
Antiepiléptico				
Carbamazepina	FD / RSN	Agua destilada	<40(50 h)	Yamamoto, 2009
	FD / RSN (40°lat; verano)	Agua destilada	50 (~ 100 días)	Andreozzi, 2003
	FD / RSN (40°lat; invierno)	Agua destilada	50 (~ 500 días)	Andreozzi, 2003
	FD / RSS	Agua destilada	-	Doll, 2003
	FI (MOD)/ RSS	Agua destilada	-	Doll, 2003
Hormonas				
Estrona 17β-estradiol	FD / RSS	Agua destilada	50 (50 min)	Liu, 2004
	FD / RSS	Água destilada	0 (60 min)	Liu, 2004
	FD / RSS	Água destilada	50 (13.6 h)	Leech, 2009
	FI (ácido húmico)/ RSS	Água destilada	50 (6.1 h)	Leech, 2009
Antibióticos				
Sulfametoxazole	FD / RSS (250 W m ⁻²)	Água destilada	40 (0.75 h)	Trovo, 2009
	FD / RSS (250 W m ⁻²)	Água de mar	14 (7 h)	Trovo, 2009
	FI (NO ₃ ⁻)/ RSS (250W m ⁻²)	Água destilada	-	Trovo, 2009
Tetraciclina	FD / RSS	Agua destilada	-	Chen, 2008
	FI (NO ₃ ⁻)/ RSS	Agua destilada	-	Chen, 2008
	FI (ácido húmico)/ RSS	Agua destilada	-	Chen, 2008
	FI (HCO ₃ ⁻)/ RSS	Agua destilada	-	Chen, 2008
	FI (Fe ³⁺)/ RSS	Agua destilada	-	Chen, 2008
Ofloxacino	FD / RSN (40°lat; verano)	Agua destilada	50 (~ 2 días)	Andreozzi, 2003
	FD / RSN (40°lat; invierno)	Agua destilada	50 (> 4 días)	Andreozzi, 2003
Difloxacino	FD / RSS (500 W m ⁻²)	Agua destilada	50 (1.23h; pH 6.0)	Prabhakaran, 2009
	FD / RSS (500 W m ⁻²)	Agua destilada	50 (0.55h; pH 8.6)	Prabhakaran, 2009
	FD / RSS (500 W m ⁻²)	Agua destilada	50 (0.88 h)	Kusari, 2009
Sarafloxacino	FD / RSS (500 W m ⁻²)	Agua destilada	50 (0.43h; pH 4.4)	Prabhakaran, 2009
	FD / RSS (500 W m ⁻²)	Agua destilada	50 (1.4h; pH 9.05)	Prabhakaran, 2009
	FD / RSS (500 W m ⁻²)	Agua destilada	50 (2.69 h)	Kusari, 2009
Contrastes de radiología				
Iomeprol	FD / RSS	Agua destilada	-	Doll, 2003
	FI (MOD)/ RSS	Agua destilada	-	Doll, 2003
Metabolitos				
Acido clofibrico	FD / RSN (40°lat; verano)	Agua destilada	50 (~ 25 días)	Andreozzi, 2003
	FD / RSN (40°lat; invierno)	Agua destilada	50 (~ 100 días)	Andreozzi, 2003
	FD / RSS	Agua destilada	-	Doll, 2003
	FI (MOD)/ RSS	Agua destilada	-	Doll, 2003
4-Formilaminoantipirina	FD / RSS (250 W m ⁻²)	Agua dulce	50 (24.7 h)	Gómez, 2008
4-Acetilaminoantipirina	FD / RSS (250 W m ⁻²)	Agua dulce	50 (27.9 h)	Gómez, 2008
Otros				
Verde de Malaquita	FD / RSN	Agua destilada	50 (30h)	Pérez-Estrada, 2008

FD: Fotólisis Directa

RSN: Radiación Solar Natural

RSS: Radiación Solar Simulada

FI: Fotólisis Indirecta

La necesidad de realizar estudios de degradación fotoquímica de los contaminantes presentes en las aguas superficiales ha sido evidenciada por diversos autores y se prevé que en el futuro siga siendo un área de investigación creciente (Boreen y cols., 2003). Como se observa en la **figura 1.5** las publicaciones relacionadas con el proceso de fotólisis de compuestos farmacéuticos ha crecido considerablemente en la última década, pasando de una media anual de 66 trabajos en el año 2000 a los 305 artículos publicados en el año 2009. Sin embargo, la realización de estos estudios requiere un adecuado diseño experimental (OECD, 2000) con el empleo posterior de técnicas analíticas, sensibles y específicas que permitan la identificación de los PT y que se realice una extensa evaluación toxicológica de los mismos. Es fundamental que se considere el impacto toxicológico de la introducción de los PT al ecosistema acuático a través de la alteración de la cadena trófica, como consecuencia de los efectos nocivos que pueden tener sobre las diferentes especies que la componen.

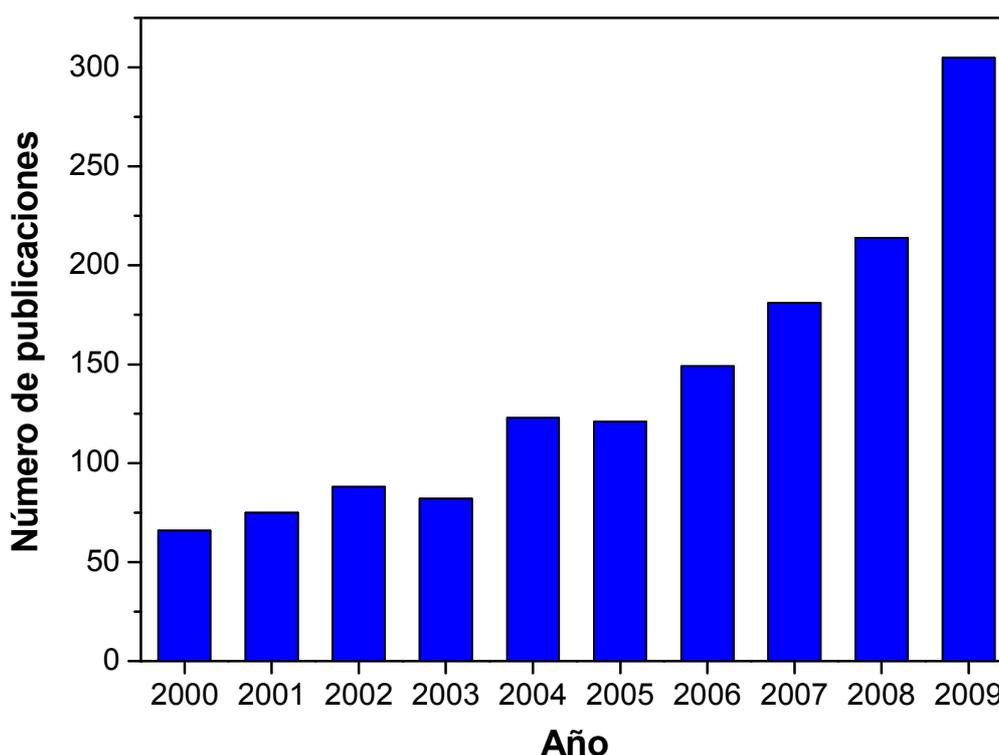


Figura 1.5 Publicaciones relacionadas con el estudio del proceso de fotólisis de fármacos entre 2000 y 2009 (Fuente: www.sciencedirect.com; palabras clave utilizadas en la búsqueda: "photolysis" y "pharmaceuticals").

1.4 Degradación de contaminantes en agua: Fotocatálisis Solar

Como se ha mencionado anteriormente, la contaminación del agua por la continua aportación de microcontaminantes, como es el caso de los fármacos y sus metabolitos, se ha convertido en los últimos años en un problema medioambiental realmente relevante de ámbito mundial. Así, este panorama ha impulsado el desarrollo de sistemas novedosos de descontaminación de agua más eficaces y versátiles.

En este sentido, los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO) representan una opción que se ha revelado eficaz en los últimos años para el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos orgánicos. Estos procesos se caracterizan por la generación de radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), especie altamente oxidante, a presión atmosférica y temperatura ambiente, como se comenta más adelante. Aunque es ampliamente reconocido el elevado potencial de los PAO para el tratamiento de aguas conteniendo contaminantes persistentes, es también conocido que los costes de operación de estos PAO para la oxidación completa de compuestos orgánicos tóxicos son elevados, si se comparan con los de los tratamientos biológicos (Comninellis y cols., 2008). El principal coste de los PAO está relacionado con el uso de reactivos (por ejemplo H_2O_2 y O_3) y consumo energético (generación de radiación UV). Por ello, procesos como la fotocatálisis con TiO_2 o el foto-Fenton son de especial interés dado que pueden utilizar la radiación UV solar para generar los $\bullet\text{OH}$ (Malato y cols., 2002; Malato y cols., 2003).

La fotocatálisis (mediante TiO_2 o foto-Fenton) se ha mostrado como un eficiente proceso de tratamiento de contaminantes orgánicos en agua que permite la total mineralización de los mismos (Gogate y Pandit, 2004). Mediante la fotocatálisis se generan radicales hidroxilo, cuyo potencial de oxidación ($E^\circ = 2.8 \text{ V}$) es mucho mayor que el de otros oxidantes tradicionales (ozono 2.07 V, agua oxigenada 1.78 V, dióxido de cloro 1.57 V, cloro 1.36 V, etc.). Los radicales hidroxilo son capaces de oxidar compuestos orgánicos principalmente por abstracción de hidrógeno o por adición electrofílica a los dobles enlaces, generándose radicales orgánicos libres ($\text{R}\bullet$) que reaccionan a su vez con moléculas de oxígeno formando un peroxiradical, iniciándose una serie de reacciones de degradación oxidativa que pueden conducir a la completa mineralización del contaminante. La fotocatálisis solar, para aplicaciones relacionadas con el tratamiento de microcontaminantes y sustancias no biodegradables, es una tecnología que está en franca expansión (Malato y cols., 2009) como expresa la **figura 1.6**. Se observa un incremento próximo a 10 veces en la media de publicaciones anuales relacionadas a la fotocatálisis solar, desde el año 2000 cuando se publicaron 106 artículos hasta el año 2009 cuando el número de publicaciones alcanzó la cifra de 1024 artículos. Así, se considera que este avance permita en un futuro próximo la

solución de problemas reales a través de la instalación de plantas industriales operadas con la tecnología de la fotocatalisis solar (Bahemann, 2004; Blanco-Galvez, 2007).

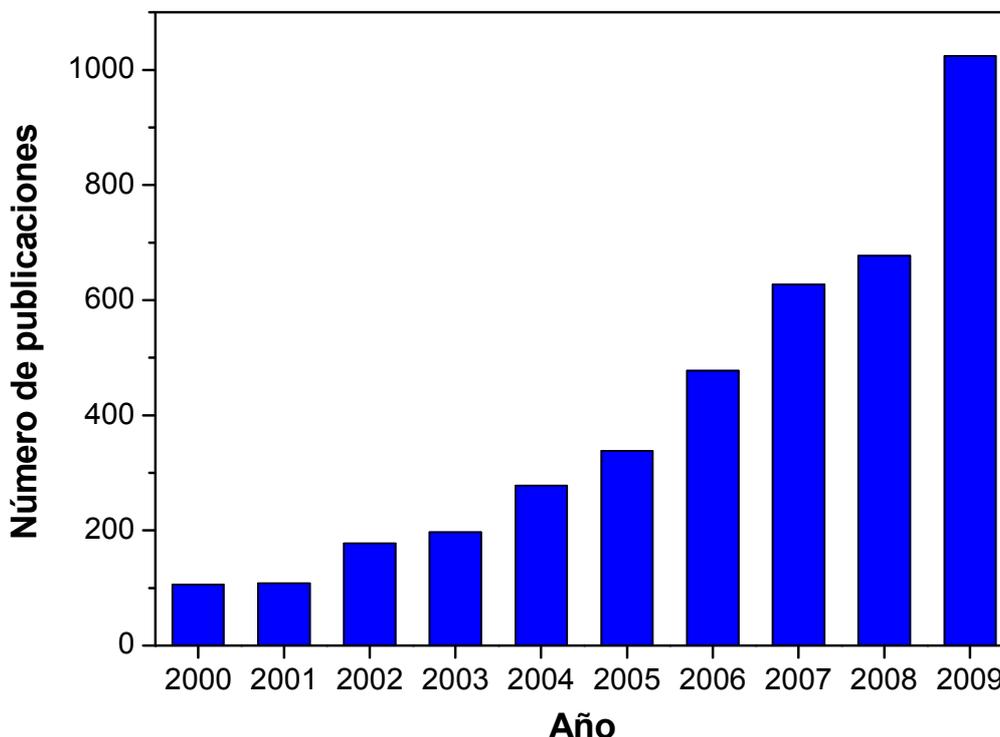


Figura 1.6 Publicaciones relacionadas con la temática de la fotocatalisis solar entre 2000 y 2009 (Fuente: www.sciencedirect.com; palabras clave utilizadas en la búsqueda: "solar photocatalysis" y "pharmaceuticals").

1.4.1 Fotocatalisis Heterogénea

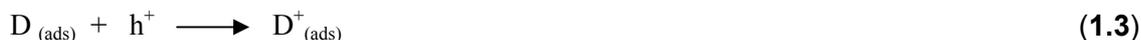
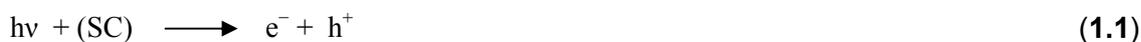
El término "fotocatalisis" fue introducido en los años 30 y desde entonces, ha sido utilizado a menudo en la literatura científica mundial para designar las reacciones catalíticas que ocurren exclusivamente bajo la acción de la luz. De hecho, en el año 2002, la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, en su acrónimo en inglés) propuso la actual definición de fotocatalisis, que en su acepción más simplista denota la aceleración de una fotorreacción por la acción de un catalizador. En ese contexto, terminológicamente se conceptúa la fotocatalisis heterogénea (FH) como la fotocatalisis que ocurre en el límite entre dos fases (sólido-líquido; sólido-gas; líquido-gas) (Parmon y cols., 2002).

En cuanto al proceso fotocatalítico heterogéneo clásico aplicado a la descontaminación de agua se puede considerar que globalmente éste está constituido por cinco etapas independientes: (i) transferencia de lo(s) reactivo(s) de la fase acuosa a la superficie del catalizador, (ii) adsorción de por lo menos uno de los reactivos, (iii) reacción en la fase adsorbida (iv) desorción de los productos, (v) remoción de los productos de la región de

interfase. La reacción fotocatalítica ocurre en la fase adsorbida (etapa iii). La principal diferencia de la FH en relación a la catálisis convencional es el modo de activación del catalizador, ya que se sustituye la activación térmica por una activación fotónica. Algunos autores (Herrmann, 2005) defienden incluso que la fotocatalisis heterogénea se caracteriza por interaccionar tres fases, siendo una de ellas la luz.

Cuando un semiconductor (SC) tal como óxidos (TiO_2 , ZnO , ZrO_2 , CeO_2), o sulfuros (CdS , ZnS) es irradiado por fotones con una energía igual o superior al ancho de banda del catalizador (Eg, **figura 1.7**), la absorción de estos fotones provoca el paso de un electrón desde la banda de valencia hasta la banda de conducción. Simultáneamente, en presencia de una fase flúida (gas o líquido), ocurre una adsorción que permite una transferencia de electrones hacia las moléculas del aceptor, mientras que los fotohuecos positivos son transferidos a las moléculas donantes.

Cada ion formado, reacciona posteriormente para formar los intermedios y los productos finales. Como se muestra en las reacciones **(1.1-1.3)**, la excitación fotónica del catalizador es el paso inicial de la activación del sistema catalítico. Por lo tanto, se considera el fotón como un reactivo y el flujo de fotones como una fase flúida especial, la “fase electromagnética”. Así, la energía del fotón se relaciona con la absorción del catalizador, no con la energía de los reactivos. La fotoeficiencia suele ser disminuida por la recombinación del par electrón-hueco, la cuál supone la disipación de parte de la energía fotoeléctrica en forma de calor (Herrmann, 1999).



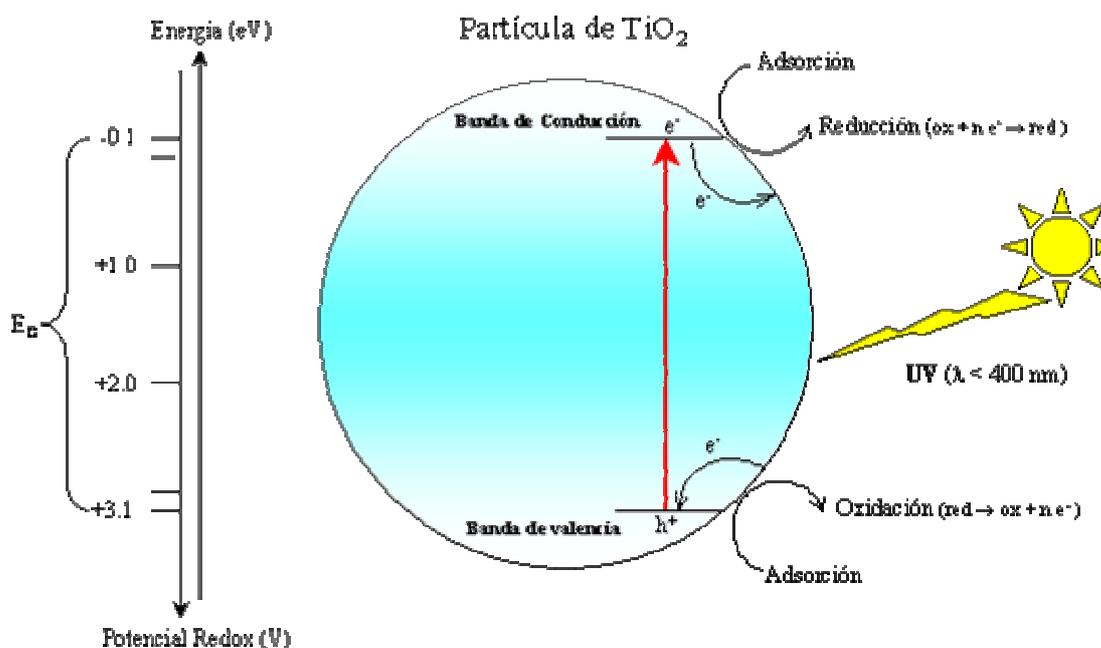


Figura 1.7 Representación esquemática del proceso de fotocatalisis heterogénea en una partícula de TiO_2 (adaptada de Herrmann, 1999).

Los fotocatalizadores más investigados hasta el momento son los óxidos metálicos semiconductores y, particularmente el TiO_2 , que presenta una elevada estabilidad química y es apto para trabajar en un amplio rango de pH. Entre todos los productos comerciales, el TiO_2 P-25 Degussa, es el catalizador que proporciona mayor eficiencia cuántica para una amplia gama de contaminantes (Fujishima y cols., 2000). Se ha observado que muchos son los parámetros que afectan directamente el proceso de FH. Aspectos relacionados con la masa de catalizador, la fuente de radiación, la concentración inicial del contaminante, la temperatura, el flujo radiante, la eficiencia fotónica, entre otros, se conocen desde hace tiempo (Linsebigler y cols., 1995) como los parámetros fundamentales de este proceso.

Desde un punto de vista histórico, se considera que la primera publicación que aparece sobre el proceso de FH aplicado a la descontaminación de agua se debe a Carey en 1976 (Carey y cols., 1976). Desde entonces la evolución del proceso de FH para el tratamiento de aguas permite identificar cuatro etapas claramente diferentes en el desarrollo del mismo. En una primera etapa, aproximadamente entre 1976 y 1985, solo unos pocos grupos científicos trabajan sobre el mismo y con escasas publicaciones ya que no se le ve una aplicación concreta clara. En una segunda etapa, a partir de mediados de la década de los 80 y hasta los primeros años de la década de los 90, y coincidiendo con una creciente preocupación e inquietud de la comunidad científica internacional sobre temas medioambientales, se plantea la posibilidad de aplicar este proceso al tratamiento de contaminantes en agua. El éxito de las primeras experiencias da lugar a una masiva incorporación de grupos de investigación que enfocan su interés hacia este proceso. En esta situación, a inicios de los 90s, los

procesos fotocatalíticos se llegaron a considerar como un posible método universal para la degradación de contaminantes orgánicos en agua, como resultado de optimistas extrapolaciones de los resultados indicados anteriormente.

La tercera etapa, que se puede enmarcar entre mediados y finales de la década de los 90, es una especie de antítesis de la etapa anterior. Aquí se tiene una profusión de resultados contradictorios, alternándose tanto trabajos de investigación básica como aplicada, que llevaron a una discusión con respecto a las posibilidades reales de aplicación del proceso debido, sobre todo, a la baja eficiencia cuántica y a la lenta cinética del proceso global de degradación (Parent y cols., 1996; Romero y cols., 1999). La cuarta etapa, en la que nos encontramos actualmente, se caracteriza por una perspectiva más conservadora en la que la tecnología asociada se está focalizando hacia unas determinadas aplicaciones que parecen prometedoras (Augugliaro y cols., 2007). Ya no se piensa que el proceso de fotocátalisis, tal y como se conoce y se define en la actualidad, pueda ser algo universal, pero si en cambio que existen determinadas aplicaciones concretas en las que la tecnología que se encuentra en proceso de desarrollo puede resultar viable y competitiva (Shannon y cols., 2008; Blanco-Galvez y cols., 2001).

En la **tabla 1.8** se presenta una selección de las publicaciones de los últimos cinco años relacionadas con la degradación de compuestos farmacéuticos mediante FH con TiO₂ como catalizador.

Tabla 1.8 Estudios de degradación fotocatalítica de fármacos con TiO₂.

Fármacos	Fotocatalizador / Reactor	matriz	% degrad. / Tiempo y fuente de iluminación	Referencias
Antiinflamatorios/analgésicos				
Ibuprofeno	TiO ₂ (0.1 g L ⁻¹) / PC 1.5	AD1	25 / 4 KJ L ⁻¹ , solar	Méndez-Arriaga, 2009
	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / PC 1.5	AD1	50 / 4 KJ L ⁻¹ , solar	Méndez-Arriaga, 2009
	TiO ₂ (0,1 g L ⁻¹) / CPC 35	AD1	30 / 5 KJ L ⁻¹ , solar	Méndez-Arriaga, 2009
	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / CPC 35	AD1	35 / 5 KJ L ⁻¹ , solar	Méndez-Arriaga, 2009
	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / 1.5L	AD1	71 / - (RSS)	Méndez-Arriaga, 2008
Acetaminofen	TiO ₂ (0.005 g L ⁻¹) / CPC 35	AD2	100 / 145 min, solar	Klamerth, 2009
	nano-TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / 1L	AD1	95 / 100 min (lámpara λ≥365 nm)	Zhang, 2008
	TiO ₂ (0.2 g L ⁻¹) / CPC 150	AD1	100 / 24 min, solar	Radjenovic, 2009
	TiO ₂ (0.2 g L ⁻¹) / CPC 150	ES	100 / 79.1 min, solar	Radjenovic, 2009
Diclofenaco	TiO ₂ (0.005 g L ⁻¹) / CPC 35	AD2	100 / 145 min, solar	Klamerth, 2009
	TiO ₂ (0.2 g L ⁻¹) / 0,3L	AD1	50 / 82.5 min (lámpara λ=300-420nm)	Rizzo, 2009
	TiO ₂ (0.4 g L ⁻¹) / 0,3L	AD1	50 / 52.5 min (lámpara λ=300-420nm)	Rizzo, 2009
	TiO ₂ (0.8 g L ⁻¹) / 0,3L	AD1	50 / 52.9 min (lámpara λ=300-420nm)	Rizzo, 2009

	TiO ₂ (1.6 g L ⁻¹) / 0,3L	AD1	50 / 52.9 min (lámpara λ=300-420nm)	Rizzo, 2009
	TiO ₂ (0.1 g L ⁻¹) / 1,5L	AD1	90 / - (RSS)	Méndez-Arriaga, 2008
	TiO ₂ (0.5 g L ⁻¹) / 1,5L	AD1	89 / - (RSS)	Méndez-Arriaga, 2008
	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / 1,5L	AD1	75 / - (RSS)	Méndez-Arriaga, 2008
	TiO ₂ (0.5 g L ⁻¹) / 0,05L	AD1	~98 / 30 min (RSS, 750W m ⁻²)	Calza, 2006
Paracetamol	TiO ₂ (0.4 g L ⁻¹) / 0.15L	AD1	- / (lámpara UVA λ=365nm)	Yanga, 2008
	TiO ₂ (0.4 g L ⁻¹) / 0.15L	AD1	- / (lámpara UVC λ=254nm)	Yanga, 2008
Naproxeno	TiO ₂ (0.1 g L ⁻¹) / 1.5L	AD1	44 / - (RSS)	Méndez-Arriaga, 2008
	TiO ₂ (0.5 g L ⁻¹) / 1.5L	AD1	28 / - (RSS)	Méndez-Arriaga, 2008
	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / 1.5L	AD1	28 / - (RSS)	Méndez-Arriaga, 2008
4-MAA (metabolito activo dipirona)	TiO ₂ (0.2 g L ⁻¹) / CPC 35	AD1	100 / 60 min, solar	Pérez-Estrada, 2007
Betabloqueantes				
Atenolol	TiO ₂ (0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	67 / 30 min (lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Hombikat UV 100 (0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	39 / 30 min (lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Aldrich(0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	15 / 30 min (lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Tronox A-K-1(0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	30 / 30 min (lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Tronox TR-HP-2(0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	10 / 30 min (lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Tronox TR(0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	9 / 30 min (lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ (0.2 g L ⁻¹) / CPC 150	AD1	100 / 33 min, solar	Radjenovic, 2009
	TiO ₂ (0.2 g L ⁻¹) / CPC 150	ES	90 / 72 min, solar	Radjenovic, 2009
Antiepiléptico				
Carbamazepina	TiO ₂ (0.001-1 g L ⁻¹) / -	AD1	- / RSS	Doll, 2004
	TiO ₂ Hombikat UV 100 (0.001-1 g L ⁻¹) / -	AD1	- / RSS	Doll, 2004
	TiO ₂ (0.5 g L ⁻¹) Degussa P25 / -	MOD	- / RSS	Doll, 2005
	TiO ₂ Hombikat UV 100 (0.5 g L ⁻¹) / -	MOD	- / RSS	Doll, 2005
Hormonas				
progesterona	TiO ₂ (0.005 g L ⁻¹) / CPC 35	AD2	100 / 145 min, solar	Klamerth, 2009
estrone	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / 0.4L	AD1	45 / 60 min (lámpara λ=238-579nm)	Zhang, 2007
	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / 0.7L	AD1	94 / 60 min (lámpara λ=253nm)	Zhang, 2007
17β-estradiol	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / 0.4L	AD1	56 / 60 min (lámpara λ=238-579nm)	Zhang, 2007
	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) / 0.7L	AD1	94 / 60 min (lámpara λ=253nm)	Zhang, 2007
Antibióticos				
Sulfametoxazole	TiO ₂ (0.005 g L ⁻¹) / CPC 35	ÁD2	100 / 145 min, solar	Klamerth, 2009
	TiO ₂ (0.1 g L ⁻¹) / 0.25L	AD1	>95 / 60 min (lámpara UVA)	Hua, 2007
	TiO ₂ (0.1 g L ⁻¹) / 0.25L	AD1	0 / 60 min (lámpara luz visible)	Hua, 2007
	TiO ₂ (0.1 g L ⁻¹) / 1L, recirculación	AD1	≤ 90 / 300 min (RSS)	Abelán, 2009
	TiO ₂ (0.5 g L ⁻¹) / 1L, recirculación	AD1	~100 / 300 min (RSS)	Abelán, 2009
	TiO ₂ (2 g L ⁻¹) / 1L, recirculación	AD1	~100 / 300 min (RSS)	Abelán, 2009

Tetraciclina	TiO ₂ (0.5-1 g L ⁻¹) / 1L	AD1	50 / 10 min (lámpara UV, λ >254nm)	Reyes, 2006
	TiO ₂ (0.5-1 g L ⁻¹) / 1L	AD1	50 / 20 min (lámpara λ =300-400nm)	Reyes, 2006
	TiO ₂ (0.5-1 g L ⁻¹) / 1L	AD1	50 / 120 min (luz negra, λ=365nm)	Reyes, 2006
	TiO ₂ (1.5 g L ⁻¹) / 0.12L	AD1	96,4 / 10 min (RSS, 250W m ⁻²)	Palominos, 2009
Ofloxacino	TiO ₂ (0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	85 / 30 min (lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Hombikat UV 100 (0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	83 / 30 min(lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Aldrich(0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	73 / 30 min(lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Tronox A-K-1(0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	67 / 30 min(lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Tronox TR-HP-2(0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	39 / 30 min(lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
	TiO ₂ Tronox TR(0.25 g L ⁻¹) / 0.35L	AD1	33 / 30 min(lámpara λ=300-400nm)	Hapeshi, 2010
Trimetoprim	TiO ₂ (0.1 g L ⁻¹) /1L, recirculación	AD1	≤ 70 / 300 min (RSS)	Abelán, 2009
	TiO ₂ (0.5 g L ⁻¹) / 1L, recirculación	AD1	≤ 80 / 300 min (RSS)	Abelán, 2009
	TiO ₂ (2 g L ⁻¹) / 1L, recirculación	AD1	≥ 80 / 300 min (RSS)	Abelán, 2009
Norfloxacino	TiO ₂ (1 g L ⁻¹) /0.25L	AD1	~ 100 / 80 min (lámpara λ=284nm)	Haque, 2007

Regulador Lipídico

Gemfibrozil	TiO ₂ (0.1-1 g L ⁻¹) / FMC "batch" 0.7L	AD1	98,5 / 30 min (lámpara vapor Hg)	Molinari,2008
	TiO ₂ (0.1-1 g L ⁻¹) / FMC recirculación 0.7L	AD1	98,9 / 40 min (lámpara vapor Hg)	Molinari, 2008
	TiO ₂ Degussa P25 / 0.5L	AD1	100 / 50 min (lámpara vapor Hg)	Yurdakal, 2007
	TiO ₂ Merck / 0.5L	AD1	100 / 180 min (lámpara vapor Hg)	Yurdakal, 2007

Regulador del colesterol

Benzofibrato	TiO ₂ (0.1 g L ⁻¹) / 0.1L	AD1	100 / <200 min (RSS, 765W m ⁻²)	Lambropoulou, 2008
--------------	--	-----	---	--------------------

Medios de contraste rayos-X

Iomeprol	TiO ₂ (0.5-1 g L ⁻¹) / -	AD1	- / RSS	Doll, 2004
	TiO ₂ Hombikat UV 100 (0.5-1 g L ⁻¹) / -	AD1	- / RSS	Doll, 2004
	TiO ₂ (0.5 g L ⁻¹) / -	MOD	- / RSS	Doll, 2005
	TiO ₂ Hombikat UV 100 (0.5 g L ⁻¹) / -	MOD	- / RSS	Doll, 2005
Iopromide	TiO ₂ (0.5 g L ⁻¹) / -	AD1	- / RSS	Doll, 2004
	TiO ₂ Hombikat UV 100 (0.5 g L ⁻¹) / -	AD1	- / RSS	Doll, 2004

Metabolitos

Acido clofibrico	TiO ₂ (0.05-0.5 g L ⁻¹) / -	AD1	- / RSS	Doll, 2004
	TiO ₂ Hombikat UV 100 (0.05-0.5 g L ⁻¹) / -	AD1	- / RSS	Doll, 2004
	TiO ₂ (0.5 g L ⁻¹) / -	MOD	- / RSS	Doll, 2005
	TiO ₂ Hombikat UV 100 (0.5 g L ⁻¹) / -	MOD	- / RSS	Doll, 2005
4-Acetilaminoantipirina	TiO ₂ (0.005 g L ⁻¹) / CPC 35	AD2	~100 / 196 min, solar	Klamerth, 2009

Otros				
cafeína	TiO ₂ (0.005 g L ⁻¹) / CPC 35	AD2	100 / 113 min, solar	Klamerth, 2009

* En todos los casos en que no se especifica el origen comercial del TiO₂, se considera que se ha utilizado P25-Degussa.

PC 1,5: Colector parabólico con capacidad de tratamiento de un volumen total de 1,5L

AD1: agua destilada

CPC 35: Concentrador parabólico compuesto con capacidad de tratamiento de un volumen total de 35L

RSS : Radiación Solar Simulada

AD2: agua dulce

CPC 150: Concentrador parabólico compuesto con capacidad de tratamiento de un volumen total de 150L

ES: Efluente Simulado

MOD: Materia Orgánica Disuelta en agua destilada

FMC: Fotorreactor de Membrana Catalítica

Contemplando los estudios que componen la **tabla 1.8**, se observa que la mayoría de estos trabajos son llevados a cabo con el TiO₂ P25-Degussa como catalizador en agua destilada. De hecho, muy pocos de estos estudios consideran la influencia del efecto de la matriz durante la eliminación de los contaminantes. El interés por la FH mediante TiO₂ como método de tratamiento de contaminantes ha ido en aumento y esto se demuestra en la **figura 1.8**. En el año 2000 se publicaron 174 artículos y en 2009 el número de publicaciones superó los 1500 artículos. De esta forma, se constata el continuo progreso del proceso de FH y permite una evaluación más correcta de las diferentes ventajas y desventajas de la aplicación del mismo para el tratamiento de una amplia gama de contaminantes.

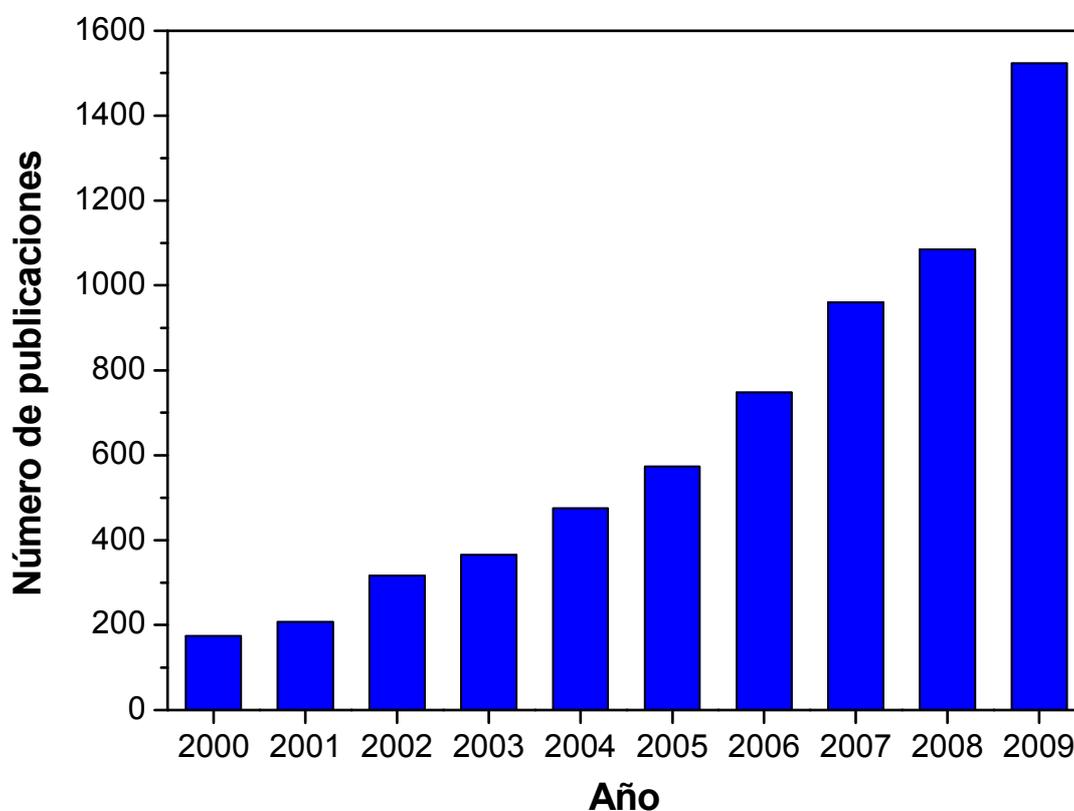


Figura 1.8 Publicaciones relacionadas con el proceso de fotocatalisis con TiO₂ entre 2000 y 2009 (Fuente: www.sciencedirect.com; palabras clave utilizadas en la búsqueda: "TiO₂ photocatalysis" y "pharmaceuticals").

1.4.2 Fotocatálisis Homogénea

Conceptualmente la IUPAC define la fotocatálisis homogénea como el proceso en que tanto el fotocatalizador como las demás especies reactivas se encuentran en el mismo estado físico (Parmon y cols., 2002). Por tanto, en el caso de aplicaciones para el tratamiento de aguas, el catalizador debe estar disuelto.

En este contexto, los procesos Fenton y foto-Fenton (FF) son claros ejemplos de procesos fotocatalíticos homogéneos. De forma simplificada, se puede describir el proceso Fenton como el proceso en que una combinación de peróxido de hidrógeno y Fe(II) (reactivo Fenton) en medio ácido conlleva a la formación de radicales $\bullet\text{OH}$ y a la oxidación de Fe(II) a Fe(III). A su vez, en el proceso FF la irradiación del reactivo Fenton provoca la fotorreducción del Fe^{3+} con la generación adicional de más radicales $\bullet\text{OH}$.

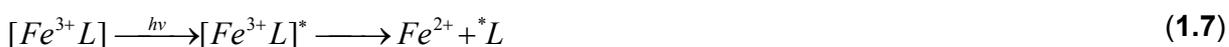
Historicamente, el proceso Fenton fue descrito por primera vez por Henry Fenton en 1894 a través de un estudio en lo cual este investigador demostró que el peróxido de hidrógeno podía ser activado por sales de Fe^{2+} para oxidar ácido tartárico (Fenton, 1984). A continuación, Haber y Weiss propusieron en 1934 que el $\bullet\text{OH}$ era el oxidante activo generado mediante la reacción de Fenton y más tarde Barb y cols. (Barb y cols., 1949; Barb y cols., 1951a; Barb y cols., 1951b), revisaron el mecanismo original propuesto por Haber y Weiss para dar lugar a lo que actualmente se conoce como la reacción en cadena “clásica” o “vía radicales libres” de Fenton, en la que se considera como etapa clave del proceso la producción de radicales $\bullet\text{OH}$. La aplicación de la reacción de Fenton como proceso oxidante para la destrucción de sustancias orgánicas tóxicas comenzó a desarrollarse a mediados de los años 60 (Brown y cols., 1964).

El reactivo Fenton se ha empleado de forma eficiente en la eliminación de fármacos de forma individual (Shemer y cols., 2006), o de forma combinada con otros procesos de tratamiento en la degradación de efluentes industriales (Badawy y cols., 2009; Martínez y cols., 2003; Tekin y cols., 2006), a efluentes contaminados con medicamentos de uso veterinario (Ben y cols., 2009) o para el tratamiento de aguas residuales hospitalares (Berto y cols., 2009).

La necesidad de un control estricto del pH es uno de los mayores inconvenientes del proceso clásico de Fenton. En la mayoría de los casos se ha observado que el pH óptimo es 3 (Tang y Huang, 1996). Los complejos de Fe^{3+} que se suelen formar en solución ácida son el $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ y $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$, que absorben luz UV y visible. Estos complejos sufren una fotorreducción para dar lugar a radicales hidroxilo y Fe^{2+} . La especie más importante es el

complejo $Fe(OH)_2^+$ debido a la combinación entre su alto coeficiente de absorción y su alta concentración relativa con respecto a otras especies de Fe^{3+} . La formación del complejo $[Fe(H_2O)]^{2+}$ en un pH inferior a 2.5, hace con que esta especie reaccione lentamente con el peróxido de hidrógeno, produciendo una menor cantidad de radicales hidroxilo, hecho que se refleja en la disminución de la eficiencia del proceso Fenton (Gallard y cols., 1998). Por otro lado, a pH 3 y 7 se generan las especies $[Fe(H_2O)_8(OH)_2]^{4+}$, $[Fe_2(H_2O)_7(OH)_3]^{3+}$ y $[Fe_2(H_2O)_7(OH)_4]^{5+}$, las cuales favorecen la precipitación del hierro y, en consecuencia reducen la eficacia del proceso. Otro aspecto relevante que restringe la aplicabilidad del mismo se debe al hecho de que generalmente al final del tratamiento es preciso neutralizar el agua previamente a su descarga y por tanto se generan fangos conteniendo Fe^{3+} . Además, en el proceso Fenton las **reacciones 1.4 y 1.5** son de reactivo limitante, por tanto cuando el H_2O_2 se agota la reacción prácticamente se detiene. La regeneración de hierro, **reacción 1.5**, es mucho más lenta que la reacción inicial, **reacción 1.4**.

La velocidad de degradación de los contaminantes orgánicos mediante el proceso de Fenton, es fuertemente acelerada gracias a la irradiación con rayos UV o UV/luz visible. Este proceso se conoce como foto-Fenton (FF), y en él los complejos de Fe^{3+} sufren una transferencia de carga ligando-metal, dando lugar a su disociación en Fe^{2+} y $\bullet OH$. El hierro reducido puede entonces reaccionar de nuevo con el peróxido de hidrógeno. Todo esto se resume en las **reacciones 1.6–1.8**, donde L es un ligando orgánico (Pignatello, 1992; Ruppert y cols., 1993).



Los radicales hidroxilo reaccionan de forma conocida con los compuestos orgánicos, principalmente mediante abstracción de hidrógeno de los enlaces C-H, N-H u O-H, adición a enlaces C=C, adición electrofílica, por transferencia de electrones, o adición a anillos aromáticos (Legrini y cols., 1993). La abstracción de hidrógeno es el mecanismo de degradación más a menudo observado. La **reacción 1.9** demuestra se puede generar

radicales orgánicos ($R\cdot$), los cuales pueden seguir oxidándose en presencia de peróxido de hidrógeno u oxígeno molecular (**reacciones 1.10 y 1.11**). Como resultado, se generan radicales hidroxilo o radicales peróxido, respectivamente. Esta serie de reacciones, conduce la mineralización de los compuestos orgánicos. La **tabla 1.9** describe una breve revisión de los estudios de degradación fotocatalítica de fármacos vía el proceso FF llevados a cabo en los últimos cinco años.

Tabla 1.9 Estudios de degradación fotocatalítica de fármacos vía el proceso FF.

Fármacos	Fuente de Fe^* / Reactor	Consumo H_2O_2	matriz	% degrad. / Tiempo y fuente de iluminación	Referencias
Antiinflamatorios/analgésicos					
Ibuprofeno	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	ES	100/261 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L^{-1} /CPC35	5 mg L^{-1}	ES	100/294 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	ER	100/109 min, solar	Klamerth, 2010
	1.2 mM / 0.08 L	0.04 mM	AD1	>85/2 h, RSS	Méndez-Arriaga,2009
	1.2 mM / 0.08 L	0.08 mM	AD1	>95/2 h, RSS	Méndez-Arriaga,2009
	1.2 mM / 0.08 L	0.16 mM	AD1	100/2 h, RSS	Méndez-Arriaga,2009
	1.2 mM / 0.08 L	0.32 mM	AD1	100/1 h, RSS	Méndez-Arriaga,2009
Acetaminofen	20 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	ER	100/<100 min, solar	Klamerth, 2010b
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	ER	100/<30min, solar	Klamerth, 2010b
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	ES	100/261 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L^{-1} /CPC35	5 mg L^{-1}	ES	100/248 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	ER	100/109 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L^{-1} /CPC150	-	AD1	100/12 min, solar	Radjenovic, 2009
	5 mg L^{-1} /CPC150	2.5 mM	ES	100/21.8 min, solar	Radjenovic, 2009
Diclofenaco	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	AD1(pH 2.8)	100/33 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	AD1(pH natural)	100/<20 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	AD2(pH natural, sin HCO_3^-)	100/50 min, solar	Klamerth, 2009
	20 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	ER	100/30 min, solar	Klamerth, 2010b
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	ER	100/>10 min, solar	Klamerth, 2010b
	5 mg L^{-1} /CPC35	50mg L^{-1}	ES	100/111 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L^{-1} /CPC35	5mg L^{-1}	ES	100/133 min, solar	Klamerth, 2010
Diclofenaco	5 mg L^{-1} /CPC35	50mg L^{-1}	ER	100/64 min, solar	Klamerth, 2010
	0.05-0.75 mM / CPC35	35-40mM	AD2	~100/100-110 min, solar	Pérez-Estrada, 2005
	0.05 mM / CPC35	>15mM	AD1	~100/50 min, solar	Pérez-Estrada, 2005
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	AD1(pH 2.8)	100/33 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	AD1(pH natural)	100/<20 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	AD2(pH natural, sin HCO_3^-)	100/<25 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L^{-1} /CPC35	50 mg L^{-1}	ER	100/<30 min, solar	Klamerth, 2010b

Ketorolaco	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ES	100/191 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	5 mg L ⁻¹	ES	100/248 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35 5 mg L ⁻¹ /CPC35	50 mg L ⁻¹ 50 mg L ⁻¹	ER ER	100/43 min, solar 100/>10 min, solar	Klamerth, 2010 Klamerth, 2010b
Paracetamol	0.2 mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.8L	5 mM	AD1	53/5 min, luz negra	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	5 mM	AD1	98/5 min, luz negra	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	2 mM	ER	98/5 min, luz negra	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	2 mM	ER	100/5 min, solar	Trovó, 2008
Betabloqueantes					
Atenolol	5 mg L ⁻¹ / CPC150	-	AD1	100/<3.8 min, solar	Radjenovic, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC150	2.9mM	ES	100/30 min, solar	Radjenovic, 2009
Antiepiléptico					
Carbamazepina	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ES	100/300 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	5 mg L ⁻¹	ES	100/336 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ER	100/158 min, solar	Klamerth, 2010
	20 mg L ⁻¹ /CPC35 5 mg L ⁻¹ /CPC35	50 mg L ⁻¹ 50 mg L ⁻¹	ER ER	100/>50 min, solar 100/<40 min, solar	Klamerth, 2010b Klamerth, 2010b
Antidepresivos					
imipramine	5.688 mg L ⁻¹ / 0.05L	363 mg L ⁻¹	AD1	90.6/15 min, RSS (750W m ⁻²)	Calza, 2008
Hormonas					
progesterona	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50mg L ⁻¹	ES	97/300 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	5mg L ⁻¹	ES	98/336 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50mg L ⁻¹	ER	100/158 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD1(pH 2.8)	100/33 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD1(pH natural)	100/<20 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD2(pH natural)	75/270 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD2(pH natural, sin HCO ₃ ⁻)	100/>135 min, solar	Klamerth, 2009
17β-estradiol	5 mg L ⁻¹ /CPC35	50 mg L ⁻¹	ER	100/<40 min, solar	Klamerth, 2010b
	10 μM (Fe ³⁺) / 0.05L	1mM	AD1 (pH3)	61.7 / 160 min (lámpara, λ>313nm)	Feng, 2005
	10 μM (Fe ³⁺) / 0.05L	1mM	AD1 (pH4)	47.9 / 160 min (lámpara, λ>313nm)	Feng, 2005
	10μM (Fe ³⁺) / 0.05L	1mM	AD1 (pH5)	34.5 / 160 min (lámpara, λ>313nm)	Feng, 2005
	10μM (Fe ³⁺) / 0.05L	1mM	AD1 (pH6)	27.3 / 160 min (lámpara, λ>313nm)	Feng, 2005
	10μM (Fe ³⁺) / 0.05L	0.2mM	AD1 (pH3)	48.5 / 160 min (lámpara, λ>313nm)	Feng, 2005
	10μM (Fe ³⁺) / 0.05L	0.5mM	AD1 (pH3)	53.7 / 160 min (lámpara, λ>313nm)	Feng, 2005
10μM (Fe ³⁺) / 0.05L	2 mM	AD1 (pH3)	69 / 160 min (lámpara, λ>313nm)	Feng, 2005	
Antibióticos					
Sulfametoxazole	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ES	98/300 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	5 mg L ⁻¹	ES	97/336 min, solar	Klamerth, 2010

	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ER	100/198 min, solar	Klamerth, 2010
	2.6mg L ⁻¹ / CPC35	30 mg L ⁻¹	AD1	100/ - , solar	Trovó, 2009
	2.6mg L ⁻¹ / CPC35	60 mg L ⁻¹	AM	100/ - , solar	Trovó, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD1(pH 2.8)	100/33 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD1(pH natural)	100/<20 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD2(pH natural, sin HCO ₃ ⁻)	100/50 min, solar	Klamerth, 2009
	20 mg L ⁻¹ /CPC35	50 mg L ⁻¹	ER	100/10 min, solar	Klamerth, 2010b
	5 mg L ⁻¹ /CPC35	50 mg L ⁻¹	ER	100/<40 min, solar	Klamerth, 2010b
Tetraciclina	0.2mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.5L	10 mM	AD1	100/1 min, luz negra	Bautitz, 2007
	0.1mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.5L	10 mM	AD1	100/5 min, luz negra	Bautitz, 2007
	0.2mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.5L	1-20 mM	AD1	100/1-1.5 min, luz negra	Bautitz, 2007
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.5L	1-20 mM	AD1	100/8 min, luz negra	Bautitz, 2007
	0.2mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.5L	3 mM	AD1	100/0.5 min, solar	Bautitz, 2007
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.5L	3 mM	AD1	100/3 min, solar	Bautitz, 2007
	0.2mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.5L	3 mM	AD2	100/0.5 min, luz negra	Bautitz, 2007
	0.2mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.5L	3 mM	ER	80/3 min, luz negra	Bautitz, 2007
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.5L	3 mM	AD1	100/1.5 min, solar	Bautitz, 2007
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.5L	3 mM	AD2	100/1.5 min, solar	Bautitz, 2007
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.5L	3 mM	ER	100/1.5 min, solar	Bautitz, 2007
Ofloxacino	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ES	100/56 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	5 mg L ⁻¹	ES	100/114 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ER	100/102 min, solar	Klamerth, 2010
Ampicilina	0.16mM / 0.5L	24.3 mM	AD1	76/50 min (lámpara, λ~ 365nm)	Elmolla, 2009
	2.4 mM / 0.5L	24.3 mM	AD1	48/50 min (lámpara, λ~ 365nm)	Elmolla, 2009
Amoxicilina	0.16mM / 0.5L	24.3 mM	AD1	76/50 min (lámpara, λ~ 365nm)	Elmolla, 2009
	2.4mM / 0.5L	24,3mM	AD1	48/50 min (lámpara, λ~ 365nm)	Elmolla, 2009
	0.2 mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.8L	5 mM	AD1	100/0.5 min, luz negra	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	5 mM	AD1	100/0.5 min, luz negra	Trovó, 2008
	0.2 mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.8L	5 mM	AD1	62/1 min, solar	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	5 mM	AD1	96/1 min, solar	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	2 mM	RE	90/1 min, luz negra	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	2 mM	RE	85/1 min, solar	Trovó, 2008
Cloxacilina	0.16 mM / 0.5L	24.3 mM	AD1	76/50 min (lámpara, λ~ 365nm)	Elmolla, 2009
	2.4 mM / 0.5L	24.3 mM	AD1	48/50 min (lámpara, λ~ 365nm)	Elmolla, 2009

Flumequina	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ES	100/56 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	5 mg L ⁻¹	ES	100/114 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ER	100/102 min, solar	Klamerth, 2010
Regulador del colesterol					
Benzofibrato	0.2 mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.8L	5 mM	AD1	100/3.5 min, luz negra	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	5 mM	AD1	98/5 min, luz negra	Trovó, 2008
	0.2mM (Fe(NO ₃) ₃)/ 0.8L	5 mM	AD1	90/9 min, solar	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	5 mM	AD1	100/7 min, solar	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	2 mM	RE	100/10 min, luz negra	Trovó, 2008
	0.2mM (Ferrioxalato)/ 0.8L	2 mM	RE	100/3.5 min, solar	Trovó, 2008
Metabolitos					
4-Acetilaminoantipirina	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ES	93/300 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	5 mg L ⁻¹	ES	92/336 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ER	100/276 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD1(pH 2.8)	100/33 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD1(pH natural)	100/<20 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD2(pH natural)	50/270 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD2(pH natural, sin HCO ₃ ⁻)	100/>75 min, solar	Klamerth, 2009
	20 mg L ⁻¹ /CPC35 5 mg L ⁻¹ /CPC35	50 mg L ⁻¹ 50 mg L ⁻¹	ER ER	100/>50 min, solar 100/>10 min, solar	Klamerth, 2010b Klamerth, 2010b
Otros					
cafeína	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ES	95/300 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	5 mg L ⁻¹	ES	91/336 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	ER	100/158 min, solar	Klamerth, 2010
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD1(pH 2.8)	100/33 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD1(pH natural)	100/<20 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD2(pH natural)	50/270 min, solar	Klamerth, 2009
	5 mg L ⁻¹ / CPC35	50 mg L ⁻¹	AD2(pH natural, sin HCO ₃ ⁻)	100/>75 min, solar	Klamerth, 2009
	20 mg L ⁻¹ /CPC35 5 mg L ⁻¹ /CPC35	50 mg L ⁻¹ 50 mg L ⁻¹	ER ER	100/<10 min, solar 100/>10 min, solar	Klamerth, 2010b Klamerth, 2010b

* cuando no se menciona la especie de Hierro utilizada considerar Fe²⁺

CPC 35: Concentrador parabólico compuesto con capacidad de tratamiento de un volumen total de 35L

ES: Efluente Simulado

ER: Efluente Real proveniente de EDAR

AD1: agua destilada

CPC 150: Concentrador parabólico compuesto con capacidad de tratamiento de un volumen total de 150L

AD2: agua dulce

RSS : Radiación Solar Simulada

AM: Agua de Mar

La degradación de los compuestos que pertenecen a la categoría terapéutica de los antiinflamatorios y de los antibióticos mediante FF se muestra como la más estudiada,

posiblemente por la relativa importancia y alto consumo de estos fármacos (véase **tabla 1.9**). Además, la mayoría de estos trabajos versan sobre la evaluación de variables importantes del proceso, tales como la concentración de hierro, la concentración de peróxido de hidrógeno y el tipo de radiación utilizado. Por ejemplo, en el estudio conducido por Bautistz y Nogueira (2007), se valora el uso de distintas formas de hierro y sus posibles efectos para el tratamiento de la tetraciclina. El efecto de la concentración inicial del peróxido de hidrógeno o de la proporción $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$ es constantemente objeto de investigación. También se observa, en general, un aumento en la complejidad de la matriz acuosa utilizada (ER, ES, AM), lo que representa un importante intento en ampliar el conocimiento sobre la potencialidad del proceso FF para el tratamiento de aguas reales. De hecho, en general, se observa un incremento constante en los últimos años en los estudios de eliminación de contaminantes orgánicos vía proceso FF. La **figura 1.9**, presenta el número de publicaciones relacionadas con el proceso FF durante la última década. Estos resultados indican que en el año 2000 se publicaron 91 artículos y en 2009 el número de publicaciones alcanzó la cifra de 658 artículos.

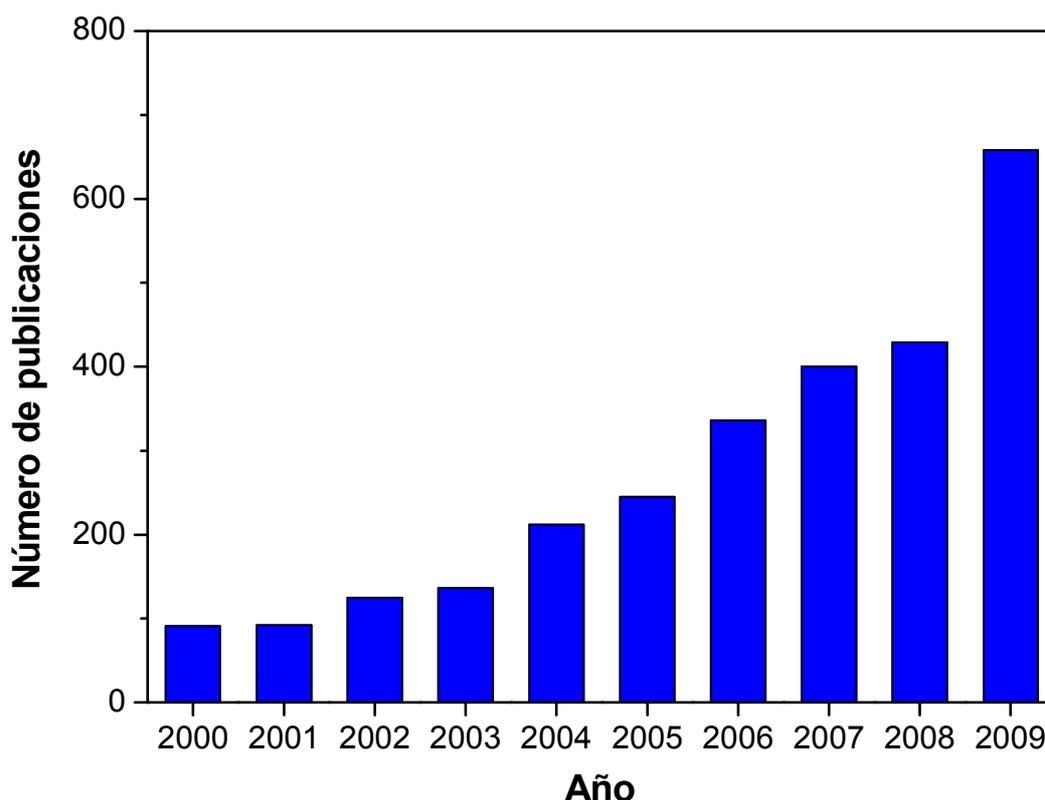


Figura 1.9 Publicaciones relacionadas con el proceso de foto-Fenton entre 2000 y 2009 (Fuente: www.sciencedirect.com; palabras clave utilizadas en la búsqueda: "photo-Fenton" y "pharmaceuticals").

1.4.3 Fotorreactores Solares

Los materiales específicos necesarios para aplicaciones fotocatalíticas solares tienen mucho en común con los usados para aplicaciones solares térmicas. Como resultado, los sistemas fotocatalíticos y fotorreactores solares han seguido los diseños de los captadores térmicos, como son los cilindro-parabólicos y los captadores que no concentran la radiación solar. En este contexto cabe destacar que los fotorreactores solares se distinguen de los captadores térmicos en: (i) el agua a ser tratada se debe exponer a los fotones solares, y, por lo tanto, el tubo debe ser transparente, y (ii) la temperatura no desempeña un papel significativo en el proceso fotocatalítico, así que no se requiere ningún aislamiento térmico. Esto, en todo caso, es aplicable a FH, aunque no tanto a FF, donde la temperatura sí juega un papel importante, incrementando la eficiencia conforme aumenta la temperatura. Sin embargo, se ha demostrado que el proceso de FF no mejora su eficiencia con el incremento de temperatura a partir de unos 45°C (Zapata y cols., 2009). Se debe remarcar que la fotocatalisis es un proceso fotónico, a diferencia de los procesos térmicos de aprovechamiento de la energía solar.

La mayoría de los componentes de un sistema fotoquímico solar están hechos de materiales convencionales disponibles en el mercado, siendo muchos de ellos (bombas, tanques, conexiones, sensores) idénticos a los que se utiliza para otros procesos de tratamiento de aguas, evitando el uso de metales por las condiciones de pH y el uso de oxidantes y teniendo en cuenta que todos los materiales usados deben ser inertes a la degradación por la luz solar para alcanzar un tiempo de vida mínimo de operación a la intemperie. Todos los tubos, el reactor y los dispositivos de conexión deben soportar la presión del flujo de agua, siendo los valores típicos de 2-4 bares.

Los reactores fotocatalíticos deben transmitir la radiación UV solar ($\lambda > 300$ nm) de forma eficiente. Con respecto a los materiales de los captadores, el aluminio es la mejor opción debido a su alta reflectividad del espectro UV solar en la superficie terrestre. Las reflectividades se extienden desde el 92.3% en 280 nm al 92.5% en 385 nm. Las superficies de aluminio son frágiles y necesitan ser protegidas contra la erosión y la abrasión, pero el revestimiento de cristal usado en los espejos convencionales tiene la desventaja de no transmitir adecuadamente la luz UV. Actualmente las superficies disponibles que mejor se ajustan a estos requisitos son: (i) aluminio anodizado electropulido y (ii) películas de plástico orgánico aluminizado (Blanco y cols., 2000).

Otra característica importante en el diseño de los fotorreactores es que los materiales no deben reaccionar con el catalizador o los agentes contaminantes que se tratarán o sus

productos de transformación. Son pocos los materiales que son al mismo tiempo transparentes a la luz UV solar y resistentes a sus efectos destructivos. La resistencia a pH bajos es necesaria puesto que la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos como subproductos de la reacción es muy habitual. Los materiales comunes que cumplen estos requisitos son los fluoropolímeros y varios tipos de vidrio. El cuarzo tiene una transmisión UV excelente así como buena resistencia química, pero el alto coste lo hace totalmente inasequible en sistemas fotocatalíticos. Los fluoropolímeros son una buena opción debido a su buena transmitancia y excelente estabilidad ultravioleta asociadas a una elevada inercia química. Una de las principales desventajas de este tipo de material reside en el hecho de que para alcanzar un grado mínimo de resistencia a la presión, el espesor de la pared del tubo de fluoropolímero tiene que ser aumentado, hecho que supone una reducción de la transmitancia UV. Otros materiales poliméricos de bajo coste son más susceptibles de ser atacados por los radicales $\bullet\text{OH}$. El vidrio estándar no se puede utilizar porque absorbe parte de la radiación UV debido a su elevado contenido en hierro. Por lo tanto, la utilización de un vidrio con bajo contenido en hierro parece ser la opción más adecuada. El vidrio borosilicatado tiene muy buenas propiedades transmisivas del espectro solar. Así, se puede considerar que tanto los fluoropolímeros como el vidrio borosilicatado son materiales válidos para la construcción de un fotorreactor, pero es más recomendable el vidrio debido a su mayor resistencia mecánica (Malato y cols., 2002).

Para asegurar la conversión eficiente de los fotones incidentes a las especies portadoras de carga, el diseño apropiado de un reactor solar es de extrema importancia (véase **figura 1.10**). Se ha observado que sistemas en que se concentra la luz, tales como reactores con concentración en forma parabólica, no exhiben necesariamente ventajas sobre sistemas sin concentración de luz (Blanco-Galvez y cols., 2007). Es conocido que en la gama de longitudes de onda del espectro solar que se puede utilizar para la excitación del TiO_2 (FH), la porción de radiación solar difusa y directa que alcanzan la superficie de la tierra es casi igual (Bird y cols., 1983). Esto significa que un captador solar con concentración puede aprovechar únicamente la mitad de la radiación solar disponible para la activación del catalizador.

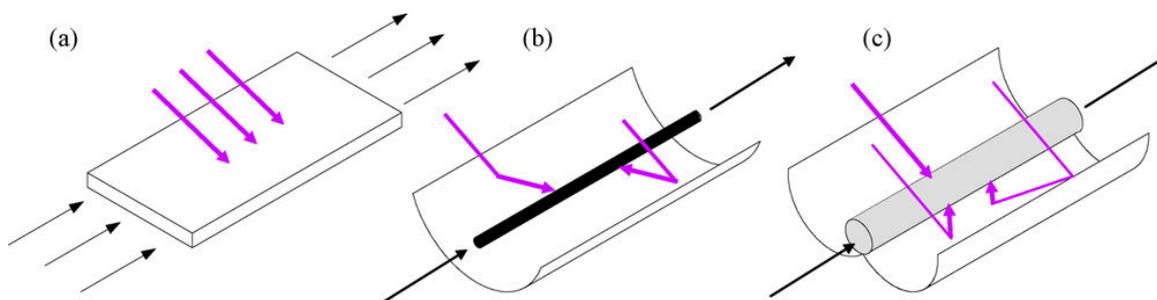


Figura 1.10 Conceptos de diseño para reactores fotocatalíticos solares utilizados en el tratamiento de aguas (a) sin concentración (sistema de un sol), (b) con concentración (cilíndrico-parabólico, PTC), y (c) captador parabólico-compuesto (CPC).

Los diseños de fotorreactores solares para aplicaciones fotoquímicas fueron basados, fundamentalmente, en captadores cilindro-parabólicos (PTC, en su acrónimo inglés), que era la tecnología más desarrollada y en la que históricamente se ha puesto un mayor énfasis (Goswami, 1995). Estos colectores pueden tener mecanismos de seguimiento solar en uno o dos ejes y se basan en una parábola que refleja y concentra la luz solar sobre su foco (véase **figura 1.11**). En dicho foco está situado el receptor, que es el reactor tubular transparente de vidrio. Los sistemas de concentración tienen la ventaja de requerir un área de tubo reactor mucho más pequeña, lo que significa un circuito mucho menor para confinar, manejar y controlar el fluido del proceso.



Figura 1.11 Colector cilindro-parabólico instalado en la PSA.

Sin embargo, los sistemas fotocatalíticos con seguimiento solar tienen dos desventajas importantes frente a los que no tienen seguimiento (sistemas estáticos). La primera es su mayor complejidad, coste y necesidades de mantenimiento debido al propio sistema de

seguimiento y que obliga a estructuras más complejas y reforzadas. La segunda desventaja de los sistemas con seguimiento solar, tan importante o más que la primera para aplicaciones fotocatalíticas, es la imposibilidad de aprovechar correctamente la radiación difusa. La componente difusa llega a representar el 50% de la radiación UV total que llega a la superficie terrestre.

Por estas razones se ha realizado un gran esfuerzo en el diseño de sistemas estáticos solares y sin concentración para aplicaciones fotoquímicas en general y en especial para procesos fotocatalíticos. Sin embargo, el diseño de reactores robustos no es sencillo debido a los requerimientos de resistencia a la intemperie, baja pérdida de carga, elevada transmitancia en el UV, operación a elevadas presiones, etc. Los captadores sin concentración también denominados “sistemas de un sol” no tienen ninguna pieza móvil o dispositivos de seguimiento solar (véase ejemplo ilustrativo en la **figura 1.12**). Estos sistemas no concentran la radiación, así que su eficacia no es reducida por los factores asociados a la concentración y seguimiento solar. Los costes de fabricación y mantenimiento son más asequibles porque sus componentes son más simples. Estos reactores permiten utilizar tanto la componente difusa como la porción directa de la radiación UV solar. Aunque los captadores sin concentración presenten ventajas importantes, ya que el diseño de un fotorreactor sin concentración robusto no es trivial, debido a la necesidad de resistencia a la intemperie y de que sean químicamente inertes y garanticen una buena transmitancia UV. Además, deben ser diseñados para soportar la presión de operación necesarias para la circulación del fluido en el sistema. Por otro lado, los fotorreactores sin concentración desarrollados como un sistema abierto permiten que tanto los reactivos como el catalizador se contaminen a lo largo del proceso de tratamiento.



Figura 1.12 Colectores sin concentración utilizados para degradación de contaminantes mediante FH (izquierda) y FF (derecha), desarrollados en la PSA.

Muy a menudo la inercia química de los materiales usados (resistencia a la corrosión y a la exposición a la radiación solar) para construir un captador sin concentración es difícil de garantizar. Para diseñar un captador solar para aplicaciones fotocatalíticas, un conjunto de condiciones debe ser considerado: (i) la radiación UV, (ii) temperaturas de trabajo, (iii) la eficiencia cuántica (correcto aprovechamiento de los fotones incidentes) y (iv) la necesidad de captar la radiación UV difusa. Finalmente, su construcción debe ser económica y eficiente, con una pérdida de carga baja. Por consiguiente, el uso de fotorreactores tubulares tiene siempre unas ventajas decisiva respecto a los diseños mostrados en la **figura 1.12**. Las tuberías suelen estar disponibles en una gran variedad de materiales y de tamaños y son la mejor opción para un sistema que debe manejar agua en circulación. En este contexto, es de destacar una categoría de captadores de baja concentración denominados Captadores Parabólico-Compuestos (CPC). Los CPC son una interesante mezcla entre los PTC y los sistemas sin concentración, y suponen una de las mejores opciones para las aplicaciones fotocatalíticas utilizando la luz solar. Antes de introducir los CPC, y debido a sus especiales características, resulta interesante exponer las principales ventajas e inconvenientes de los PTC y los captadores sin concentración, lo que se realiza en la **tabla 1.10**.

Tabla 1.10 Comparación cualitativa entre reactores PTC y reactores sin concentración para aplicaciones fotocatalíticas, usando TiO_2 y luz solar.

Reactores Cilindro-Parabólicos		Reactores sin concentración	
Ventajas	Inconvenientes	Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> - Flujo turbulento (favorece la transferencia de materia). - Ausencia de vaporización de compuestos volátiles. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sólo aprovechan la radiación directa. - Alto coste. - Baja eficiencia óptica. - Baja eficiencia cuántica. - Sobrecalentamiento del agua a tratar. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aprovechamiento de la radiación directa y difusa. - No se produce sobrecalentamiento del agua a tratar. - Bajo coste. - Alta eficiencia óptica y cuántica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Flujo laminar (baja transferencia de materia). - Vaporización de compuestos volátiles.

Los reactores tipo CPC son unos sistemas estáticos con una superficie reflectante enfocada hacia un fotorreactor cilíndrico siguiendo una involuta (véase **figura 1.13**). Estos dispositivos proporcionan una de las mejores ópticas para los sistemas de baja concentración, pudiendo además ser diseñados con un $R_C=1$, con lo que se consiguen simultáneamente las ventajas de los PTC y de los reactores sin concentración.

Gracias al diseño de su superficie reflectante, casi toda la radiación que llega al área de apertura del captador (no sólo la directa, sino también la difusa) puede ser recogida y estar disponible para el proceso fotocatalítico en el reactor. La radiación UV reflejada por el CPC es además distribuida alrededor de la parte trasera del tubo fotorreactor y como resultado la mayoría de la circunferencia del tubo fotorreactor se encuentra iluminada. Además, como en un PTC, el agua es más fácilmente conducida y distribuida que en los diseños de los captadores sin concentración. A diferencia de las instalaciones de PTC, no se necesitan equipos de refrigeración (que aumentan el coste de la instalación) porque no existe un sobrecalentamiento del agua. En estos casos en los que no hay concentración solar, ningún punto del tubo recibe mucho más de 1 Sol de radiación UV, debido a la relación entre la superficie del tubo fotorreactor y del captador. Como resultado, la radiación UV incidente en el reactor es muy similar a la de los fotorreactores basados en captadores de placa plana. La eficiencia máxima de captación anual, para captadores estáticos sin seguimiento, se consigue con un ángulo de inclinación del sobre la horizontal semejante a la latitud del lugar de emplazamiento. Todos estos factores contribuyen a un excelente comportamiento de los CPC en las aplicaciones fotocatalíticas solares.

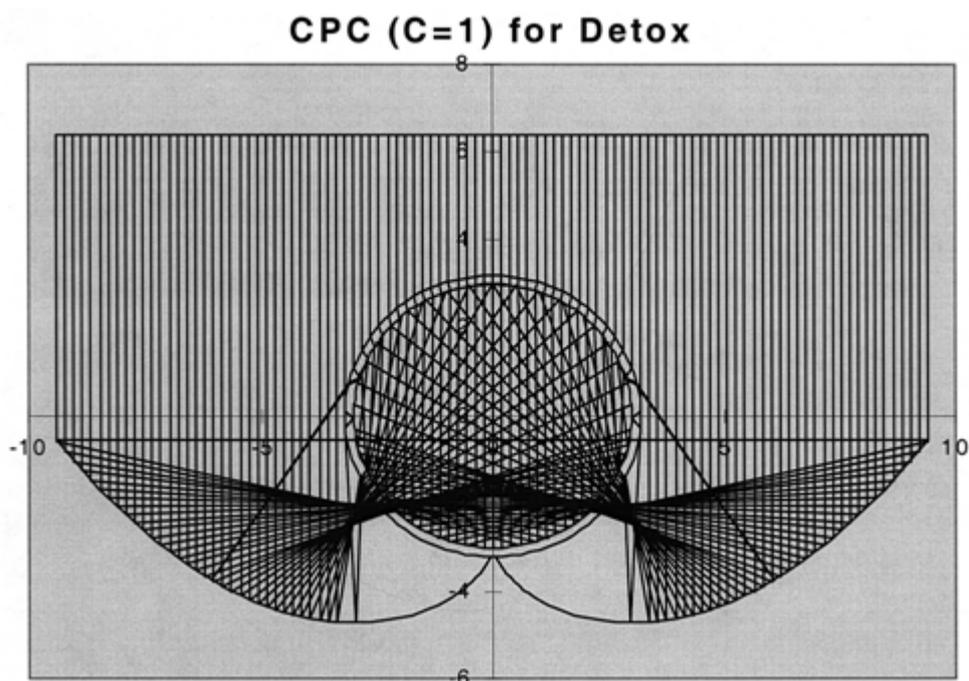


Figura 1.13 Dibujo esquemático del recorrido de los fotones en un CPC con un semi-ángulo de la aceptación de 90° , estando el sol situado en el cenit.

El factor de concentración (RC) de un CPC bidimensional se expresa mediante la **ecuación 1.1**. Si $\theta_a = 90^\circ$, entonces $R_C = 1$ (sistema sin concentración solar). Cuando esto pasa, toda la radiación UV que alcanza el área de la abertura del CPC (directa y difusa) se puede recoger y reorientar al reactor. Si el CPC se diseña para un ángulo de aceptación desde $+90^\circ$ hasta -90° , toda la radiación solar difusa incidente puede ser recogida como demuestra la **figura 1.14**.

$$R_{C,CPC} = 1 / \sin \theta_a = A / 2\pi r \quad (1.1)$$

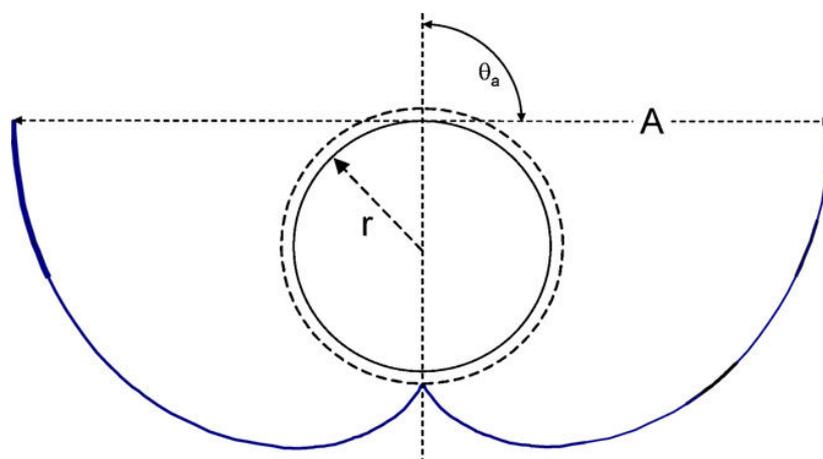


Figura 1.14 Dibujo esquemático de un CPC con un semi-ángulo de la aceptación de 90° .

De esta forma se puede considerar que los CPC han resultado ser una de las mejores tecnologías disponibles en el mercado para la construcción de fotorreactores fotocatalíticos solares (Blanco y cols., 2009). Seguidamente se observa un fotorreactor tipo CPC instalado en la PSA (**figura 1.15**).



Figura 1.15 CPC utilizado para aplicaciones solares de fotocatalisis, instalado en la PSA.

Los fotorreactores solares utilizados en esta Memoria serán descritos con más detalle en el **capítulo 2**, apartados **2.7.1** y **2.7.2**.

1.4.4 Sistemas acoplados de tratamiento

Las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) suelen hacer uso de sistemas biológicos convencionales, en especial procesos de fangos activos para reducir la carga orgánica biodegradable de las aguas residuales objeto del tratamiento. Sin embargo, como las aguas residuales industriales suelen contener un alto contenido orgánico asociado a la presencia de compuestos biorrecalcitrantes, el tratamiento mediante procesos biológicos convencionales no es eficiente. Esta desventaja puede ser particularmente crítica si estos compuestos además de no ser biodegradables presentan toxicidad (Oller y cols., 2007; Gogate y Pandit, 2004; Malato y cols., 2007; Muñoz y Guieysee, 2006; Mantzavinou y Psillakis, 2004; Parra y cols., 2000; Pulgarín y cols., 1999; Pulgarín y Kiwi, 1996). En tales casos, el empleo de una pre-oxidación química para aumentar la biodegradabilidad de esos compuestos biorrecalcitrantes o un post-tratamiento, también basado en oxidación química para eliminar aquellos que no han sido biodegradados, es una solución a tener en cuenta. La elección de una u otra está basada en las características del agua a tratar, como representado en la **figura 1.16**.

Los post-tratamientos se emplean como una etapa de afino después de un tratamiento biológico en el caso de las aguas residuales que contienen grandes cantidades de materia orgánica biodegradable, además de compuestos biorrecalcitrantes aunque no tóxicos para los fangos activados (Haberl y cols., 1991). Los tratamientos previos son recomendables en el caso opuesto, es decir, cuando la cantidad de contaminantes biorresistentes es muy elevada o bien tienen elevada toxicidad para el tratamiento biológico (González y cols., 2009; Coelho y cols., 2009; Qian y cols., 1994). El punto clave es minimizar el tiempo de residencia y el consumo de reactivos durante la etapa de oxidación química, que es la más costosa (Sarria y cols., 2003; Esplugas y Ollis, 1997).

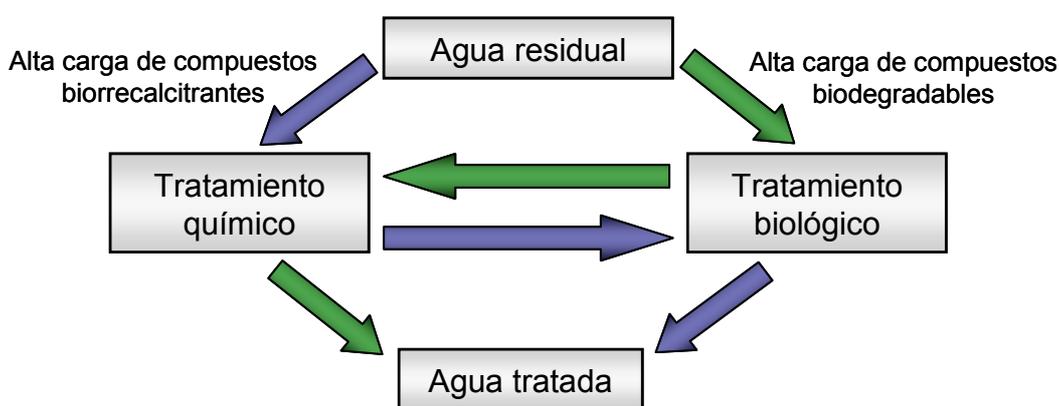


Figura 1.16 Esquema ilustrativo simplificado de las posibilidades de acople entre los distintos procesos de tratamiento.

Así, se considera que, para el caso de aguas residuales biológicamente resistentes, una alternativa viable es el uso de tecnologías avanzadas basadas en la oxidación química. Habitualmente, los métodos de oxidación química presentan un elevado coste y cuando se emplean para mineralizar los contaminantes el coste puede ser aún mayor, ya que los productos de oxidación que se forman durante el tratamiento tienden a ser cada vez más resistentes a su completa oxidación. Por otro lado, si el tiempo de pre-tratamiento es demasiado corto, los intermedios de reacción generados podrían ser estructuralmente muy similares a los componentes iniciales y seguir siendo no biodegradables (Cominellis y cols., 2008.). No obstante hay que considerar que cuanto más prologado es el tratamiento, mayores son el consumo de energía (como la radiación y la producción de ozono, entre otros) y de reactivos químicos (catalizadores y oxidantes). Así, el empleo de un pre-tratamiento químico debe ser el mínimo posible que permita que los compuestos generados a partir de la oxidación parcial de los contaminantes iniciales, puedan ser degradados por la acción de microorganismos en el proceso biológico posterior.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los PAO degradan la materia orgánica de forma no selectiva y dependiendo de las características del agua residual, el pre-tratamiento

químico puede tener un efecto insignificante o nocivo principalmente por: (i) la formación de productos de transformación menos biodegradables y más estables que los compuestos iniciales, (ii) el empleo de condiciones que no favorezcan un post-tratamiento biológico (una situación ilustrativa de tal condición ocurre cuando se emplea un pre-tratamiento químico prolongado, lo cual proporciona una elevada mineralización de los compuestos iniciales dando origen a un efluente con escaso valor metabólico para los microorganismos), y (iii) la presencia de reactivos químicos (oxidantes y catalizadores) altamente tóxicos para los microorganismos del biotratamiento posterior.

El control detallado de las condiciones de operación (temperatura, dosis y toxicidad del catalizador y/u oxidante, tiempo de exposición a los mismos, etc.), durante la etapa de pre-oxidación química puede minimizar los inconvenientes (ii) y (iii) antes descritos. La formación de productos menos biodegradables no es una situación habitual, ya que los compuestos más oxidados suelen ser más biodegradables, aunque no se puede descartar algún caso concreto. Las variables que se emplean comúnmente para describir la oxidación química es la reducción del valor de parámetros como la concentración de Carbono Orgánico Disuelto (COD) y la Demanda Química de Oxígeno (DQO). Por otro lado, aspectos relacionados con la formación de intermedios pueden ser comprobados a través de técnicas analíticas avanzadas, las cuales permiten dilucidar la naturaleza química de estos intermedios y/o las rutas de degradación. Los parámetros biológicos usualmente se evalúan mediante: ensayos de biodegradabilidad, ensayos de toxicidad y estudios integrados en los que el agua parcialmente tratada alimenta a un post-tratamiento biológico (Pulgarín y cols., 1999; Fernández-Alba y cols., 2002; Oller y cols 2007). Así, un profundo conocimiento del agua inicial y de los parámetros químicos y cinéticos asociados a parámetros como la toxicidad y la biodegradabilidad son fundamentales y determinantes para definir el tratamiento de oxidación química y garantizar que éste tenga éxito. Asimismo, normalmente es necesario realizar experimentos que integren la degradación química y biológica para obtener la información precisa del proceso combinado. Para el diseño de este sistema combinado se deben tener en cuenta aspectos tales como: la biodegradabilidad del efluente inicial, el modo de operación del reactor combinado, las características químicas y biológicas del efluente del tratamiento de oxidación química, las condiciones óptimas para ambos procesos y la eficiencia del reactor combinado (Parra y cols., 2002).

En los estudios de procesos acoplados para el tratamiento de aguas residuales, siempre hay que considerar que cada efluente concreto debe ser evaluado individualmente. No es muy a menudo posible dilucidar el comportamiento de un efluente *a priori*. Se han identificado cuatro tipos de aguas residuales potencialmente tratables mediante los procesos de degradación combinados: (i) aguas residuales conteniendo compuestos biorrecalcitrantes;

(ii) aguas residuales con elevada biodegradabilidad pero que contienen también compuestos no biodegradables y que requieren un posterior tratamiento químico; (iii) aguas residuales conteniendo compuestos inhibidores de los fangos activados; y, finalmente, (iv) aguas residuales conteniendo productos inertes al biotratamiento, los cuales, se suelen acumular en el biorreactor y terminarían por inhibir el crecimiento de los microorganismos (Scott y Ollis, 1995).

De acuerdo con todo lo anterior, a lo largo de los últimos años, fueron llevados a cabo muchos estudios en los que la oxidación química, como pre-tratamiento o post-tratamiento, se ha utilizado con fármacos contenidos en aguas (véase **tabla 1.11**). En estos trabajos se estudiaron desde disoluciones modelo con fármacos individuales hasta efluentes reales.

Tabla 1.11 Estudios de degradación de fármacos y/o efluentes farmacéuticos vía tratamientos combinados.

Fármaco/ matriz	pre-tratamiento	post- tratamiento	% degradación global	Referencias
Diclofenaco/ efluente EDAR	MBR	ozono	100%	Gebhardt, 2007
	MBR	ozono+UV	100%	Gebhardt, 2007
	MBR	H ₂ O ₂ +UV	99%	Gebhardt, 2007
	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Ácido clofibríco/ efluente EDAR	MBR	ozono	90%	Gebhardt, 2007
	MBR	ozono+UV	98%	Gebhardt, 2007
	MBR	H ₂ O ₂ +UV	97%	Gebhardt, 2007
Carbamazepina/ efluente EDAR	MBR	ozono	99%	Gebhardt, 2007
	MBR	ozono+UV	99%	Gebhardt, 2007
	MBR	H ₂ O ₂ +UV	96%	Gebhardt, 2007
	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Diazepan/ efluente EDAR	MBR	ozono	65%	Gebhardt, 2007
	MBR	ozono+UV	88%	Gebhardt, 2007
	MBR	H ₂ O ₂ +UV	73%	Gebhardt, 2007
Indometacin/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
4-MAA (<i>metabolito activo dipirona</i>)/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Ketorolaco/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Propranolol/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Atenolol/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Sulfametoxazole/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Sulfametoxazole/ agua sintética	foto-Fenton (300 mg L ⁻¹ de H ₂ O ₂)	SBBR	75.5%	González, 2009
Sulfametoxazole/ agua sintética	foto-Fenton (400 mg L ⁻¹ de H ₂ O ₂)	SBBR	100%	González, 2009
Trimetoprim/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Naproxeno/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Norfloxacin/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
Gemfibrozil/ efluente EDAR	Trat. Biológico	ozono	95%	Rosal, 2009

efluente EDAR	convencional			
Benzofibrato/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	<100%	Rosal, 2009
Ketoprofeno/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	<100%	Rosal, 2009
Metronidazole/ Efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	<100%	Rosal, 2009
Ranitidina/ efluente EDAR	Trat. Biológico convencional	ozono	100%	Rosal, 2009
α - metilfenilglicina/ agua destilada	foto-Fenton	IBR	100%	Oller, 2007
Efluente simulado con penicilina	Ozono Ozono+H ₂ O ₂	Tratamiento biológico con fangos activos	84% 79%	Arslan-Alaton, 2004
Efluente farmacéutico	Reactor anaerobio de lecho fluidizado operado en sistema de lotes	Fenton/ coagulación con Al	-	Xing, 2006
Agua residual industrial	Electrocoagulación +ozono	Trat. Biológico convencional	>60% (DQO)	Hernández-Ortega, 2010

MBR: Reactor Biológico de Membrana
 SBBR: Reactor Biológico Secuencial de Biopelículas
 α -metilfenilglicina: precursor en la síntesis de fármacos
 IBR: Reactor Biológico de Lecho Fijo

Un estudio pormenorizado y sistemático de las investigaciones anteriores, permiten establecer un procedimiento de decisión sobre la estrategia del tratamiento y que permita el diseño de una instalación de tratamiento, considerando los pasos siguientes (Malato y cols., 2009) :

- i) comprobar si las aguas residuales son potencialmente tratables por PAO y/o tratamientos biológicos.
- ii) seleccionar la estrategia de tratamiento en función de las características de las aguas residuales (solamente PAO, PAO-BIO, BIO-PAO y solamente BIO).
- iii) desarrollar y optimizar la estrategia de combinación (en el caso de que en el paso anterior fuera elegida la secuencia PAO-BIO o BIO-PAO).
- iv) estudiar la cinética de ambos procesos en planta piloto.
- v) obtener un modelo teniendo en cuenta los datos anteriores.
- vi) elegir el PAO de aplicación más satisfactoria.
- vii) estudiar la viabilidad económica del proceso.
- viii) diseño de las instalaciones.

Debido a su especial importancia en esta Tesis, se comentan en detalle los tres primeros pasos del mismo:

- i) Comprobar si las aguas residuales son potencialmente tratables mediante PAO y/o tratamientos biológicos. El primer paso sería siempre comprobar si el agua residual es biodegradable, descartándose todo lo comentado a continuación si así fuera. Si no fuera así, en este caso las variables que debemos considerar son: la volatilidad y la solubilidad de los contaminantes, la concentración de los mismos en el agua residual, y la cinética de

degradación del contenido orgánico de la matriz en estudio. La volatilidad representa un obstáculo al diseño del reactor, y además se agrava si se eleva la temperatura durante el tratamiento, lo que es habitual en los PAO. La solubilidad debe tenerse en cuenta, especialmente cuando una segunda fase está presente. Mientras que las especies oxidantes ($\cdot\text{OH}$) se generan en la fase acuosa, el que los contaminantes estén adsorbidos en sólidos o disueltos en una fase líquida secundaria (por ejemplo películas de aceite) puede ser fuertemente perjudicial para la cinética y la reproductibilidad del proceso, puesto que la eficacia del mismo disminuye y la incertidumbre aumenta. La concentración del contaminante y su influencia en el proceso también deben de ser consideradas. En este caso, una alta concentración del contaminante puede llevar a elevados costes de operación debido a los altos tiempos de residencia en el reactor. Por otra parte, bajas concentraciones del contaminante significan que la combinación con un biotratamiento no sería posible.

ii) seleccionar la estrategia de tratamiento en función de las características de las aguas residuales. El Carbono Orgánico Total (COT) debe de ser utilizado como un parámetro general del tratamiento y ha de ser controlado antes y durante el proceso. Además, habitualmente se deben conocer la toxicidad y la biodegradabilidad y, como regla general, se recomiendan ambos parámetros al tratar efluentes reales. Una vez evaluados los parámetros de COT, de biodegradabilidad y de toxicidad, se puede seguir la secuencia propuesta en el diagrama de decisión (véase también **figura 1.17**) de acuerdo con las situaciones que se describen con mayor detalle seguidamente:

a) Si las aguas residuales son biodegradables, es recomendable realizar un tratamiento biológico previo, ya que los tratamientos biológicos clásicos son, actualmente, la opción más asequible y de mayor compatibilidad ambiental. Después de este biotratamiento, la calidad del efluente tiene que ser comprobada para determinar si un tratamiento adicional es necesario o si se puede verter con seguridad el efluente una vez alcanzados los límites legales.

b) Si las aguas residuales no son biodegradables y el COT es alto ($>100 \text{ mg L}^{-1}$), se debe de considerar un tratamiento previo mediante PAO y un posterior biotratamiento. Después del tratamiento se tiene que comprobar la calidad del efluente para determinar si éste cumple con los requisitos legales medioambientales que permiten su vertido.

c) Si las aguas residuales no son biodegradables y el COT es bajo ($<100 \text{ mg L}^{-1}$) pero la toxicidad es alta, se puede emplear un tratamiento mediante PAO para reducir la toxicidad, pero sin la aplicación de un tratamiento biológico subsiguiente, porque se generaría un efluente con un COT todavía más bajo, lo cual no convendría a un biotratamiento. Sería recomendable que estas aguas, después del tratamiento con PAO, se vertieran al sistema público de tratamiento de aguas residuales para afinarlas.

d) Si las aguas residuales no son biodegradables, el COT es bajo ($<100 \text{ mg L}^{-1}$), la toxicidad es baja, pero otros requisitos fisicoquímicos legales no se cumplen, se debe considerar un tratamiento mediante PAO sin un tratamiento biológico subsiguiente. En este caso, después del tratamiento químico la calidad del efluente tiene que ser evaluada antes de la descarga del mismo.

e) Si las aguas residuales no son biodegradables pero el COT es bajo ($<100 \text{ mg L}^{-1}$), la toxicidad es baja y todos los requisitos legales para la descarga se cumplen, éstas pueden ser vertidas con seguridad.

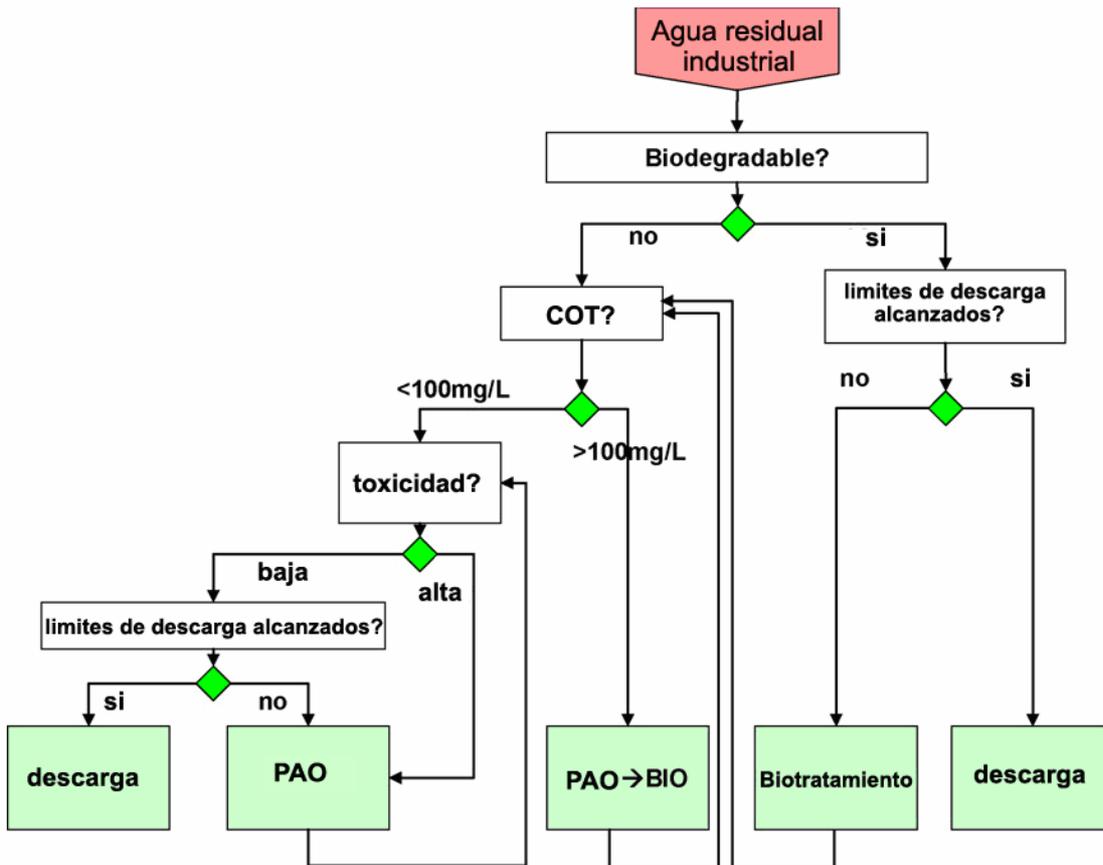


Figura 1.17 Diagrama de decisión para definir la estrategia más conveniente para el tratamiento de aguas residuales mediante combinación de PAO y biotratamiento.

iii) Desarrollar y optimizar una estrategia de acoplamiento (si se ha elegido PAO-BIO en el paso ii). Este paso es en verdad multidisciplinario y requiere el conocimiento del proceso biológico y químico. Una serie de parámetros analíticos fundamentales a lo largo de todo el proceso global de tratamiento necesitan ser medidos, parámetros globales como: COT, DQO, métodos cromatográficos (HPLC-UV para cuantificar los contaminantes de interés), pruebas de toxicidad aguda (por ejemplo *Vibrio fischeri* y *Daphnia magna*), pruebas de biodegradabilidad (DBO_5 , Zahn-Wellens, respirometría) y, finalmente, medidas de los aniones y los cationes. Otra serie de parámetros relacionados con las condiciones del proceso de oxidación química debe ser evaluada, la cual incluye la concentración de hierro,

la concentración de H_2O_2 y el valor del pH en el caso de foto-Fenton. Estos parámetros analíticos pueden satisfacer las necesidades desde un punto de vista ingenieril para el diseño de una estrategia de acoplamiento. Por otro lado, si se busca la comprensión adicional de los procesos subyacentes, se deben aplicar métodos analíticos adicionales que permitan la identificación de los PT desconocidos. Tal estudio requiere el empleo de equipos analíticos sofisticados, como es el caso de esta Tesis.

En sistemas combinados, se requiere un tratamiento previo mediante PAO para modificar la estructura de los contaminantes, permitiendo que éstos sean transformados en intermedios menos tóxicos y fácilmente biodegradables, lo que permite el empleo de una degradación biológica subsiguiente. La matriz fototratada químicamente se considera que es biológicamente compatible después: (i) de la eliminación de los compuesto iniciales biorrecalcitrantes, (ii) de la eliminación de los intermedios inhibidores y/o no-biodegradables, (iii) de la eliminación del H_2O_2 residual u otros reactivos que se utilizan durante el fototratamiento, y (iv) del ajuste del pH, cuando sea necesario. Estos requisitos y toda la información referente a la evolución de la toxicidad y de la biodegradabilidad permiten la determinación de un punto óptimo de tratamiento. Sin embargo, intermedios estructuralmente similares a los compuestos iniciales pueden permanecer en la muestra tratada y presentar características biorrecalcitrantes incluso después de tratamientos prolongados, no permitiendo en este caso el posterior tratamiento biológico. En estos casos, la única solución es mineralizar los contaminantes exclusivamente mediante los PAO (Zapata y cols., 2008).

De acuerdo con la Organización para Cooperación Económica y Desarrollo (OCDE, en su acrónimo inglés), los ensayos de biodegradabilidad se dividen en tres categorías principales: pruebas de biodegradabilidad de respuesta inmediata, pruebas de biodegradabilidad inherente y pruebas de simulación (Pagga, 1997). Los ensayos para la biodegradabilidad de respuesta inmediata son las pruebas más rigurosas, permitiendo un período corto (días) de aclimatación del inóculo durante la duración del ensayo. En general, los ensayos para la biodegradabilidad de respuesta inmediata tienen una capacidad limitada para la predicción de una instalación de tratamiento biológico, en el cual puede tener lugar la aclimatación de los microorganismos al efluente, sobre todo en sistemas de tratamiento biológico modernos, que se basan en tecnologías donde la edad del fango es mucho más alta si se compara con procesos biológicos convencionales, como es el caso de biorreactores de membrana. En tal situación, de entre los ensayos de biodegradabilidad inherente el procedimiento de Zahn-Wellens (ZW) es el método más apropiado para la evaluación de la biodegradación de soluciones de contaminantes parcialmente fotodegradados. El inconveniente de este procedimiento es que tiene una larga duración que puede variar desde pocos días (es decir,

muestras de biodegradabilidad rápida), hasta 4 semanas, que es la duración de la prueba si la biodegradabilidad no se muestra antes, según el protocolo estándar.

Una técnica complementaria al procedimiento de ZW son los ensayos de toxicidad aguda, que ofrecen una respuesta rápida. Están disponibles diferentes ensayos de toxicidad aguda (Farré y Barceló, 2003), siendo los ensayos más habituales los que están basados en bacterias bioluminiscentes (*Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*) ya que pueden ser aplicados de forma fácil, con resultados inmediatos y poco costosos. Otra prueba interesante que relaciona de forma indirecta las pruebas de biodegradabilidad y los ensayos de toxicidad aguda son los ensayos respirométricos de respuesta rápida realizados con fangos activos (Amat y cols., 2009). Siendo una prueba rápida, la toxicidad aguda se puede evaluar regularmente durante el curso de los experimentos que se realizan para optimizar la estrategia de acoplamiento. Habitualmente, se debe muestrear a lo largo del experimento para observar el impacto del tratamiento oxidativo en el comportamiento toxicológico. La evolución de la toxicidad se considera como un indicador de una transformación molecular progresiva de la solución, pudiendo mantenerse en el mismo nivel, disminuir o aumentar mientras avanza el tratamiento. Así, siempre que se considere que la solución fototratada sufrió modificaciones sustanciales a nivel toxicológico debe realizarse un análisis de ZW. Este procedimiento es aplicable a cualquier punto donde la toxicidad sufre una variación sustancial (Lapertot y cols., 2008) y suele ayudar a que los puntos elegidos para el test de ZW den información útil.

Otro parámetro interesante que puede ayudar a decidir cuándo aplicar o no un biotratamiento (o qué muestra debe ser probada por ZW) es el Estado de Oxidación Medio (EOM), definido por la **ecuación 1.2**, la cual considera el COT (en mM de C) y la DQO (en mM de O₂) (Scott y Ollis, 1995). El valor del EOM varía entre +4 correspondiente al estado más oxidado del carbono (cuando todo el C está en forma de CO₂), y -4 que corresponde al estado más reducido del carbono (cuando se encuentra en forma de CH₄). Normalmente el EOM aumenta con el tiempo de tratamiento fotocatalítico hasta alcanzar un máximo a partir del cual permanece aproximadamente constante. A partir de ese momento, el estado de oxidación del carbono contenido en la mayoría de los intermedios generados no cambia sustancialmente, incluso aunque continúe el PAO. La formación de intermedios de reacción cada vez más oxidados demuestra indirectamente que el tratamiento es capaz de seguir mejorando la biodegradabilidad del agua, ya que los compuestos más oxidados suelen ser, generalmente, más biodegradables que los menos oxidados. Pero el momento en el que el EOM se estabiliza indica una oxidación muy avanzada de la mezcla de forma que si continúa el PAO conducirá únicamente a la mineralización total de la misma. Además, es necesario destacar que en el período en el que el EOM permanece constante, las velocidades de

degradación medidas a partir de la DQO y del COD suelen ser muy parecidas. Los cambios en el EOM se deben también tener en cuenta para determinar cuándo aplicar los ensayos de ZW:

$$EOM = \frac{4(COD - DQO)}{COD} \quad (1.2)$$

Como conclusión, la **figura 1.18** resume los procedimientos que han de seguirse para determinar la mejor estrategia de combinación entre PAO-BIO, es decir, determinar el punto óptimo de combinación entre un tratamiento de oxidación química mediante PAO con un tratamiento biológico. La estrategia de combinación entre estos procesos debe ser verificada experimentalmente a través del estudio del proceso cinético en planta piloto (paso iv). Seguidamente, el desarrollo de un modelo teórico en planta piloto con su respectivo análisis de coste (pasos v y vi) permitirá elegir las condiciones más favorables de operación y la estrategia de tratamiento posible (paso vii). Finalmente, después de que se hayan definido las variables anteriores se puede proceder al diseño final de la instalación de tratamiento (paso viii).

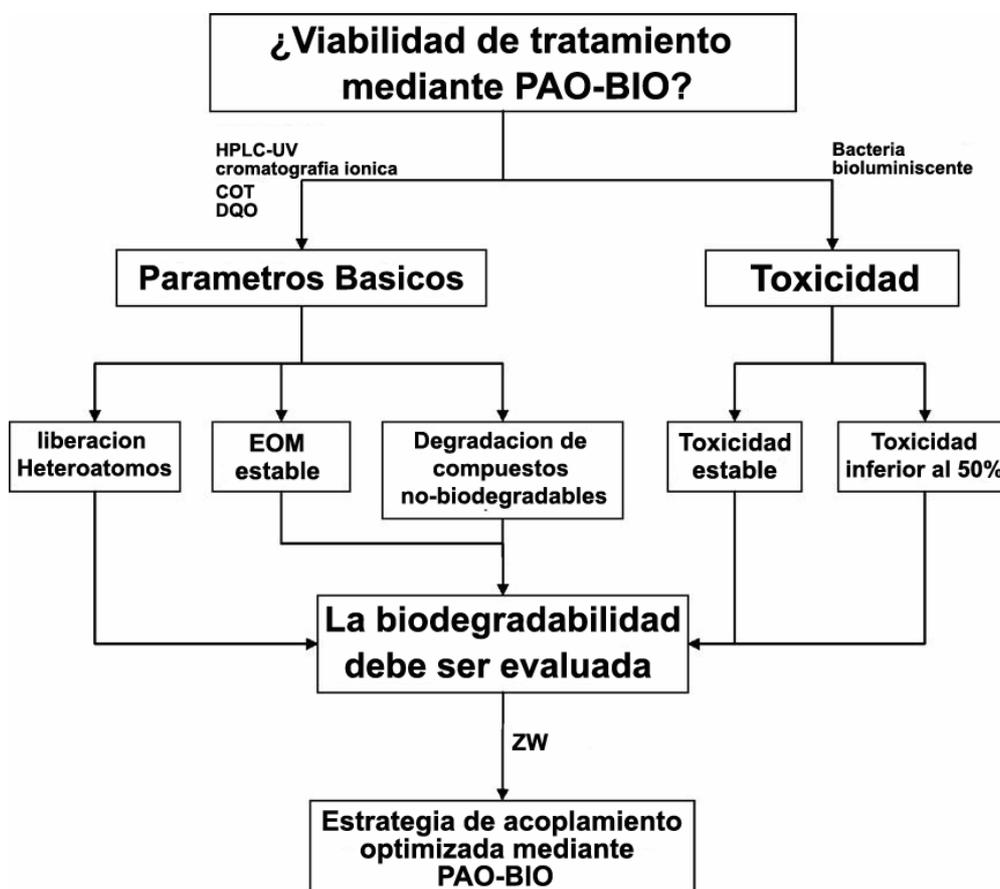


Figura 1.18 Diagrama de decisión para la determinación previa de los procedimientos que se deben aplicar para decidir una estrategia optimizada de acoplamiento mediante PAO-BIO.

Un importante campo de aplicación se abre en la actualidad al procedimiento de decisión anteriormente descrito ya que actualmente los PAO combinados a procesos biológicos están ganando importancia como sistema de tratamiento, de la mano del tratamiento de aguas residuales urbanas impuesta por la Directiva Europea 91/271/EEC. Esta normativa establece la obligatoriedad del tratamiento de todas las aguas residuales (generalmente realizada vía tratamiento biológico), en las poblaciones entre 2000 y 10000 habitantes en el 31 de diciembre de 2005. De la misma forma, aglomeraciones más pequeñas que ya cuenten con un sistema de alcantarillado deben también tener un sistema de tratamiento apropiado para la misma fecha (Directiva 98/15/EC, 2004). Esto significa que hoy en día, a condición de que se hayan aplicado las regulaciones, las plantas de PAO desarrolladas en la UE pueden verter aguas residuales pretratadas a sistemas de tratamiento biológico convencional cercanos a las mismas, y por tanto deben diseñarse con esta importante consideración.

1.5 Evaluación analítica de procesos de degradación: Identificación de productos de transformación (PT)

En los últimos años, se ha observado un creciente desarrollo en las técnicas de análisis de fármacos en aguas superficiales y/o aguas residuales (Fatta y cols., 2007; Hernando y cols., 2007). La sensibilidad de los métodos analíticos desarrollados ha permitido la determinación de muchos de esos compuestos a concentraciones muy bajas (niveles “sub” o ppb), permitiendo disponer de una valiosa información sobre la presencia de esos contaminantes desde un punto de vista medioambiental (Mompelat y cols., 2009; Gómez y cols., 2007; Farré y cols., 2008), como ya se ha comentado en el **apartado 1.2.1** de esta Memoria.

Sin embargo, desde un punto de vista analítico, la identificación de compuestos desconocidos, como son los PT generados en procesos de fototransformación y/o fotodegradación, presenta dificultades adicionales con respecto al análisis de compuestos objetivo, asociadas sobre todo a la gran cantidad de compuestos que pueden generarse, a las destacadas diferencias en sus características físico-químicas y al amplio rango de concentraciones al que son producidos.

Las diferencias de polaridad afectan principalmente a la extracción y a la separación cromatográfica. La ausencia de patrones para compuestos *a priori* desconocidos, impide la optimización de ambos procesos y por ello es recomendable emplear adsorbentes de amplio espectro y condiciones cromatográficas genéricas en la recuperación y detección de estos PT. Otro problema que se presenta a menudo en el análisis cromatográfico es que los PT generados a baja concentración y por tanto de escasa abundancia no son “visibles” por

observación directa de los cromatogramas de iones totales (TIC, en su acrónimo en inglés). Asimismo, en muchos casos los picos más intensos fácilmente observados pueden no corresponder con un solo compuesto, puesto que puede darse la formación de compuestos con estructuras relacionadas, que dan lugar a coeluciones que son difíciles resolver.

A pesar de las dificultades descritas anteriormente, los estudios de fotodegradación también presentan ventajas, como el hecho de que todos los PT proceden de una estructura común. Así, se parte de una composición elemental conocida que puede generar información valiosa a la hora de interpretar los espectros de masas de los PT, como la presencia de átomos con patrones isotópicos característicos o la presencia de fragmentos comunes, pertenecientes a una fracción de la molécula compartida por la molécula precursora y sus derivados (García-Reyes y cols., 2007). Por otra parte, el conocimiento previo acerca de las reacciones que tienen lugar durante los procesos de fotólisis, fotocátalisis y biodegradación puede ayudar a predecir los posibles PT que se pueden originar en cada situación.

Considerando los aspectos anteriores, la identificación de productos de degradación requiere el uso de técnicas analíticas o combinaciones de éstas, que sean capaces de: (i) proporcionar una alta sensibilidad en modo de barrido completo de iones o *full scan*; (ii) proporcionar información estructural altamente específica y abundante y (iii) no presentar restricciones en cuanto al tipo y la cantidad de compuestos que se pueden analizar de forma simultánea.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS) satisface todos los requisitos anteriormente expuestos y ha demostrado ser una técnica analítica extremadamente valiosa para la identificación de compuestos desconocidos (Gómez y cols., 2008). Cuando sea posible, la combinación de LC-TOF-MS con otras técnicas complementarias, como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), también ha sido empleada con éxito con este fin (Agüera y cols., 2005).

El empleo de la espectrometría de masas en tándem, MS/MS o MS³, con analizador de triple cuadrupolo (QqQ-MS) o de trampa de iones (TRAP-MS), o el uso de sistemas híbridos más modernos como el cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqTOF) o cuadrupolo-trampa de iones lineal (QTRAP-MS), también proporcionan información estructural adicional útil para la confirmación de estructuras de compuestos desconocidos (Siemer y cols., 2004). Recientemente, se ha publicado una revisión sobre la aplicación de estas técnicas a la identificación de fotoproductos de compuestos farmacéuticos (Petrovic y Barceló, 2007). A

continuación, en el **epígrafe 1.5.3** se hará una descripción sucinta de las principales técnicas analíticas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

1.5.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

En el año 2002 la Real Academia de Ciencias Sueca galardonó con el Premio Nobel de Química a los científicos John B. Fenn, Koichi Tanaka y Kurt Wiithrich por su exitoso trabajo en el desarrollo de métodos analíticos para la identificación y análisis estructural de macromoléculas biológicas a través de técnicas de ionización “blanda”, como la ionización por *electrospray* (ESI) y desorción por *soft-laser*, descubiertas por estos científicos.

No obstante, antes de tal hecho la combinación entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas ya era una temática de investigación en notable expansión. Diversos tipos de interfaces se han desarrollado para LC-MS, incluyendo fuentes de bombardeo atómico rápido (FAB, en su acrónimo en inglés) y *thermospray* (TSP). Sin embargo, una aceptación amplia de la LC-MS sólo ocurrió con el advenimiento de nuevos métodos de ionización tales como la ESI. Desde entonces, la LC-MS tiene un papel fundamental en la identificación y el análisis de fármacos tanto en el proceso de producción como en su determinación en ecosistemas naturales. Además de los nuevos métodos de ionización, la fuerza impulsora del éxito de la LC/MS se debe a su flexibilidad en diseños experimentales, su extraordinaria capacidad para generar información cualitativa y cuantitativa, así como la confiabilidad y la asequibilidad de los sistemas comerciales actualmente disponibles en el mercado.

Es notable la diversidad en la instrumentación y usos de la LC-MS para el análisis de muestras de interés medioambiental. Como se puede observar en la **tabla 1.12**, los sistemas de LC-MS permiten una identificación fiable de muchos fármacos a través del uso de técnicas apropiadas de ionización y de detección. Algunos de los trabajos más recientes de identificación y cuantificación de estas sustancias mediante LC-MS en muestras tales como influentes y efluentes de EDAR y aguas superficiales son descritos a continuación.

Tabla 1.12 Determinación de fármacos mediante LC-MS.

Fármacos	Matriz	Concentración (ng L ⁻¹)	Técnica	Referencias
Antiinflamatorios/analgésicos				
Ibuprofeno	Influente	<760-3204	LC-MS/MS	Lacey, 2008
	Aguas superficiales	42	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Influente	20	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	20	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	370	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Aguas superficiales	0,358*	LC-MS/MS	Marchese, 2003
	Aguas	0,751*	LC-QqTOF	Marchese, 2003

Acetaminofen	superficiales			
	Efluente	42-10639	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
	Aguas	40	LC-MS/MS	Gros, 2006
Ketoprofeno	superficiales			
	Influente	58	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	58	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Aguas	70	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influente	73	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	95	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	200	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Aguas	0,211*	LC-MS/MS	Marchese, 2003
Naproxeno	superficiales			
	Aguas	0,63*	LC-QqTOF	Marchese, 2003
	superficiales			
	Efluente	225-954	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
	Aguas	20	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influente	32	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	32	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	300	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Aguas	0,234*	LC-MS/MS	Marchese, 2003
Propifenazona	superficiales			
	Aguas	0,468*	LC-QqTOF	Marchese, 2003
	superficiales			
	Efluente	359-4200	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
	Aguas	23	LC-MS/MS	Gros, 2006
Diclofenaco	superficiales			
	Influente	9	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	30	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	<743-<2478	LC-MS/MS	Lacey, 2008
	Aguas	5	LC-MS/MS	Gros, 2006
Indometacin	superficiales			
	Influente	30	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	30	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	810	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Aguas	0,115*	LC-MS/MS	Marchese, 2003
	superficiales			
	Aguas	0,574*	LC-QqTOF	Marchese, 2003
	superficiales			
Efluente	6-5922	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007	
Aguas	20	LC-MS/MS	Gros, 2006	
Ácido mefenámico	superficiales			
	Influente	20	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	20	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	30-3819	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
	Aguas	540-1050	LC-MS/MS	Lacey, 2008
4-MAA (metabolito activo dipirona)	superficiales			
	Influente	20	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	26	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	9-9253	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Betabloqueantes				
Propranolol	Influente	17	LC-MS/MS	Nikolai, 2006
	Efluente	4,4	LC-MS/MS	Nikolai, 2006
	Influente	92	LC-MS/MS	Piram, 2007
	Efluente	2	LC-MS/MS	Piram, 2007
	Aguas	7	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influente	20	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	40	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	170	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Efluente	16-100	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Metoprolol	Influente	42	LC-MS/MS	Nikolai, 2006
	Efluente	17	LC-MS/MS	Nikolai, 2006
	Influente	111	LC-MS/MS	Piram, 2007
	Efluente	1	LC-MS/MS	Piram, 2007
	Aguas	12	LC-MS/MS	Gros, 2006

	superficiales			
	Influyente	30	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	36	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	730	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Efluente	18-154	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Atenolol	Influyente	110	LC-MS/MS	Nikolai, 2006
	Efluente	12	LC-MS/MS	Nikolai, 2006
	Influyente	170	LC-MS/MS	Piram, 2007
	Efluente	1,8	LC-MS/MS	Piram, 2007
	Aguas	30	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influyente	40	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	141	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	275-4850	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Antiepiléptico				
Carbamazepina	Efluente	163-881	LC-MS/MS	Lacey, 2008
	Aguas	10	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influyente	40	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	61	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	2100	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Efluente	69-273	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Reguladores del colesterol				
Gemfibrozil	Influyente	<26-<86	LC-MS/MS	Lacey, 2008
	Efluente	<32-330	LC-ESI-MS/MS	Lacey, 2008
	Aguas	3	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influyente	3	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	9	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	400	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Efluente	2-28571	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Hormonas				
Estrona	Efluente	1	LC-MS/MS	Ternes, 2001
Antibióticos				
Sulfametoxazole	Efluente	<116-<553	LC-MS/MS	Lacey, 2008
	Aguas	16	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influyente	60	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	120	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	400	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Efluente	91-794	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Trimetoprim	Influyente	<171-<57	LC-MS/MS	Lacey, 2008
	Efluente	<67-36	LC-ESI-MS/MS	Lacey, 2008
	Aguas	4	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influyente	40	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	82	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	320	LC-MS/MS	Ternes, 2001
	Efluente	99-1264	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Ofloxacino	Aguas	56	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influyente	110	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	110	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	217-13426	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Azitromicina	Aguas	3	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influyente	10	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	23	LC-MS/MS	Gros, 2006
Eritromicina	Aguas	14	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influyente	20	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	20	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	106-973	LC-QTRAP-MS/MS	Martinez Bueno, 2007
Contrastes de radiología				
Iomeprol	Efluente	370	LC-MS/MS	Ternes, 2001
Metabolitos				
Acido clofíbrico	Influyente	<222-<740	LC-MS/MS	Lacey, 2008
	Aguas	3	LC-MS/MS	Gros, 2006
	superficiales			
	Influyente	6	LC-MS/MS	Gros, 2006

	Efluente	6	LC-MS/MS	Gros, 2006
	Efluente	370	LC-MS/MS	Ternes, 2001
Ácido salicílico	Influente	351-9172	LC-MS/MS	Lacey, 2008
	Efluente	<115	LC-MS/MS	Lacey, 2008
4-Formilaminoantipirina	Efluente	40-10114	LC-QTRAP-MS/MS	Martínez Bueno, 2007
4-Acetilaminoantipirina	Efluente	2109-25030	LC-QTRAP-MS/MS	Martínez Bueno, 2007
Otros				
cafeína	Efluente	262-24658	LC-QTRAP-MS/MS	Martínez Bueno, 2007

* Límite de detección

Diversos analizadores de masa pueden imponer requisitos técnicos únicos cuando están acoplados a la LC. En este contexto, la comprensión de los principios de funcionamiento y las propiedades técnicas de las interfaces en LC-MS y de los analizadores de masa es fundamental.

Particularmente, la LC-MS tiene una amplia gama de usos en la industria farmacéutica, donde la cuantificación y la caracterización estructural de compuestos inestables e hidrofílicos es rutinaria y requiere, por ejemplo, pruebas y caracterizaciones estructurales de los compuestos o estudios cinéticos y de impurezas, entre otras.

En lo que se refiere a las técnicas de detección, a continuación se comentan brevemente las características de los diversos analizadores que están disponibles actualmente en el mercado y que son ampliamente empleados en la identificación y cuantificación de los compuestos estándar y, en particular, para el análisis de los PT.

1.5.2 Técnicas e instrumentación

En los últimos 15 años, los esfuerzos de los investigadores en el campo de la LC-MS han cambiado considerablemente. En los primeros años, la mayor parte de la atención se centró en resolver los problemas con las interfaces y en el desarrollo de nuevas tecnologías. Sin embargo, hoy en día la mayoría de los avances se centran en las aplicaciones con los equipos comercialmente disponibles. Las nuevas interfaces a presión atmosférica han sido la clave de este desarrollo.

Una interfaz ideal de LC/MS debe tener las siguientes características: (i) permitir una transferencia eficiente y exacta de la muestra del LC al MS con poca destrucción o pérdida de analitos; (ii) permitir una amplia posibilidad de métodos de LC y de condiciones de funcionamiento del MS; (iii) garantizar la integridad del análisis cromatográfico con el mínimo ensanchamiento de los picos; (iv) proporcionar velocidad y confiabilidad; (v) requerir mínimo mantenimiento y entrenamiento para operar los equipos.

En este contexto, muchas interfaces se han desarrollado para hacer frente a estos desafíos. Algunos de los métodos de acoplamiento, tales como el *moving belt* o *Particle Beam Interface* (PB), se basan en la eliminación concomitante del solvente antes de que éste entre en el espectrómetro de masas. Otros métodos tales como la introducción líquida directa (DLI) o flujo continuo FAB, fraccionan el flujo del líquido que se introduce en la interfaz para obtener un flujo que se pueda infundir directamente en la fuente de ionización. Sin embargo, estos tipos de interfaces pueden manejar solamente una fracción del flujo líquido de la LC. Un cierto número de interfaces tales como ionización química a presión atmosférica (APCI), *electrospray* (ESI) y *thermospray* (TSP) pueden tolerar flujos mucho más altos sin requerir que el flujo esté partido en el extremo de la columna del análisis cromatográfico. Los iones que se producen en fuentes de ionización a presión atmosférica se trasladan directamente al espectrómetro de masas. Las tres técnicas están basadas en la formación de aerosoles.

A continuación se realizará una breve descripción en la cual se presenta el desarrollo de las diversas interfaces en LC/MS. Sin embargo, no se espera efectuar una presentación exhaustiva de los principios de funcionamiento de estas interfaces ya que estudios excelentes de estas técnicas se pueden encontrar en artículos publicados por Niessen y cols. (Niessen y cols., 1991; Niessen y Tinke, 1995; Niessen, 1998).

I. Acoplamiento *moving belt*: La interfaz denominada *moving wire* fue desarrollada por Scott y cols (1974) y la interfaz *moving belt* fue desarrollada poco después por McFadden y cols. (1976). Ésta fue la primera interfaz comercial para LC/MS, introducida en el mercado en 1977. En ambas técnicas, el eluyente se deposita sobre un alambre de acero inoxidable, o una placa hecha generalmente de poliimida (conocida como "Kapton"), eliminándose seguidamente el solvente mediante vacío. El analito sólido residual se vaporiza en la fuente de ionización. La eliminación de los solventes se obtiene generalmente pasando una corriente eléctrica a través del alambre.

El dispositivo móvil del alambre presenta algunas desventajas importantes. Debido a la pequeña superficie del alambre inoxidable (aproximadamente 0.1 milímetros de diámetro), el dispositivo puede acomodar solamente alrededor de 10 pL min⁻¹ de eluyente, lo que da lugar a una escasa sensibilidad. El sistema es difícil de operar en modo continuo. El desarrollo de esta tecnología ha llevado a la invención de una interfaz conocida como *continuous moving belt*, la cual ofrece mayor eficacia y por tanto una sensibilidad y transferencia mejoradas. Esta interfaz es capaz de manejar hasta mLmin⁻¹ de fase móvil y, una de sus principales ventajas es su capacidad de ionizar el analito sólido usando la ionización electrónica (EI) o la ionización química (CI). Además de la EI y CI, se ha observado que la ionización directa FAB habitualmente presenta la masa molecular relativa y los iones fragmento.

II. Introducción líquida directa (DLI): La interfaz DLI se convirtió en 1981 en la segunda interfaz disponible comercialmente para sistemas de LC/MS. En este caso, el eluyente líquido se introduce en la fuente de iones a través de un capilar o de un diafragma por medio de un orificio. Como el nombre indica, en la DLI se introduce directamente el analito de la solución a la fuente del MS. En ese caso, se da a la solución suficiente energía que permite ionizar los iones preformados en la solución tales como moléculas protonadas, moléculas deprotonadas, moléculas ionizadas e iones solvatados, los cuales pueden ser desorbidos en el espectrómetro de masas mientras que el solvente es vaporizado y eliminado por el sistema de vacío.

Los índices de corriente máximos compatibles con las interfaces DLI están en el rango de 50 a 100 pL min⁻¹. Las columnas Microbore (<1 mm) que trabajan desde 5 hasta 100 pL min⁻¹ se adaptan idealmente a este sistema. Se requiere un divisor de flujo para acoplar un LC convencional con una interfaz de DLI ya que se introduce solamente una fracción del eluyente total en el espectrómetro de masas. Partir el flujo fuera del espectrómetro de masas da lugar a una consecuencia indeseable: la pérdida de sensibilidad. Este inconveniente puede ser minimizado al incorporar el divisor de flujo en la cámara de desolvatación del espectrómetro de masas. La eliminación del solvente es alcanzada convirtiéndose el vapor generado por el solvente sin pérdida de muestra y, por lo tanto, de sensibilidad. Así se evita el exceso de presión dentro del espectrómetro de masas mientras que índices de corriente más altos pueden ser utilizados.

III. Thermospray (TSP): El TSP es una interfaz capaz de eliminar con eficacia el solvente de la muestra (fase móvil) a través de un vaporizador capilar a elevada temperatura. Esta interfaz se adapta fácilmente a los eluyentes utilizados en LC de fase reversa, los cuales presentan flujos convencionales entre 0.5 y 2.0 mL min⁻¹ y una alta sensibilidad (niveles de picogramas). Un TSP básico se compone de un vaporizador de alta temperatura que se interconecta a una cámara de desolvatación, y de un filtro extractor de iones. Cuando se bombea una muestra en un capilar inoxidable a elevada temperatura tiene lugar una rápida evaporación del solvente, dando como resultado un aerosol cargado de pequeñas gotas. La desintegración de las gotas cargadas ocurre debido a la evaporación continuada del solvente y por la repulsión Coulombica entre las cargas. Eventualmente, el proceso genera iones y/o moléculas neutras, los cuales son llevadas a la superficie de las microgotas. Los iones son extraídos y acelerados hacia el analizador por un sistema de voltaje electrostático. Por lo tanto, el TSP es una interfaz y una fuente de iones, que hace innecesaria una fuente de ionización.

Los iones en el proceso TSP también se pueden producir en dos etapas, de forma similar a la CI convencional. Los iones reactivos (por ejemplo, NH_4^+ , forman electrólitos tales como el acetato de amonio), los cuales reaccionan con las moléculas del analito en fase gaseosa para generar los iones positivos del analito. Este proceso puede también ser utilizado para generar los iones negativos del analito.

La interfaz TSP fue muy popular y atractiva en los años 80, como resultado de su comodidad de uso y funcionamiento confiable. Los sistemas comerciales de LC/MS con TSP están equipados con un filamento emisor de electrones para aumentar el proceso de CI. Además, este tipo de sistema TSP puede ser operado en tres modos distintos: (a) modo de ionización TSP, (b) modo filamento-*on*, y (c) modo de ionización por descarga.

IV. FAB de flujo continuo: El principio del FAB es muy similar a la espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS, en su acrónimo en inglés). Sin embargo, el FAB utiliza una matriz líquida, tal como glicerol, en el cual se disuelve la muestra. Se utiliza la matriz para aumentar la sensibilidad y la estabilidad de la corriente de iones. Barber y cols. introdujeron el FAB en 1981 (Barber y cols., 1981). En esta técnica, el bombardeo de una superficie líquida por un haz de átomos con alta energía tales como xenón o argón, causa la desorción continua de los iones característicos de este líquido. En un espectro típico de FAB, el ion del analito se forma generalmente como iones protonados o cationizados en modo FAB positivo y deprotonados en modo FAB negativo. También puede que se formen algunos pocos iones fragmento. Generalmente el espectro contiene picos de la matriz, tal como *clusters* protonados de glicerol, cuando se utiliza éste como solvente, habitualmente para aumentar la sensibilidad y la estabilidad de la corriente del iones. La interfaz FAB de uso más general en LC/MS es la conocida FAB de flujo continuo (CF-FAB, en su acrónimo en inglés), en la cual átomos o iones con elevada energía se dirigen en un blanco a lo largo de la cual la matriz líquida puede ser añadida al eluyente de la columna, pre- o post-columna, y el flujo pasa continuamente por la fuente del espectrómetro de masas donde es bombardeado con el flujo de iones. El flujo máximo está comprendido en el rango entre 5 y 15 $\mu\text{L min}^{-1}$. Un estudio completo de los principios y del uso del CF-FAB para LC/MS ha sido elaborado por Caprioli (1990).

V. Particle Beam Interface (PB): La interfaz PB es un dispositivo capaz de separar el solvente del soluto sin generar pérdidas del mismo (soluto). El desarrollo de esta interfaz se basó en el trabajo de Browner y cols. (Willoughby y cols., 1984; Winkler y cols., 1988). El eluyente de la LC pasa a través de un nebulizador y se convierte en un aerosol con alta velocidad. El nebulizador está asistido neumáticamente, o termicamente. Los solventes comienzan a evaporarse y el soluto comienza a concentrarse. Cuando las pequeñas gotas

líquidas salen de la cámara calentadora, éstas son conducidas como un haz de partículas con alta energía hasta la cámara de ionización. En verdad, la PB sólo es una técnica de introducción de la muestra donde la ionización es efectuada posteriormente por EI o por CI.

VI. Electrospray (ESI): La ESI se ha convertido en la interfaz de uso más general en LC/MS en la actualidad. Esta interfaz fue desarrollada por Fenn y cols. (1985). La ESI es un método continuo de ionización que es particularmente útil para el uso como interfaz con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, en su acrónimo en inglés). Además, se considera la ESI como una técnica de ionización blanda, la cual permite la determinación de pesos moleculares de una gran variedad de analitos.

En la ESI la muestra es disuelta en la fase móvil, mezclando una parte de agua y otra de acetonitrilo o metanol, y es bombeada a través de un fino capilar de acero inoxidable. La punta del capilar está a presión atmosférica dentro de la primera región del espectrómetro y se le aplica un alto potencial (del orden de 3 a 4 kV) con respecto a un contra electrodo (que trabaja a un potencial cercano a 0 V). La gran diferencia de potencial crea un spray electrostático de múltiples gotitas cargadas conteniendo la muestra. El proceso de formación del spray es asistido por una corriente de nitrógeno gaseoso (conocido como gas nebulizador) que fluye a través de un tubo coaxial al capilar de acero inoxidable. A menudo se refiere esta técnica como ESI asistido neumáticamente o *ionspray*. El spray es dirigido hacia una corriente de nitrógeno gas caliente (gas cortina secante, que tiene la función de acelerar la desolvatación de las moléculas de la muestra), a través de una serie de cámaras mantenidas a un vacío creciente. Después de la desolvatación, que origina la pérdida de moléculas de solvente-fase móvil con la subsiguiente concentración de cargas, se producen los iones en fase gas, por un fenómeno de repulsión de cargas (explosión coulombica) y son llevados hacia la región de alto vacío del analizador de masas.

La técnica *electrospray* es considerada una técnica de ionización blanda, ya que muy poca energía es transferida a la molécula que la requerida para producir la ionización. Así se generan compuestos protonados, desprotonados o moléculas catiónicas que sufren muy poca fragmentación, incluso aunque provengan de sustancias termolábiles muy polares. Los iones generados de grandes moléculas (por ejemplo >1000-2000 Da) son con frecuencia múltiplemente cargados, produciendo un espectro de masas complejo que refleja el desarrollo de los diferentes estados de carga. Éste puede ser matemáticamente transformado en un espectro de masas sencillo que revela los pesos moleculares de los analitos.

La fragmentación puede inducirse, bajo ciertas condiciones, mediante la imposición de un pequeño voltaje de aceleración a las moléculas cargadas en la región a presión atmosférica entre el capilar y el cono de muestra. La disociación ocurre como resultado de una activación por colisiones en la región todavía rica en partículas. Esta técnica es conocida como disociación inducida por voltaje en cono o disociación en fuente (*insource dissociation*). Cabe destacar algunos excelentes estudios realizados sobre el mecanismo de ionización en ESI (Bruins, 1998; Niessen, 1999).

VII. Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI): La APCI es una técnica de ionización en la que los iones son producidos a presión atmosférica, donde el efluente líquido se introduce en la fuente a través de una interfaz muy similar a la utilizada en ESI. La diferencia consiste en que el líquido procedente del sistema cromatográfico pasa a través de un vaporizador calentado que facilita la rápida desolvatación/vaporización de las gotas. Las moléculas de analito y disolvente atraviesan una región donde mediante descarga en corona se favorecen las reacciones ión-molécula entre el analito y los iones formados desde el disolvente en fase vapor a presión atmosférica, con un alto grado de eficiencia. La protonación ($[M+H]^+$) se produce en el modo positivo de APCI y la transferencia electrónica ($M-H^-$) en el modo negativo de APCI.

Así, la ionización a presión atmosférica (API), y por lo tanto la ESI y la APCI, son técnicas de ionización blandas que, actuando a presión atmosférica y no a alto vacío como es habitual en otras técnicas, obtienen un alto rendimiento de producción de iones. Su eficacia es muy superior a la obtenida mediante TSP o PB, y es una técnica versátil y robusta, por lo que estas interfaces se han convertido en las más ampliamente utilizadas en diversas áreas.

Tanto la ESI como la APCI se aplican en el análisis de una amplia gama de compuestos y problemas, incluyendo especies no volátiles, térmicamente lábiles y/o polares. Además, ambas proporcionan una alta sensibilidad, lo que es esencial para el análisis medioambiental, donde la mayoría de las veces los contaminantes están a niveles trazas ($ng\ L^{-1}$ o $\mu g\ L^{-1}$). Una representación esquemática simplificada de estas dos interfases puede ser vista en la **figura 1.19**. La ESI es una técnica particularmente más conveniente para el análisis de compuestos polares, mientras que APCI es muy efectiva en el análisis de sustancias de polaridad media o de baja polaridad. En el análisis de fármacos, las técnicas LC/MS y LC-MS/MS con ESI, han sido las más empleadas frente a la APCI, obteniéndose en la mayoría de los casos mejores límites de detección. No obstante, la APCI es un valioso complemento a ESI, ya que tolera mayores valores de flujo y permite el análisis de moléculas de baja polaridad, además de ser menos susceptible a las interferencias de la matriz.

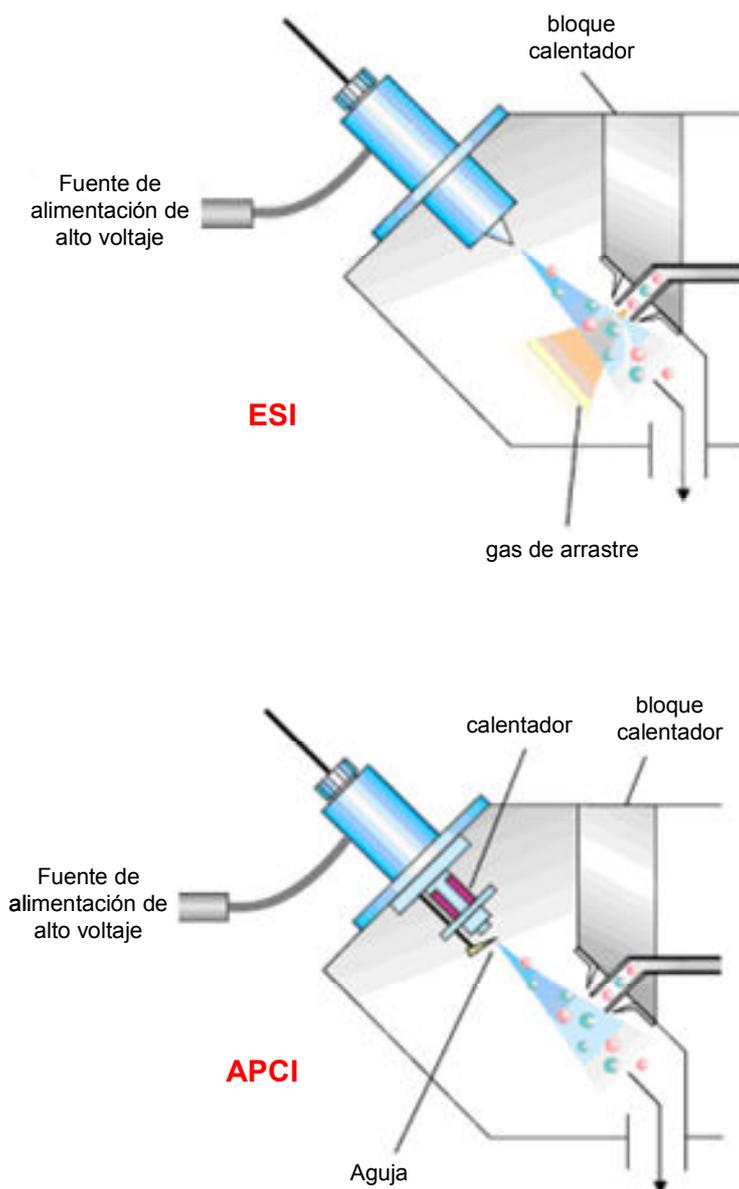


Figura 1.19 Representación ilustrativa de las técnicas de ESI y APCI.

En muchos instrumentos de LC-MS es muy fácil el intercambio entre las técnicas de ESI y APCI, y otros disponen de una fuente multimodo para la detección simultánea ESI y APCI con posibilidad de doble polaridad +/- y/o modo individual. Esto es muy útil para el desarrollo de métodos y análisis de muestras complejas que requieren tanto ESI como APCI. Además ambas interfaces pueden trabajar tanto en modo positivo como negativo. La selección de uno u otro modo de trabajo puede tener un fuerte impacto en la intensidad de la señal, la formación de aductos o el ruido químico encontrado.

Recientemente se han utilizado otros tipos de interfaces que expanden el rango de aplicación de la LC a compuestos menos polares, como la foto ionización a presión

atmosférica (APPI), la electroquímica con ESI o captura de ionización electrónica con APCI. Estos diferentes modos de ionización son descritos con detalle por Hayen y Karst (2003).

En la **figura 1.20** se demuestra la aplicabilidad relativa de las diferentes técnicas de ionización en función del peso molecular y la polaridad de los analitos. Como se observa, la técnica de ionización ESI es la más suave e ideal para compuestos lábiles. También ésta es la interfaz con mayor aplicabilidad y sensibilidad, indicada para compuestos de baja-media a muy alta polaridad que se pueden ionizar en solución y mediante la formación de iones con múltiples cargas, permite el análisis de compuestos de muy elevado peso molecular. Por otro lado, la APCI es válida para compuestos de baja a alta polaridad y requiere compuestos con una cierta volatilidad. Además presenta una buena sensibilidad para compuestos de polaridad y peso molecular intermedios. Finalmente, la APPI, como la APCI, es una técnica indicada para compuestos de muy baja a alta polaridad y requiere compuestos con una cierta volatilidad y posibilita el análisis de compuestos apolares.

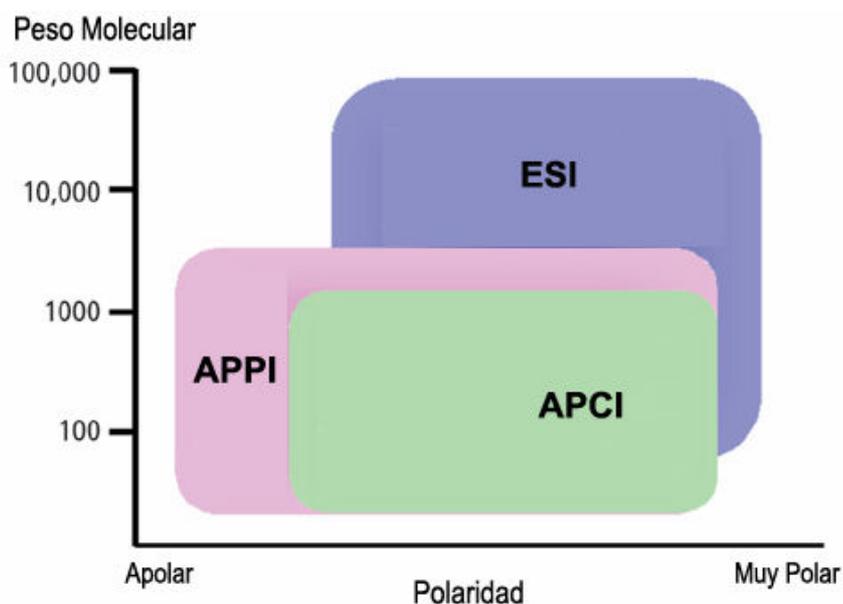


Figura 1.20 Aplicabilidad relativa de las técnicas de ionización de LC-MS.

Hay que tener en cuenta que, además del desarrollo de estas interfaces, se han producido otras mejoras técnicas. Así, la introducción del flujo de iones de forma no axial, implica una disminución en la cantidad de matriz que pasa al sistema, mejorando el rango lineal, disminuyendo las interferencias de matriz en la ionización y evitándose los problemas de obturación, lo que ha permitido sistemas más robustos (Niessen, 2003).

1.5.3 Analizadores para LC-MS

Los iones generados mediante las técnicas de ionización más ampliamente utilizadas, ESI o APCI, son guiados hacia el espectrómetro de masas y separados por su relación masa/carga (m/z) creando el espectro de masas. El espectro de masas es una representación gráfica de la intensidad en función de la relación m/z . El pico con mayor intensidad en el espectro es llamado pico base, y es casi siempre la molécula protonada en ionización positiva o la molécula desprotonada en ionización negativa. Generalmente, el espectro se normaliza a la intensidad del pico base, dando como resultado intensidades relativas. El espectro de masas nos proporciona el peso molecular e información estructural de los analitos.

Habitualmente en LC/MS se utiliza una técnica de fragmentación de baja energía denominada disociación por colisión inducida (CID). Por esta razón, casi siempre el ión molecular es el pico base. Normalmente, el incremento del voltaje de fragmentación en la fuente conlleva un aumento en la fragmentación mediante CID, llegando incluso a la destrucción parcial o total del protón o de los aductos formados (Thurman y cols., 2005).

Una forma alternativa de aumentar la fragmentación en LC-MS es mediante el empleo de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), posible con el uso de analizadores de trampa de iones o sistemas híbridos, como el triple cuadrupolo. Se basa en un fenómeno de CID producido en la trampa o en la celda de colisión de un instrumento de MS/MS. Los iones se aceleran para incrementar su energía cinética y se hacen interaccionar con el gas de colisión, He, Ar o N₂.

La masa molecular es una de las informaciones más valiosas que puede proporcionar un espectro de masas. Sin embargo, identificar la masa molecular con certeza puede no ser sencillo en algunos casos, debido a los aductos que se pueden formar entre el amonio, el sodio y dímeros de la molécula. Los iones positivos se forman por la adición de un protón $[M+1]^+$, de un ión amonio $[M+18]^+$, o sodio $[M+23]^+$. Estos iones se forman frecuentemente en modo positivo. La adición de un protón o de un ión amonio es el resultado de la fase móvil (formiato amónico, por ejemplo). El sodio puede estar tanto en la fase móvil, en el estándar o en la muestra que se va a analizar. Los iones negativos se forman por la eliminación de un protón de la molécula y generalmente no se forman aductos. La fragmentación en modo negativo es normalmente menor que en modo positivo, porque hay menos posibilidades de fragmentar una molécula para quitarle un protón que para añadirsele.

Como ya se ha mencionado anteriormente, diferentes analizadores pueden ser acoplados a sistemas de LC. Los analizadores de uso más general incluyen los de sector (magnéticos y electrostáticos), cuadrupolos (cuadrupolo sencillo o triple cuadrupolo), trampa de iones, tiempo-de-vuelo y de transformada de Fourier. La separación de iones se puede alcanzar en una dimensión temporal o espacial. Algunos analizadores permiten la detección simultánea de todos los iones, tales como el de transformada de Fourier. Otros espectrómetros de masas, por ejemplo cuadrupolos, actúan como filtros de masa donde solamente los iones con un específico coeficiente masa/carga pueden ser detectados. En el analizador de tiempo-de-vuelo los iones son producidos de forma simultánea y son acelerados con la misma energía cinética antes de que sean separados en el tubo del vuelo. Sin embargo, puesto que la ionización es una operación en que se genera una corriente continua de iones, generalmente los iones son introducidos ortogonalmente en el analizador antes de que éstos sean acelerados hacia el tubo de vuelo mediante un pulso eléctrico.

El tipo de analizador determina en gran parte la información obtenida en cada situación, y en qué medida esa información puede convertirse en conocimiento. Se evalúa el funcionamiento de un analizador por su capacidad para resolver iones “vecinos”, exactitud de masa, límite superior de masa y eficacia de transmisión. Un resumen que compara las ventajas y las desventajas de diversos analizadores está expreso en la **tabla 1.13** (Zhou, 2005).

Tabla 1.13 Ventajas y desventajas de los analizadores de masa.

Analizador	Ventajas	Desventajas
Sector	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada resolución y medidas de masa exacta, generación de la composición elemental; - alta energía CID MS/MS para generar información subestructural; - rango de masa superior a 20000. 	<ul style="list-style-type: none"> - El sistema es costoso y complejo; - baja sensibilidad; - baja velocidad de barrido; - para el acoplamiento al LC se necesita auxilio técnico.
Cuadrupolo	<ul style="list-style-type: none"> - La energía y la distribución espacial de iones producidos en la fuente no es crítica; - bajo coste y fácil acoplamiento a la LC; - experimentos en tándem disponibles en triple cuadrupolo o los sistemas de Q-TOF para la información de la subestructura y/o análisis cuantitativo; - las demandas de sistema de vacío son mínimas. 	<ul style="list-style-type: none"> - baja resolución y medida de masa exacta, excepto en el caso de los sistemas Q-TOF; - rango de masa limitado a aproximadamente 4000. -

Trampa de Iones	<ul style="list-style-type: none"> - La energía y la distribución espacial de los iones producidos en la fuente no es crítica; - utiliza la ventaja inherente del tándem para generar información subestructural; - bajo coste y de fácil acople a la LC; - las demandas de sistema de vacío son mínimas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja resolución y medida de masa exacta.
Transformada de Fourier	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada resolución y alta resolución de masa, la composición elemental puede ser obtenida; - utiliza la ventaja inherente del tándem para generar información subestructural; - el análisis de masa no es destructivo; - alta sensibilidad; - rango de masa superior a 20000; - rápida velocidad de barrido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto precio de compra y alto coste de mantenimiento; - los requisitos de vacío son exigentes y el acoplamiento al LC es difícil; - los datos requieren un rápido procesamiento computacional.
Tiempo-de-vuelo	<ul style="list-style-type: none"> - Alta resolución y medidas de masa exacta cuando operado en modo <i>reflectron</i> o para sistemas Q-TOF, la composición elemental puede ser obtenida; - experimentos en tándem pueden ofrecer información de la subestructura o relacionada con el análisis cuantitativo; - elevada sensibilidad; - alta velocidad de barrido; - rango de masa ilimitado. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se deben corregir la energía inicial y la distribución espacial para los iones; - necesita un alto rendimiento electrónico.

Los instrumentos que combinan varios analizadores en orden secuencial son muy comunes. Esta combinación permite la espectrometría de masa y los experimentos de MS/MS. Un equipo moderno de MS/MS incluye muy diversos experimentos diseñados para generar información subestructural o para cuantificar compuestos a niveles de traza.

Un análisis más completo de los principios de estos analizadores puede ser encontrado, por ejemplo, en una magnífica revisión del tema elaborada por Niessen (1999b). A continuación, se detalla una breve descripción de los principios de funcionamiento de analizadores de uso más habitual en sistemas de LC/MS.

I. Analizadores de sector magnético: En los analizadores de sector magnético el campo magnético ejerce una fuerza perpendicular al movimiento del ion para desviar los iones de acuerdo a su momento. Estos analizadores utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que el haz procedente de la fuente de iones se desplace con una trayectoria circular, también denominados de enfoque simple. Por otra parte, en los analizadores de sector eléctrico el campo eléctrico ejerce una fuerza perpendicular al movimiento del ion para desviar los iones de acuerdo a su energía cinética. Al salir de la cámara de ionización, los iones tienen velocidades diferentes. Para obtener una mejor resolución es necesario adicionar un sector eléctrico que colime o reúna los iones de acuerdo con su energía cinética. Las principales ventajas de este tipo de analizador es que presenta una excelente resolución y exactitud de masa y alta sensibilidad. Las principales desventajas asociadas a este analizador son su alto costo y una adquisición espectral lenta, lo que conlleva tiempos de análisis largos. A continuación, en la **figura 1.21** se representa esquemáticamente un analizador de sector magnético.

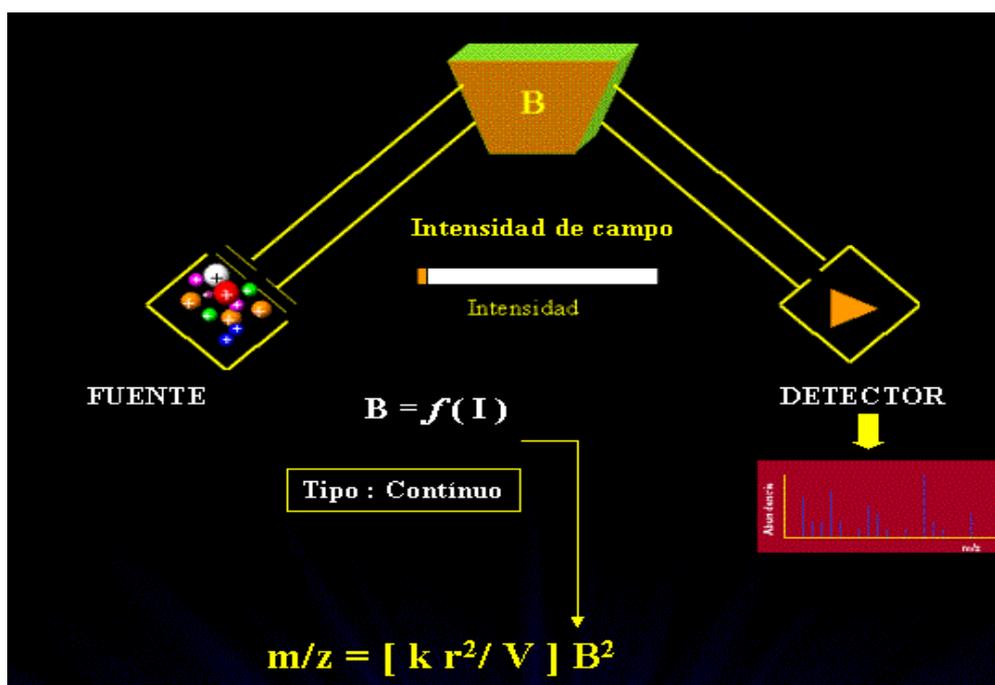


Figura 1.21 Representación esquemática de un analizador de sector magnético (adaptado de <http://niobio.grasa.csic.es/jrrios/weblab/analizador.html>).

II. Analizadores de Cuadrupolo: El cuadrupolo es un dispositivo en el cual se aprovecha la estabilidad de las trayectorias del ion para separar los iones de acuerdo con su coeficiente de masa-carga (m/z). Los analizadores de cuadrupolo consisten en cuatro barras circulares o, idealmente, secciones superficiales hiperbólicas. Las cuatro barras están dispuestas de forma paralela y son exactamente equidistantes alrededor de un eje central. A estas barras circulares se aplica una corriente continua (DC) sobre la que se superpone un potencial de

radiofrecuencia (RF). El campo creado en las barras actúa a modo de filtro y determina que iones alcanzarán el detector. Los iones, en esta región de campo variable, oscilarán dependiendo del campo de radiofrecuencia aplicado así como de su relación masa/carga, por lo que sólo determinados iones alcanzarán el detector. De este modo, un espectro de masas se conseguirá barriendo el campo de RF dentro de un rango de frecuencias. En la **figura 1.22** se muestra una representación esquemática de un analizador de cuadrupolo. El analizador de cuadrupolo es uno de los más extendidos hoy en día. A su relativa sencillez se une una alta tolerancia a vacíos relativamente pobres, rango de masas de hasta 3000 Da que le hace muy adecuado para ser acoplado a interfases de cualquier tipo, incluida la ESI, para el análisis de una amplia gama de compuestos y biomoléculas asociado a un bajo coste. Además, los analizadores de cuadrupolo son muy sensibles y tienen la habilidad de analizar muy rápidamente, en intervalos de milisegundos. El cuadrupolo no es muy sensible en modo barrido completo (*full scan*), por lo que se suele utilizar en modo de selección de iones (*SIM-selected ion monitoring*). Normalmente, en el análisis de fármacos, se selecciona la molécula protonada o desprotonada y al menos dos iones fragmento, que garanticen la correcta confirmación de los compuestos en las muestras. El modo de análisis SIM es muy sensible, pero requiere el conocimiento previo de los compuestos que se van a analizar, ya que sólo se utilizan los iones seleccionados y no el barrido completo de iones de la muestra.

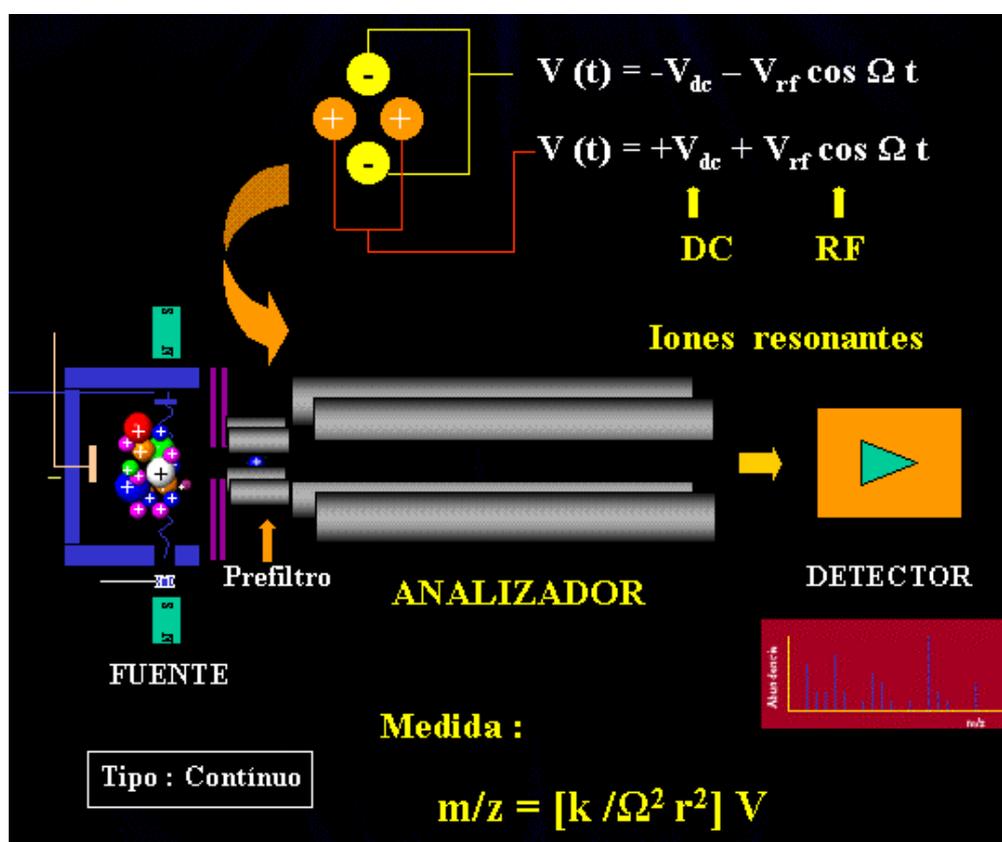


Figura 1.22 Representación esquemática de un analizador de cuadrupolo (adaptado de <http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html>).

El analizador híbrido de triple cuadrupolo consiste en dos cuadrupolos con un segundo cuadrupolo entre ellos que actúa como celda de colisión, permitiendo el análisis de masas en tándem. Los iones se dirigen desde la fuente de ionización al primer cuadrupolo, donde se selecciona el ión precursor. La celda de colisión es seguida por el cuadrupolo final y el detector fotomultiplicador. Los instrumentos de MS/MS triple cuadrupolo estándar tienen cuatro posibles modos de operación: análisis de los iones producto (*product-ion scan*), seguimiento de la reacción seleccionada (*SRM-selected-reaction monitoring*), pérdida neutra constante (*constant neutral loss*) y análisis del ión precursor (*precursor-ion scan*). Estos cuatro modos de operación corresponden a las opciones de trabajo de los cuadrupolos 1 y 3 en modo de barrido completo de iones (*full scan*) o de monitoreo del ión seleccionado (SIM).

En el modo *product-ion scan*, en el primer cuadrupolo se selecciona el ión molecular y se envía sólo este ión a la celda de colisión donde se fragmenta para generar el espectro de iones producto.

En el modo de operación SRM, se selecciona el ión molecular en el primer cuadrupolo y se envía al segundo cuadrupolo para su colisión y fragmentación. En el tercer cuadrupolo se selecciona y analiza un ión producto específico. Este modo de operación es el más utilizado para el análisis cuantitativo ya que es el más sensible y selectivo, aunque también es el que proporciona una menor información estructural.

En modo *constant neutral loss* el primer y tercer cuadrupolo analizan simultáneamente, luego a las pérdidas neutras de los iones moleculares detectadas en el primer cuadrupolo se les puede atribuir su correspondiente espectro. El instrumento después calcula las pérdidas de masa entre el primer y tercer cuadrupolo y encuentra todos los picos que dan una pérdida de masa característica. Desafortunadamente, la sensibilidad disminuye cuando se opera en este modo. Esta técnica puede ser útil para la detección de compuestos desconocidos de una misma familia o que poseen grupos funcionales comunes.

En modo *precursor-ion scan*, en el cuadrupolo 1 se analiza todo el espectro y el cuadrupolo 3 busca un ión seleccionado. Este modo de operación puede ser interesante cuando el ión fragmento producido en la celda de colisión es específico de una familia de compuestos. Cada pico del cromatograma de los iones fragmento puede ser examinado, mostrándose el espectro completo y posibilitando la identificación de desconocidos.

III. Analizadores de Trampa de Iones: Los analizadores descritos anteriormente son todos analizadores de masa con “filtro”, separados espacialmente en la entrada y salida. Hay otra clase de espectrómetros de masas en que los analizadores almacenan los iones para el

análisis subsiguiente de la masa. El más común de éstos es la trampa de iones. En este sistema los iones generados en la fuente son “atrapados”, durante un cierto tiempo, en un campo de radiofrecuencia dentro de un anillo toroidal situado entre dos electrodos hiperbólicos. Mediante la aplicación simultánea de corrientes continuas (DC) y radiofrecuencia (RF) se consigue “atrapar” y mantener dentro del anillo central los iones procedentes de la fuente de iones. Una vez allí, dichos iones pueden ser extraídos a voluntad aplicando corrientes de radiofrecuencia variables hasta valores de resonancia y expulsados a través del anillo de salida. La posición de los anillos exteriores puede ser modificada para una mayor eficiencia de transmisión. La **figura 1.23** muestra una representación esquemática de un analizador de trampa de iones. Un espectro de masas completo se obtiene mediante el barrido de un rango de radiofrecuencia determinado. Una ventaja particular de este analizador es la posibilidad de utilizarlo en la técnica de masas-masas (MS^n), puesto que permite la extracción de iones individuales (Iones Precusores) que posteriormente pueden ser fragmentados para análisis estructural (Iones Fragmento).

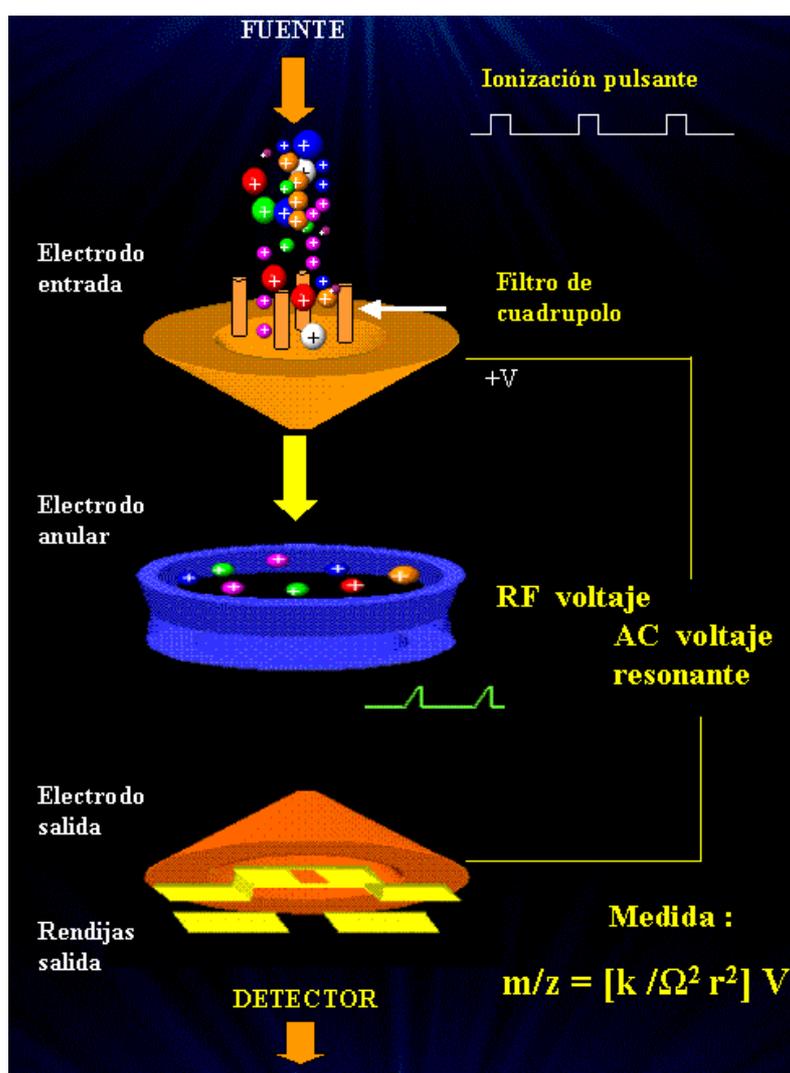


Figura 1.23 Representación esquemática de un analizador con Trampa de Iones (adaptado de <http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html>).

Las trampas de iones presentan mayor sensibilidad en modo de barrido completo que los analizadores cuadrupolares. Sin embargo, no pueden trabajar en modo SRM, lo cual limita sus dotes en MS/MS comparado con el triple cuadrupolo. Otra desventaja de la trampa de iones frente al triple cuadrupolo es su menor rango de respuesta lineal y su sensibilidad por las impurezas de la muestra. Sin embargo, como ya se ha dicho anteriormente, la trampa de iones tiene la particularidad de poder realizar experimentos múltiples de MS/MS (MS^n), atrapando primero un ión específico, fragmentándolo y atrapando después un nuevo ión producto para fragmentarlo de nuevo, y así sucesivamente. Esta herramienta es única de la trampa de iones y es muy útil para la identificación de compuestos desconocidos, investigando la “genealogía” de los iones fragmento y por tanto sus mecanismos de reacción.

Las excepcionales características de todos estos analizadores han permitido expandir considerablemente el campo de aplicaciones de la LC-MS en el área medioambiental. Sin embargo, la presencia de falsos positivos e identificaciones equívocas debido a la complejidad de las matrices y a las interferencias isobáricas están conduciendo la LC-MS hacia nuevas estrategias y avances instrumentales. Una estrategia para incrementar la selectividad y evitar falsos positivos es la utilización de instrumentos de alta resolución de MS, como el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS), que permiten medidas de masa exacta. Así mismo, estos instrumentos representan una herramienta muy poderosa para la determinación de nuevos compuestos y productos de transformación presentes en las muestras ambientales. En los últimos años la aceptación de los instrumentos TOF-MS y su aplicación en análisis medioambientales ha aumentado significativamente.

IV. Analizadores de Transformada de Fourier (FTMS): El analizador de Transformada de Fourier está basado en la acción que un campo magnético ejerce sobre una partícula cargada (ión) girando en un campo de radiofrecuencia. Mediante el primero, los iones son dirigidos al interior de una caja donde giran describiendo una órbita de diámetro reducido y mínima frecuencia (véase **figura 1.24**). Por aplicación de una señal de radiofrecuencia (RF) los iones son excitados a describir órbitas espirales de amplitud creciente. Llega un momento en que la órbita descrita es tal que alcanza el diámetro igual a la distancia de separación de dos electrodos detectores, momento en el cual son detectados originando una imagen de corriente, que es función directa de su relación masa/carga. Esta imagen de corriente es integrada mediante una transformada de Fourier y convertida en una señal proporcional a su intensidad. El espectro completo se obtiene mediante un barrido del campo de radiofrecuencia aplicado que varía entre 8 KHz y 100 MHz. La principal ventaja de este tipo de instrumentos está en la altísima precisión en la medida de masas (0.001 % y

superiores) y un poder de resolución casi ilimitado. Por el contrario, el nivel de vacío es un parámetro crítico y su costo es muy elevado.

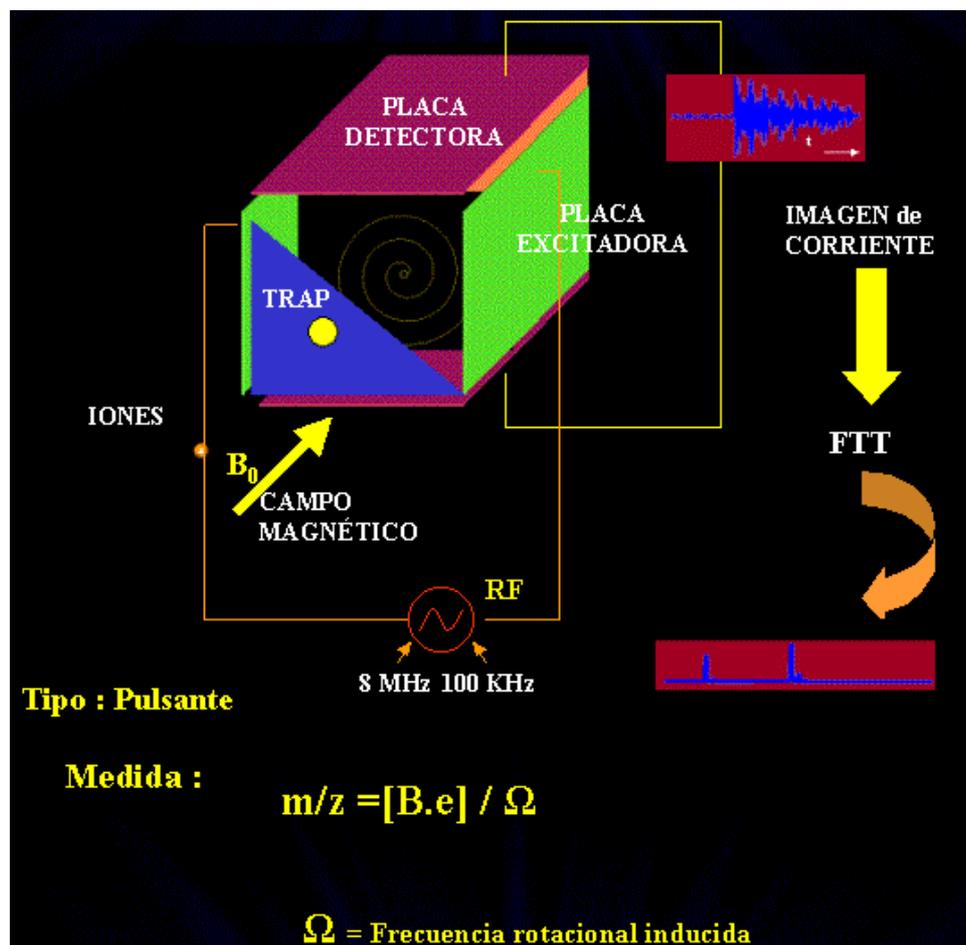


Figura 1.24 Representación esquemática de un analizador FTMS (adaptado de <http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/analizador.html>).

V. Analizadores de Tiempo-de-Vuelo (TOF): La separación del ion en un analizador por Tiempo-de-Vuelo se basa en la tercera ley de Newton. Fundamentalmente este analizador se basa en la medida del tiempo que tardan los iones generados y acelerados con igual energía en la fuente de iones en alcanzar un electrodo colector situado a una distancia predeterminada. Como los iones poseen la misma energía pero diferentes masas alcanzarán el colector a diferentes tiempos, dependiendo de su masa, carga y energía cinética. A continuación, en la **figura 1.25** se presenta una representación esquemática de un analizador TOF.

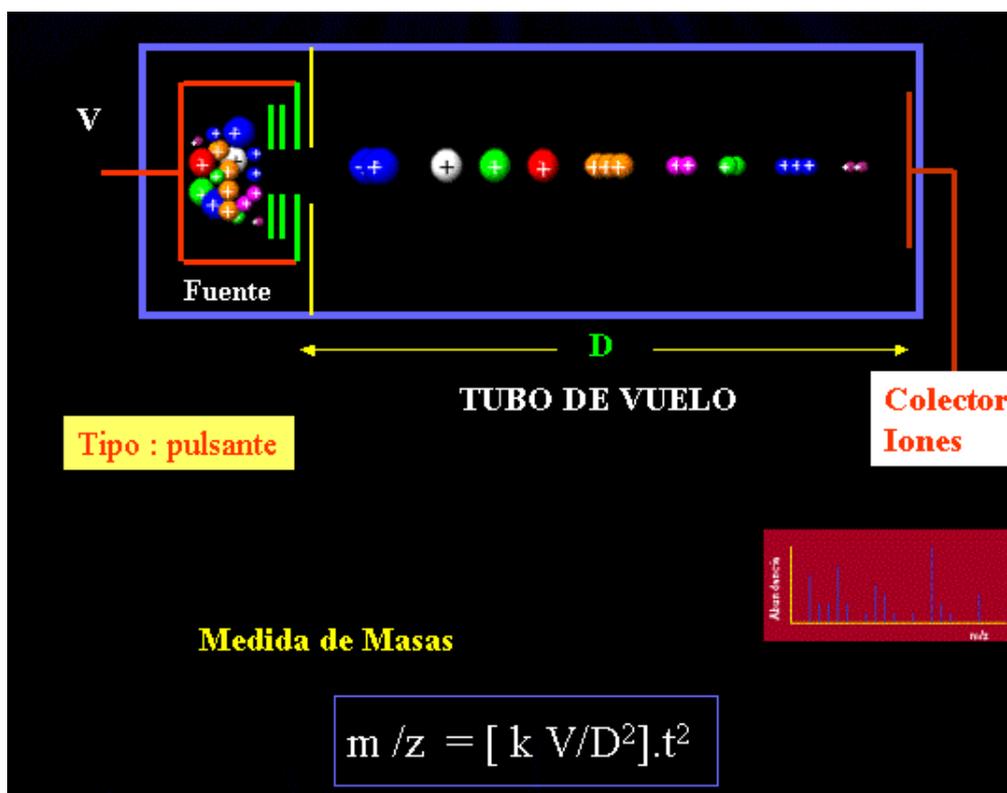


Figura 1.25 Representación esquemática de un analizador TOF (adaptado de <http://niobio.grasa.csic.es/jrrios/weblab/analizador.html>).

Como se puede observar, el analizador de tiempo de vuelo es, en cuanto a fundamento, uno de los analizadores más simples de los que se utilizan hoy en día. Los iones se introducen directamente de la fuente al instrumento. La fuente de iones está generalmente conectada con el analizador de masas TOF mediante un sistema de “aceleración ortogonal”, en el cual los iones se introducen en el analizador de masas en dirección perpendicular a la dirección de vuelo. Los iones generados en la fuente de iones son acelerados hacia el tubo de vuelo de campo libre mediante un pulso eléctrico. Recorren el tubo de vuelo y se separan por sus masas. Esto permite al instrumento registrar todos los iones que llegan al detector y aporta una alta sensibilidad a la técnica.

Al final del tubo de vuelo se coloca un *reflectron* (espejo de iones), que utiliza un campo electrostático para reflejar los iones hacia el detector. Los iones con mayor energía cinética penetrarán más profundamente en el gradiente de potencial y tardarán más en regresar que los iones con menor energía cinética, resultando en una focalización de los iones con el mismo valor de masa/carga en el *reflectron*. Una ventaja adicional del *reflectron* es que el camino de vuelo se recorre dos veces para una longitud dada del instrumento. Este tipo de configuración se denomina en modo “V”.

En el pasado, y debido a las limitaciones de tipo electrónico y de software, el uso de los analizadores de tiempo de vuelo fue muy limitado debido a su escaso poder de resolución y rango de masas. No es de extrañar que durante años este analizador estuviera poco menos que olvidado. Sin embargo, en la última década, y debido precisamente a los enormes avances en el campo de la microelectrónica y el software ha recibido un increíble impulso, hasta el punto de que actualmente, junto con los analizadores de cuadrupolo, es el analizador más ampliamente utilizado.

Tres son las principales características que convierten al TOF-MS en una poderosa herramienta para la detección inequívoca de fármacos y/o compuestos desconocidos en matrices medioambientales complejas: su elevada sensibilidad en *full scan*, su excelente resolución (10000 o mayor), que permite discriminar interferencias de matriz, y la capacidad de medir masa exacta, que permite obtener información acerca de la composición elemental de las moléculas.

La exactitud en la medida de las masas proporcionada por un TOF-MS es mucho más alta que para cualquier otro instrumento, debido a la excelente separación y detección de iones en el tubo de vuelo, permitiendo errores en la exactitud de la medida de masas de los iones inferiores a 5 ppm, valor aceptado para la verificación de la composición elemental. Para alcanzar tal exactitud de medida de masa, los instrumentos TOF-MS requieren una frecuente calibración y afinación del espectrómetro. La nueva generación de TOF-MS utiliza un nebulizador dual en la fuente de iones que permite realizar una calibración de masa exacta interna automáticamente, introduciendo un compuesto de referencia a una velocidad de flujo muy baja junto con la salida del sistema del LC. La calibración *on-line* es vital para evitar fluctuaciones que pueden ocurrir durante el curso de la medida.

VI. Sistemas híbridos: Los avances más recientes y las tendencias en el desarrollo de los analizadores de masas están dirigidos hacia los instrumentos híbridos con analizadores convencionales para permitir funcionalidades adicionales del instrumento en la detección de masas, según se requiera en el análisis de muestras complejas, mientras que se reduce significativamente el tiempo necesitado para el análisis. Hay varios tipos de espectrómetros de masas híbridos disponibles, los más importantes son: el cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqTOF o Q-TOF), la trampa de iones-tiempo de vuelo (IT-TOF), el cuadrupolo-trampa de iones lineal (Q-LIT), la trampa de iones lineal-transformada de Fourier resonancia ión ciclotrón (LIT-FT-ICR) o la trampa de iones lineal-Orbitrap (LTQ Orbitrap).

- *Trampa de iones-tiempo de vuelo (IT-TOF)*: Una interesante característica de los instrumentos TOF es su fácil acoplamiento con otros analizadores para mejorar sus

capacidades de detección. Los analizadores híbridos como QqTOF e IT-TOF son instrumentos con características únicas en cuanto a sensibilidad y capacidad de identificación. Estos sistemas híbridos proporcionan medidas de masa exacta tanto de los iones precursores como de sus iones producto, constituyendo un orden superior de identificación que el que ofrecen los analizadores de masas con medida de masa nominal.

- *Cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqTOF)*: El QqTOF consiste en un cuadrupolo y región de colisión adaptado de un instrumento triple cuadrupolo acoplado a un analizador tiempo de vuelo con aceleración ortogonal para MS². Por consiguiente, el QqTOF tiene la capacidad de análisis de MS así como modos de operación en MS/MS. En modo MS/MS, el equipo selecciona un ión precursor en el primer cuadrupolo, lo fragmenta mediante CID en la celda de colisión y realiza el análisis de masas de los iones fragmento en el analizador TOF, proporcionando un espectro de masa exacta de iones producto en *full-scan*. La utilización de instrumentos QqTOF en el medio ambiente es todavía escasa, principalmente debido a su alto coste, sin embargo, la aplicación de esta técnica se está extendiendo simultáneamente con las nuevas tendencias en el análisis medioambiental, que van dirigidas hacia la identificación de productos de degradación y transformación de los contaminantes orgánicos.
- *LC-LTQ Orbitrap-MS/MS y LC-LIT-FT-ICR-MS/MS*: Otro tipo de instrumento híbrido de alta resolución y masa exacta es el recientemente comercializado LTQ Orbitrap, que combina una trampa de iones lineal con un analizador de masas Orbitrap. Este sistema proporciona una excelente exactitud de masa, resolución y sensibilidad en modo MSⁿ. El sistema híbrido trampa de iones con espectrómetro de masas transformada de Fourier resonancia ión ciclotron (LC-FT-ICR) es otra nueva técnica de muy alta resolución, en la que se pueden determinar las masas con una gran exactitud y también es capaz de realizar MSⁿ. Estas dos técnicas todavía no están muy extendidas debido a su alto coste: sin embargo, la tecnología Orbitrap apunta hacia una tendencia futura debido a su alto poder de resolución y su alta sensibilidad, además de un coste inicial y requerimientos de mantenimiento significativamente menores comparados con el instrumento LC-LIT-FT-ICR.
- *Triple cuadrupolo-trampa de iones lineal (Q-LIT o Q TRAP)*: Otro nuevo instrumento es el analizador híbrido triple cuadrupolo-trampa de iones lineal (Q-LIT o Q TRAP). El Q TRAP combina la funcionalidad de un triple cuadrupolo con las capacidades de una trampa de iones. La especificidad y cuantificación de los triples cuadrupolos combinada con la sensibilidad del *full scan* MS/MS y la posibilidad de realizar

experimentos en MS^n que aporta la trampa lineal de iones permite obtener excelentes resultados cualitativos y cuantitativos. El Q TRAP está basado en un QqQ en el cual el tercer cuadrupolo (Q3) puede operar como un cuadrupolo normal (modo cuadrupolo) o como una trampa de iones lineal (modo LIT). La tecnología del Q TRAP constituye una poderosa herramienta para obtener excelentes resultados cualitativos y cuantitativos en un solo análisis, ya que presenta una alta selectividad y especificidad en la cuantificación de los analitos; permite el empleo del criterio de confirmación que ofrece el QqQ empleando los *selected reactions monitoring (SRM) ratios* y, finalmente, un alto grado de confirmación que se puede conseguir usando la trampa lineal de iones en *full scan MS/MS* (modo de trabajo *EPI-enhanced product ion*) o MS^n , para aquellos compuestos que sólo presenten una transición o que a pesar de tener dos transiciones, una de ellas sea muy poco intensa. Los sistemas Q TRAP precisan una inversión considerablemente superior que los instrumentos QqQ (Gómez, 2008).

1.5.4 El uso de la LC-TOF-MS para la identificación de los productos de transformación (PT)

En los últimos años se ha visto la importancia del desarrollo de métodos genéricos para el análisis simultáneo de un amplio número de fármacos en el medio ambiente, que nos permitan tener un mayor conocimiento sobre la presencia, eliminación y destino de estos contaminantes en el medio ambiente. No obstante, la mayoría de los esfuerzos están dirigidos hacia el análisis de compuestos “objetivo” o seleccionados previamente para su análisis. Mientras que el análisis de compuestos “no objetivo” o desconocidos, como pueden ser los PT o los metabolitos de los fármacos, todavía no está muy implementado. Estos estudios son decisivos, ya que en muchas ocasiones los productos de degradación o los metabolitos de los fármacos son más tóxicos y/o más persistentes que los fármacos originales. Para entender el comportamiento de los fármacos en el medio ambiente y los subproductos generados a lo largo de los distintos procesos de degradación de los mismos, tenemos que estudiar sus productos de transformación, ya que la desaparición del fármaco en sí no significa que se haya eliminado, sino que éste haya podido transformarse en otros productos. En la actualidad se ha puesto de manifiesto la importancia de estos análisis, y en este contexto, el desarrollo de la espectrometría de masas de alta resolución como TOF y QqTOF así como otros instrumentos híbridos (ej. QqLIT), que permiten la elucidación estructural y la identificación de productos de degradación desconocidos, permiten que cada vez haya más aplicaciones de este tipo de análisis.

Es evidente que la identificación de compuestos desconocidos implica un alto grado de dificultad y solamente es posible cuando se obtiene información en *full scan*. Por lo tanto, los instrumentos de TOF por sí mismos o junto con otras técnicas complementarias, como por ejemplo Q TRAP, representan una herramienta valiosa para lograr este objetivo. Como se ha demostrado en la literatura reciente, se observa el incremento de estudios relacionados con la elucidación de los PT generados en distintos procesos (véase **tabla 1.14**).

Tabla 1.14 Determinación de PT de fármacos mediante LC/MS.

Fármacos	Proceso	Técnica	Referencia
Analgésicos/ antiinflamatorios			
Diclofenaco	Fotólisis Foto-Fenton Biodegradación Cloración Biodegradación	LC-TOF-MS LC-TOF-MS LC-QqTOF LC-TOF-MS LC-QqTOF	Agüera, 2005 Pérez-Estrada, 2006 Kosjek, 2009 Quintana, 2010 Kosjek, 2008
Ibuprofeno	Cloración Fotocatálisis (TiO ₂)	LC-TOF-MS LC-TOF-MS	Quintana, 2010 Méndez-Arriaga, 2008
Naproxen	Cloración Fotólisis, Fotocatálisis TiO ₂	LC-TOF-MS LC-QqTOF	Quintana, 2010 Kosjek, 2007
Ketoprofen	Cloración Fotólisis, Fotocatálisis TiO ₂	LC-TOF-MS LC-QqTOF	Quintana, 2010 Kosjek, 2007
Fenoprofeno	Cloración	LC-TOF-MS	Quintana, 2010
4-MAA (<i>metabolito activo dipirona</i>)	Fotólisis Fotocatálisis (TiO ₂ y foto-Fenton)	LC-TOF-MS LC-TOF-MS	Gómez, 2008 Pérez-Estrada, 2007
Acido salicílico (<i>metabolito aspirina</i>)	Cloración	LC-TOF-MS	Quintana, 2010
Indometacin	Cloración	LC-TOF-MS	Quintana, 2010
Antibióticos			
Clorotetraciclina	Fotólisis	LC-TOF-MS	Eichhorn, 2004
Sulfonamidas	Fotólisis Fotólisis	LC-TOF-MS LC-TOF-MS	Boreen, 2004 Boreen, 2005
Sulfametoxazol	Fotólisis Foto-Fenton	LC-TOF-MS LC-TOF-MS	Trovó, 2009A Trovó, 2009B
Betabloqueantes			
Enalapril	Fotólisis	LC-Qq-TOF, LC-Qq-LIT	Pérez, 2006
Atenolol	Biodegradación	LC-QqTOF	Radjenovic, 2008
Reguladores del colesterol			
Bezafibrato	Cloración Fotocatálisis TiO ₂	LC-TOF-MS LC-TOF-MS	Quintana, 2010 Lambropoulou, 2008
Acido clofíbrico (<i>metabolito</i>)	Cloración Fangos activos	LC-TOF-MS LC-QqTOF	Quintana, 2010 Kosjek, 2009
Antihistamínicos			
Cimetidina	cloración	LC-TOF-MS	Buth, 2007

Generalmente, cuando se utiliza un analizador TOF, el primer paso en la identificación de compuestos desconocidos consiste en la obtención de los espectros de masa exacta, a partir de los cuales el sistema genera una lista de fórmulas empíricas posibles, que concuerdan con la masa exacta registrada. Esta lista puede verse drásticamente reducida si se limita el error ($< 5\text{ ppm}$) y se consideran las características estructurales del compuesto de partida. Un ejemplo que ilustra la información antedicha está representado en la **figura 1.26**.

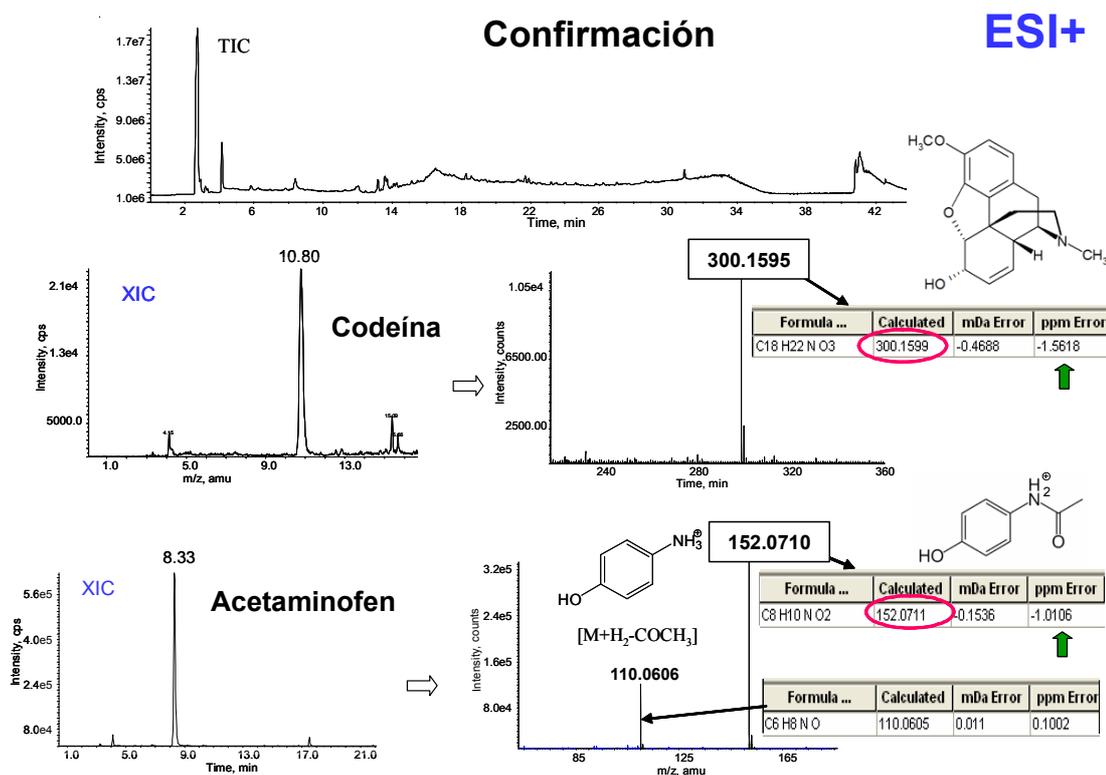


Figura 1.26 Ejemplo de la identificación de dos fármacos (codeína y acetaminofen), donde se obtuvieron errores menores a 1.5 ppm (0.5 mDa).

El interés en obtener una identificación inequívoca de compuestos desconocidos justifica el uso de distintos voltajes de fragmentación en la fuente que promueve una fragmentación por CID directamente en la fuente. Esa estrategia permite obtener más información, en algunos casos, aunque a costa de una simultánea disminución de la sensibilidad conforme se incrementa el voltaje, y de la dificultad de predecir los parámetros de operación de la CID cuando se analizan compuestos desconocidos, lo que requiere realizar múltiples inyecciones. En la **figura 1.27** se presenta un ejemplo de espectros a diferentes valores de voltaje de fragmentación.

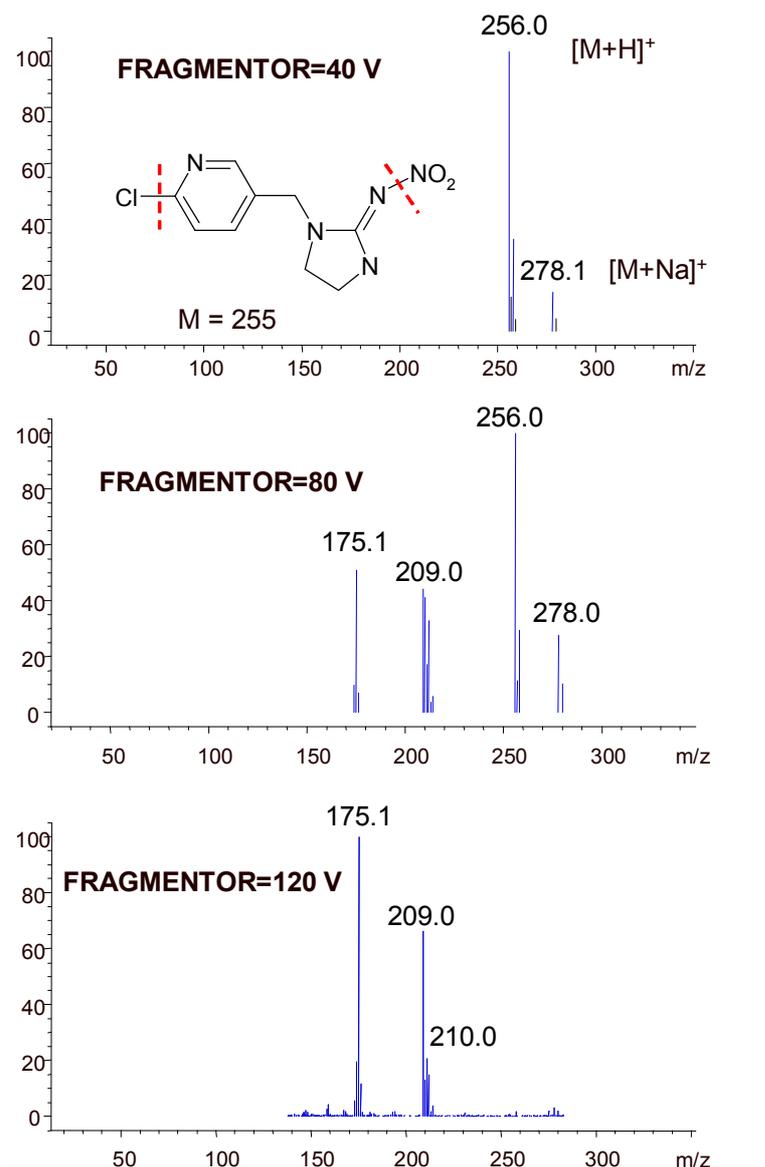


Figura 1.27 Espectros de masas obtenidos para el plaguicida imidacloprid a diferentes valores de voltaje de fragmentación.

La fragmentación en la fuente (CID) puede ser utilizada como guía o referencia para detectar posibles PT, ya que puede esperarse que los enlaces más débiles o partes más reactivas de la molécula tengan un destino similar en las muestras reales que en el instrumento. Es también frecuente que los compuestos que comparten una estructura común presenten uno o más fragmentos comunes. Así, la obtención del cromatograma para los fragmentos del ion seleccionado permite detectar los posibles PT, incluso cuando éstos no son visibles en TIC (véase **figura 1.28**).

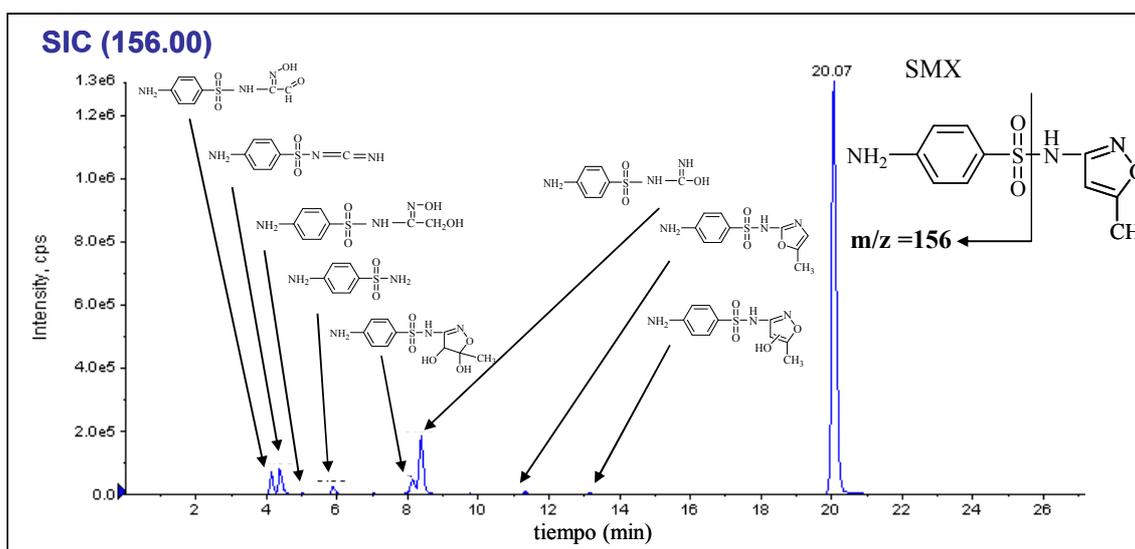


Figura 1.28 Cromatograma de iones seleccionados de una muestra de sulfametozazol donde se observan, a la vez, señales de los PT generados.

Es importante mencionar que la identificación de desconocidos por TOF-MS es solamente factible cuando se tiene un conocimiento previo sobre la molécula original y el proceso de transformación/degradación. En ese contexto, muchos estudios han evidenciado la aplicabilidad del TOF-MS en la determinación de rutas metabólicas o rutas de fotodegradación de ciertos contaminantes orgánicos (Agüera y cols., 2005; Perez-Estrada y cols., 2005.; Pérez-Estrada y cols., 2007).

Las dificultades principales en esta clase de estudios están relacionadas con (i) la respuesta escasa para los metabolitos de menor importancia, los cuales son indistinguibles en TIC, (ii) la dificultad para reconocer cuando ocurre coelución con otros componentes de la muestra, y (iii) la carencia de estándares para una confirmación inequívoca. Una revisión detallada de la literatura, referente al compuesto de interés o de otros compuestos relacionados sometidos al mismo proceso de transformación, puede ser un buen punto de partida en la identificación de los metabolitos y/o PT.

La presencia de heteroátomos en la molécula original es otra información interesante que ayuda a reconocer especies sospechosas que todavía conservan características isotópicas típicas. Los picos isotópicos son el resultado de las abundancias de isótopos naturales de los elementos individuales, las cuales pueden ser altamente indicativas. Por ejemplo, el cloro natural existe en un 75% como isótopo-³⁵Cl y 25% como isótopo-³⁷Cl, de forma que cada ion molecular o ion fragmento que contenga cloro puede ser fácilmente identificado por su perfil isotópico característico. Hay elementos mono-isotópicos como el flúor, iodo y fósforo y otros con picos isotópicos adicionales típicos en el espectro como el bromo y azufre. Las

moléculas y los iones fragmentos que contienen más de un átomo de cloro o bromo dan patrones muy característicos, como se muestra en la **figura 1.29**.

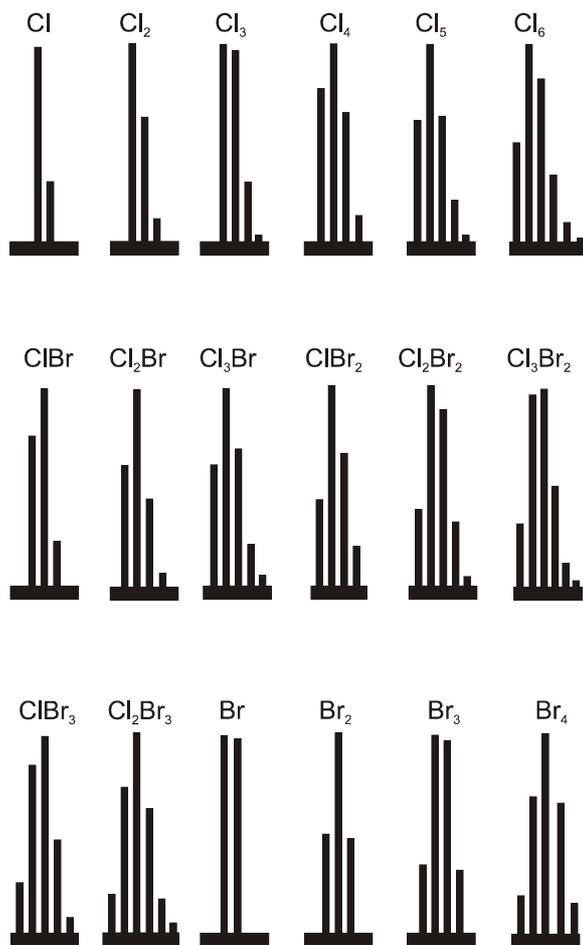


Figura 1.29 Intensidades relativas de isótopos.

A continuación, la **figura 1.30** ilustra el perfil isotópico característico de dos fármacos en sus espectros de masa: uno conteniendo un átomo de cloro (ácido clofíbrico) y otro que contiene un átomo de azufre (omeprazol).

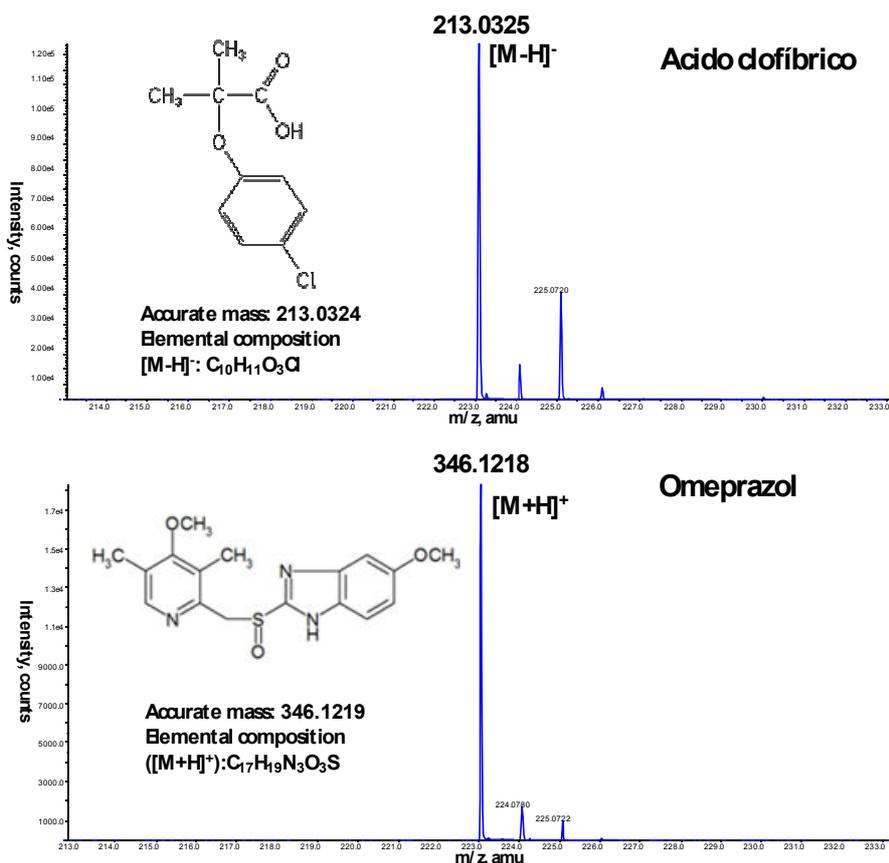


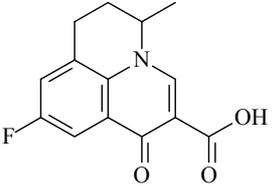
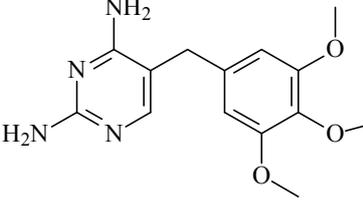
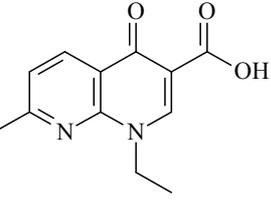
Figura 1.30 Espectros de masa exacta del ácido clofibrico y del omeprazol.

Hasta el momento, la aplicabilidad de los QqTOF para la identificación de productos de transformación ha sido poco estudiada. Sin embargo, estos sistemas asocian: medida de masa exacta y fragmentación de MS/MS y presentan un alto potencial para la investigación de desconocidos.

1.6 Fármacos Modelo Seleccionados

Para la realización de los estudios que serán descritos con más detalle a lo largo de esta Memoria Doctoral, se han seleccionado tres fármacos con amplio campo de aplicación tanto en la medicina humana como animal. Los compuestos objeto de estudio pertenecen a la categoría terapéutica de los antibióticos y son: la flumequina (FLU), el trimetoprim (TMP) y el ácido nalidíxico (NXA). Además, como ya se ha comentado en el **epígrafe 1.2.1** los compuestos elegidos son habitualmente encontrados en aguas naturales y presentan niveles de remoción discretos cuando son sometidos a los procesos de tratamiento usualmente utilizados en las EDAR (Pérez y Barceló, 2007). A continuación, en la **tabla 1.15** están descritos los principales parámetros químico-físicos de los compuestos estudiados, acrecidos por un breve relato respecto a las principales características farmacológicas y toxicológicas de los mismos.

Tabla 1.15 Principales características químico-físicas de los fármacos estudiados (adaptado de <http://www.drugbank.ca/> y <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Nombre/ Estructura química	<p style="text-align: center;">Flumequina (FLU)</p> 	<p style="text-align: center;">Trimetoprim (TMP)</p> 	<p style="text-align: center;">Ácido Nalidíxico (NXA)</p> 
Nombre IUPAC	Ácido 7-fluoro-12-metil-4-oxo-1-azatriciclo[7.3.1.0.05,13]trideca-2,5,7,9(13)-tetraeno-3-carboxílico	5-(3,4,5- trimetoxibenzil) pirimidina- 2,4- diamina	Ácido 1-etil-7-metil-4-oxo-[1,8]naftiridina-3-carboxílico
Fórmula/ Masa molecular	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃ 261.2484 g mol ⁻¹	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃ 290.3177 g mol ⁻¹	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃ 232.2353 g mol ⁻¹
Número CAS	42835-25-6	738-70-5	389-08-2
Punto de fusión	219.7°C	199-203°C	229.5°C
Solubilidad experimental en agua	<100 mg L ⁻¹	12.1 mg mL ⁻¹	100 mg L ⁻¹
Solubilidad teórica en agua	-	0.615 mg mL ⁻¹	2.3 mg mL ⁻¹
pKa	6.2	-	5.95
Hidrofobicidad	-	0.6	2.1
Indicación	Flumequina constituye uno de los fármacos de primera elección en acuicultura, dado su amplio espectro de acción. Se indica para el tratamiento de infecciones causadas por flavobacterias.	Para el tratamiento de episodios iniciales de infecciones de vías urinarias sencillas.	Para el tratamiento de las infecciones urinarias causadas por microorganismos gramnegativos, incluyendo la mayoría de especie de <i>Escherichia coli</i> , especies <i>Enterobacteria</i> , <i>Klebsiella</i> y especies <i>Proteus</i> .
Farmacología	La flumequina es un derivado tricíclico con un átomo de fluor en su estructura, mejorando la penetración celular y la afinidad por la DNA girasa, lo que resulta en un incremento de 10 veces en su actividad frente a bacterias gram negativas comparado con el ácido nalidíxico (Bryskier and Chantot, 1995)	El trimetoprim es un agente antiinfectante sintético que se utiliza para tratar y para prevenir infecciones de vías urinarias, diarrea, y, cuando está combinado con el sulfametoxazol es utilizado para el tratamiento de infecciones de <i>Pneumocystis carinii</i> .	El ácido nalidíxico es un agente antibacteriano de la familia de las quinolonas suministrado por vía oral. El ácido nalidíxico posee actividad antibacteriana contra bacterias gramnegativas incluyendo la especie <i>Enterobacteria</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> y <i>Providencia rettgeri</i> . Las especies de las <i>Pseudomonas</i> son generalmente resistentes a esta droga. El ácido nalidíxico es un eficaz bactericida en toda la

			gama de pH de la orina. La resistencia cromosómica convencional al ácido nalidíxico durante el tratamiento ocurre en el rango de 2-14% de los pacientes; sin embargo, la resistencia bacteriana al ácido nalidíxico no se ha mostrado transferible vía factor R.
Mecanismos de acción	Se fija a las proteínas plasmáticas. Bloquea e inhibe la ADN polimerasa, inhibe la síntesis proteica de las bacterias sensibles.	El trimetoprim ata al dihidrofolato reductasa bacteriano, interfiriendo posteriormente en la absorción del ácido p-aminobenzoico (PABA) y en el ácido fólico. Este último es una coenzima responsable del transporte de los fragmentos de carbono de una molécula a otra, así es un componente esencial del desarrollo bacteriano.	Existen pruebas de que el metabolito activo, el ácido hidroxinalidíxico, establece enlaces fuertes, pero reversibles, con el ADN, interfiriendo en la síntesis del ARN y, por lo tanto, en la síntesis de proteínas.
Absorción	-	-	Después de la administración oral, el ácido nalidíxico se absorbe rápidamente en el aparato gastrointestinal. La biodisponibilidad es de aproximadamente 96%. La absorción puede ser retrasada por la ingestión de antiácidos.
Toxicidad	ORAL (LD ₅₀): 2000 mg kg ⁻¹ para ratas, ratones	ORAL (LD ₅₀): 4850 mg kg ⁻¹ (en ratones)	ORAL (LD ₅₀): Aguda: 1160 mg kg ⁻¹ (rata). 572 mg kg ⁻¹ (ratón). Pueden ocurrir psicosis tóxica, convulsiones, aumento de la presión intracraneal o acidosis metabólica en los pacientes que toman más que la dosificación recomendada. Vómitos, náuseas y letargo pueden también ocurrir después de la sobredosificación.
Biotransformación	-	-	Hepática: el 30% de la dosis administrada se metaboliza al metabolito activo, el ácido hidroxinalidíxico. Conjugación rápida de la droga padre y del metabolito activo a los metabolitos inactivos. El metabolismo puede variar extensamente entre individuos. En la orina, el ácido hidroxinalidíxico representa 80-85% de la actividad antibacteriana.
Tiempo de vida medio	7 horas	8-10 horas	1.1 a 2.5 horas en pacientes adultos sanos, y hasta 21 horas en pacientes con la función renal empeorada.

Una revisión detallada de la literatura demuestra que estudios de evaluación de procesos de fotodegradación solar y estudios de la aplicación de procesos de fotocátalisis solar a los compuestos modelo elegidos, son escasos y enfocados principalmente al estudio cinético y/o mejora del proceso de tratamiento (Pouliquen y cols., 2007; Palominos y cols., 2008; Nieto y cols., 2008; Yamamoto y cols., 2009; Abellán y cols., 2009; Vargas y cols., 1991). Sin embargo, una apreciación más detallada desde un punto de vista analítico, con la identificación de los PT generados durante los procesos antedichos teniendo en cuenta, además de los parámetros cinéticos, medidas toxicológicas es una temática inusual y que constituye un abordaje crucial para ampliar el conocimiento sobre el comportamiento e impacto de los contaminantes en el medio ambiente y valorar la potencialidad de los procesos de fotocátalisis solar.

Capítulo 2

EXPERIMENTAL

2.1 Reactivos y aguas modelo

Muchos de los experimentos de descontaminación mediante PAO de aguas conteniendo los fármacos modelo seleccionados, se llevaron a cabo usando agua desmineralizada. Este agua procede de la planta de desmineralización existente en la Plataforma Solar de Almería y presenta las siguientes características: conductividad $< 20 \mu\text{S cm}^{-1}$, $\text{Cl}^- < 0.8 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{NO}_3^- < 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ y $\text{COD} < 0.5 \text{ mg L}^{-1}$.

Parte de los experimentos de fotodegradación y descontaminación se realizaron en agua de mar simulada. La composición de esta agua fue adaptada de APHA (1998) y consistía en una mezcla de sales descrita en la **tabla 2.1**. Una vez preparada, en este agua eran disueltos los compuestos objeto de estudio. También se realizaron estudios con un agua residual industrial simulada, la cual está descrita en la **tabla 2.2**.

Tabla 2.1 Composición del agua de mar simulada.

Compuesto	Concentración (mg L ⁻¹)
NaF	3
SrCl ₂ 6H ₂ O	20
H ₃ BO ₃	30
KBr	100
KCl	700
CaCl ₂ 2H ₂ O	1470
Na ₂ SO ₄	4000
MgCl ₂ 6H ₂ O	10780
NaCl	23500
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	20
NaHCO ₃	200

Tabla 2.2 Composición del agua residual industrial simulada.

Compuesto	Concentración (mg L ⁻¹)
NaCH ₃ COO	3840
NH ₄ HCO ₃	334
(NH ₄) ₂ HPO ₄	62
NaCl	4200
NXA	45

Para demostrar la aplicabilidad de los PAO asociados a tratamientos biológicos, se realizó el estudio de degradación de un agua residual industrial proveniente de una industria farmacéutica, ubicada en Milán (Italia). Esta agua real presentaba los parámetros descritos a continuación, en la **tabla 2.3**. Además, presentaba una elevada cantidad de sólidos en suspensión, los cuales fueron retirados por sedimentación ya que perjudicarían la efectividad de los tratamientos estudiados. El sobrenadante, como puede ser observado en la **figura 2.1**, exhibía una coloración amarillo verdosa y una elevada concentración de sales, en especial Cl⁻ y Na⁺.

Tabla 2.3 Composición del agua residual industrial.

Parámetro	Valor
pH	3.98
conductividad	7 mS cm ⁻¹
COD	775 mg L ⁻¹
DQO	3420 mg L ⁻¹ O ₂
STS	407 mg L ⁻¹
NXA	45 mg L ⁻¹
Cl ⁻	2800 mg L ⁻¹
PO ₄ ³⁻	10 mg L ⁻¹
SO ₄ ²⁻	160 g L ⁻¹
Na ⁺	2000 mg L ⁻¹
Ca ²⁺	20 mg L ⁻¹

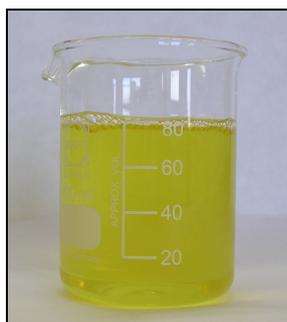


Figura 2.1 Agua residual industrial después de la sedimentación utilizada en los estudios de tratamiento combinando foto-Fenton y biodegradación.

Finalmente, un agua simulando las condiciones de un efluente de EDAR fue utilizada como fuente de alimentación de la biomasa en la etapa del tratamiento biológico y, en especial, en su puesta en marcha. La composición de este agua fue adaptada de las pautas de la OCDE (1999) y consistía en una mezcla de los compuestos descritos en la **tabla 2.4**.

Tabla 2.4 Composición del efluente de EDAR simulado.

Compuesto	Concentración (mg L ⁻¹)
Peptona	160
Extracto de carne	110
Urea	30
K ₂ HPO ₄	28
Mg ₂ SO ₄ 7H ₂ O	2
CaCl ₂ 2H ₂ O	4

Para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos con cada una de estas matrices, se repetirá esta información en la sección de resultados correspondiente a cada una de ellas.

Los experimentos de fotocatalisis heterogénea con TiO₂ se realizaron utilizando una suspensión de partículas de TiO₂ P-25 procedente de Degussa (Frankfurt, Alemania, 80% anatasa y 20% rutilo), con un área superficial de entre 51 y 55 m² g⁻¹. En cuanto a los experimentos fotocatalíticos en fase homogénea (foto-Fenton), el catalizador empleado fue Fe²⁺ en forma de FeSO₄·7H₂O procedente de Panreac, y el peróxido de hidrógeno empleado en la reacción fue de pureza 30% p/v también de Panreac. Se empleó una disolución de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄ 96% pureza, Panreac) para ajustar el pH de la mezcla a valores entre 2.6 y 2.9 para los ensayos de foto-Fenton.

Los patrones de los fármacos modelo empleados en la realización de los experimentos fueron de pureza analítica. La flumequina (FLU) y el trimetoprim (TMP) fueron suministrados por Sigma y el ácido nalidíxico (NXA) por Fluka. Los disolventes empleados en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, en su acrónimo inglés), procedían de Sigma-Aldrich y eran de pureza analítica (acetonitrilo, metanol, etc). El agua desmineralizada

(conductividad $0.054 \mu\text{S cm}^{-1}$, $\text{COD}_{\text{máx}} 0.3 \text{ mg L}^{-1}$), empleada en los estudios de fotodegradación y en todas las técnicas analíticas se obtuvo a partir de un equipo de agua desionizada de Millipore Co (Milli-Q).

2.2 Técnicas analíticas convencionales

2.2.1 Carbono Orgánico Disuelto (COD)

Descripción del equipo y fundamento teórico

La determinación del Carbono Orgánico Total (COT) permite evaluar el grado de mineralización del contaminante durante el proceso fotocatalítico. Para ello se ha empleado un analizador de Carbono Orgánico Total Shimadzu modelo TOC-5050A, equipado con un muestreador modelo ASI-5000A. Este analizador mide el Carbono Total (CT) y el Carbono Inorgánico Total (CIT) disueltos en agua, la diferencia entre ambas medidas proporciona el COT.

El análisis de CT se lleva a cabo mediante la combustión de las muestras en un tubo relleno de un catalizador de platino soportado sobre bolas de alúmina, a una temperatura de 680°C . El CT presente en la muestra se oxida dando lugar a CO_2 que es arrastrado por aire de alta pureza (flujo de 150 mL min^{-1}), enfriado y secado mediante un deshumidificador. A continuación, el CO_2 es analizado mediante un detector de infrarrojos no dispersivo (NDIR), generando un pico cuya área es proporcional a la cantidad de carbono presente en la muestra y es integrada por un procesador de datos.

En la medida de CIT, la muestra se introduce en un recipiente de reacción en el que se burbujea aire en presencia de ácido fosfórico (25% p/V). La descomposición de los carbonatos y bicarbonatos (CIT) presentes en la muestra genera CO_2 , que es arrastrado por el aire de alta pureza y procesado en el NDIR, de la misma forma que el CT. La relación lineal existente entre el área calculada por el procesador de datos y la concentración correspondiente de CT y CIT permite una cuantificación basada en rectas de calibración internas. Estas rectas se elaboran utilizando disoluciones estándar preparadas en agua desmineralizada (sistema Milli-Q), de hidrogeno ftalato de potasio para el CT (conteniendo unas gotas de ácido sulfúrico para evitar contaminación atmosférica de CO_2) y una disolución de carbonatos en la que la mitad de carbonos procede de carbonato sódico y la otra mitad de bicarbonato sódico para el CIT. Los rangos correspondientes a las cinco rectas de calibración realizadas para el CT y el CIT respectivamente, son los siguientes: 1-10, 10-50, 50-250, 250-1000 y 1000-4000 mg L^{-1} , y 0.5-5, 5-20, 20-200 mg L^{-1} . Para todas ellas los coeficientes de regresión lineal obtenidos son próximos a 1. La desviación estándar del

equipo es del 1%. La comprobación del correcto funcionamiento y calibración del equipo se llevan a cabo mediante la medida periódica de disoluciones patrón.

Procedimiento.

La medida del COD requiere un sencillo tratamiento previo de la muestra, consistente en la filtración de unos 12-15 mL de la misma a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore Millex[®] GN) antes de introducirla en el muestreador del equipo. De esta forma se retiran los sólidos en suspensión presentes en la muestra y, por tanto, ya no es correcto notarlo como COT sino como COD. A continuación se produce la inyección automática de la muestra y se realiza la medida de COD por diferencia entre el CT y el CIT, tal y como se detalla arriba.

2.2.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-UV)

Descripción del equipo y fundamento teórico

El seguimiento de la concentración de cada uno de los fármacos estudiados durante los procesos de degradación se realiza mediante HPLC con detector de UV. Esta técnica de cuantificación de compuestos disueltos en agua, es ampliamente utilizada gracias a la alta sensibilidad que presenta, y a su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, etc.) (Skoog, 1996). Además, este método permite la inyección directa de las muestras acuosas.

El equipo empleado en estos análisis es un cromatógrafo Agilent Technologies serie 1100 que consta de un equipo de desgasificación a vacío, una bomba cuaternaria de pistón (capaz de proporcionar mezclas de hasta cuatro disolventes diferentes en diversas proporciones), un compartimiento termostatzado para la columna cromatográfica, un detector de red de diodos UV/Vis y un sistema de inyección automática. El control y la adquisición de datos se lleva a cabo mediante la conexión a un ordenador en el que está instalado el software Agilent Chemstation[®]. La columna cromatográfica utilizada para la separación de los diferentes compuestos es una columna de fase reversa C18 (Gemini[®] 5 μm , 3 x 150 mm de Phenomenex), la cual se encuentra protegida por una precolumna conocida como *guard-column* (Phenomenex Security Guard[®]).

En la cromatografía líquida de alta resolución la fase móvil se bombea a alta presión por una columna que contiene partículas de fase estacionaria con un diámetro de entre 3 y 10 μm . A menor tamaño de partícula, más eficiente es la columna, pero mayor es la resistencia que opone al flujo. Las partículas micro-porosas más comunes son aquellas esféricas e irregulares con una superficie adsortiva o una fase líquida ligada. En la cromatografía en

fase reversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, los solutos más polares eluyen primero y la retención del soluto se incrementa aumentando la polaridad de la fase móvil. Dicha fase móvil suele estar formada por una mezcla de agua y un disolvente orgánico (metanol, acetonitrilo...). La elección del procedimiento de separación se basa en el tamaño, la polaridad y la naturaleza iónica del soluto. Dependiendo de la dificultad del problema, puede emplearse una elución isocrática, en la que la proporción de fase móvil no cambia durante el análisis, o en gradiente, en la que dicha proporción cambia a lo largo del análisis. Esta última se utiliza en casos más complejos como, por ejemplo, cuando varios contaminantes deben de ser analizados simultáneamente. A la salida de la columna cromatográfica, el contaminante genera una señal en el detector de UV/Vis, que se encuentra linealmente relacionada con su concentración y con las propiedades de absorción de luz del mismo.

Procedimiento

Previamente a su inyección en el HPLC-UV, la muestra a analizar es diluida mediante la adición del mismo disolvente orgánico empleado en el método de detección, en un porcentaje lo más parecido posible al usado en dicho método. Además, los posibles sólidos en suspensión presentes en la muestra se eliminan filtrándola una vez diluida, a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore Millex[®] GN). Este tratamiento previo de las muestras permite, no sólo evitar la adsorción del contaminante analizado sobre el filtro, sino que también desorbe los compuestos orgánicos que, en el caso de la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 , podrían estar adsorbidos al fotocatalizador. Por otro lado, la adición de disolventes orgánicos en la preparación de la muestra detiene las posibles reacciones que pudieran tener lugar en ausencia de luz (este efecto se denomina *quenching*) y distorsionarían los cálculos de cinéticas en experimentos fotolíticos y fotocatalíticos, sobre todo en el caso de los experimentos de foto-Fenton, ya que la reacción de Fenton puede transcurrir con una eficacia relevante en la oscuridad.

Las condiciones óptimas de detección, así como la fase móvil empleada, son específicas para cada compuesto estudiado y dependen de las características del mismo. En la **tabla 2.5** se muestran las condiciones propuestas para cada uno de los fármacos seleccionados. Todos los métodos desarrollados eran isocráticos, el caudal de la bomba cuaternaria era constante en 0.5 mL min^{-1} y el volumen inyectado fue siempre $20 \mu\text{L}$.

Tabla 2.5 Fase móvil y condiciones de detección en HPLC-UV para los fármacos estudiados.

Fármaco	Fase móvil (porcentajes)	Longitud de onda (nm)
FLU	Ácido Fórmico 25mM/Metanol (50/50)	223
TMP	Ácido Fórmico 25mM/H ₂ O/Metanol (50/40/10)	254
NXA	Ácido Fórmico 25mM/Metanol (50/50)	254

Para comprobar el correcto funcionamiento del equipo, diariamente se inyecta una disolución patrón con una concentración del contaminante que corresponde a la concentración inicial empleada en el experimento.

2.2.3 Cromatografía iónica. Determinación de aniones y cationes inorgánicos y ácidos carboxílicos

Descripción del equipo y fundamento teórico

Esta técnica analítica se emplea para la evaluación del grado de mineralización de las muestras tratadas mediante fotocatalisis solar, gracias a la medida de iones inorgánicos que aparecen como consecuencia de la liberación de los heteroátomos presentes en la molécula de los fármacos, sobre todo en forma de NO_3^- , NH_4^+ y, en especial para FLU, en forma de F^- . Además, este método permite determinar la concentración de ácidos carboxílicos que suelen formarse como productos intermedios previos a la completa mineralización del compuesto (acético, fórmico, propiónico, pirúvico, oxálico y maléico). Por otro lado, en la investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral, la medida de ciertas especies iónicas (NH_4^+ , NO_3^- y ácidos carboxílicos), permiten establecer, no sólo el nivel de nitrificación alcanzado en el birreactor, sino también la biodegradación de los ácidos carboxílicos procedentes de la fotocatalisis.

La cromatografía iónica es un método moderno y eficaz de separación y determinación de iones, que se basa en el uso de columnas cromatográficas que contienen resinas de intercambio iónico. Los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una disolución y los iones del mismo signo de la fase estacionaria. Existen dos tipos de resinas dependiendo de la naturaleza del ión retenido, por un lado están las resinas de intercambio catiónico cuyos puntos activos más comunes son los grupos de ácido sulfónico (H^+SO_3^- , ácido fuerte), y los de ácidos carboxílicos (H^+COO^- , ácido débil). Y por otro, las resinas de intercambio aniónico que contienen grupos de amina cuaternaria ($\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$, base fuerte), o grupos de amina primaria (NH_3^+OH^- ; base débil) (Skoog, 1996). La fase móvil empleada en los equipos de cromatografía iónica consiste en una solución acuosa (agua desmineralizada) de iones que compiten con los analitos de los puntos activos de la fase estacionaria. Para la medida de aniones, las fases móviles más

usadas contienen hidrógeno carbonato/carbonato, hidróxido o una mezcla de ácido bórico y tetraborato. Las fases móviles más empleadas para la determinación de cationes contienen normalmente ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico o ácido clorhídrico.

El detector más comúnmente empleado en la cromatografía iónica es el detector de conductividad, que registra cualquier aumento en la conductividad eléctrica de la fase móvil a medida que el analito va pasando por el detector, y una vez separado en la columna de intercambio iónico. Estos detectores pueden tener una elevada sensibilidad, son universales para las especies cargadas y, como norma general, responden de una forma predecible a los cambios de concentración. Sin embargo, presentan una limitación procedente de la elevada concentración de electrolito que se requiere para eluir la mayoría de los iones analitos en un tiempo razonable. Por ello, la conductividad de los componentes de la fase móvil tiende a enmascarar la de los analitos, reduciéndose así considerablemente la sensibilidad del detector. Este problema fue resuelto en 1975 gracias al uso de una columna supresora de membrana en la que el eluyente y la disolución supresora fluyen en direcciones opuestas a ambos lados de unas membranas permeables de intercambio iónico, convirtiendo el eluyente en una forma no iónica de manera que los analitos puedan detectarse por su conductividad con mayor sensibilidad.

El equipo empleado para la detección de aniones y ácidos carboxílicos es un Dionex DX-600 equipado con un muestreador automático (Dionex AS40), una bomba cuaternaria de gradiente (Dionex GP50), un horno termostaticado (Dionex LC30) y un detector de conductividad (Dionex ED50). En primer lugar, la fase móvil pasa a través de una trampa de aniones (Dionex Ionpac ATC-3), que garantiza la pureza de la misma, para fluir a continuación a través de la pre-columna (Dionex Ionpac AG11-HC 4 x 50 mm), la columna cromatográfica (Dionex Ionpac AG11-HC 4 x 250 mm), una supresora (Dionex ASRS- Ultra II 4mm) y la celda de conductividad eléctrica. Esta supresora trabaja usando programas de gradiente y en el modo de operación que se conoce como *AutoSuppression Recycle Mode*, en el que el flujo a la salida del detector se introduce en un bote cerrado y completamente lleno, de 250 mL de capacidad, que alimenta de nuevo a la supresora, permitiendo proporcionar a la misma una solución regeneradora de composición estable.

El sistema cromatográfico usado en la detección de cationes es un equipo Dionex DX-120 que consta de un muestreador automático (Dionex AS40), una bomba cuaternaria, una pre-columna (Dionex Ionpac CG-12A 4 x 50 mm), una columna cromatográfica (Dionex Ionpac CS12A 4 x 250 mm), una supresora (Dionex CSRS-Ultra 4 mm) y una celda de conductividad eléctrica. A la salida de la celda, el efluente se introduce en el puerto de

regeneración de la supresora, de forma que ésta trabaja en la configuración estándar con programas isocráticos.

La señal emitida por el detector genera un pico cuya área se evalúa mediante una calibración interna. La respuesta del detector de conductividad no es lineal en todo el rango de medida, por lo que se realizan varias rectas de calibrado dentro del rango en el que la respuesta es lineal: 0-1 mg L⁻¹, 1-10 mg L⁻¹ y de 10-50 mg L⁻¹ (tanto para aniones como para cationes). Para el caso del amonio, las curvas de calibrado se ajustan a un polinomio de segundo grado debido a que el grado de disociación de ácidos débiles a bases débiles a pH neutro se ve afectado por su concentración. El rango para las rectas de calibrado de los ácidos carboxílicos es ligeramente diferente: 0-1 mg L⁻¹, 1-5 mg L⁻¹ y 5-20 mg L⁻¹. La desviación estándar de ambos equipos es aproximadamente del 3%. La rutina de funcionamiento de los equipos, así como la evaluación y adquisición de los datos se lleva a cabo mediante la conexión a un ordenador en el que está instalado el software Chromeleon®.

Procedimiento

Las muestras procedentes de un tratamiento fotocatalítico heterogéneo con TiO₂ son filtradas directamente sobre los propios viales proporcionados por Dionex a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore Millex® GN). Sin embargo, para aquellas muestras procedentes de fotocatálisis homogénea con foto-Fenton deberán diluirse previamente a su filtración debido a la presencia, en algunos casos, de una alta concentración de sulfatos procedente de la acidificación del sistema con ácido sulfúrico. A su vez, las muestras provenientes del sistema biológico fueron filtradas a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore Millex® GN) y, cuando era necesario, fueron previamente diluidas debido a la presencia de elevadas concentraciones de sulfato y sodio, presentes en el sistema debido al control de pH, y de amonio, derivado de la acción de los microorganismos. A continuación, se introducen los viales en el muestreador automático. Las condiciones de operación de los dos equipos y de detección de los iones inorgánicos y ácidos carboxílicos se muestran en la **tabla 2.6**.

Tabla 2.6 Fase móvil y condiciones de detección en los Cromatógrafos Iónicos

Equipo	Iones	Caudal bomba	Fase móvil (porcentajes)
Dionex DX-120	Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	1.2 mL min ⁻¹	H ₂ SO ₄ 20 mM (isocrático)
Dionex DX-600	Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , F ⁻ , SO ₄ ²⁻ , PO ₄ ³⁻	1.5 mL min ⁻¹	H ₂ O/ NaOH 100 mM (80/20): 0-8 min H ₂ O/ NaOH 100 mM (65/35): 8-15 min (Gradiente)
Dionex DX-600	Acetato, formiato, propionato, piruvato, oxalato y maleato	1.5 mL min ⁻¹	H ₂ O/ NaOH 5 mM (80/20): 0-8 min H ₂ O/ NaOH 5 mM (80/20): 8-18 min H ₂ O/ NaOH 100 mM (85/15): 18-28 min H ₂ O/ NaOH 100 mM (70/30): 28-38 min (Gradiente)

El buen funcionamiento de ambos equipos, así como la correcta calibración de los mismos, se comprueba mediante la inyección diaria de disoluciones patrón de cada uno de los iones que se van a medir. Para el caso de los aniones, se introduce un patrón de 10 mg L⁻¹ de cada uno de ellos, en los cationes el patrón se prepara de 2.5 mg L⁻¹ y, puesto que la concentración esperada de ácidos carboxílicos al final de un proceso fotocatalítico es muy pequeña, se inyecta un patrón que contenga 1 mg L⁻¹ de cada uno de ellos.

2.3 Técnicas analíticas avanzadas

2.3.1 Pretratamiento de las muestras: extracción en fase sólida (SPE)

Descripción de la técnica y fundamento teórico

El análisis de los productos de transformación (PT) generados durante los procesos fotolíticos y fotocatalíticos presenta una serie de dificultades como consecuencia de los bajos niveles de concentración de estos compuestos durante los tratamientos. En este contexto, son requeridos procedimientos de extracción que sean selectivos y eficaces, para poder llegar a conseguir buenos resultados en la extracción y preconcentración de los analitos de interés.

Actualmente, las técnicas de enriquecimiento de trazas que utilizan SPE se han impuesto como alternativa a las técnicas clásicas, como la extracción líquido-líquido (LLE), que es laboriosa, consume grandes cantidades de disolventes, y proporciona bajas recuperaciones para muchos analitos polares por su relativamente alta solubilidad en agua. La SPE se ha desarrollado mucho, con mejoras en el formato, automatización y con la introducción de nuevos adsorbentes, convirtiéndose en la técnica de preparación de muestra más utilizada para el análisis de fármacos y sus PT en muestras acuosas. Se trata de una técnica más selectiva, reproducible y con un gasto bajo de disolventes orgánicos en comparación con la LLE y fácilmente automatizable. Además esta técnica permite la extracción, purificación, concentración y/o cambio de disolvente de solutos. La SPE se puede realizar *off-line*, cuando el tratamiento de muestra está completamente separado del análisis cromatográfico, u *on-line* cuando está directamente integrado en el sistema analítico. En el procedimiento de SPE *off-line*, la extracción se lleva a cabo en un adsorbente sólido empacado a baja presión en membranas de extracción o en un cartucho (véase **figura 2.2**). El formato más utilizado para extraer fármacos de muestras acuosas son las minicolumnas, si bien algunos autores han utilizado discos de poliestireno-divinilbenzeno.



Figura 2.2 Fotografía de un cartucho utilizado en SPE.

Una secuencia típica de SPE consiste en varios pasos:

- i) Acondicionamiento del adsorbente;
- ii) Carga de la muestra a un flujo lo suficientemente bajo (ej. 10 ó 20 mL min⁻¹) para asegurar una adsorción eficiente de los analitos en el adsorbente;
- iii) Lavado del cartucho, cuando sea posible, para eliminar interferencias de matriz;
- iv) Secado, normalmente con flujo de nitrógeno, para eliminar la mayor parte de agua posible;
- v) Desorción y recuperación de los analitos mediante la elución con un disolvente orgánico.

Normalmente, el volumen final obtenido se reduce completa o casi completamente con un flujo suave de nitrógeno y se reconstituye con el disolvente apropiado para su posterior análisis. En la **figura 2.3** se puede observar el sistema de SPE utilizado en este estudio.

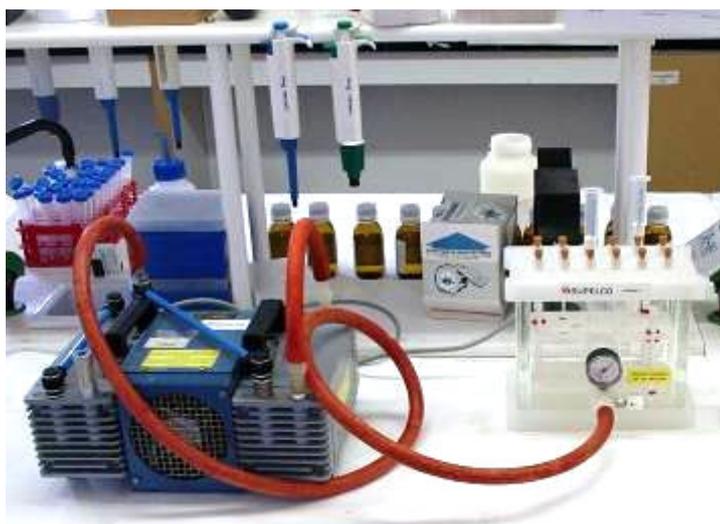


Figura 2.3 Sistema utilizado para la preconcentración de muestras con SPE utilizando cartuchos.

La SPE permite la extracción simultánea de varios cartuchos utilizando unidades de extracción múltiple que trabajan bajo presión positiva o negativa. Asimismo, la secuencia de extracción puede automatizarse completamente mediante dispositivos automáticos comercialmente disponibles.

El desarrollo experimentado por la SPE nos permite disponer de un gran número de adsorbentes comerciales. Los más usados para extraer fármacos de matrices acuosas son las sílicas químicamente enlazadas con grupos n-alquil (C-8, C-18), copolímeros apolares y adsorbentes de carbón. Existen también adsorbentes más selectivos, como los de intercambio iónico, inmunoadsorbentes, adsorbentes de acceso restringido (RAM) o polímeros de impresión molecular (MIP).

El mecanismo de retención del analito en el adsorbente depende de las características del mismo y puede estar basado en interacciones tipo dipolo/dipolo-, ion/dipolo-, interacciones hidrofóbicas, dispersión o intercambio iónico. La diversidad de materiales disponible permite un ajuste específico de la SPE con los respectivos analitos.

Cuando se desarrolla un método de extracción, es necesario tener una idea inicial de la polaridad de los analitos objetos de estudio. Un parámetro que puede utilizarse como criterio para establecer la polaridad de un determinado compuesto es el coeficiente de partición octanol-agua (k_{ow}) y/o el pKa del compuesto inicial. La solubilidad en agua de un compuesto depende de la temperatura y del pH, y es un parámetro que también conviene conocer a la hora de diseñar un método de extracción. Nos puede dar una idea de la afinidad de los analitos por el adsorbente de SPE. Los compuestos muy solubles en agua pueden ser difíciles de retener por el adsorbente de SPE y tampoco se extraen bien mediante LLE.

En la actualidad, los adsorbentes poliméricos son los más utilizados para la extracción de fármacos y otros contaminantes orgánicos en aguas, por su capacidad de retener analitos en una gama muy amplia de polaridades y su gran estabilidad en todo el rango de pH. Durante los años 90 se desarrolló una nueva generación de adsorbentes basados en el empleo de copolímeros altamente enlazados (Isolute 101®, LiChrolut® EN, Isolute ENV+®, Oasis HLB®, StrataX®) o en copolímeros mixtos conteniendo grupos intercambiadores de cationes (Oasis MCX®) o de aniones (Oasis MAX®). Su alto grado de entrecruzamiento y su estructura abierta, les confieren una porosidad muy alta y una mayor superficie específica permitiendo que las interacciones π - π entre el soluto y el adsorbente sean mayores. Estos adsorbentes presentan mejores características de humedecimiento y transferencia de masa,

que les permite una eficiente preconcentración de los analitos y unos altos factores de enriquecimiento.

Actualmente, el adsorbente Oasis HLB® (Waters) es de los más comúnmente utilizados para extraer residuos de fármacos polares y apolares simultáneamente. Se trata de un adsorbente de balance hidrofílico-lipofílico que le confieren los monómeros de los que está compuesto, el divinilbenceno y la N-vinilpirrolidona. Esta propiedad, le permite poder secarse antes de la carga de la muestra sin disminuir la capacidad de retención de los analitos (Gómez, 2008). En la **figura 2.4** se presenta la estructura química del adsorbente Divinilbenzeno-N-vinilpirrolidona (Oasis HLB®).

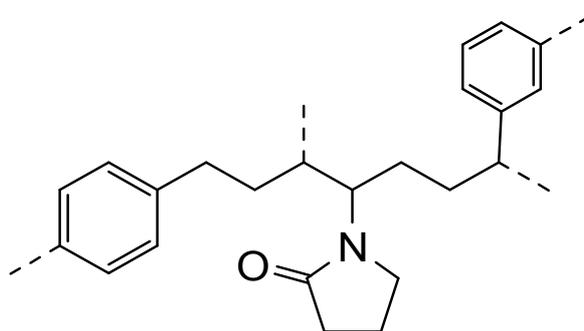


Figura 2.4 Estructura química del adsorbente Divinilbenzeno-N-vinilpirrolidona (Oasis HLB®).

A pesar de que la extracción simultánea de una amplia gama de analitos es deseable para obtener métodos rápidos y sencillos, hay una serie de limitaciones que hay que tener en cuenta:

- Compuestos muy polares pueden perderse fácilmente durante la “carga” de la muestra debido su baja afinidad por el adsorbente.
- Compuestos no polares, con baja solubilidad en agua, pueden dar bajas recuperaciones, debido a su adsorción en los tubos de conexión y recipientes empleados para la extracción o a una incompleta desorción de los mismos, fuertemente retenidos en los adsorbentes.
- Compuestos ionizables pueden requerir un ajuste de pH para mejorar su retención en los adsorbentes. Además, hay fármacos que son sólo estables en un intervalo específico de pH.
- Pérdidas de los compuestos más volátiles durante la etapa de evaporación o de la reconstitución de los extractos secos. Generalmente los fármacos no son compuestos muy volátiles y no sufren pérdidas significativas durante la etapa de evaporación.

Procedimiento

Las muestras fueron extraídas y pre-concentradas mediante SPE, utilizando un regulador de vacío Supelco Visiprep™, (véase **figura 2.3**). Con este fin, se utilizaron minicolumnas Oasis® HLB (divinilbenzeno/*N*-vinilpirrolidona) de 6 cm³ con 200 mg de adsorbente (Waters, Miliford, USA). Este adsorbente fue seleccionado por su capacidad de proporcionar una adecuada recuperación para analitos en un amplio rango de polaridades (Pichon, 2000; Pérez-Estrada y cols., 2005), como se ha mencionado anteriormente.

Se aplicó el siguiente esquema general de extracción:

- Acondicionamiento: 4 mL de metanol + 2 mL de agua desmineralizada;
- Carga: 50 mL de muestra, a un flujo aproximado de 10 mL min⁻¹;
- Limpieza del cartucho (cuando fue necesario): 3 mL de agua desmineralizada para las muestras que inicialmente presentaban una alta concentración de sales.
- Elución: con dos porciones de 4 mL de metanol, flujo de 1 mL min⁻¹.

Los eluatos obtenidos fueron concentrados, evaporando el disolvente con una corriente suave de nitrógeno, hasta un volumen final de 1 ó 2 mL en metanol. Estos extractos fueron diluidos convenientemente con agua ultra pura para su análisis en LC-MS. Los extractos fueron conservados en oscuridad y refrigeración para prevenir cualquier degradación posterior.

2.3.2 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Descripción del equipo y fundamento teórico

La técnica LC-MS con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS) ofrece unas características muy ventajosas para la identificación de compuestos desconocidos. Permite llevar a cabo medidas de masa exacta de iones de interés (tanto moléculas como fragmentos) para confirmar o proponer fórmulas moleculares para tales compuestos, aun en ausencia de estándares o bibliotecas de espectros. Tras obtener la composición elemental del compuesto de interés, se lleva a cabo un estudio exhaustivo de elucidación estructural utilizando la información proporcionada por esta misma técnica. Una descripción más detallada fue abordada en el capítulo 1 de esta Memoria Doctoral, en los **epígrafes 1.5.2 y 1.5.3**.

Para el análisis de las muestras mediante LC-MS se utilizó un analizador de tiempo de vuelo (TOF) con interfaz *electrospray* (ESI) (véase **figura 2.5**), operado en modo de ionización positiva. La muestra fue separada utilizando un sistema HPLC Agilent Technologies Series 1100 (Palo Alto, CA, USA), consistente en un desgasificador a vacío, automuestreador y

bomba binaria de pistón. Este sistema, cuando el ESI era operado en modo positivo, contaba con una columna analítica C18 de fase reversa (Zorbax SB-C18) de 150 mm x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μm . La temperatura de la columna se mantuvo a 25° C. La fase móvil consistió en acetonitrilo (canal A) y agua desmineralizada con 0,1% de ácido fórmico (canal B). El gradiente de temperatura utilizado durante el análisis empezaba con 90% de B, permaneciendo inalterado durante los primeros 5 min del análisis y, después disminuyendo hasta 0% en 40 min, manteniéndose estable durante 5 min.

El detector de masas de tiempo de vuelo (TOF) utilizado fue un Agilent MSD TOF (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con interfase de electroespray (ESI). El registro de la masa exacta se realizó en el rango de 50 a 1000 m/z, y los datos se obtuvieron a través de los software Analyst QS Applied Biosystems / MDS – SCIEX (Frankfurt, Germany) y MassHunter Workstation de Agilent Technologies (USA).

Este equipo se mantiene calibrado, usando la mezcla proporcionada por el fabricante, en el rango de 50 – 3200 m/z. Un segundo spray, colocado de manera ortogonal es utilizado con una solución de referencia proporcionando un calibrado continuo, usando las siguientes masas de referencia: 121.0509 y 922.0098 m/z (resolución: $9500 \pm 500 @ 922.0098$ m/z).

Procedimiento

Previamente a su inyección en LC-TOF-MS, cuando necesario, la muestra a analizar era diluida mediante la adición de agua desmineralizada. Las condiciones óptimas de detección, así como la fase móvil empleada, fue la misma para todos los fármacos modelo estudiados en esta memoria doctoral. Durante la separación cromatográfica mediante HPLC, el caudal de la bomba cuaternaria era en todos los casos 0.4 mL min^{-1} y el volumen inyectado fue siempre 20 μL . Las condiciones de operación de la ESI en modo positivo fueron: voltage del *skimmer* 60V; octapolo rf 250V; temperatura del gás 300 °C; gás de arrastre 9 L min^{-1} ; nebulizador 40 psig; capilar 4000V. Con vistas a incrementar la fragmentación, en muchos estudios se han utilizado distintos voltajes de fragmentación: 190 V, 230 V, 260 V y 270V.



Figura 2.5 Foto ilustrativa del sistema TOF-MS Agilent utilizado para la determinación de los PT generados.

2.4 Otros métodos analíticos y procedimientos experimentales

2.4.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Fundamento teórico

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) determina la cantidad de oxígeno requerida para oxidar la materia orgánica en una muestra de agua residual, bajo condiciones específicas de agente oxidante, temperatura y tiempo. Las sustancias oxidables presentes en la muestra se oxidan en solución fuertemente ácida con un exceso conocido de dicromato de potasio en presencia de sulfato de plata, que actúa como agente catalizador. Después de dos horas de digestión a 148°C, la concentración de iones Cr^{3+} de color verde generados a partir del dicromato son determinados por espectrofotometría. La norma que regula el protocolo seguido en este método es la ISO 15705.

La medida de la DQO en aquellas muestras procedentes de un tratamiento mediante fotocatalisis solar, permite el cálculo de un parámetro denominado Estado de Oxidación Media (EOM), que da una idea de la evolución del grado de oxidación de la mezcla, así como de las etapas de la fotocatalisis en qué es más conveniente realizar ensayos de biodegradabilidad para averiguar si ésta ha mejorado con respecto a su valor inicial. El EOM

es una relación entre la DQO y el COD, calculado de acuerdo con la **ecuación 1.2**, presentada en la parte introductoria de esta Memoria Doctoral en el **epígrafe 1.4.4**.

Procedimiento.

La determinación de la DQO se realiza con los kit Spectroquant® de Merck. El rango de medida empleado en todos los experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral fue de 10-150 mg O₂L⁻¹ (ref: 1.14540.0001).

En primer lugar, se homogeniza la muestra y se diluye, si es preciso, para que el valor esperado se encuentre comprendido entre los límites de detección. Se toma el tubo de reacción que contiene dicromato de potasio y sulfato de plata, y se agita por balanceo hasta que los sólidos depositados en el fondo (sulfato de plata) se disuelvan completamente. A continuación, se añaden 3 mL de muestra, se agita vigorosamente y el tubo se introduce en un *termoblock* durante dos horas a 148°C. Después, se deja enfriar a temperatura ambiente durante unos 30 min y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro Spectroquant® NOVA 30 de Merck a una longitud de onda de 445 nm.

El buen funcionamiento y la calidad de las medidas de DQO se evalúa mediante el uso de una recta externa de calibrado. Por otro lado, la presencia de pequeñas cantidades de H₂O₂ en las muestras altera la medida de DQO, puesto que el peróxido de hidrógeno es una sustancia oxidante que puede reaccionar con las sustancias orgánicas presentes en la muestra. Para evitar este efecto y garantizar la buena calidad de los análisis de DQO, se le añade Catalasa a las muestras según el procedimiento descrito en el **apartado 2.4.3**, de forma que se elimine todo el peróxido de hidrógeno residual.

La recta de calibrado para el rango de medida de 10-150 mg O₂L⁻¹ se ha obtenido mediante la medida de la absorbancia, a 445 nm de longitud de onda, de disoluciones de concentración conocida de hidrógeno ftalato potásico, que se corresponden con una DQO teórica también conocida (todas las medidas se hicieron por triplicado). La recta de calibrado calculada a partir de dichos datos es la siguiente (**ecuación 2.1**):

$$\begin{aligned} DQO \text{ (mg L}^{-1}\text{)} &= 317.83 - 209.66 \times \text{Absorbancia} \\ R^2 &= 0.9989 \end{aligned} \tag{2.1}$$

2.4.2 Determinación del peróxido de hidrógeno mediante método espectrofotométrico (metavanadato de amonio)

Fundamento teórico

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el reactivo consumido en los experimentos de fotocatalisis solar homogénea (foto-Fenton), por lo tanto la determinación de su consumo y concentración en cada instante del proceso, es fundamental para la evaluación de la eficiencia de la oxidación química.

La determinación de H_2O_2 durante los experimentos de foto-Fenton se realizó mediante espectrofotometría UV-visible, de acuerdo con metodología descrita por Nogueira y cols. (2005). Este método se basa en la reacción del H_2O_2 con el reactivo metavanadato de amonio en medio ácido, que da lugar a la formación de un catión de color rojo-anaranjado denominado peroxovanadio (véase **reacción 2.1**), lo cual presenta una absorción máxima en 450 nm.



Otra ventaja adicional a la sencillez y rapidez de este método, está en el hecho de que la reacción entre el metavanadato con el H_2O_2 no se ve afectada por la presencia de iones tales como Cl^- y NO_3^- , los cuales están generalmente presentes en aguas residuales, o con el Fe^{3+} añadido en la reacción de Fenton habitualmente presente al final del proceso de fotodegradación, debido a la conversión rápida de Fe^{2+} a Fe^{3+} .

Procedimiento

Para la medida de H_2O_2 , en un matraz de 10 mL, se toman entre 1 y 8 mL de muestra previamente filtrada a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore Millex® GN), y se añade 1.03 mL de solución de metavanadato de amonio (0.06 mol L^{-1}) preparada con H_2SO_4 (0.36 mol L^{-1}), completándose el volumen final del matraz con agua desmineralizada. Después se mide la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm y cubeta de un 1 cm de paso de luz en un espectrofotómetro (Unicam-II). En el caso en el que las muestras no estén coloreadas, se hace el cero del equipo poniendo agua desmineralizada en la posición de la muestra y aire en la referencia, y las muestras se miden siempre con aire como referencia. Sin embargo, cuando la muestra está coloreada, el cero se hace colocando agua desmineralizada en la posición de la muestra y de la referencia, y para la medida de la muestra se introduce en la referencia una segunda cubeta que contenga una solución formada por un volumen satisfactorio de la muestra filtrada y agua desmineralizada para enrasar el matraz.

A partir de los datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro se calcula la concentración de H_2O_2 utilizando la ecuación desarrollada por Nogueira y cols. (véase **ecuación 2.2**). En esta ecuación ΔA_{450} representa la diferencia de la absorción entre la muestra y el blanco a una longitud de onda de 450 nm y $[\text{H}_2\text{O}_2]$, la concentración de H_2O_2 en mol L^{-1} . La pendiente de la curva es la absortividad molar (ϵ) que es de $283 \pm 2 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; V_1 es el volumen de la alícuota tomada para el análisis (mL, entre 1 y 8) y V_2 es el volumen final (10 mL).

$$\Delta A_{450} = 283[\text{H}_2\text{O}_2] \frac{V_1}{V_2} \quad (2.2)$$

El buen funcionamiento y la calidad de las medidas de H_2O_2 se evalúa mediante el uso de una recta externa de calibrado expresada como (**ecuación 2.3**):

$$[\text{H}_2\text{O}_2] (\text{mg L}^{-1}) = 0.0067 \times \text{Absorbancia} - 0.003$$

$$R^2 = 0.9994 \quad (2.3)$$

2.4.3 Método de adición de Catalasa para la eliminación del H_2O_2

Fundamento teórico

La eliminación del peróxido de hidrógeno presente en las muestras pre-tratadas mediante fotocatalisis solar, se hace necesaria no sólo desde el punto de vista de la detención de la reacción Fenton que tiene lugar en la oscuridad, sino también para llevar a cabo los análisis de toxicidad, biodegradabilidad y DQO con una alta fiabilidad. Por un lado el H_2O_2 interfiere en las medidas de DQO llevadas a cabo mediante kits de Merck (**epígrafe 2.4.1**), y por el otro, la presencia de este oxidante aumenta la toxicidad y disminuye la biodegradabilidad de la muestra enmascarando el comportamiento real del agua parcialmente tratada.

El método de adición de Catalasa emplea catalasa de hígado de bovino (Sigma-Aldrich, 2300 unidades mg^{-1}), que es una enzima capaz de neutralizar formas tóxicas derivadas del oxígeno (como el H_2O_2), que se forman en los ambientes acuosos que contienen oxígeno disuelto, como el citoplasma de las células. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Una unidad de catalasa descompone 1 μmol de peróxido de hidrógeno por minuto a pH 7 y a 25°C aproximadamente.

Procedimiento

En primer lugar se prepara una disolución de catalasa a una concentración de 0.1 g L^{-1} con agua ultra pura (Milli-Q). La preparación de esta disolución debe realizarse cada dos días de forma que se mantenga la actividad de la catalasa. Además, esta enzima se inactiva a pH

por encima de 8 y por debajo de 5, con lo que las muestras a las que se pretende añadir catalasa deben de ser previamente neutralizadas a un pH entre 6 y 7.

Normalmente se añade unas tres veces más catalasa de la necesaria para eliminar el peróxido de hidrógeno presente en las muestras y garantizar una actividad satisfactoria. Para ello, se establece una adición de 0.5 mL de la disolución de catalasa a unos 25 mL de muestra y un tiempo de reacción de 10 min, para eliminar una concentración de 20 mM de H₂O₂.

Como parámetro de control que permite establecer el buen funcionamiento de este método se comprueba la eliminación de peróxido de hidrógeno mediante la medida de su concentración en alguna de las muestras con las tiras de Merck (0-5 mg L⁻¹ de rango).

2.4.4 Determinación del hierro en disolución mediante método espectrofotométrico (ISO 6332)

Fundamento teórico

El ión ferroso interviene como catalizador en la oxidación en fase homogénea con H₂O₂/UV, de los fármacos modelo seleccionados y del agua industrial real tratados mediante el proceso foto-Fenton. En este contexto, la presencia de Fe²⁺ es sumamente importante en la correcta consecución de la degradación por foto-Fenton de los contaminantes. Un pH superior a 3 y la presencia de iones fosfato (cianuros o nitritos) provocan la precipitación del mismo una vez oxidado a Fe³⁺ en forma de hidróxido férrico y fosfato férrico (cianato o nitrito), respectivamente. Según estas consideraciones, la determinación de la cantidad de hierro resulta imprescindible para asegurar el correcto funcionamiento del tratamiento mediante foto-Fenton.

El ión ferroso disuelto forma un complejo de color rojo con tres moléculas de 1,10-fenantrolina. La formación de este complejo se da en un intervalo de pH comprendido entre 2 y 9. Aunque éste es suficientemente amplio para asegurar la formación cuantitativa del complejo, es necesario mantener un pH entre 3 y 3.5, con lo que la medida se lleva a cabo en una solución tampón (ácido acético/acetato). La absorbancia del complejo Fe²⁺ con 1,10-fenantrolina medida a 510 nm es proporcional a la concentración de ión ferroso.

La presencia de otros agentes oxidantes (como el H₂O₂) en solución interfieren en este método analítico, puesto que oxidan al ión ferroso a férrico, el cual no forma complejo con la fenantrolina. Por otro lado, existen diversos metales pesados que forman complejos también con la fenantrolina, como son Cr³⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, y otros que precipitan con ella: Ag²⁺, Bi³⁺, Hg²⁺, Cd²⁺, MoO₄²⁻. Además el color que pueden presentar las muestras

procedentes del foto-Fenton supone también una interferencia importante a tener en cuenta, ya que se trata de un método espectrofotométrico. Existen publicados diferentes procedimientos que se aplican para la eliminación de estas interferencias (APHA, 1998). En este trabajo de investigación las principales interferencias que se encuentran son las debidas al color de la muestra y al H_2O_2 .

Debido a la presencia de peróxido de hidrógeno en el tratamiento con foto-Fenton el ión ferroso se oxida rápidamente a férrico, con lo que en la mayoría de las muestras se mide hierro total al reducir todo el Fe^{3+} en solución a Fe^{2+} mediante la adición de ácido ascórbico. De esta forma es posible comprobar si la cantidad de catalizador añadida al inicio del proceso se mantiene constante durante el mismo, o si por el contrario está disminuyendo debido a su precipitación.

Procedimiento

Para la medida de hierro total, se toman 4 mL de muestra previamente filtrada a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de $0.22\ \mu m$ (Millipore Millex[®] GN), y se añade 1 mL de solución 1,10-fenantrolina ($1\ g\ L^{-1}$) y 1 mL de solución tampón ($250\ g\ L^{-1}$ de acetato amónico y $700\ mL\ L^{-1}$ de ácido acético en agua desmineralizada). Se añade a la mezcla una espátula de ácido ascórbico de forma que el ión férrico se reduzca a ión ferroso y se pueda medir la absorbancia del complejo Fe^{2+} -fenantrolina. Después de 1 minuto se mide la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y cubeta de un 1 cm de paso de luz en un espectrofotómetro (Unicam-II). En el caso en el que las muestras no estén coloreadas, se hace el cero del equipo poniendo agua destilada en la posición de la muestra y aire en la referencia, y las muestras se miden siempre con aire como referencia. Sin embargo, cuando la muestra está coloreada, el cero se hace colocando agua destilada en la posición de la muestra y de la referencia, y para la medida de la muestra se introduce en la referencia una segunda cubeta que contenga una solución formada por los 4 mL de muestra filtrada, 1 mL de solución tampón, 1 mL de agua destilada (en lugar de fenantrolina) y una espátula de ácido ascórbico.

A partir de los datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro se calcula la concentración de hierro utilizando una recta de calibración externa realizada para un rango de concentraciones de 0.25 a $10\ mg\ L^{-1}$ de hierro (**ecuación 2.4**).

$$C_{Fe} (mg\ L^{-1}) = (7.4219 \times Absorbancia - 0.0369) \times factor\ de\ diluci3n \quad (2.4)$$
$$R^2 = 0.9999$$

El buen funcionamiento del espectrofotómetro así como la buena calidad de las disoluciones empleadas, se demuestra mediante la medida de la primera muestra justo después de la adición del catalizador (Fe^{2+}) y una vez bien homogeneizada. Si el pH se encuentra por debajo de 3 la concentración de ión ferroso resultante debe de corresponderse exactamente con la que teóricamente se ha añadido al reactor, puesto que el volumen del mismo es conocido.

2.5 Bioensayos

2.5.1 Ensayo basado en la bioluminiscencia de la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Biofix® Lumi) (UNE_EN_ISO-11348_1998)

En la actualidad existen diversos ensayos de laboratorio para la determinación experimental de la biotoxicidad aguda de un agua determinada. La respuesta biológica de ciertos organismos expuestos a ésta, permite tomar decisiones acerca del vertido apropiado o no, así como de las consecuencias que podría tener sobre algunos de los parámetros de calidad del medio ambiente. Sin embargo, los ensayos de toxicidad no proporcionan una respuesta absoluta al riesgo que un efluente en particular puede suponer para la población humana. Es decir, una escasa toxicidad sobre peces u otros animales de laboratorio no implica el mismo efecto para el ser humano.

Diversas correlaciones sobre la toxicidad en diferentes especies han sido anteriormente descritas, pero aún así no es fácil extrapolar los resultados obtenidos de unas especies a otras, o utilizarlos para hacer predicciones sobre los efectos dañinos que un agua tratada o efluente podrían tener sobre el ser humano y el medio ambiente (Hodson, 1985).

En esta Memoria Doctoral se han seleccionados dos ensayos de toxicidad aguda considerados representativos, rápidos y baratos. Uno basado en la inhibición de la luminiscencia emitida por la bacteria *Vibrio fischeri*, y el segundo basado en la movilidad del crustáceo *Daphnia magna*.

Fundamento teórico

Este bioensayo determina la toxicidad aguda de un agua basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*, NRRL B-11177) en presencia de agentes contaminantes. La toxicidad se expresa como la concentración de compuesto que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC_{50}) para contaminantes puros, y como porcentaje de inhibición de la emisión de luz para aguas conteniendo diferentes contaminantes.

Vibrio fischeri (véase **figura 2.6**) es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa, de la familia *Vibrionaceae* cuya característica más representativa es la bioluminiscencia (producción de luz por parte de ciertos organismos vivos). Es importante destacar la estabilidad en la emisión de luz así como la gran sensibilidad que presenta a una amplia variedad de sustancias tóxicas.

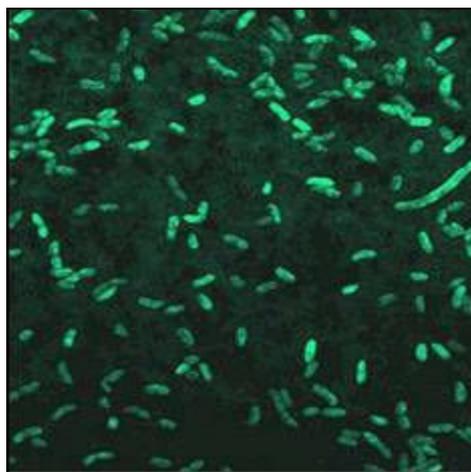


Figura 2.6 Imagen de bacterias de la especie *Vibrio fischeri*.

La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia.

Las posibles interferencias que se pueden encontrar en la medida de la toxicidad aguda mediante este método pueden tener lugar cuando: i) se utilizan sustancias insolubles, débilmente solubles o volátiles, así como las sustancias que reaccionen con la suspensión de ensayo, es decir, con el NaCl; ii) son producidas pérdidas de luminiscencia provocadas por la adsorción o la dispersión de la luz en caso de aguas fuertemente coloreadas o turbias y, finalmente; iii) las concentraciones de sal en la muestra inicial son superiores a 20 g L^{-1} de NaCl, o los contenidos de otros compuestos que produzcan una osmolaridad equivalente que pueden conducir a efectos hiperosmóticos.

Procedimiento

En este trabajo de investigación se han empleado *kits* comercialmente conocidos como BioFix®Lumi *Multi-shot* bacterias luminiscentes para 200 determinaciones de Macherey-

Nagel (referencia: 945 007), que incluye la solución reconstituyente. Cada *kit* de bacterias incluye un certificado de calidad en conformidad con la UNE_EN_ISO 11348-3.

El luminómetro empleado para la medida de la bioluminiscencia emitida por las bacterias es conocido comercialmente como Biofix[®]Lumi-10 (Macherey-Nagel), que dispone de un detector *Ultra Fast Single Photon Counter* (Contador ultra rápido de fotones), con un rango espectral de 380 a 630 nm, dando como respuesta el efecto inhibitor o porcentaje de inhibición de la actividad bioluminiscente de la bacteria después de 5, 15 y 30 min de exposición.

El tratamiento de las muestras previo a su análisis requiere, en primer lugar, la eliminación de sólidos en suspensión mediante su filtración a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore Millex[®] GN) y, en el caso de proceder de experimentos de foto-Fenton, es necesario eliminar el peróxido de hidrógeno que pueda quedar en la muestra mediante el método de la Catalasa explicado en la **sección 2.4.3**. Las muestras que sean coloreadas deben ser diluidas para reducir el color, de forma que no interfiera en la medida.

En primer lugar es necesario medir el pH de las muestras y ajustarlo, si es preciso, entre 6 y 8.5. Después, se ajusta la salinidad de las muestras al 2% (p/v) mediante la adición de NaCl sólido.

A continuación se procede a la reconstitución de las bacterias liofilizadas adicionando 11 mL de solución reconstituyente (referencia: 945 007), previamente atemperada a 4° C en el frigorífico durante 30 min. Al cabo de este tiempo se dosifican 500 μL de suspensión bacteriana en cada vial y, después de 10 min de estabilización (siempre a 15° C), se realiza la medida de luminiscencia inicial. Una vez finalizada ésta se añaden 500 μL de la muestra y se espera el tiempo de incubación requerido (5, 15 ó 30 min). Inmediatamente después de realizar la medida final de intensidad de luz (pasado el tiempo de incubación), el equipo da el valor del porcentaje de inhibición correspondiente a esa muestra.

En todos los ensayos, se lleva a cabo una evaluación de la viabilidad de las bacterias una vez reconstituidas. Para ello se prepara un control con igual procedimiento al descrito anteriormente pero al que se le añaden 500 μL de solución salina al 2% en lugar de una muestra.

2.5.2 Ensayo basado en la movilidad del crustáceo *Daphnia magna*

Fundamento teórico

Daphnia magna es un invertebrado, perteneciente a los crustáceos, del suborden *Diplostracos* o *Cladocera*, género *Daphnia*, especie *Daphnia magna*. Es una de las especies más conocidas de cladóceros. El tamaño de los crustáceos es aproximadamente 1 mm. Su hábitat natural son aguas ricas en sustancias nutritivas, como lagos y estanques. Se alimenta de algas, detritus y bacterias que filtra previamente. En cuanto a su morfología, se caracterizan por tener un caparazón que protege el tronco, y presentar en la cabeza unas potentes antenas, responsables de la locomoción, desarrollando un movimiento vertical y espasmódico. En la **figura 2.7** se muestra una fotografía del crustáceo *Daphnia magna*.



Figura 2.7 Fotografías de crustáceos de la especie *Daphnia magna*.

La presencia de agentes tóxicos en el medio puede afectar al sistema nervioso o digestivo de estos crustáceos, que se manifiestan en su capacidad de movilidad. La toxicidad aguda se determinó evaluando su movilidad tras la exposición de los crustáceos a la muestra a evaluar.

Los parámetros de toxicidad que se pueden determinar con este ensayo son la concentración efectiva o EC_{50} y la menor concentración que produce un efecto observable o LOEC. El EC_{50} es la concentración efectiva de agente tóxico que reduce la movilidad del 50% de los organismos después de 24 o 48 horas de exposición. El EC_{50} se determina mediante interpolación gráfica, en la relación establecida entre el efecto inhibitorio expresado en términos de porcentaje de inmovilidad y las concentraciones causantes de dichos efectos. Para este bioensayo, el LOEC se establece como la concentración de agente tóxico que produce un efecto inhibitorio de un 10% en la respuesta biológica estudiada (movilidad).

Procedimiento

Kit Daphtoxkit FTM de ECOTest, s.l. (Valencia, España). Permite la evaluación de la toxicidad de vertidos, residuos o sustancias químicas en agua dulce, utilizando los individuos neonatos de *Daphnia magna*. El cultivo de las efipias se inicia 3 días antes de comenzar el bioensayo. Las efipias se lavan con agua dulce, utilizando un micro-tamiz para eliminar las trazas del medio de conservación. Una vez lavadas, se incorporan en el medio de incubación (40-50 mL), en placas petri. El medio de incubación se prepara por dilución de soluciones concentradas de NaHCO₃, CaCl₂, MgSO₄, KCl en agua destilada y se airea intensamente mediante agitación, durante 15 minutos, para disminuir el riesgo de anoxias. Las placas petri se cubren para evitar procesos de evaporación y se incuban las efipias durante 3 días a 20°C y en condiciones de luminosidad constante de 6000 lux.

Como se ha mencionado en el **epígrafe 2.5.1** para los ensayos con *Vibrio fischeri*, en los ensayos con *Daphnia magna* el tratamiento de las muestras previo a su análisis también requiere la eliminación de sólidos en suspensión mediante filtración, y en el caso de que la muestra proceda de experimentos de foto-Fenton, el H₂O₂ debe de ser eliminado. Cuando sea necesario, las diluciones de estas muestras se preparan en el medio de cultivo, antes de llenar los 5 pocillos de las placas de análisis. Los neonatos de *Daphnia* consumen sus reservas internas de nutrientes rápidamente, debido a su elevada actividad metabólica. Por este motivo, dos horas antes de comenzar el test de toxicidad se alimentan los neonatos con algas (Spirulina). Esta alimentación ayuda a disminuir el porcentaje de muerte por inanición (a veces, superior al 10%). Las algas se suministran a liofilizadas y para que puedan ser consumidas como nutrientes por los neonatos, se hidratan por adición de medio de cultivo.

A continuación, se procede a la transferencia de las larvas neonatas a las placas de análisis (placas de pocillos). Cada placa de pocillos tiene 6 líneas de pocillos iguales. Cada línea de las placas de pocillos contiene 1 “pocillo de lavado” y 4 “pocillos de análisis”, para una evaluación estadística aceptable (análisis por cuadruplicado). Cada uno de estos 5 pocillos se llena con 10 mL de muestra.

La transferencia de los neonatos activos desde la placa de incubación se realiza mediante succión con pipeta Pasteur, de forma que al ejercer una presión adecuada sobre la goma, se produce la succión de los neonatos. De esta forma, poco a poco se transfieren 20 neonatos a cada uno de los “pocillos de lavado”. A continuación, se realiza la transferencia de 5 neonatos desde el “pocillo de lavado” a cada uno de los 4 pocillos réplicas. De esta forma se evita la dilución de las muestras.

Seguidamente, se cubre la placa de análisis con una banda de Parafilm® y se coloca la tapadera de la placa para evitar fenómenos de evaporación de las muestras de análisis. La incubación se lleva a cabo en oscuridad y a una temperatura de 20°C, durante 24 y 48 horas.

Finalizado el período de incubación, se procede a realizar la lectura a las 24 y 48 horas, respectivamente. La lectura se efectúa mediante la observación y recuento del número de organismos inmovilizados frente al número de organismos móviles. Los organismos son considerados inmovilizados si después de 15 segundos de observación, éstos no desarrollan movimiento alguno de locomoción y permanecen en el fondo del pocillo.

Para comprobar la correcta ejecución del bioensayo en términos de sensibilidad de los organismos, se realiza una evaluación de la respuesta de los dáfidos frente a un control negativo que es el medio del cultivo. Para que el bioensayo sea válido, de acuerdo con el protocolo ISO 6341, la inmovilización en el control negativo no debe exceder al 10%.

2.5.3 Análisis de la Biodegradabilidad Inherente. Ensayo de Zahn-Wellens/EMPA (OCDE TG 302. Dir. 88/302/EEC)

La biodegradación es el proceso por el que la destrucción de una sustancia química se lleva a cabo mediante la acción de organismos vivos, principalmente por bacterias y hongos (Alexander, 1994).

En este trabajo, la realización de ensayos de biodegradabilidad está asociada a la evaluación de un agua residual industrial procedente de una industria farmacéutica y de cómo este parámetro varía cuando es sometida a un proceso de tratamiento mediante fotocatalisis solar. O sea, la metodología descrita a continuación fue llevada a cabo para determinar el momento idóneo en el que el aumento de la biodegradabilidad, a lo largo del proceso de oxidación fotocatalítica, permita el empleo de un tratamiento biológico posterior con el fin de alcanzar el tratamiento completo del agua residual mediante la combinación de ambas tecnologías. Es preciso recordar que el objetivo es detener el tratamiento fotocatalítico (más costoso) cuando ya sea posible emplear la biodegradación (mucho más barato) con éxito.

Fundamento teórico

El estudio de la biodegradabilidad inherente de un contaminante o agua residual permite obtener datos sobre su potencial de biodegradación bajo condiciones aerobias óptimas, tales como las que se encuentran habitualmente en las EDAR. Los ensayos que se pueden

usar para determinar la biodegradabilidad inherente incluyen cuatro métodos descritos en la guía OCDE N° 302 A-D: *Modified SCAS Test* (TG 302 A), *Zahn-Wellens/EMPA Test* (TG 302 B), *Modified MITI Test* (II) (TG 302 C) y *Concawe Test* (borrador TG 302 D). Los grados de biodegradación superiores al 20% (medidos mediante la DBO, DQO o COD), se consideran como una evidencia de biodegradabilidad inherente primaria, mientras que los grados de biodegradación superiores al 70%, deben de considerarse como una evidencia de biodegradabilidad inherente final.

En este trabajo de investigación, el método de *Zahn-Wellens/EMPA Test* (TG 302 B) se ha aplicado para la determinación de la biodegradabilidad inherente de un agua residual de la industria farmacéutica y de la biodegradabilidad en diferentes momentos del tratamiento mediante foto-Fenton. Esta información ha sido muy relevante para diseñar correctamente la combinación entre tratamiento de foto-Fenton y un tratamiento biológico en un reactor aerobio de lecho fijo.

Procedimiento

El ensayo de Zahn-Wellens (Z-W) se ha llevado a cabo siguiendo una modificación de la directiva 88/302/EEC y el protocolo OCDE TG 302 B. Este método se aplica a aguas conteniendo sustancias orgánicas con valores de COD en el rango de 250 a 600 mg L⁻¹. Estas altas concentraciones permiten obtener resultados analíticos fiables. El uso paralelo de un sistema analítico específico (como HPLC-UV), hace posible la evaluación de la biodegradabilidad de las sustancias concretas de interés presentes inicialmente en la matriz. Las muestras que serán analizadas mediante el método de Zahn-Wellens deben tener un pH entre 6.5 y 7.5, y los restos de peróxido de hidrógeno que puedan quedar después de un pre-tratamiento con foto-Fenton deben eliminarse mediante el método de la Catalasa (**sección 2.4.3**).

En este ensayo, las muestras se mezclan con medio mineral (**tabla 2.7**) y con una cantidad relativamente alta de fangos activos en una solución acuosa que es agitada y aireada (para asegurar una concentración de oxígeno disuelto nunca inferior a 2 mg L⁻¹), a 20-25°C en la oscuridad o bajo luz difusa durante un período de 28 días. En paralelo se prepara un blanco que sólo contienen fangos activos y medio mineral en agua destilada. La degradación biológica se sigue mediante la medición del COD en distintos intervalos de tiempo, según sea necesario, y la eficiencia de la misma se evalúa de acuerdo a la **ecuación 2.4**.

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_B}{C_A - C_{BA}} \right] \times 100 \quad (2.4)$$

D_t es el porcentaje de biodegradación medido en el intervalo de tiempo t (máximo 28 días); C_A es la concentración (mg L^{-1}) de COD en la suspensión después de 3 horas y 30 minutos de incubación; C_t es la concentración (mg L^{-1}) de COD en la suspensión a tiempo t ; C_{BA} es la concentración (mg L^{-1}) de COD en el blanco medidos después de 3 horas y 30 minutos de incubación; C_B es la concentración (mg L^{-1}) de COD en los blancos a tiempo t . El medio mineral empleado en este ensayo está formado por las soluciones descritas en la **tabla 2.7**. La disolución de medio mineral propiamente dicha se prepara mezclando 10 mL de solución “a” y 1 mL de soluciones “b”, “c” y “d”, enrasando a 1 L con agua desmineralizada.

Tabla 2.7 Componentes del medio mineral empleado en el ensayo de Zahn-Wellens/EMPA.

solución	Composición
A	8.5 g KH_2PO_4 , 21.75 g K_2HPO_4 , 33.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl 0.5 g. Disueltos en 1L de agua destilada a un pH 7.4
B	27.5 g CaCl_2 , 36.4 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Disueltos en 1 L de agua destilada.
C	22.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua destilada.
D	0.25 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1L de agua destilada (añadir una gota de HCl para evitar precipitación de Fe)

De acuerdo con el protocolo de Zahn-Wellens (Z-W), la razón que debe existir entre el contenido en carbono orgánico de la muestra y la cantidad de inóculo seco (biomasa procedente del fango activado), está entre 1 y 4. En los ensayos realizados en esta tesis se ha tomado el valor intermedio de 3, de forma que nos aseguremos la presencia de una cantidad de biomasa suficiente para evaluar correctamente la biodegradabilidad inherente de cada una de las muestras. La **ecuación 2.5** permite determinar la masa de inóculo que es necesario pesar para mezclar con la muestra correspondiente. La determinación del porcentaje de peso de biomasa húmeda que corresponde al peso seco, se ha evaluado mediante el secado de una cantidad conocida de biomasa húmeda tomada de los fangos activos procedentes de la EDAR municipal de El Ejido.

$$\frac{\text{Inóculo (mg / L)}}{\text{COD}_{\text{muestra}} \text{ (mg / L)}} \approx 3$$

$$\text{peso}_{\text{seco}} \text{ inóculo} = 0.09 \times \text{peso}_{\text{húmedo}} \text{ inóculo}$$

$$\text{inóculo}_{\text{seco}} \text{ (mg / L)} = \frac{3}{0.09} \times \text{COD}_{\text{muestra}} \text{ (mg / L)} \quad (2.5)$$

Para la preparación del inóculo se toma una muestra fresca de fangos activos, se deja reposar durante alrededor de 30 min y se elimina el sobrenadante. Parte de la biomasa depositada se introduce en una centrífuga durante 3-5 min a unas 1000-1500 rpm. Después se elimina el sobrenadante y se rellenan los frascos de la centrífuga de nuevo con el resto

de la biomasa depositada. De nuevo se centrifuga de forma que dispongamos de una capa de biomasa en el fondo del frasco de gran espesor. Por último se realiza un lavado de la biomasa centrifugada con el medio mineral; para ello se llenan los frascos con medio mineral y se resuspende la biomasa mediante agitación. Por último se vuelven a introducir los frascos en la centrifuga, se elimina el sobrenadante, y la biomasa está lista para pesarse y mezclarse con la muestra correspondiente. Es necesario tomar la biomasa de las zonas centrales de la capa formada en cada frasco para evitar que vaya acompañada de demasiada agua.

El material empleado para llevar a cabo los ensayos de Z-W son frascos de vidrio de 250 mL de capacidad con agitadores de material inerte de entre 5 y 10 cm de longitud. En primer lugar se introducen 240 mL de cada una de las muestras en los botes, se ponen a agitar y se añaden 10 mL de la solución "a" y 1 mL de las soluciones "b", "c" y "d" del medio mineral por cada litro de muestra (2.4 mL de "a" y 240 μ L de "b", "c" y "d"). A continuación se añade la cantidad de inóculo calculada según el valor de COD de la muestra y de acuerdo a la **ecuación 2.5**. Antes de añadir la biomasa es necesario medir el pH de cada bote, para comprobar que se encuentra entre 6.5 y 7.5. Además se coloca en paralelo un blanco, lo cual dependerá de las diferentes masas de inóculo que se hayan usado, formadas por 240 mL de agua desmineralizada con pequeñas cantidades de medio mineral en lugar de muestra, y también se prepara otro bote adicional con un control que estará formado por una concentración representativa de dietilenglicol (dependiendo de los valores de COD de las muestras), que es una sustancia completamente biodegradable.

La primera medida de COD correspondiente a cada frasco se toma siempre después de 3 horas y 30 min de haber iniciado el ensayo, de forma que se pueda detectar la posible adsorción de las sustancias químicas sobre los fangos activos. A partir de entonces las medidas de COD se pueden realizar cada día o a otros intervalos regulares de tiempo, durante 28 días. Es necesario tener en cuenta que cuando las medidas se llevan a cabo cada día, es posible reconocer claramente si se está produciendo una adaptación de la biomasa al medio en el que se encuentra. Si existe algún compuesto conocido presente en alguna de las muestras, se puede también medir la variación de la concentración del mismo mediante HPLC-UV. Los valores de pH y oxígeno disuelto en cada uno de los botes deben ser controlados diariamente.

El control del buen funcionamiento de este método se lleva a cabo mediante la evaluación de la biodegradabilidad de un compuesto de referencia como es el dietilenglicol. Si se elimina al menos el 70% del COD procedente de esta sustancia en menos de 14 días, se

demuestra que la actividad de los fangos es la correcta, con lo que se puede asegurar la buena calidad del ensayo.

2.6 Experimentos de Fotodegradación - Estudios de Fotólisis Directa

Descripción del equipo y fundamento teórico

En los últimos años, la presencia y el comportamiento de residuos farmacéuticos en el medio ambiente se ha convertido en un tema de interés general, en particular por el efecto biológico específico que estos contaminantes presentan sobre el organismo humano y en la biota acuática. Como ya se ha mencionado en detalle en el **epígrafe 1.2.2**, muchos son los factores que influyen en que un fármaco sea encontrado con frecuencia en efluentes de las EDAR, en ríos y lagos. Pero, una vez en el medio ambiente, los fármacos sufren procesos de degradación fotoquímica. De hecho, se puede considerar tal proceso como el mecanismo más importante de transformación en el medio natural. En este contexto, el conocimiento de los mecanismos y de la cinética de la fotodegradación es esencial para predecir el comportamiento y las consecuencias medioambientales de estos contaminantes en aguas naturales.

Procedimiento

En esta Memoria Doctoral se evaluó la degradación fotoquímica de la FLU y del TMP en distintas matrices de agua, seguida por la identificación de los distintos PT generados para ambos compuestos. Los experimentos de fotodegradación se realizaron utilizando un simulador solar (Suntest CPS+, Heraeus, Alemania), equipado con una lámpara de arco de Xenón de 1.5 kW y filtros especiales que restringen la transmisión de la luz por debajo de 290 nm. El sistema de filtros mencionado corresponde a un rango de aproximadamente 22 W m⁻² en el espectro ultravioleta (300-400 nm). La intensidad de la radiación era constante y se mantuvo, durante todos los experimentos, en 250 W m⁻² o 960 KJ m⁻² entre 300-800 nm. Este valor corresponde a dosis de intensidad de irradiación equivalentes a un día soleado en primavera u otoño, alrededor de las 10 de la mañana. Para los ensayos se utilizaron recipientes de vidrio borosilicatado de 1000 mL agitados mediante agitadores magnéticos (véase **figura 2.8**). La temperatura durante todos los experimentos, varió entre 22-35°C.



Figura 2.8 Simulador solar Suntest CPS+ utilizado en los experimentos de fotólisis.

2.7 Experimentos de fotocátalisis solar

2.7.1 Planta piloto solar para fotocátalisis solar de compuestos puros disueltos en agua

Descripción del fotorreactor

Los experimentos de degradación de contaminantes mediante fotocátalisis solar llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, se han realizado en un campo de captadores parabólicos compuestos (CPC) ubicado en la PSA (latitud 37 °N, longitud 2.4 °W), con radiación solar natural.

En la PSA existen dos prototipos gemelos formados por dos CPC dispuestos en serie cada uno, con 3 m² de superficie irradiada. El reflector CPC está fabricado con aluminio altamente anodizado. Cada uno de los módulos está montado sobre un marco y consta de 12 tubos, estando la estructura inclinada con un ángulo igual a la latitud local del emplazamiento (37°). El fluido de trabajo circula por los tubos de los CPC y al final hasta un tanque de recirculación esférico de vidrio borosilicatado y de 10 L de capacidad. Una bomba centrífuga (PAN WORLD, Modelo: NH-100 PX, 100 W) devuelve el fluido a los CPC a un caudal constante de 22 L min⁻¹, siguiendo un modo de operación en recirculación. De este modo, el flujo, en régimen turbulento, se establece en un circuito formado por tubos de vidrio irradiados y tubos opacos de HDPE (polietileno de alta densidad). Las características y dimensiones de cada fotorreactor se resumen en la **tabla 2.8**.

Tabla 2.8 Características de cada prototipo de fotorreactor CPC para aplicaciones de fotocátalisis solar.

Prototipo del fotorreactor CPC (PSA)	
Número total de tubos	24
Longitud total de cada tubo	1502 mm
Longitud irradiada en cada tubo	1415 mm
Diámetro exterior de cada tubo	32 mm
Diámetro interno de cada tubo	28 mm
Transmisividad de cada tubo	$0.900 \leq \tau \leq 0.915$ ($\lambda \geq 350$ nm)
Reflectividad media (300-390 nm)	0.895
Área total irradiada en el reactor	3,0168 m ²
Volumen total de cada reactor	40 L
Volumen total irradiado en cada reactor	22 L
Caudal	22 L min ⁻¹

Cada uno de los tanques esféricos dispone también de una tapa de cristal que permite introducir algunos elementos durante un ensayo tales como reactivos, gas (aire, oxígeno, gas inerte, etc.), un electrodo de pH o cualquier otro elemento útil. Por otro lado, en la tubería de entrada al tanque se ha insertado un termopar (PT-100, Philips, Digital-280), que indica la temperatura en cada instante en el agua de ensayo. Seguidamente, en la **figura 2.9**, se presenta una fotografía del fotorreactor utilizado.



Figura 2.9 Fotografía del fotorreactor CPC con capacidad para tratar 35 L de agua (izquierda). En el detalle, fotografía de los tubos de un módulo de CPC (derecha, superior) y fotografía del tanque y bomba de recirculación (derecha, inferior).

Procedimiento

Durante los experimentos de fotocátalisis con TiO₂, el procedimiento seguido fue el mismo para todos los ensayos y el fotorreactor fue operado de forma discontinua. En primer lugar se llena la instalación con 35L de agua desmineralizada, y se adiciona la concentración deseada del contaminante cuya degradación se quiere estudiar. El sistema se opera en recirculación, alcanzándose una completa homogenización del compuesto una vez transcurridos 15 min. Esta etapa se lleva a cabo con los captadores solares tapados con

objeto de evitar cualquier posible efecto que pueda tener la radiación solar sobre la mezcla durante su correcta homogenización. En este punto, se toma una muestra para comprobar la concentración inicial de contaminante/s presente en el sistema. A continuación, se adiciona el catalizador: 200 mg L⁻¹ de TiO₂ Degussa P-25 (7g). El sistema trabaja en recirculación en oscuridad durante otros 15 minutos para asegurar que la suspensión sea homogénea. Transcurrido este tiempo se toma una segunda muestra y se destapan los concentradores iniciándose así el proceso de fotocátalisis heterogénea. La frecuencia de toma de muestras en todos los ensayos realizados fue variable, de acuerdo con los objetivos de cada experimento.

El fotorreactor utilizado en todos los experimentos de descontaminación de aguas mediante fotocátalisis homogénea (foto-Fenton) también siguió un modo de operación discontinuo. En primer lugar se llena la instalación con 35L de agua desmineralizada, y se adiciona, directamente en el reactor y con los CPC tapados, la concentración deseada de contaminante o contaminantes cuya degradación se desea estudiar. En el caso del tratamiento de las aguas reales industriales, se adicionan 35L de las mismas directamente al reactor, también con los CPC tapados para evitar cualquier posible efecto de la radiación solar sobre esta agua. Transcurridos 15 min de recirculación se alcanza la homogenización del sistema y se toma una muestra para comprobar la concentración inicial de los parámetros a medir en cada experimento. A continuación, se ajusta el pH de la mezcla entre 2.6 y 2.9, y se adiciona la cantidad de sal de hierro (FeSO₄·7H₂O) necesaria para obtener la concentración de Fe²⁺ deseada. Transcurridos otros 15 min de homogenización se toma una muestra para el control de la cantidad de hierro disuelta, se adiciona H₂O₂ (diferentes cantidades en función de los objetivos deseados) y se destapan los CPC iniciándose el proceso de foto-Fenton. A partir de este momento, las muestras fueron tomadas a distintos intervalos de tiempo.

En esta Tesis Doctoral se han realizado dos tipos de experimentos de fotocátalisis homogénea, unos orientados a evaluar la cinética de degradación de los compuestos originales o del agua residual industrial tratados mediante foto-Fenton, y otros destinados a la determinación de la toxicidad, biodegradabilidad de efluentes procedentes de diferentes etapas del proceso fotocatalítico y los PT generados. En ambos, las condiciones de operación se diferenciaron únicamente en la forma de adicionar el peróxido de hidrógeno. Para el caso de los experimentos cinéticos, se mantuvo una concentración del H₂O₂ relativamente estable en el reactor durante todo el ensayo. Sin embargo, en aquellos en los que las muestras iban destinadas a estudios toxicológicos, de biodegradabilidad y en algunos casos, de determinación de los PT generados, se llevó a cabo una dosificación de H₂O₂ por cargas, adicionando pequeñas cantidades de la misma. Se añade un pequeña

dosis, se espera a que se consuma y en ese momento se toma la muestra, añadiéndose a continuación otra pequeña dosis. De esta forma se consiguió que las muestras tomadas no contuvieran en ningún caso una cantidad de H₂O₂ residual que pudiera interferir negativamente en los procedimientos analíticos y bioensayos aplicados posteriormente.

2.7.2 Planta piloto solar para tratamiento fotocatalítico solar del agua residual industrial

Descripción del fotorreactor

En los experimentos donde el objetivo era preparar una cantidad de agua elevada pretratada mediante foto-Fenton para su posterior tratamiento en un sistema biológico, se hizo necesario el tratamiento en un fotorreactor de elevado volumen. En este caso, fueron utilizados fotorreactores CPC con capacidad de tratamiento de hasta 450L.

El campo de fotorreactores utilizados en este estudio está formado por 3 módulos conectados en serie y montados en una plataforma de inclinación fija de 37°. Cada módulo consiste en 16 CPC (152 mm ancho) con receptores tubulares UV-transparentes (48 mm) y con un área iluminada de 3,2 m², lo que representa un área total iluminada del sistema de 9,6 m². El CPC está fabricado de aluminio pulido ya que este material es altamente reflexivo en el rango UV (0.829 en 300 nm, 0.861 en 325 nm, 0.834 en 350 nm y 0.810 en 375 nm). A su vez, los tubos absorbedores están fabricados de fluoropolímero. Las principales características que hacen interesante el uso de este material son su destacada estabilidad y transmisividad UV (0.735 en 300 nm, 0.765 en 325 nm, 0.780 en 350 nm y 0.822 en 375 nm) y porque se tratar de un material inerte. Los 3 módulos están conectados en serie y el flujo de agua pasa directamente de un módulo al otro y finalmente es conducido al tanque de recirculación, dónde una bomba centrífuga (CALPEDA s.p.a., tipo MXH 404) impulsa el fluido a través del sistema a un caudal de aproximadamente 4m³ h⁻¹, que puede ser regulado gracias a un caudalímetro insertado en la tubería. Esta planta piloto fue operada en modo discontinuo para tratar un volumen total de agua residual de hasta 450L. El volumen iluminado en el sistema era de 108L. En la **figura 2.10** se presenta una fotografía de uno de los tres módulos de este fotorreactor CPC.



Figura 2.10 Fotografía de un módulo del fotorreactor CPC con capacidad para tratar 450L de agua (izquierda). En el detalle, fotografía de la bomba (derecha, superior) y del tanque (derecha, inferior).

Procedimiento

Los experimentos para tratar un elevado volumen del agua residual industrial estudiada fueron llevados a cabo llenando el sistema con 450L de esta agua, directamente en el tanque y con los CPC tapados para evitar cualquier posible efecto de la radiación solar sobre la matriz estudiada. Transcurridos 15 min de recirculación se alcanza la homogenización del sistema y se toma una muestra para comprobar la concentración inicial de los parámetros deseados del agua real a tratar. A continuación, se ajusta el pH de la mezcla entre 2.6 y 2.9, y se adiciona 20 mg L^{-1} de Fe (como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Transcurridos otros 15 min de homogenización se toma una muestra para el control de la cantidad de hierro disuelta y se adicionan un volumen conveniente de peróxido de hidrógeno, lo cual ya fue determinado de acuerdo con los experimentos previos realizados en el fotorreactor de 35L. Simultáneamente a la adición del H_2O_2 se destapan los CPC iniciándose el proceso de foto-Fenton. En este experimento el H_2O_2 añadido al sistema fue dosificado por cargas, repetido diversas veces hasta llegar al punto idóneo para verter el agua en el biorreactor.

2.7.3 Medida de la radiación UV

Descripción del equipo y fundamento teórico

Dependiendo del emplazamiento, la radiación UV sufre variaciones en su intensidad por posibles alteraciones de los agentes atmosféricos que la atenúan, así como por las condiciones meteorológicas siempre cambiantes. Sin embargo, el estudio de los distintos fenómenos atenuadores de la radiación indica que la presencia de nubes es el factor predominante en la región UV (Blanco, 2002). Las nubes producen, por tanto, una gran disminución de la cantidad de fotones UV que alcanzan la superficie terrestre, aunque su distribución espectral no se ve alterada.

El estudio del rendimiento de los procesos de fotocátalisis solar se debe realizar mediante el análisis de la degradación del compuesto que se desea eliminar del agua en función del tiempo transcurrido y la radiación incidente sobre el reactor. Se trata de una aproximación que integra la densidad de energía radiante del espectro solar útil para la fotocátalisis solar (Malato y cols., 2000).

El equipo utilizado en esta tesis doctoral para la medida de la radiación UV global es el radiómetro KIPP&ZONEN, modelo CUV3, con una sensibilidad de $264 \text{ mV/W}\cdot\text{m}^2$ que se encuentra montado en una plataforma inclinada el mismo ángulo que los captadores cilindro parabólicos (CPC, 37°). Este radiómetro proporciona datos en términos de radiación incidente, $W_{UV} \text{ m}^{-2}$ para longitudes de onda inferiores a 400 nm. Esta medida de energía media incidente por unidad de superficie es una aproximación válida cuando los tiempos empleados en los experimentos son suficientemente largos en comparación con los que se producen en las fluctuaciones de radiación. En la **figura 2.11** se muestra una fotografía del radiómetro empleado en esta tesis doctoral.



Figura 2.11 Fotografía del radiómetro de UV global empleado en los ensayos realizados en la Plataforma Solar de Almería.

La radiación solar incidente sobre el fotorreactor se incluye en los cálculos cinéticos de los experimentos de degradación, mediante una aproximación matemática que permite comparar y combinar experimentos llevados a cabo en diferentes días con diferentes condiciones meteorológicas (presencia de nubes). Para ello se usa una relación entre el tiempo experimental (t), el volumen de la planta (V_t), la superficie de los captadores iluminada (A_r) y la densidad de la radiación ($UV_G = W_{UV} \text{ m}^{-2}$) medida por el radiómetro. Como los datos de radiación son recogidos continuamente, se puede calcular el promedio de la radiación incidente sobre la superficie del colector ($\overline{UV_{G,n}}$) para cada período de tiempo (t), y además calcular la energía acumulada en ese período. Consecuentemente, la cantidad de energía recogida por los captadores (por unidad de volumen) desde el comienzo del experimento hasta que cada muestra es tomada puede ser expresada mediante la siguiente ecuación (**ecuación 2.6**):

$$Q_{UV,n} = Q_{UV,n-1} + \Delta t_n \overline{UV}_{G,n} \frac{A_r}{V_t}; \quad \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad (2.6)$$

Donde t_n es el tiempo experimental de cada muestra y $Q_{UV,n}$ es la energía acumulada (por unidad de volumen, kJ L^{-1}) incidente en el reactor para cada muestra tomada durante el experimento.

En ocasiones, resulta más útil representar los resultados de degradación obtenidos durante los procesos fotocatalíticos solares frente al tiempo de iluminación (t_{30W}), en lugar de en términos de $Q_{UV,n}$ (energía acumulada). Para este propósito puede asumirse que la radiación UV solar media en un día perfectamente soleado durante 2 horas alrededor del mediodía es aproximadamente de $30 \text{ W}_{UV} \text{ m}^{-2}$. La expresión que permite calcular el tiempo de iluminación viene dada por la **ecuación 2.7**.

$$t_{30W,n} = t_{30W,n-1} + \Delta t_n \frac{UV}{30} \frac{V_i}{V_T}; \quad \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad (2.7)$$

Donde t_n es el tiempo experimental para cada muestra, UV es la radiación solar ultravioleta media medida durante Δt_n , t_{30W} es el tiempo de iluminación normalizado, V_i es el volumen del reactor iluminado y V_T el volumen total del foto-reactor.

Todos los resultados obtenidos en los estudios fotocatalíticos descritos en esta Tesis han sido graficados en función del tiempo de iluminación.

2.8 Reactor biológico de lecho fijo a escala planta piloto

Los reactores biológicos de lecho fijo permiten el crecimiento de una capa de biomasa en la superficie de un medio (normalmente material plástico), expuesto a la atmósfera de donde se capta el oxígeno necesario. Al hacerlo así, la capa microbiana transforma la carga orgánica biodegradable de las aguas residuales en biomasa y subproductos. El lecho fijo es habitual en la depuración de aguas residuales urbanas que ya han pasado por una decantación primaria, sin embargo, se pueden también utilizar para aguas con más carga orgánica como son las aguas residuales industriales. Actualmente, los trabajos de investigación en este campo están dirigidos al desarrollo de nuevos sistemas de tratamiento biológicos de lecho fijo que sustituyan a los convencionales sistemas de fangos activos. En los reactores de lecho fijo, el crecimiento de la biopelícula en el soporte hace que las capas más internas entren en anoxia haciendo que se desprenda parte de la misma de forma

automática. A su vez, estos sólidos desprendidos del soporte sirven como alimento a los microorganismos adheridos a los soportes, y se recirculan al reactor o se depositan en su fondo.

Las principales ventajas que presentan los reactores biológicos de lecho fijo frente a los convencionales de tanque agitado son: i) la reducción del volumen del reactor gracias al empleo de un soporte que proporciona una superficie específica elevada; ii) no requiere recirculación de biomasa al reactor; iii) la operación y control de este tipo de reactores es sencillo; iv) mejora de las tasas de nitrificación y desnitrificación y, finalmente, v) mejora en la eficiencia global del proceso por una mayor especialización de la biomasa (Fernández-Alba y cols., 2009; Sarria y cols., 2003).

La etapa biológica de los ensayos de combinación de fotocátalisis homogénea con oxidación biológica, para el tratamiento de aguas residuales provenientes de una industria farmacéutica contaminadas con NXA, se ha llevado a cabo en un reactor aerobio de lecho fijo (IBR) a escala planta piloto instalado en la PSA. El sistema biológico IBR (véase **figura 2.12**) está formado por tres módulos: tanque de neutralización cónico de 165L de volumen total; tanque de acondicionamiento cónico de 100L de volumen total y reactor de lecho fijo (IBR) de fondo plano de 170L de volumen total. Todos los tanques fueron construidos en polipropileno con 8mm de espesor de pared y fueron ubicados bajo el armazón metálico que soporta a cuatro módulos de captadores CPC pertenecientes a un fotorreactor que no fue objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

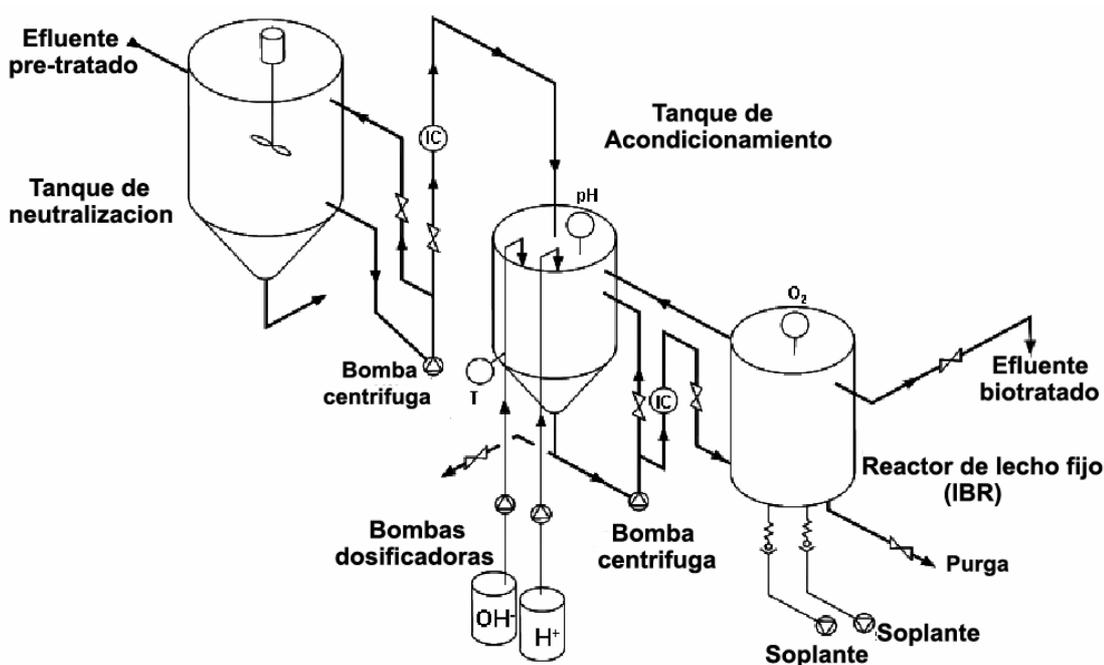


Figura 2.12 Esquema ilustrativo del reactor biológico aerobio IBR utilizado en este estudio.

Los tanques están conectados entre sí mediante tubería de polipropileno, Solarflex 16x23. El tanque de neutralización es cónico de forma que el catalizador empleado en la etapa fotocatalítica pueda separarse por decantación cuando sea necesario, además, este tanque dispone de un agitador mecánico (TIMSA, 300 rpm; 187.5 W. Acero inoxidable), que permite la correcta homogenización del efluente pre-tratado y el ajuste de pH del efluente de la fotocatalisis. En el tanque de acondicionamiento se encuentran dos sondas, una de pH y otra de potencial redox (CRISON), ambas conectadas a sus respectivos controladores CRISON pH28. Esto permite realizar un control automático de pH entre 6.5 y 7.5 en el tanque de acondicionamiento mediante la adición automática de NaOH o H₂SO₄, gracias a la acción ejercida por el controlador sobre dos bombas dosificadoras peristálticas para el H₂SO₄ (ALLDOS Eichler GmbH pfinzta 208-1,6, S/N:04/16937) y para el NaOH (ALLDOS Eichler GmbH pfinzta 208-1,6 E22, S/N: 03/73313). Además, este tanque dispone también de un sensor de temperatura PT100 que permite registrar los valores de este parámetro en cada instante.

El reactor biológico de lecho fijo IBR es plano a diferencia de los demás tanques del sistema. En el fondo y superficie del mismo se disponen dos rejillas que sustentan el empaquetamiento del lecho ocupando entre 90 y 95L del volumen total del reactor. El IBR se encuentra relleno de soportes de polipropileno marca Pall®Ring (diámetro nominal: 15mm, densidad: 80 kg m⁻³, área específica: 350 m² m⁻³, fracción de espacio vacío: 0.9 m³ m⁻³), que están colonizados por fangos activos procedentes de una EDAR. Este reactor está equipado con un control automático de oxígeno disuelto formado por una sonda de oxígeno CRISON (InPro 6050) instalada en el interior del tanque, y un controlador OXI 49 que actúa sobre dos soplantes SIROCCO (caudal máximo de 400 L h⁻¹), manteniendo la concentración de oxígeno disuelto en el interior del IBR entre 4 y 6 mg L⁻¹. El aire de las soplantes es introducido en el fondo del tanque a través de difusores, que proporcionan un burbujeo lo más homogéneo posible.

El fluido es impulsado desde el tanque de neutralización al de acondicionamiento a través de una bomba centrífuga PAN WORLD CO., (flujo máximo de 1200L h⁻¹), cuyo caudal se regula mediante un rotámetro (indicador de caudal, COMAQUINSA, 0-0.3L min⁻¹). Una vez en el tanque de acondicionamiento, entre éste y el IBR se establece un flujo de recirculación a un caudal entre 5 y 8L min⁻¹, mediante una segunda bomba centrífuga PAN WORLD CO., (caudal máximo 1200L h⁻¹). También aquí el caudal es regulado por un rotámetro, esta vez con un rango de medida de 0 a 26.5L min⁻¹ (véase **figura 2.13**). Desde el IBR al tanque de acondicionamiento el agua retorna por gravedad.



Figura 2.13 Reactor biológico aerobio IBR utilizado en este estudio.

2.8.1 Puesta en marcha y acondicionamiento del reactor biológico

El acondicionamiento del reactor biológico de lecho fijo utilizado en esta Tesis Doctoral sigue una serie de etapas encaminadas a la puesta en marcha del mismo después de garantizar la óptima actividad de la biomasa fijada sobre los soportes de polipropileno:

i) En primer lugar se lleva a cabo la inoculación del IBR con al menos el 70% del volumen total de fangos activos procedentes de una EDAR. Este volumen se diluye con agua destilada hasta alcanzar el volumen mínimo que permita una recirculación continua entre el tanque de acondicionamiento y el IBR. A esta mezcla inicial se le añaden las soluciones del medio mineral A, B, C, D, E y F detalladas en la **tabla 2.9**, en función de la concentración de carbono presente en el sistema, y según la relación que debe de existir ente el carbono, nitrógeno, hierro, fósforo y calcio. De esta forma es posible asegurar unas condiciones y un medio óptimos para el crecimiento y fijado de la biomasa sobre los soportes (Pall® Ring).

Tabla 2.9 Componentes del medio mineral empleado en la puesta en marcha y acondicionamiento de los reactores biológicos.

solución	sales	Concentración [g L ⁻¹]	Cantidad adicionada
A	KH ₂ PO ₄	43.8	Cumplir relación: C:P/100:5
B	CaCl ₂	27.5	1 mL L ⁻¹ efluente
C	MgSO ₄ ·7H ₂ O	22.5	1 mL L ⁻¹ efluente
D	FeSO ₄ ·7H ₂ O	50 (+ 0.5 mL L ⁻¹ H ₂ SO ₄ concentrado para evitar precipitación Fe)	Cumplir relación: C:Fe/100~2
E	NaHCO ₃	48	2 mL L ⁻¹ efluente
F	NH ₄ Cl	38.5	Cumplir relación: C:N/100:20

La recirculación de la mezcla entre el tanque de acondicionamiento y el IBR, se mantiene durante al menos unos 7 u 8 días a un caudal mínimo de 8L min⁻¹. Durante esta etapa no se añade al sistema ninguna fuente adicional de carbono, ni tampoco más medio mineral, únicamente se asegura un pH entre 6.5 y 7.5 en todo momento, así como una correcta aireación que mantenga la concentración de oxígeno disuelto siempre por encima de 4 mg L⁻¹. En este período de tiempo el COD procedente del agua de depuradora sobre la que la biomasa se encuentra suspendida (80-100mg L⁻¹), se verá reducido hasta un valor mínimo procedente de la propia actividad metabólica de los microorganismos (20-30mg L⁻¹).

Durante esta etapa, se puede observar cómo se alcanza la completa fijación de la biomasa sobre los soportes de polipropileno, mediante la medida de los sólidos totales en suspensión (STS). En la determinación de los STS se filtra una muestra homogénea en un filtro previamente secado en un horno. El aumento en el peso del filtro con respecto a su peso inicial representa los sólidos totales en suspensión. Una cantidad de residuo excesiva en el filtro puede formar una costra que atrape fácilmente el agua, con lo que se debe de establecer un límite de muestra de forma que el residuo obtenido no sea mayor de 200 mg.

En primer lugar se preparan los filtros lavándolos con agua destilada y secándolos en el horno a una temperatura entre 103 y 105°C durante una hora. Los filtros empleados tienen un tamaño de poro de 1.2 µm y están formados por una mezcla biológicamente inerte de acetato de celulosa y de nitrato (MF-Millipore Membrane Filter, 1.2µm y 47mm, ref: RAWP04700). Una vez secados se almacenan en un desecador y se pesan justo antes de ser utilizados.

Se escoge un volumen de muestra a filtrar que vaya a dar lugar a un residuo que pese entre 2.5 y 200mg. Se toma el volumen elegido de la muestra perfectamente homogeneizada y se hace pasar a través del filtro previamente secado y pesado. El filtrado se lleva a cabo en un

sistema a vacío con un matraz kitasatos. Se evapora y se seca la muestra retenida sobre el filtro en la estufa a una temperatura entre 103 y 105°C durante al menos 2 horas. A continuación el filtro con la materia seca se deja enfriar en un desecador y se pesa. Este proceso de secado, enfriado y pesado se repite hasta que el peso obtenido sea constante o se obtenga una variación inferior al 4% con respecto al peso anterior. La **ecuación 2.8** permite realizar el cálculo de los sólidos totales en suspensión a partir del peso del filtro vacío y con el residuo:

$$\text{sólidos totales en suspensión (mg / L)} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{volumen muestra, mL}} \quad (2.8)$$

$A = \text{peso del filtro} + \text{residuo seco (mg)}$

$B = \text{peso del filtro seco (mg)}$

El control de calidad de este método analítico se lleva a cabo mediante el estudio de los sólidos totales en suspensión por triplicado para cada una de las muestras. Este parámetro va decreciendo a lo largo de los días hasta un valor de cero, lo que se traduce en una cantidad mínima de biomasa en suspensión dentro del sistema. La medida de STS también permite detectar posibles problemas en el sistema que provoquen la desorción de la biomasa de los soportes, si su valor empieza a aumentar sería indicativo de que el agua que está en el biorreactor es tóxica y provoca la muerte de la biomasa, o que los valores de pH u oxígeno disuelto no son los óptimos.

Además, con objeto de obtener, de forma rápida, una gran cantidad de biomasa activa en el sistema, se realizó una segunda inoculación del biorreactor añadiendo esta vez una cantidad menor de fangos activos procedentes de una EDAR directamente al tanque de acondicionamiento (alrededor de 70L en el caso del IBR), de forma que se mezcle con el agua, libre ya de sólidos en suspensión. Con esto se consigue una mayor concentración específica de biomasa, y un lecho fijo muy poblado en corto espacio de tiempo.

ii) En el caso especial de que el agua residual industrial a tratar en el IBR contenga una elevada concentración de sales, los fangos activos inoculados en el reactor deben ser acondicionados a este medio de características osmóticas especiales. Estas características estaban presentes en el agua residual industrial que fue objeto de estudio en esta memoria doctoral. Así, se hizo necesario extender el período de acondicionamiento de la biomasa de forma gradual con la incorporación de cantidades crecientes de NaCl añadidas al sistema conjuntamente con el efluente de EDAR simulado, descrito en la **sección 2.1**, lo cual consistía en una mezcla de peptona, extracto de carne, urea, K_2HPO_4 , $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

Para favorecer la aclimatación de la biomasa al elevado contenido en sales presente en el agua residual industrial, cantidades crecientes de NaCl fueron añadidas al efluente de EDAR simulado. Inicialmente se añadieron al sistema biológico, el efluente de EDAR simulado con 1g L^{-1} de NaCl. Este procedimiento fue repetido 4 veces más, cada 4 días. Así, después de 4, 8, 12 y 16 días se volvió a añadir al sistema el efluente de EDAR simulado añadiendo 1g L^{-1} de NaCl más cada vez, obteniendo una concentración final de NaCl de 5g L^{-1} en el sistema biológico, similar a la determinada para el agua residual industrial.

El ajuste de pH se llevó a cabo con diferentes disoluciones de ácido sulfúrico e hidróxido sódico ambos procedentes de Panreac, según la etapa de tratamiento. Por otro lado, en la fase inicial del acondicionamiento de la biomasa se utilizó glucosa (D(+)-Glucosa anhidra, Panreac), y diferentes soluciones salinas que forman el medio mineral necesario para obtener unas condiciones de crecimiento y fijación sobre los soportes óptimas para los fangos. Las soluciones salinas empleadas en el medio de cultivo así como la cantidad necesaria de cada una de ellas añadida al sistema se muestra en la **tabla 2.9** (Zahn-Wellens biodegradability test. Directiva 88/302/EEC.).

iii) Después de la inoculación del reactor se recomienda alimentar al mismo con un efluente de biodegradabilidad variable. En este estudio y con vistas a facilitar operacionalmente el mantenimiento del sistema biológico, se optó por ir añadiendo cantidades variables de un efluente de EDAR simulado. Tras un par de adiciones sucesivas y crecientes de tal efluente (COD en el sistema entre 100 y 200mg L^{-1}), y teniendo el cuidado de mantener la concentración de NaCl equivalente a la que el sistema fue previamente aclimatado, se puede vaciar completamente el sistema, muy lentamente para evitar un posible arrastre de la biomasa recién fijada a los soportes. Finalmente, se vuelve a llenar el sistema con el efluente de EDAR simulado (COD inicial de aproximadamente 500mg L^{-1}) y NaCl (5g L^{-1}). Transcurridos unos días (alrededor de 7 días), el COD habrá descendido de nuevo a sus valores mínimos de entre 20 y 30mg L^{-1} . Este procedimiento debe ser repetido un par de veces ya que resulta especialmente importante, puesto que con ello se consigue un crecimiento de la biomasa adherida a los soportes y un espesor de biopelícula capaz de afrontar la degradación biológica aerobia de las aguas residuales industriales en óptimas condiciones. Además, esta etapa se repetirá siempre que se detecte un descenso en la actividad de la biomasa fijada o en su concentración adherida a los soportes (aumento de STS), con objeto de regenerar el sistema recuperando las condiciones óptimas iniciales.

iv) Por último y previamente a rellenar el sistema con cargas completas de aguas residuales parcialmente tratadas mediante foto-Fenton, se recomienda adaptar la biomasa a la nueva agua industrial que va a recibir, de forma que se pueda evitar la pérdida de una cantidad

importante de biomasa activa debido a un posible “shock” provocado por un cambio brusco de efluente. Para ello, basta con llevar a cabo algunas adiciones del agua pre-oxidada mediante foto-Fenton sobre el tanque de acondicionamiento. En este estudio tres adiciones de una mezcla de efluente de EDAR simulado (COD de 200 mg L⁻¹) y 30 L de agua fototratada (COD de 320mg L⁻¹) aproximadamente fueron añadidos al sistema a cada 5-7 días.

En caso de vaciar completamente el sistema y añadir directamente todo el volumen de efluente procedente del foto-Fenton, es posible que una cantidad de la biomasa fijada se vea dañada, aumentando el valor de los STS. Esto ralentizará la degradación biológica de esas aguas, hasta que la biomasa se adapte y utilice esa nueva fuente de carbono (características de biodegradabilidad no óptimas), para recuperarse y aumentar la concentración de biomasa en la biopelícula. Después de este *shock* inicial el resto de cargas que se realicen, serán biodegradadas con mayor rapidez.

Una vez finalizadas estas cuatro etapas, el reactor biológico de lecho fijo se encuentra en condiciones óptimas para llevar a cabo la degradación biológica de efluentes previamente oxidados mediante foto-Fenton solar.

Capítulo 3

DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN DE FLUMEQUINA Y TRIMETOPRIM EN AGUA (DESMINERALIZADA Y DE ELEVADA SALINIDAD)

3.1 Fotólisis directa de flumequina

La presencia y persistencia en el medio ambiente de compuestos orgánicos comúnmente utilizados tanto en medicina como en veterinaria ha sido descrita por numerosos autores, como ya se ha mencionado en la parte introductoria de esta Memoria. En el presente capítulo se describe el estudio que se ha llevado a cabo referente a la degradación fotolítica de flumequina (FLU), un antibiótico de amplio espectro y uso en la industria acuícola. La elección de esta sustancia se justifica por presentar una alta estabilidad y toxicidad en ambientes acuáticos. La FLU fue determinada a diferentes niveles de concentración en el medio ambiente, como ha sido descrito por Tamtam y cols. (2008) que observaron la presencia de 50 ng L^{-1} de FLU en aguas del río Sena en distintas condiciones hidrogeológicas. A su vez, se determinaron concentraciones que variaban desde 51 hasta $261 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ de este mismo compuesto en sedimentos y suelos (Prat y cols., 2006) y de $578 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ en criaderos de trucha, lubina y ambiente circundante (Lalumera y cols., 2004). A

nivel regional, se puede destacar el trabajo de Martínez-Bueno y cols. (2009), el cual señaló la presencia de 0.13 ng L⁻¹ de FLU en piscifactorías en el Mediterráneo, concretamente en la provincia de Almería.

Aunque la literatura actual permite establecer los fundamentos para una mejor comprensión de la permanencia de los fármacos en el medio ambiente acuático, algunos aspectos relacionados con la presencia continuada de los mismos, a largo plazo, en aguas naturales y la posible formación de productos de transformación (PT) que, en muchos casos, presentan una elevada persistencia y toxicidad sobre los organismos acuáticos, constituyen problemáticas que todavía están poco estudiadas (Tamtam y cols., 2008). En ese contexto, se considera la fotodegradación solar como el principal proceso de transformación de los fármacos en aguas naturales (Boreen y cols., 1995), pero, desafortunadamente, el actual conocimiento de este proceso es limitado, especialmente si se tiene en cuenta que algunos estudios han evidenciado la formación de PT cuyas consecuencias para el medio ambiente son de mayor interés que el compuesto original (Chiron y cols., 2006; Gómez y cols., 2008). Además, desde un punto de vista analítico, la identificación de los PT presenta dificultades adicionales, asociadas principalmente a la gran cantidad de compuestos que pueden ser generados, a las diferencias significativas en sus propiedades fisicoquímicas y a las bajas concentraciones a las que pueden ser producidos.

A continuación, se detalla el estudio de degradación fotoquímica de FLU en distintas matrices de agua (agua desmineralizada y agua de mar simulada) y la identificación de los PT generados en una de estas matrices mediante LC-TOF-MS. Además, se describen ensayos de toxicidad aguda realizados frente a los organismos *Vibrio fischeri* y *Daphnia magna*, aplicados antes y después de la fotodescomposición de la FLU, para estimar la toxicidad de los PT formados.

La comparación entre los espectros UV de una disolución de FLU preparada en agua desmineralizada y el espectro solar puede ser apreciada en la **figura 3.1**. La FLU presenta un espectro con bandas de absorción características para longitudes de onda de 217, 248 y 331 nm. Existe un solapamiento del espectro solar y de la FLU desde 300 nm hasta 360 nm, aproximadamente. Ese comportamiento es el esperado ya que los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, absorben radiación en las regiones del espectro electromagnético ultravioleta o visible. En estos casos, la absorción directa de fotones solares (fotólisis directa) puede ocasionar transformaciones en los compuestos orgánicos que están presentes en ambientes acuáticos.

Conviene aquí distinguir entre los procesos de fotólisis directa e indirecta. En esta última, las transformaciones son provocadas por fotosensibilizadores y especies oxidantes transitorias. Así como la fotólisis directa, la fotólisis indirecta también está considerada como una importante ruta de degradación abiótica de compuestos orgánicos en aguas naturales (OECD, 2000). Sin embargo, el foco central de ese estudio es ampliar el conocimiento del proceso de fotólisis directa de la FLU en agua desmineralizada y en una matriz que simula las condiciones de un ambiente análogo al utilizado en la acuicultura marina.

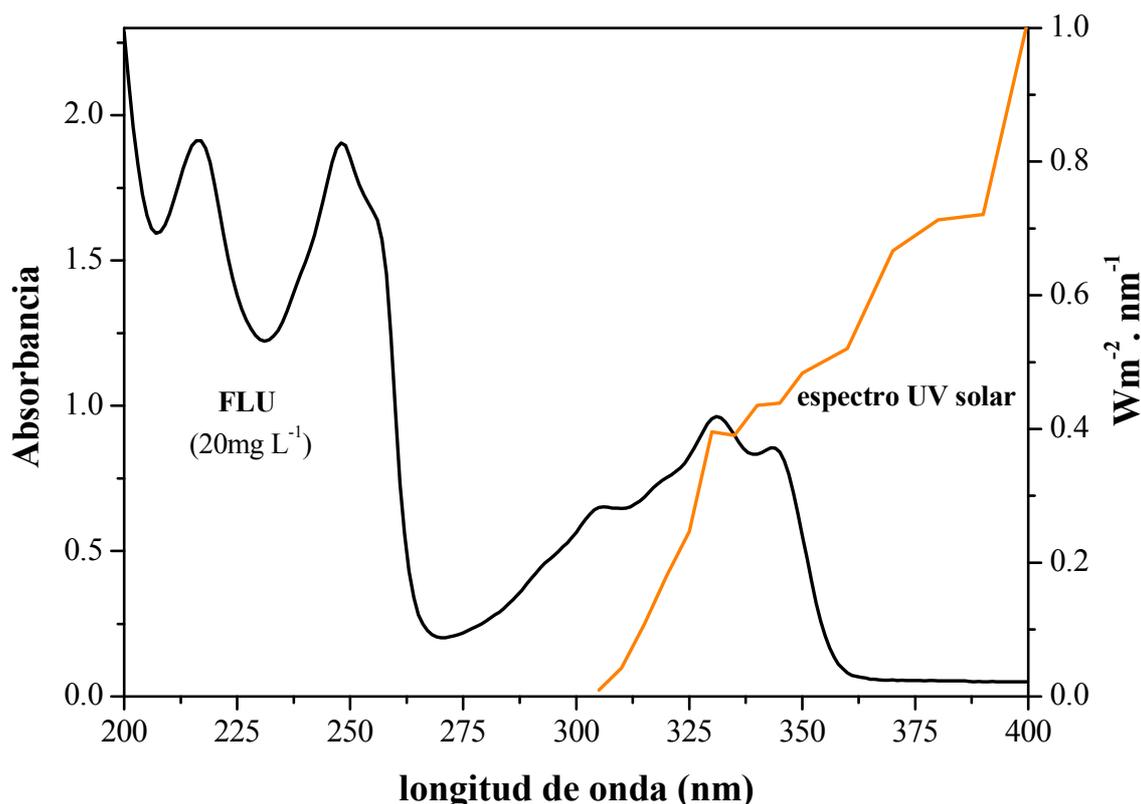


Figura 3.1 Espectro de absorción UV (200-400 nm) de la FLU en agua ultra pura y espectro solar UV en la superficie terrestre (Almería).

Se realizaron también estudios para observar la importancia de la contribución de la hidrólisis en los estudios de fotólisis. Los experimentos de hidrólisis se realizaron en botellas ámbar de 125 mL revestidas con papel de aluminio y sometidas a las mismas condiciones experimentales de temperatura y pH que los estudios de fotodegradación. En los experimentos de hidrólisis, la concentración de FLU y el COD fueron monitorizados. En ambos medios (agua desmineralizada y agua de mar simulada), la concentración de FLU y el COD permanecieron estables a lo largo de los ensayos.

El pH inicial de ambas disoluciones (agua desmineralizada y agua de mar simulada) estaba en el rango de 8.5-9 y no se han probado otros valores por dos razones fundamentales.

Primero, porque la FLU presenta una baja solubilidad en agua, la cual puede ser incrementada a medida que se aumenta el pH del medio (Khandal y cols., 1991). Por otro lado, la matriz de agua de mar simulada presenta un pH ligeramente alcalino y además produce un efecto tampón. Ese comportamiento dificulta un estudio a distintos pH ya que el cambio en este parámetro acarrearía pérdidas por precipitación de FLU y/o variaría las características del agua de mar.

Para el estudio de fotólisis se utilizó una concentración inicial de FLU de 20 mg L⁻¹. Si se consideran las concentraciones reportadas para ambientes donde este antibiótico fue encontrado, la concentración de partida puede resultar elevada, sin embargo, como el principal objetivo de este estudio es identificar los productos de fototransformación por inyección directa en LC/MS sin recurrir a la utilización de técnicas de extracción y preconcentración de la muestra (que podrían originar pérdidas de PT), esta concentración está justificada.

La experimentación fue realizada en un simulador solar con las condiciones de operación descritas con mayor detalle en el **capítulo 2, sección 2.6**. La intensidad de radiación “total” de 250 W m⁻² utilizada durante toda la investigación, corresponde a una radiación entre 300-400nm de 22 W m⁻², lo que en términos prácticos equivale a la radiación de un día con nubes, o bien a la radiación de las primeras horas de la mañana o la tarde en un día soleado en el Mediterráneo, o bien a las horas centrales de un día soleado en latitudes elevadas. La elección fue un intento de reproducir condiciones climáticas habituales pero no muy favorables. Por tanto, los resultados obtenidos en estas condiciones serían más relevantes aún en condiciones de irradiación solar elevada.

Los ensayos de fotólisis se desarrollaron en el simulador solar (Suntest CPS+) exponiendo las disoluciones de FLU por un periodo de tiempo superior a cuatro y cinco días para la matriz de agua de mar simulada (SW) y agua desmineralizada (DIW), respectivamente. Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo para cada experimento. La degradación de la FLU y la evolución del COD están representados en la **figura 3.2**. El seguimiento del COD demuestra que los productos de fototransformación generados durante el proceso no son mineralizados. Los valores del COD son estables para las dos disoluciones a lo largo de todo el tiempo de exposición a la radiación solar. En la matriz de DIW, se observó una disminución del 50% en la concentración inicial de FLU, durante los primeros 1152 minutos (19.2 horas) de iluminación. Por su parte, la FLU en SW presentó una reducción de 50% en relación a la concentración de partida después de 1324 minutos (22 horas) de transcurrido el experimento.

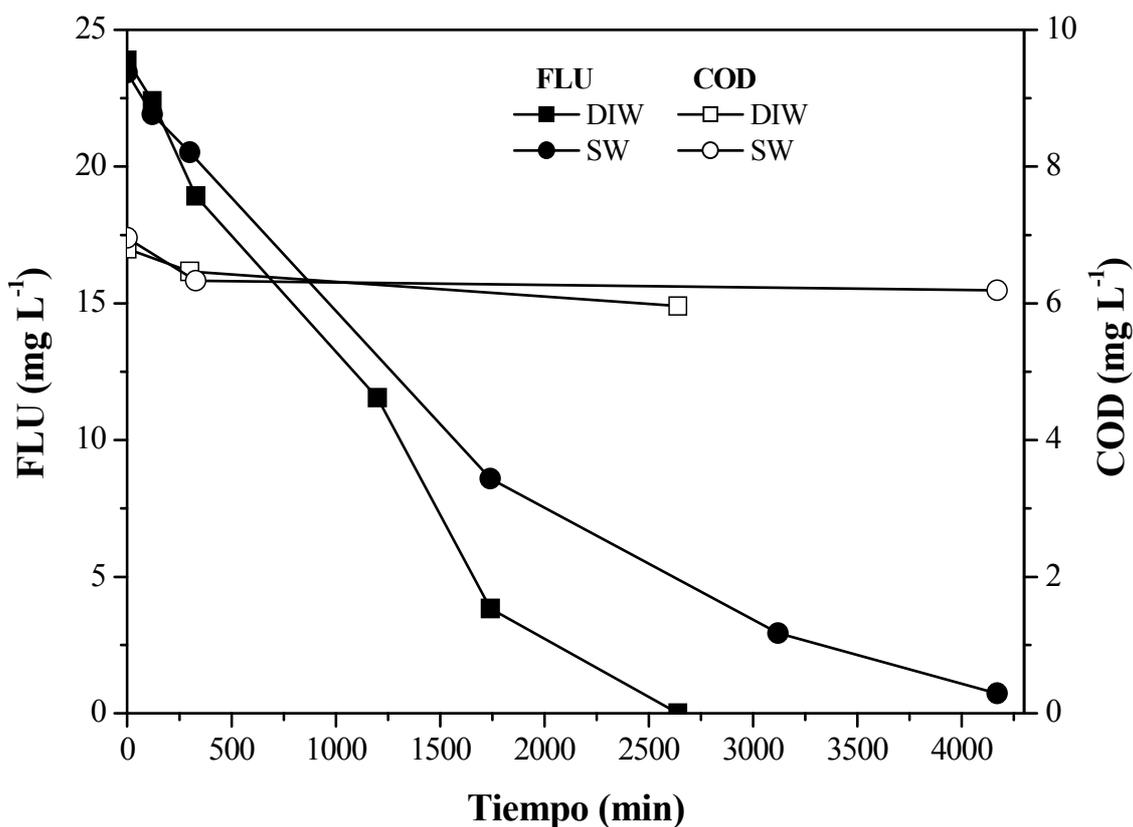


Figura 3.2 Degradación de la FLU y COD durante el proceso de fotólisis en ambas matrices estudiadas.

Se logró la degradación del 95% de la FLU inicialmente presente, transcurridos 2347 y 3995 minutos para DIW y SW, respectivamente. Estos datos evidencian el efecto de la composición de la matriz en la degradación del compuesto modelo estudiado. Según Pouliquen y cols. (2007), este comportamiento puede explicarse por la formación de quelatos entre las quinolonas y los cationes divalentes que están presentes a elevadas concentraciones en el agua marina. En este caso, los complejos se forman por interacciones ion-dipolo a través del oxígeno del grupo ceto y del grupo carboxílico ionizado (Park y cols., 2002).

En la **figura 3.3** están representados los espectros UV de las disoluciones iniciales de FLU (20 mg L^{-1}) y finales tras la fotólisis directa de este compuesto. Un breve análisis de los perfiles de absorción de las muestras iniciales permite observar una disminución moderada de la banda a 217 nm, la intensificación entre 260 y 280 nm y un cambio discreto en el perfil de la banda a 331 nm para la matriz SW si se compara con la matriz DIW. Estas variaciones corroboran la explicación presentada en los trabajos mencionados anteriormente.

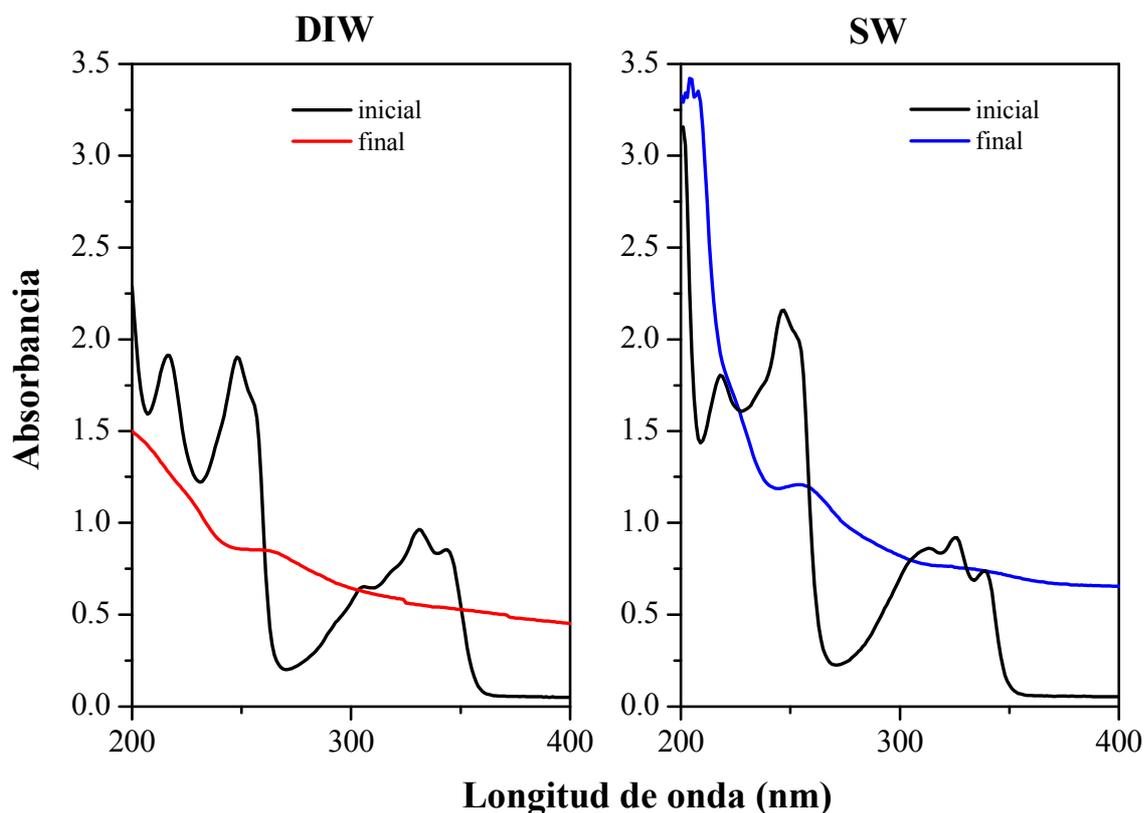


Figura 3.3 Espectros UV de las muestras iniciales y finales (2640 minutos para DIW y 4171 minutos para SW) durante el proceso de fotólisis.

3.1.1 Estudio cinético de la fotólisis directa de flumequina

Con el objetivo de comparar el efecto de la matriz en la degradación de FLU, se calcularon los parámetros cinéticos de acuerdo con la recomendación que aparece en la *OECD guideline for testing chemicals – photolysis* (2000). Los parámetros cinéticos han sido calculados representando la concentración de FLU frente al tiempo. Los datos fueron calculados en base a un modelo cinético de pseudo primer orden (**ecuación 3.1**):

$$C = C_0 \times e^{-kt} \quad (3.1)$$

Se calcularon los tiempos de vida medios ($t_{1/2}$) a través de la **ecuación 3.2**:

$$t_{1/2} = \ln 2 \cdot k^{-1} \quad (3.2)$$

La constante cinética (k) del proceso de fotólisis directa para DIW se determinó en $1.02 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ y para SW fue de $7.408 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. Se determinó que la k para la FLU en DIW es únicamente 1.5 veces mayor que la k cinética en la matriz marina. Consecuentemente, el

tiempo de vida medio no es muy diferente: 679.6 minutos ($R^2 = 0.998$) para DIW y 935.7 minutos ($R^2 = 0.995$) para SW.

3.1.2 Identificación de los productos de transformación de flumequina mediante LC-TOF-MS

En un primer intento, se analizaron muestras tomadas a diferentes tiempos de exposición durante los experimentos de fotólisis directa mediante LC-TOF-MS con la interfaz *electrospray* (ESI) operando en modo positivo. No se han aplicado preconcentraciones a las muestras para evitar pérdidas de los PT como resultado del empleo de métodos de extracción y, consecuentemente, evitar una incorrecta estimación en la abundancia relativa de los fotoproductos detectados. Esta observación justifica la utilización de una concentración inicial relativamente alta de FLU (20 mg L^{-1}), como se comentó anteriormente. Además, se optó por realizar la identificación de los PT sólo en DIW ya que la elevada concentración de sales presentes en el agua de mar podría ocasionar problemas en la fuente de ionización. La **figura 3.4** presenta tres cromatogramas típicos de iones totales (TIC) generados después de 1200, 2640 y 7460 minutos de irradiación, en los que se pueden observar algunos de los fotoproductos formados.

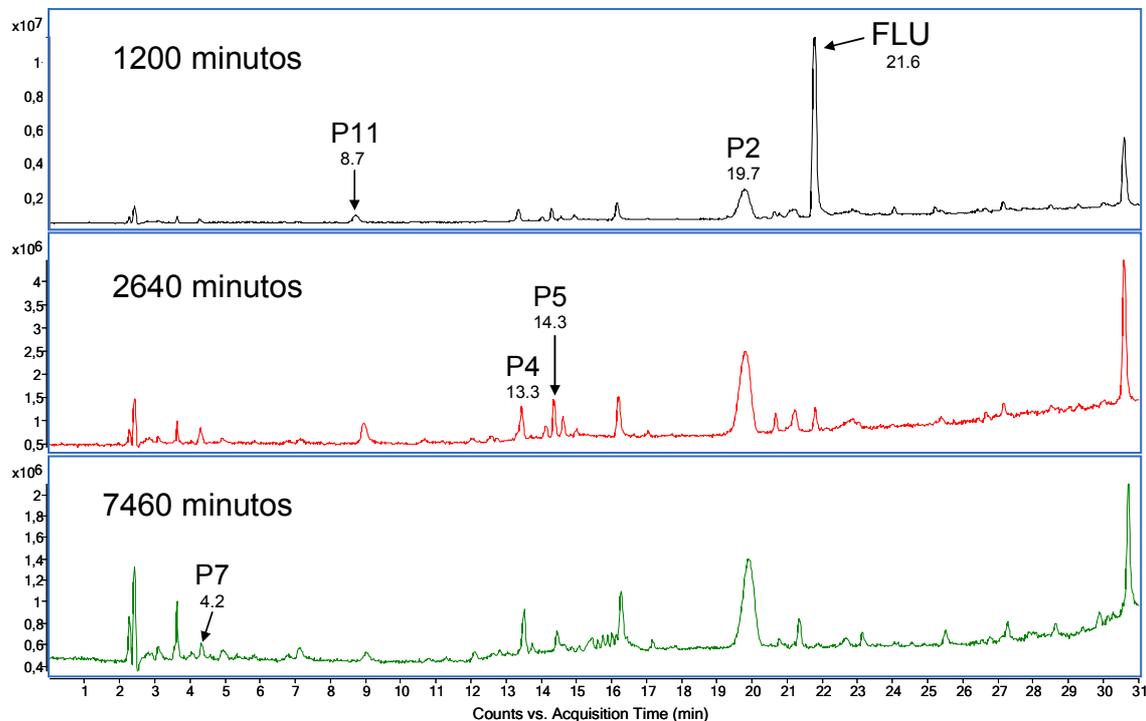


Figura 3.4 Cromatogramas de iones totales (TIC) de muestras a lo largo del proceso de fotólisis.

La observación detallada de estos cromatogramas permitió identificar 14 PT de la FLU durante el proceso de fotólisis. La **tabla 3.1** presenta las medidas de masa exacta,

determinadas por el TOF y calculadas por el software, de los iones moleculares protonados. También se muestra el error entre ambas y la fórmula empírica propuesta.

Tabla 3.1 Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para la FLU y los PT generados durante el proceso de fotólisis en DIW.

Comp	R _t	Formula	Masa Experimental (m/z)	Masa Calculada (m/z)	Error ppm	DBE
FLU	21.6	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ F	262.0874	262.0873	0.007	9
		C ₁₄ H ₁₂ NNaO ₃ F	284.0695	284.0693	-0.42	9
		C ₁₄ H ₁₁ NO ₂ F	244.0768	244.0765	1.36	10
		<i>C₁₁H₅NO₂F</i>	<i>202.0302</i>	<i>202.0298</i>	<i>1.56</i>	<i>10</i>
		<i>C₁₀H₅NOF</i>	<i>174.0358</i>	<i>174.0350</i>	<i>-4.89</i>	<i>9</i>
		<i>C₉H₅NOF</i>	<i>162.0356</i>	<i>162.0350</i>	<i>-3.98</i>	<i>8</i>
		<i>C₈H₅NF</i>	<i>134.0405</i>	<i>134.0401</i>	<i>-3.6</i>	<i>7</i>
P1	16.0	C ₁₁ H ₉ NO ₂ F	206.0615	206.0611	1.53	8
		C ₁₁ H ₈ NNaO ₂ F	228.0430	228.0431	0.38	8
		C ₁₁ H ₇ NOF	188.0509	188.0506	1.49	9
		<i>C₁₀H₇NF</i>	<i>160.0558</i>	<i>160.0557</i>	<i>0.60</i>	<i>8</i>
P2	19.7	C ₁₂ H ₁₃ NO ₃ F	238.0864	238.0862	0.60	7
		C ₁₂ H ₁₂ NNaO ₃ F	260.0682	260.0681	0.0005	7
		C ₁₂ H ₁₁ NO ₂ F	220.0771	220.0768	1.21	8
		C ₁₁ H ₁₃ NO ₂ F	210.0928	210.0924	1.50	6
		C ₁₁ H ₁₁ NOF	192.0821	192.0819	0.94	7
		<i>C₉H₅NO₂F</i>	<i>178.0297</i>	<i>178.0299</i>	<i>1.21</i>	<i>8</i>
<i>C₇H₅NF</i>	<i>122.0401</i>	<i>122.0401</i>	<i>-0.03</i>	<i>6</i>		
P3	25.1	C ₁₁ H ₁₃ NO ₂ F	210.0927	210.0924	1.03	6
		C ₁₁ H ₁₁ NOF	192.0823	192.0819	1.98	7
P4	13.3	C ₁₃ H ₁₂ NO ₅	262.0712	262.0709	0.76	9
		C ₁₃ H ₁₁ NNaO ₅	284.0531	284.0529	-0.65	9
		C ₁₃ H ₁₂ NO ₃	230.0810	230.0812	0.66	9
		<i>C₁₀H₄NO₄</i>	<i>202.0131</i>	<i>202.0135</i>	<i>1.91</i>	<i>10</i>
		<i>C₉H₄NO₃</i>	<i>174.0201</i>	<i>174.0186</i>	<i>-0.76</i>	<i>9</i>
<i>C₈H₄NO₂</i>	<i>146.0239</i>	<i>146.0237</i>	<i>-2.02</i>	<i>8</i>		
P5	14.3	C ₁₃ H ₁₂ NO ₅	262.0710	262.0709	0.003	9
		C ₁₃ H ₁₁ NNaO ₅	284.0537	284.0529	-2.74	9
		C ₁₃ H ₁₀ NO ₄	244.0606	244.0604	0.67	10
		<i>C₁₂H₁₀NO₃</i>	<i>216.0661</i>	<i>216.0655</i>	<i>-2.51</i>	<i>9</i>
		<i>C₁₁H₁₀NO₂</i>	<i>188.0708</i>	<i>188.0706</i>	<i>-1.03</i>	<i>8</i>
P6	13.4	C ₈ H ₁₂ NO ₃	170.0812	170.0811	0.17	4
		C ₈ H ₁₀ NO ₂	152.0707	152.0706	0.62	5
		<i>C₇H₁₀NO</i>	<i>124.0756</i>	<i>124.0757</i>	<i>0.38</i>	<i>4</i>
		<i>C₆H₁₀N</i>	<i>96.0805</i>	<i>96.0808</i>	<i>3.12</i>	<i>3</i>
P7	4.2	C ₁₂ H ₁₂ NO ₆	266.0660	266.0659	0.32	8
		C ₁₂ H ₁₀ NO ₅	248.0555	248.0553	0.60	9
		<i>C₁₁H₁₀NO₃</i>	<i>204.0657</i>	<i>204.0655</i>	<i>0.88</i>	<i>8</i>
		<i>C₁₀H₁₀NO₂</i>	<i>176.0707</i>	<i>176.0706</i>	<i>0.53</i>	<i>7</i>
		<i>C₉H₁₀NO</i>	<i>147.0675</i>	<i>147.0684</i>	<i>5.68</i>	<i>6</i>
P8	12.6	C ₁₂ H ₁₂ NO ₅	250.0708	250.0709	-0.79	8
		C ₁₂ H ₁₀ NO ₄	232.0608	232.0604	1.57	9
		<i>C₉H₁₀NO₃</i>	<i>180.066</i>	<i>180.0655</i>	<i>-2.58</i>	<i>6</i>
P9	13.3	C ₁₂ H ₁₂ NO ₅	250.0712	250.0709	0.80	8
		C ₁₂ H ₁₀ NO ₄	232.0601	232.0604	-1.44	9
P10	13.4	C ₁₃ H ₁₆ NO ₅	266.1025	266.1022	0.75	7
		C ₁₃ H ₁₄ NO ₄	248.0918	248.0917	0.26	8
		<i>C₁₃H₁₂NO₃</i>	<i>230.0805</i>	<i>230.0811</i>	<i>-2.91</i>	<i>9</i>

P11	8.7	$C_{12}H_{12}NO_2$	202.0856	202.0862	-3.24	8
		$C_{14}H_{16}NO_7$	310.0923	310.0921	0.55	8
		$C_{14}H_{15}NNaO_7$	332.0742	332.0741	-0.37	8
		$C_{14}H_{14}NO_6$	292.0816	292.0815	0.12	9
		$C_{14}H_{12}NO_5$	274.0705	274.0709	-1.82	10
		$C_{13}H_{12}NO_4$	246.0758	246.0760	-1.15	9
		$C_{13}H_{12}NO_3$	230.0814	230.0812	-1.04	9
		$C_{12}H_{12}NO_2$	202.0864	202.0863	-0.77	8
P12	12.0	$C_{11}H_{12}NO$	174.0918	174.0913	-2.42	7
		$C_{10}H_{12}NO_3$	194.0812	194.0811	0.15	6
		$C_{10}H_{10}NO_2$	176.0704	176.0706	-1.16	7
		$C_8H_{12}NO_2$	154.0860	154.0862	-1.65	4
		$C_7H_{10}NO$	124.0758	124.0757	-1.08	4
P13	12.5	$C_8H_{12}NO_3$	170.0809	170.0811	-1.58	4
		$C_8H_{10}NO_2$	152.0704	152.0706	1.93	5
P14	7.1	$C_5H_{10}NO$	100.0755	100.0756	-1.9	2

En la mayoría de los casos se obtuvo una muy buena concordancia entre las medidas de masa exacta experimentales y las formulas propuestas (< 3 ppm de error), lo cual confiere una elevada certidumbre a la identificación. La propuesta de estructuras químicas fue posible tomando como base el conocimiento previo de la molécula precursora y del mecanismo del proceso de fotólisis directa.

Un primer punto de partida en la identificación de PT consiste en la observación del espectro de masas del compuesto de partida, ya que pérdidas, patrones isotópicos o fragmentos característicos pueden repetirse en los PT generados, facilitando el reconocimiento de los mismos y su identificación. El espectro de masas de la FLU ($R_t = 21.6$ minutos), presenta además de la señal del ion molecular (m/z 262) y del correspondiente aducto de Na (m/z 284), un ion fragmento de m/z 244, correspondiente a una pérdida de 18 Da, atribuida a la pérdida de una molécula neutra de agua. Esta pérdida de agua es característica de compuestos aromáticos que poseen un grupo carboxilo (COOH) con un hidrógeno en posición α , y lleva aparejado un incremento del DBE en una unidad, por formación de un anillo, como se muestra en la **figura 3.5**.

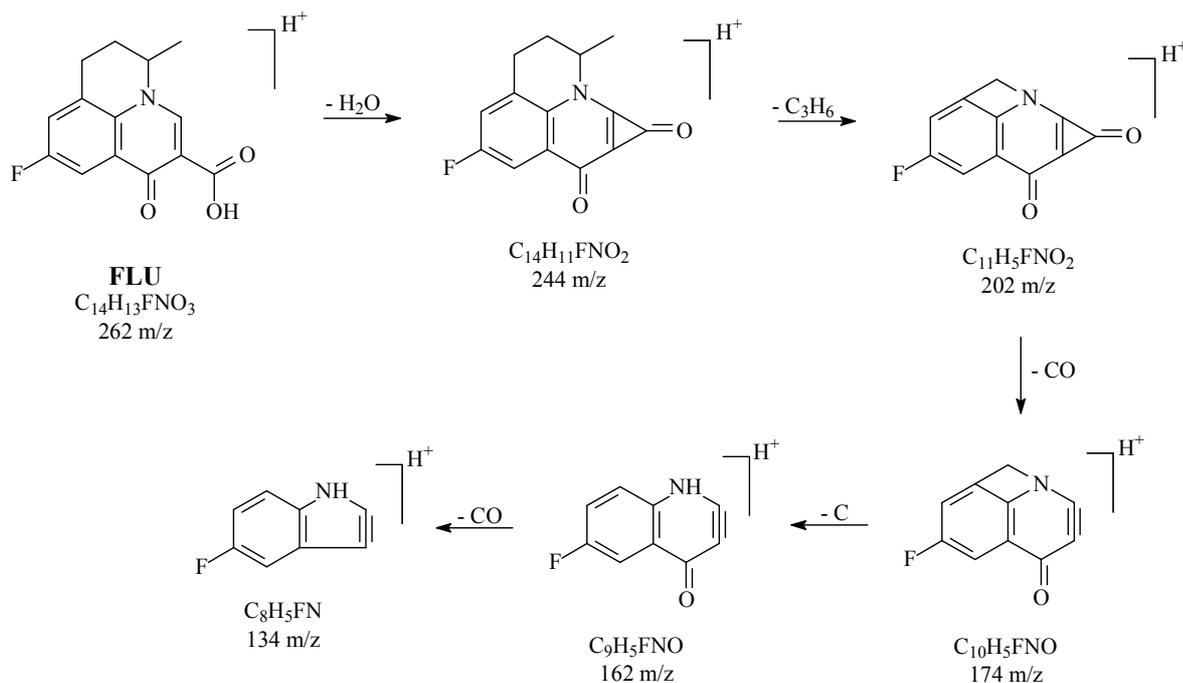


Figura 3.5 Fragmentación de la FLU con sus pérdidas características.

En el análisis inicial de las muestras se utilizó un voltaje de fragmentación en la fuente de 190V. Este voltaje se consideraba adecuado para garantizar la observación del ion molecular de los PT generados, imprescindible para su correcta identificación. Posteriormente, algunas muestras seleccionadas en las que aparecían la mayor parte de los intermedios identificados (2640 y 7460 minutos), se analizaron utilizando voltajes de fragmentación superiores (230 y 270V). Ésta es una posibilidad que el equipo ofrece y que permite incrementar la fragmentación en la fuente, facilitando la elucidación estructural de los intermedios desconocidos, tal como se muestra en la **figura 3.6** para el compuesto P11. Estos fragmentos aparecen en la **tabla 3.1** señalados con color azul. Para el caso particular de la FLU se detectaron 4 nuevos fragmentos cuyas estructuras aparecen propuestas en la **figura 3.5**. Estos fragmentos correspondían, entre otras, con sucesivas pérdidas de un grupo carbonilo (C=O), o pérdida de C_3H_6 , originada por la rotura del anillo saturado.

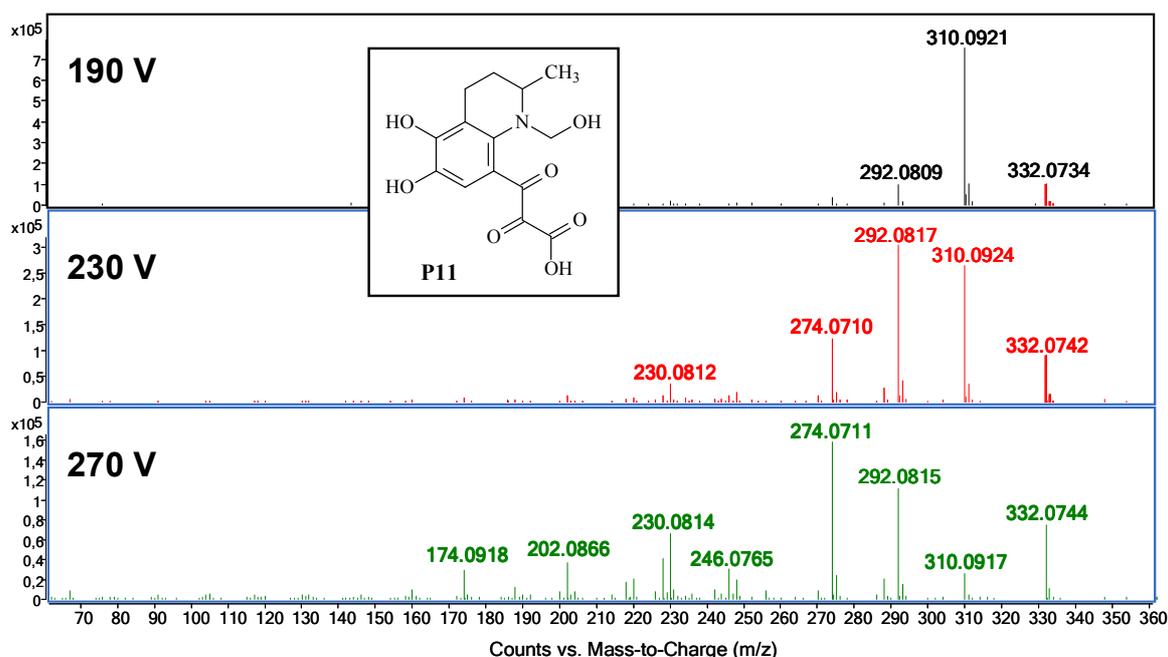


Figura 3.6 Espectros de masas del P11 (m/z 310) a diferentes voltajes de fragmentación.

La señal cromatográfica observada al tiempo de retención de 16.0 minutos fue atribuida al compuesto nombrado como P1 (véase **tabla 3.1**), el cual presenta una composición elemental de $C_{11}H_9NO_2F$ y masa nominal 206. La escasa fragmentación obtenida para este compuesto dificultó su asignación. Se observó solo una pérdida neutra de H_2O seguida de un grupo CO, típica de la presencia de un grupo carboxilo en la molécula, tal como se apreciaba en la FLU. Esto que sugería la presencia de este grupo. Por otro lado, un valor de DBE (número de dobles enlaces equivalentes) de 8 y la pérdida de C_3H_4O con respecto a la FLU permitió proponer la estructura mostrada en la **figura 3.7**.

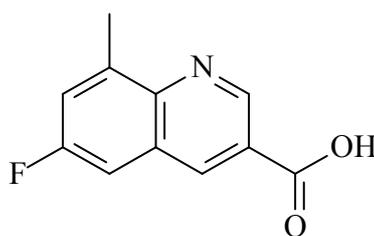


Figura 3.7 Estructura química propuesta para el P1.

El DBE (*Double Bond Equivalent*), que representa el número de anillos y dobles enlaces presentes en la molécula, es un parámetro de gran ayuda en la asignación de estructuras, proporcionando una confirmación adicional de la estructura molecular propuesta.

El compuesto nombrado como P2 ($C_{12}H_{13}NO_3F$, m/z 238.0864), era el compuesto encontrado con mayor abundancia a lo largo de los ensayos. Al igual que la FLU y P1, el espectro también presentaba el aducto de Na correspondiente. Estas especies confirman la

identidad del ion molecular pero no generan información adicional para la elucidación estructural. La fragmentación de P2 se muestra en la **figura 3.8**. Se observa de nuevo una pérdida de agua (18 Da), que en este caso no va seguida de la pérdida de CO, y que se asignó a la presencia de un grupo OH. La pérdida de un grupo CO se produce directamente del ion molecular y corresponde con la pérdida del grupo aldehído.

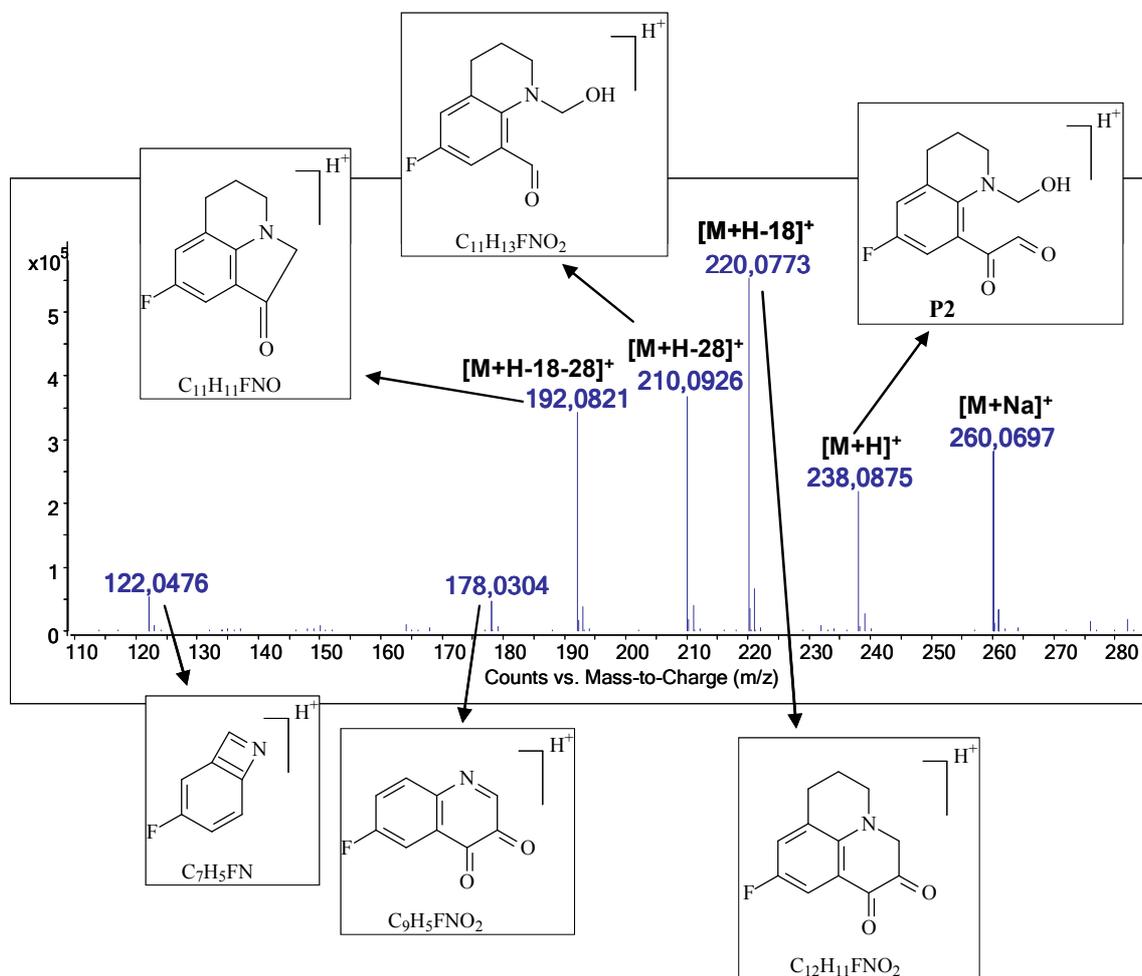


Figura 3.8 Fragmentación del P2 con las pérdidas características.

Además de P2, los productos de transformación P3, P7, P8, P9, P10, P11 y P12 también se generan a partir de la rotura del doble enlace entre los carbonos C2 y C3, con consecuente apertura del anillo. De ellos, tan solo P3 conservaba el átomo de fluor. Considerando la composición elemental, el DBE y el patrón de fragmentación del espectro de masas se han propuesto las posibles estructuras de estos PT tal y como se ilustra en la **figura 3.9**.

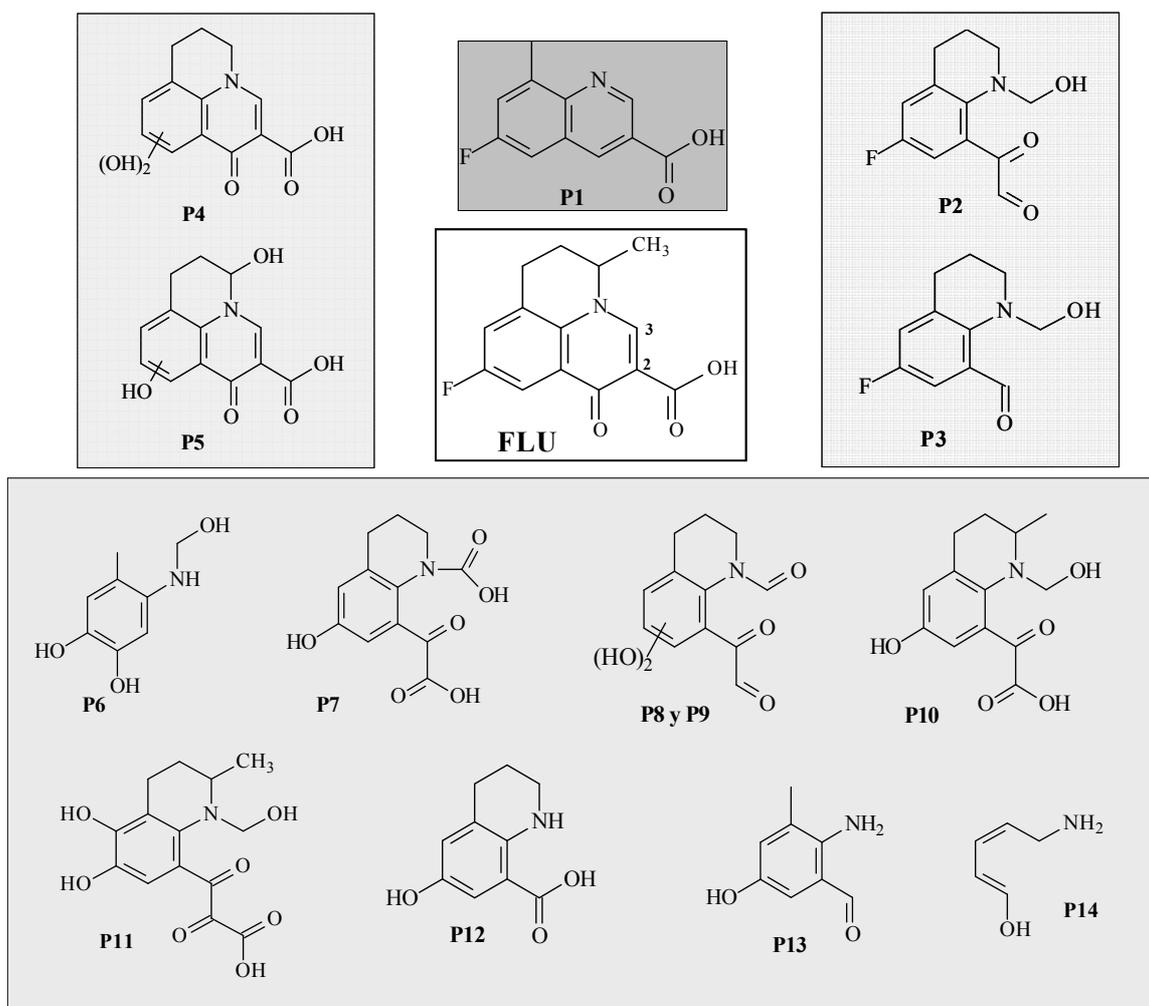


Figura 3.9 Estructura química propuesta para los PT generados durante la fotólisis directa de la FLU en DIW.

La capacidad de los analizadores de TOF también permite discriminar compuestos isobáricos, es decir, con igual masa nominal pero diferente masa exacta, para diferencias de masa muy pequeñas (del orden de 0.005 Da o inferiores). Este es el caso de los compuestos P7 y P10 que presentaban la misma masa nominal, m/z 266, pero diferente masa exacta y, por tanto, diferente composición elemental, como se puede comprobar en la **tabla 3.1**. Esta información, junto con la interpretación del patrón de fragmentación obtenido de los correspondientes espectros de masas, permitió proponer las estructuras presentadas en la **figura 3.9**.

Los compuestos P4 y P5 también presentaban la misma masa nominal (m/z 262) pero, a diferencia del par P7/P10, éstos también tenían la misma masa exacta. En consecuencia, la fórmula propuesta para ambos compuestos era la misma, sugiriendo que se trataba de isómeros en los que los grupos OH ocupaban distintas posiciones en la molécula (véase **figura 3.9**). La diferente fragmentación observada permitió proponer las estructuras mostradas en **figura 3.10**.

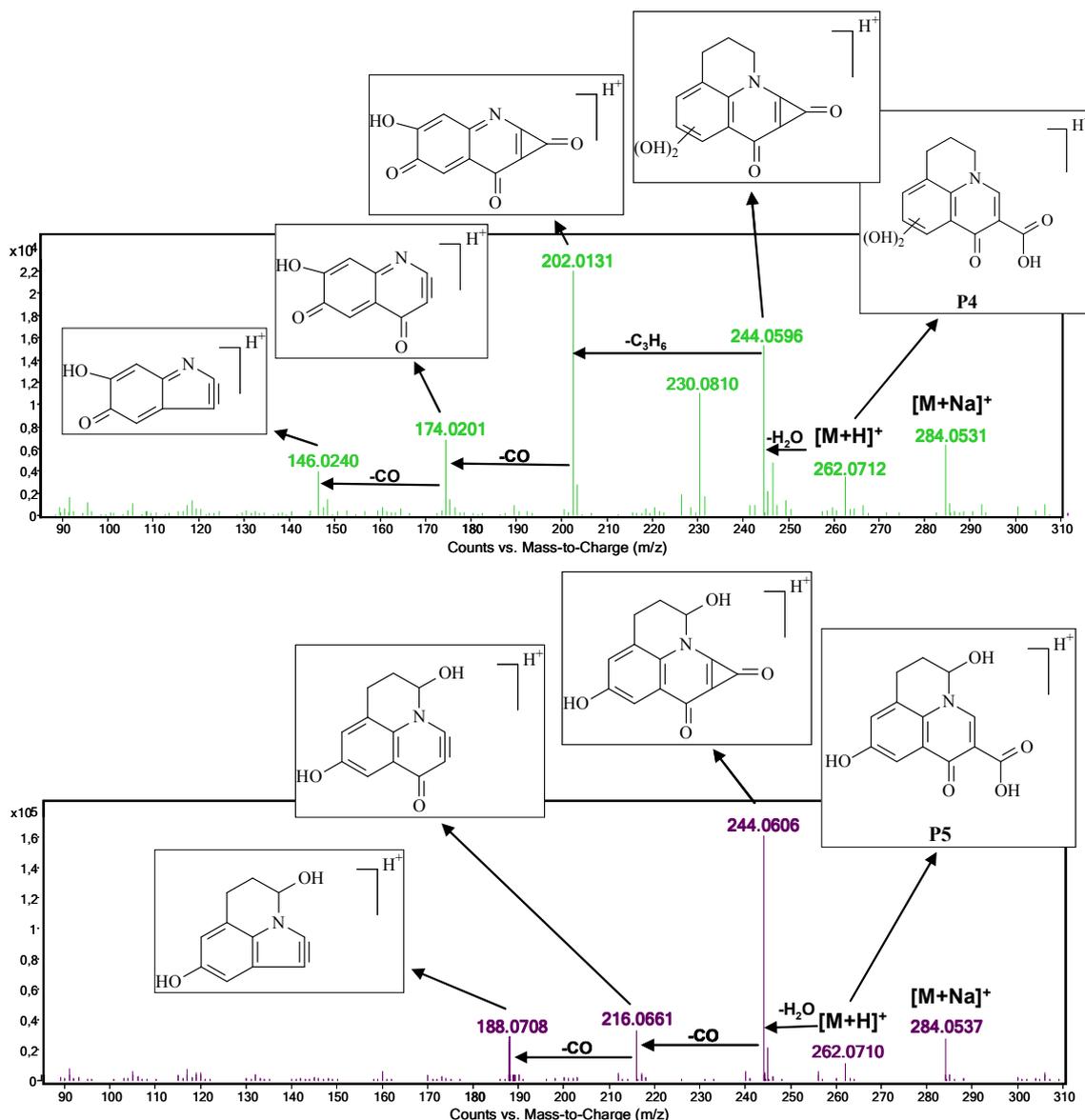


Figura 3.10 Espectros de masas de P4 y P5 con sus respectivos fragmentos.

Uno de los inconvenientes, ya comentados, asociado a este tipo de estudios es la posibilidad de que aparezcan coeluciones de los PT, ya que en muchos casos puede tratarse de compuestos de estructuras parecidas. Este hecho complica la interpretación de los espectros de masas, en los que *a priori* es difícil predecir si los fragmentos observados proceden de un único compuesto o de varios. La **figura 3.11** muestra un ejemplo de identificación de tres compuestos coeluyentes (P6, P9 y P10) mediante la obtención de los correspondientes cromatogramas de iones seleccionados para los fragmentos sospechosos de pertenecer a compuestos diferentes. Puede observarse claramente cómo los tres picos están desplazados y presentan diferentes aunque próximos tiempos de retención, lo que sugiere que se trata de intermedios diferentes. La posición del cursor en zonas de los picos en donde la coelución es menor permite obtener espectros separados para cada compuesto,

confirmando la presencia de los tres compuestos. Instrumentos más modernos permiten realizar la separación de compuestos solapados mediante algoritmos de deconvolución de espectros de forma automática.

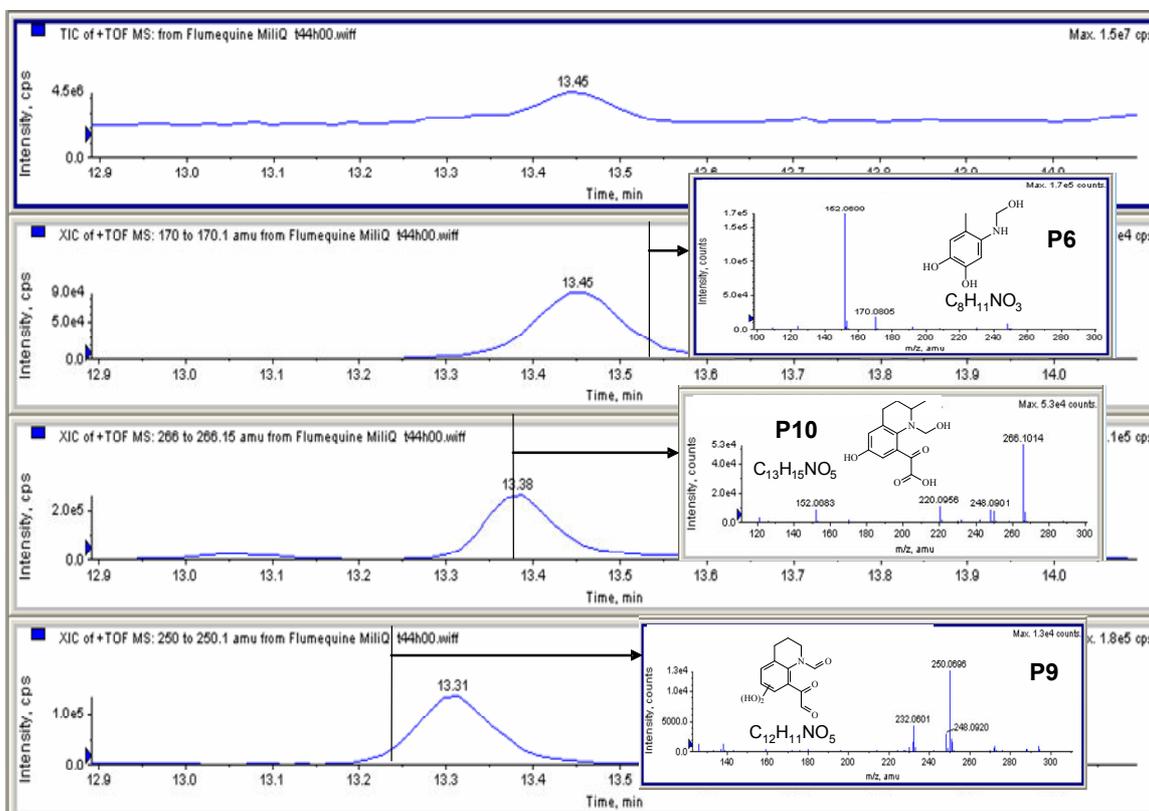


Figura 3.11 Identificación de compuestos coeluyentes.

En relación a la disponibilidad y persistencia de los PT a lo largo del proceso fotolítico, como se indica en la **figura 3.12**, se observa que uno de los primeros fotoproductos generados y, a su vez degradado, es el P1. A continuación se forma el intermedio P2 que es el más abundante y que perdura hasta el final del proceso. Simultáneamente, se determina la presencia de P5 que, como P2, se mantiene hasta 7460 minutos. Finalmente, después de 1000 minutos de exposición, se observa la generación de los últimos PT: P7 y P11. Desde los 2500 minutos de iluminación y hasta el final del experimento, P7 y P5 se mantienen prácticamente constantes. Por otro lado, para este mismo intervalo de exposición, P11 alcanza su máxima concentración y, a continuación, se degrada lentamente hasta su total desaparición en poco más de 124 horas.

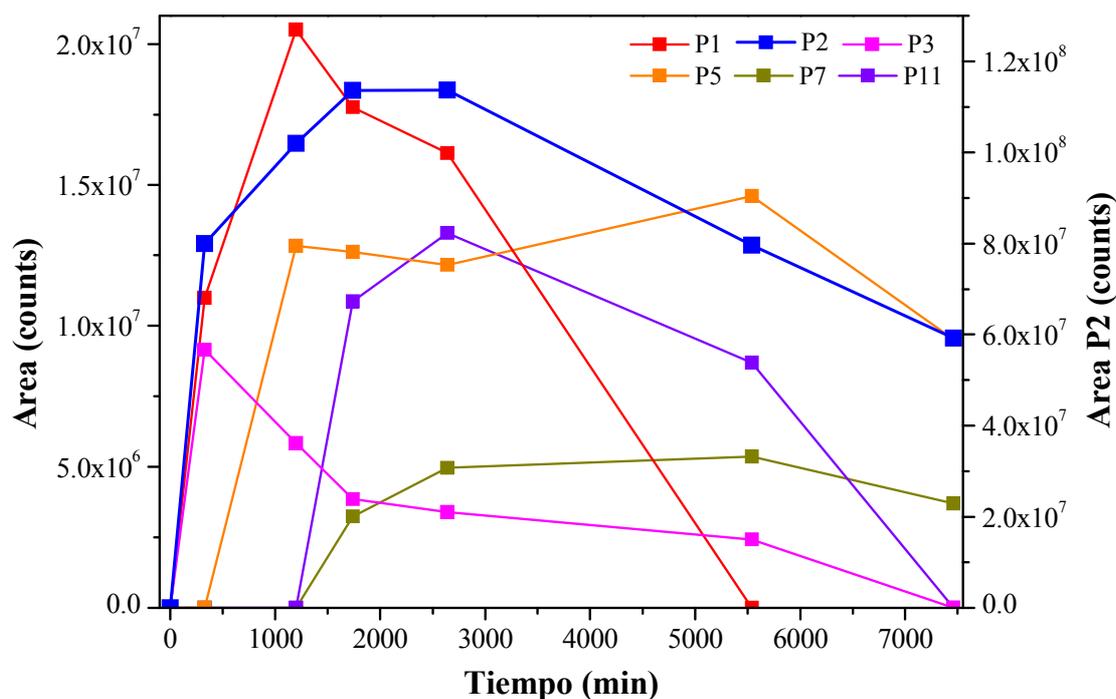


Figura 3.12 Formación y persistencia de los PT más abundantes de la FLU durante el proceso de fotólisis directa.

3.1.3 Toxicidad de flumequina y de sus productos de transformación

La toxicidad aguda de la FLU y de los PT generados por fotólisis directa se estudió frente a dos organismos-test, cada uno de los cuales representa un nivel trófico distinto.

En la **tabla 3.2** están representados los resultados obtenidos para los dos bioensayos realizados. Además, en esta tabla se muestran los valores de EC_{50} que encontramos en la literatura para FLU. Las referencias de estudios con *Vibrio fischeri* revelan discrepancias en los valores del EC_{50} de 3 órdenes de magnitud. No se han encontrado datos de EC_{50} de FLU para *Daphnia magna*. Sin embargo, se realizó un estudio con un organismo-test del mismo nivel trófico (*Artemia salina*/micro crustáceo marino) que puede servir de base para la evaluación de los resultados obtenidos en este trabajo.

Debido a la elevada respuesta para dosis pequeñas para el agua de mar en los bioensayos, fue necesaria la realización de una dilución 1:20 de todas las muestras de ambas matrices, previa a la evaluación de la toxicidad. En el caso de la bacteria *Vibrio fischeri* la dilución de la muestra es importante ya que el elevado contenido de sales del agua de mar simulada induce a respuestas erróneas. *Vibrio fischeri* es una bacteria que se encuentra en agua de mar y, por esa razón, cuando entra en contacto con muestras que contienen altas concentraciones de sales responde con un aumento de la bioluminiscencia, es decir la

bacteria es estimulada. Para la *Daphnia magna* es importante realizar la dilución de la muestra porque aunque es más tolerante a elevadas concentraciones de sales que otros cladóceros, ese micro crustáceo es un organismo típico de aguas dulces (Gonçalves y cols., 2007). La aplicación de la dilución propuesta no representaba un problema grave respecto a la interpretación de los resultados, ya que en todo caso la concentración inicial del contaminante en los experimentos era elevada y, por tanto, la dilución permitía un mayor acercamiento a condiciones reales. Asimismo, los resultados han de ser considerados no de forma absoluta sino como indicativos de la evolución de la toxicidad con el proceso.

El bioensayo con *Vibrio fischeri* presentó un 60% de inhibición de la actividad bioluminiscente en la muestra inicial de FLU preparada en DIW, lo que indicaba que la disolución presentaba un cierto grado de toxicidad al inicio del tratamiento. Ya, al final del proceso de fotólisis, se observó no obstante una reducción de un 29% en el porcentaje de inhibición, que alcanzó valores por debajo de los considerados como tóxicos. La disolución de FLU en SW generó valores de % de inhibición muy similares para la muestra inicial y final, siendo en ambos casos inferior al 50%. La comparación de los resultados de *Vibrio fischeri* confirman un efecto de matriz leve aún realizándose la dilución previa de estas muestras.

En el bioensayo con *Daphnia magna*, el porcentaje de inhibición de la movilidad a una concentración inicial de FLU de 20 mg.L⁻¹ en DIW fue del 15% y 60% después de 24 y 48 h, respectivamente. Al final del proceso de fotólisis, se obtuvo un incremento discreto de la toxicidad, inalcanzándose un 65% de inmovilidad a las 48 horas. Esto indica que los PT tienen similar naturaleza tóxica que el compuesto de partida al final de bioensayo. La muestra inicial de FLU en medio marino presentó una toxicidad del 0 y 50% después de 24 y 48 horas, respectivamente. La muestra final en SW presentó una toxicidad más elevada, con un porcentaje de inhibición en la movilidad del 80% tras 48 horas. De acuerdo con estos datos, los PT se revelan como más tóxicos que la FLU para *Daphnia magna*.

Tabla 3.2 Evaluación de la toxicidad aguda (expresada como porcentaje de inhibición) frente a *Vibrio fischeri* (30min) y *Daphnia magna* (48h) de las muestras sometidas al proceso de fotólisis directa.

Comp/bioensayo		<i>Vibrio fischeri</i>		<i>Daphnia magna</i>		Literatura
		DIW	SW	DIW	SW	
FLU	Inicial	60%	34%	60%	50%	<u>EC₅₀ (<i>V. fischeri</i>)</u> 12-15 mg L ⁻¹ (Lalumera y cols., 2004); > 0.198 mg L ⁻¹ (Hernando y cols., 2007); 19.02 µg. L ⁻¹ (Backhaus y cols., 2000)
	Final	31%	26%	65%	80%	<u>EC₅₀ (<i>A. salina</i>)</u> 1000-100000 µg. L ⁻¹ (Backhaus y cols., 2000)

3.2 Fotólisis directa de Trimetoprim

En la actualidad, como se ha comentado en la parte introductoria de esta memoria, algunos antibióticos son foco de especial interés ya que no son eficientemente eliminados en las EDAR. El trimetoprim (TMP), por ejemplo, ha sido detectado en el medio ambiente en concentraciones de $\mu\text{g L}^{-1}$ en efluentes de EDAR (Batt y cols., 2007; Nagulapally y cols., 2009). De hecho, el TMP sólo es parcialmente eliminado mediante tratamientos convencionales y en tratamientos que utilizan biorreactores de lecho fijo (Göbel y cols., 2007). Además, el TMP es altamente soluble en agua y cuando es sometido a tratamientos biológicos, presenta una modesta absorción en la biomasa (Batt y cols., 2006).

Puesto que el TMP no puede ser biodegradado (Lunestad y cols., 1995), se considera, como en el caso de la FLU, la fotodegradación solar como la vía principal de transformación una vez que este compuesto alcanza el medio acuático. La eficacia de la fototransformación depende de la intensidad y frecuencia de la luz. Asimismo, se ve influenciada por condiciones ambientales tales como el pH, la composición del agua y ubicación, así como la estación del año y latitud. En algunos casos, la fotodegradación incompleta (fototransformación) puede llevar a la formación de compuestos tóxicos de estabilidad variable (Kümmerer, 2009a y 2009b). Por lo tanto, debido a la elevada solubilidad del TMP en agua y también por ser susceptible de generar un amplio número de PT bajo diversas condiciones, su estudio es pertinente.

En este trabajo, al igual que con FLU, se ha estudiado la fotólisis directa del TMP en dos matrices de agua distintas (agua desmineralizada y agua de mar simulada), con la intención de ampliar la comprensión del comportamiento de este compuesto cuando es sometido al proceso de fotólisis directa en el medio acuático natural. Además, como una de las matrices de estudio se ha seleccionado el agua de mar, fundamentalmente, porque las EDAR ubicadas cerca del litoral suelen verter sus efluentes en el mar. Asimismo, los estudios relacionados con el comportamiento de fármacos en tal matriz son escasos (Weigel y cols., 2004) y se conoce (Kiwi y cols., 2000) que la fotodegradación bajo condiciones de elevadas concentraciones de sales, como es el caso del agua de mar, podría generar compuestos indeseables como, por ejemplo, PT clorados.

Para garantizar la calidad de los resultados obtenidos en agua de mar simulada, se han aplicado los mismos procedimientos experimentales y analíticos en una matriz de agua desmineralizada. Así, sería posible determinar la aparición de cualquier nuevo compuesto durante los ensayos de agua de mar simulada comparando los resultados con los obtenidos en agua desmineralizada. Los principales PT generados a lo largo del proceso fotolítico fueron identificados mediante LC-TOF-MS. De esta forma, se evaluó la influencia de la

composición del agua en la ruta de fotodescomposición del TMP y, finalmente, se estimó la toxicidad de los PT formados a través de ensayos de toxicidad aguda realizados con *Vibrio fischeri*.

En la **figura 3.13** se comparan los espectros UV de una disolución de TMP preparada en agua desmineralizada y el espectro solar. El TMP presenta un espectro con bandas de absorción características para longitudes de onda de 203 y 281 nm. Igualmente, se observa que el espectro del TMP se solapa ligeramente con el espectro solar en el rango entre 305 y 315 nm.

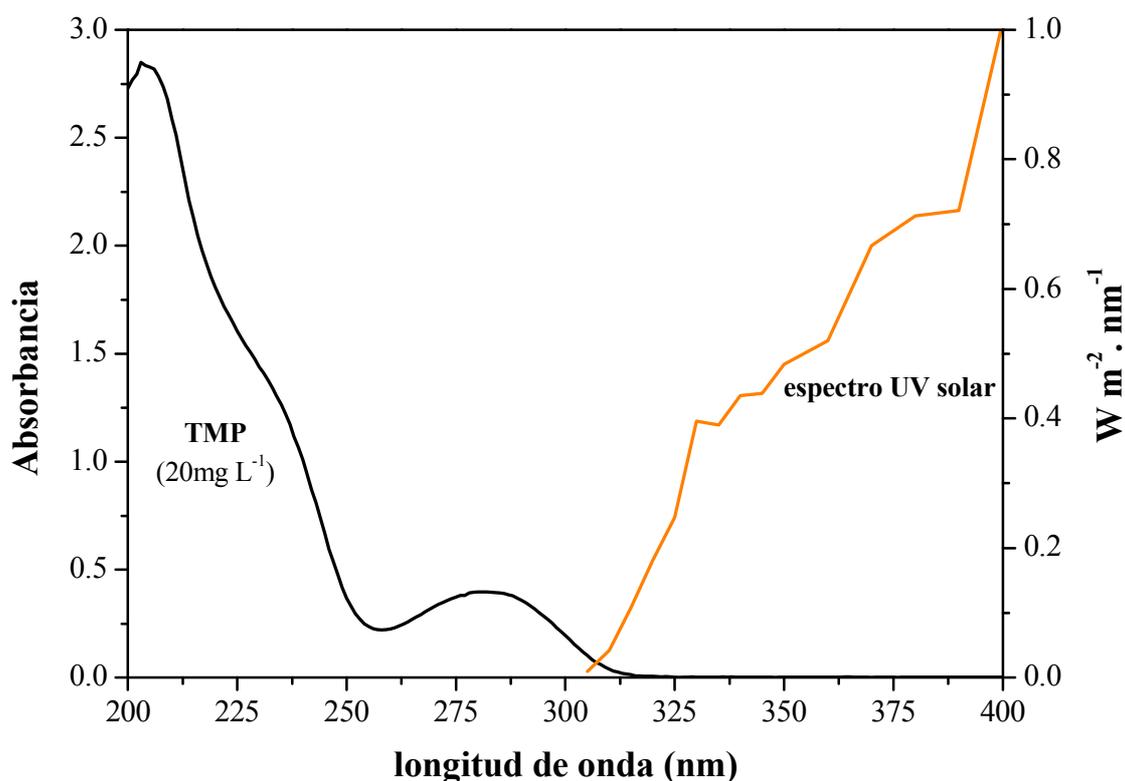


Figura 3.13 Espectro de absorción UV (200-400 nm) de TMP en agua ultra pura y espectro solar UV en la superficie terrestre (Almería).

En los experimentos de fotodescomposición del TMP se utilizó una concentración inicial de 20 mg L⁻¹ y pH 6 y 7.5 para agua desmineralizada (DIW) y agua de mar simulada (SW), respectivamente. La exposición a la radiación UV produjo la fototransformación del TMP en ambas matrices estudiadas, sin embargo la total desaparición de este compuesto sólo se alcanzó después de largos tiempos de exposición (>1000 minutos), hecho que demuestra la elevada estabilidad del TMP (véase **figura 3.14**). En DIW, el TMP alcanzó el 50% de reducción de su concentración inicial después de 780 minutos de exposición y la total degradación en aproximadamente 1100 minutos. Esta degradación no fue acompañada por la reducción del COD que, después de 3000 minutos, solo alcanzó una reducción de 27% del contenido orgánico determinado al principio del proceso. Tal resultado indica un proceso

de mineralización lento que se debe a la formación de PT más estables. La evolución del COD fue muy similar en ambas matrices acuosas estudiadas. Sin embargo, la degradación del TMP en SW estuvo influenciada por el contenido en sales del agua, mostrando una degradación más lenta, en aproximadamente 1400 minutos.

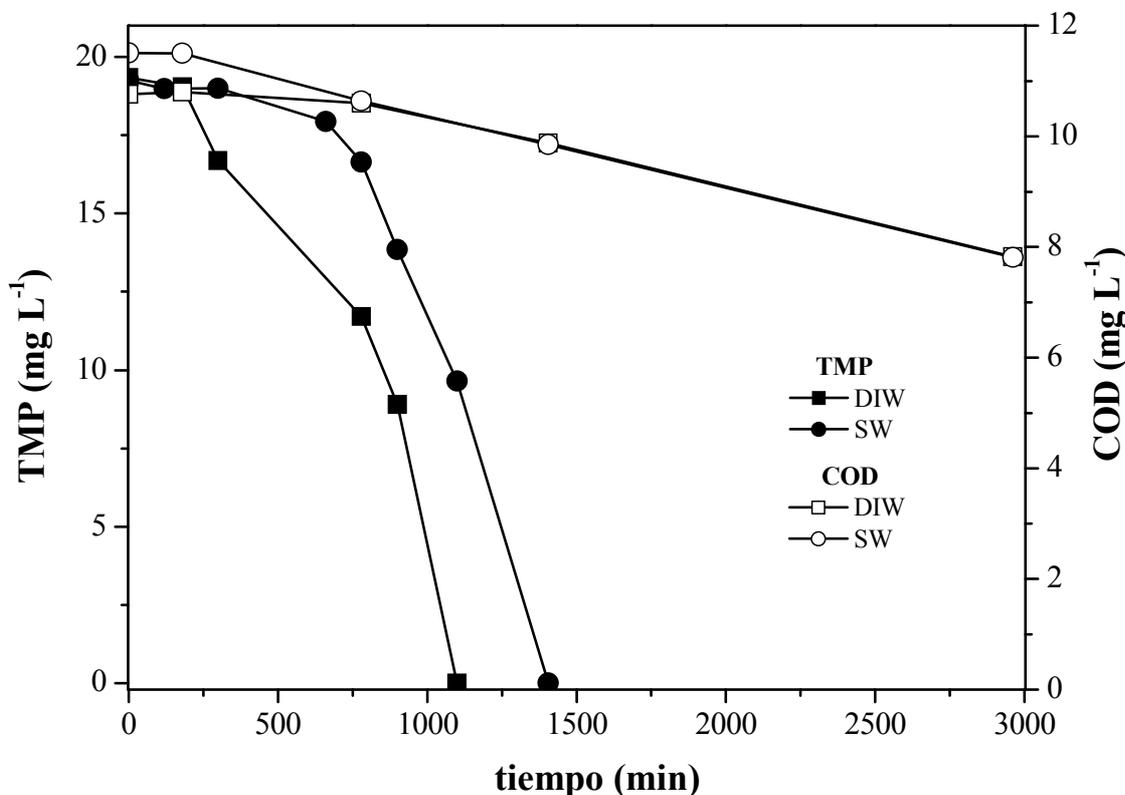


Figura 3.14 Degradación del TMP y COD durante el proceso de fotólisis en ambas matrices estudiadas.

La degradación del TMP no siguió una cinética de primer orden. Durante una primera etapa, que corresponde a los 700 minutos iniciales de exposición, la concentración del TMP era prácticamente estable, experimentando, después de este tiempo una degradación más rápida. Este comportamiento podía ser un indicio de que el mecanismo de degradación estaba condicionado, inicialmente a una reacción lenta por la irradiación solar y seguidamente a un segundo mecanismo más rápido inducido por la formación de un intermedio fotorreactivo que producía un efecto autocatalítico. Para legitimar esta hipótesis, los espectros UV de las soluciones de TMP fueron registrados a lo largo de todo el proceso fotolítico. Los resultados, tal y como se indica en las **figuras 3.15** y **3.16**, mostraron cambios significativos en los espectros UV iniciales del TMP en ambas matrices sugiriendo así la formación de una o más especies fotorreactivas, las cuales presentan una absorción UV más intensa que TMP en el rango de 300 nm hasta 350 nm.

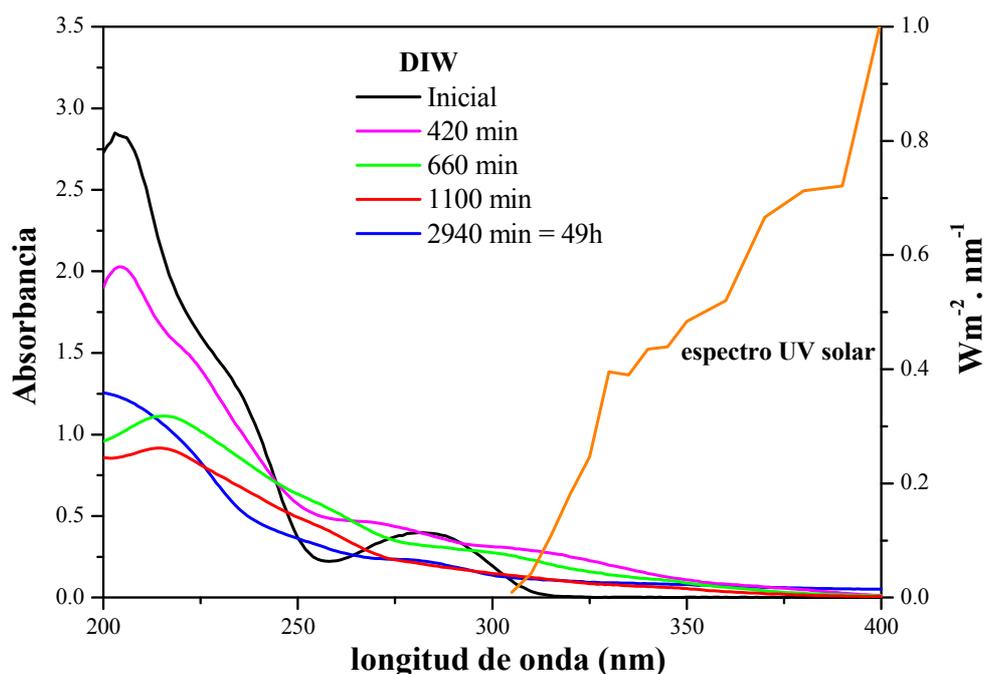


Figura 3.15 Espectros UV de las soluciones de TMP en DIW durante el proceso de fotólisis directa.

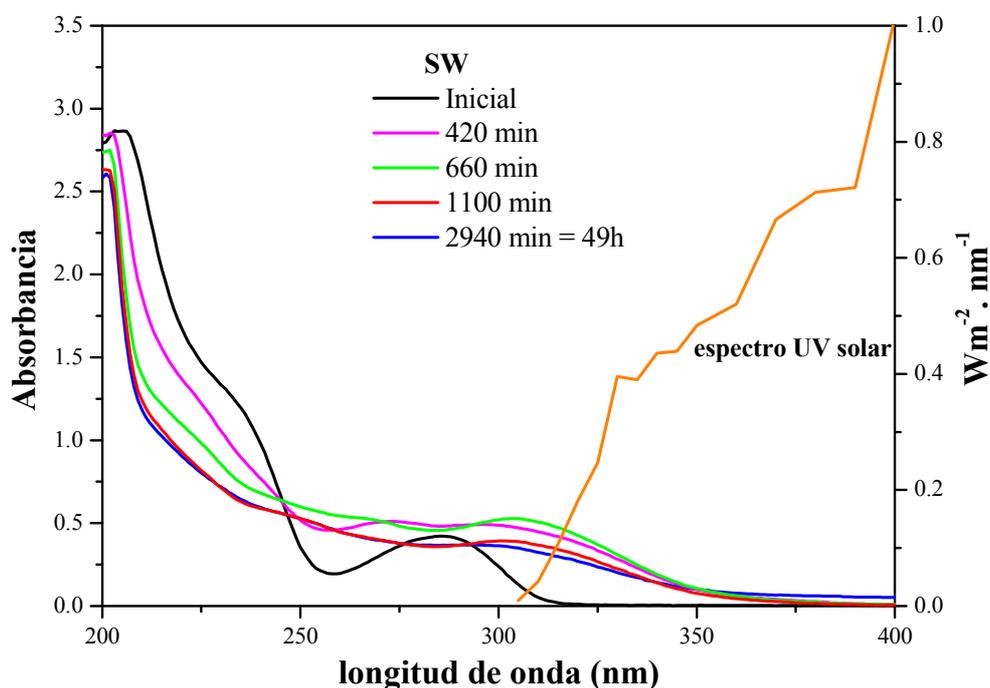


Figura 3.16 Espectros UV de las soluciones de TMP en SW durante el proceso de fotólisis directa.

La comparación de las curvas de degradación del TMP con las de aparición-desaparición de los principales PT generados durante los experimentos de fotodescomposición, permitió identificar un derivado cetónico (trimetoxibenzoilpirimidina. P1; véase en la **figura 3.17**), como el responsable más probable de este comportamiento. La formación de este

intermedio cetónico había sido previamente descrita por Bergh y cols. (1989) en disoluciones y suspensiones de TMP tamponadas a distintos pH (4.5-8) cuando éstas eran expuestas a la luz solar. Este compuesto podría actuar como un fotosensibilizador (Canonica y cols., 1995), induciendo la degradación del TMP mediante un mecanismo en el que podrían estar implicadas especies altamente oxidantes, como oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) o radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), (Gan y cols., 2008). En un intento de identificar las especies reactivas involucradas en el proceso, se aplicaron técnicas de *scavenging* o captura de radicales. Así, se irradiaron soluciones de TMP en presencia y en ausencia de 2-propanol. Está referenciado que este alcohol inhibe las reacciones inducidas por los radicales $\cdot\text{OH}$, mientras que su efecto es despreciable en procesos promovidos por estados triplete excitados u oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Vialaton y Richard, 2002). El efecto inhibitorio sobre la fotodegradación observado en los experimentos con 2-propanol (**figura 3.17**) sugiere que los radicales hidroxilo están implicados en la fototransformación de TMP en agua, así como se ha observado para las quininas solubles en agua (Alegría y cols., 1999).

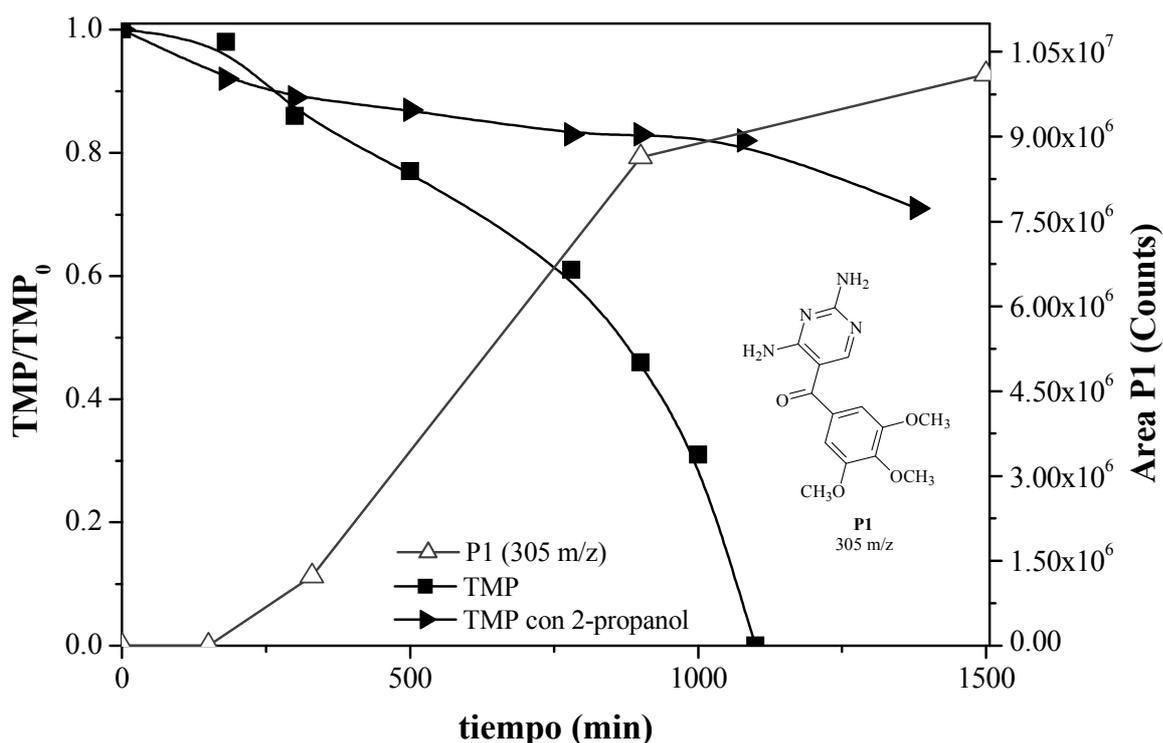


Figura 3.17 Degradación de TMP en presencia y ausencia de 2-propanol y formación del P1 (véase **tabla 3.3**).

3.2.1 Identificación de los productos de transformación del Trimetoprim mediante LC-TOF-MS

Para la identificación de los PT generados durante la fotólisis de TMP se utilizó una estrategia similar a la descrita previamente para FLU. La **figura 3.18** muestra los cromatogramas de iones totales (TIC) obtenidos durante los experimentos de degradación de TMP en DIW al principio del proceso, en un tiempo intermedio (1500 minutos) y al final del mismo (2940 minutos).

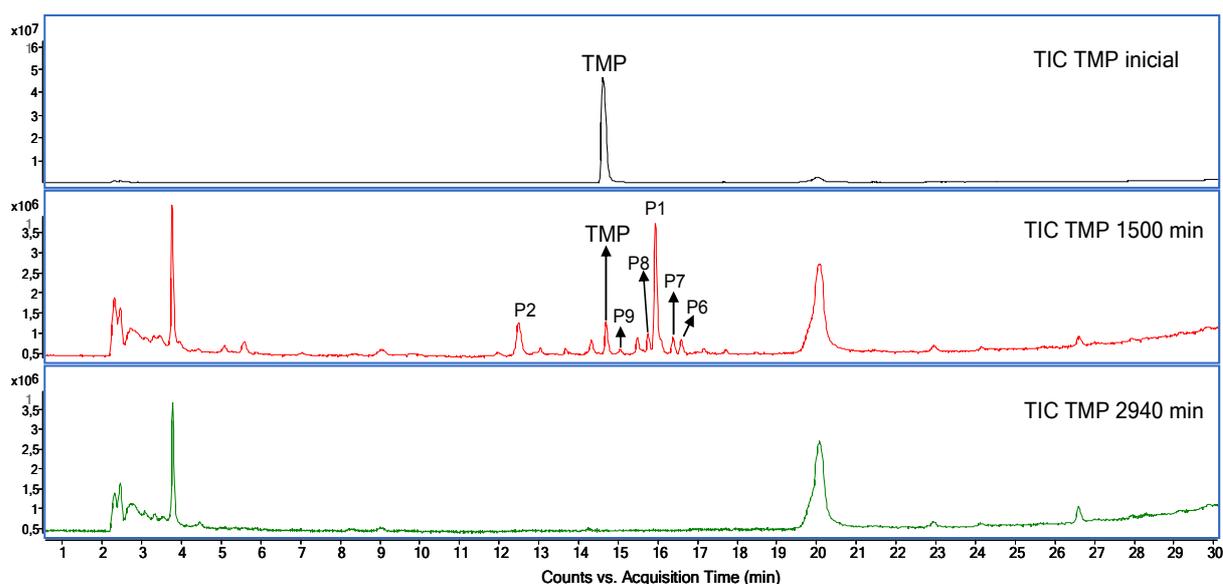


Figura 3.18 Cromatogramas de iones totales (TIC) de muestras del TMP en DIW a lo largo del proceso de fotólisis.

La información analítica obtenida a partir de los espectros de masa exacta de los PT identificados se muestra en las **tablas 3.3** y **3.4**. La elucidación estructural se basó, siempre que fue posible, en el patrón de fragmentación obtenido usando una fuente de ionización de *electrospray* operada en modo positivo. Además, para aumentar la fragmentación en la fuente se emplearon dos voltajes de fragmentación distintos, de 190 V (negro) y 260 V (azul) (véase **figura 3.19**). Los resultados de los análisis permitieron identificar 28 PT del TMP durante la fotólisis en DIW y 5 más observados en SW.

Tabla 3.3 Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para el TMP y los PT generados durante el proceso fotolítico en DIW.

Comp.	R _t	Formula	Masa Experimental (m/z)	Masa Calculada (m/z)	Error ppm	DBE
TMP	15.6	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₃	291.1451	291.1451	-0.23	8
		C ₁₃ H ₁₅ N ₄ O ₃	275.1140	275.1144	1.6	9
		C ₁₂ H ₁₃ N ₄ O ₃	261.0983	261.0988	1.9	9
P1	16.6	C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O ₄	305.1242	305.1244	-0.76	9

		$C_{13}H_{13}N_4O_4$	289.0942	289.0937	-1.62	10
		$C_{12}H_{11}N_4O_4$	275.0779	275.0780	0.37	10
P2	10.9	$C_{14}H_{19}N_4O_4$	307.1397	307.1400	-1.24	8
		$C_{14}H_{17}N_4O_3$	289.1303	289.1301	-0.21	9
		$C_{12}H_{11}N_4O_3$	259.0831	259.0831	0.27	10
		$C_{12}H_{11}N_4O_2$	243.0979	243.0882	1.18	10
		$C_{11}H_{11}N_4O_2$	231.0878	231.0882	1.68	9
P3	13.0	$C_{14}H_{19}N_4O_4$	307.1396	307.1401	1.57	8
		$C_{12}H_{13}N_4O_4$	277.0920	277.0931	4.1	9
		$C_5H_5N_4O$	137.0455	137.0458	2.1	6
		$C_5H_7N_4$	123.0665	123.0665	0.19	5
P4	14.3	$C_{14}H_{19}N_4O_4$	307.1395	307.1401	1.9	8
		$C_{12}H_{13}N_4O_4$	277.0928	277.0931	1.2	9
		$C_{12}H_{11}N_4O_3$	259.0826	259.0826	-0.13	10
		$C_5H_7N_4$	123.0666	123.0665	-0.63	5
P5	17.1	$C_{14}H_{19}N_4O_5$	323.1349	323.1349	-0.3	8
		$C_{11}H_{13}N_4O_3$	249.0988	249.0987	-0.45	8
P6	16.8	$C_{14}H_{19}N_4O_5$	323.1352	323.1349	0.63	8
		$C_{14}H_{17}N_4O_4$	305.1247	305.1244	0.88	9
		$C_{13}H_{15}N_4O_4$	291.1104	291.1093	-3.72	9
		$C_{11}H_{13}N_4O_3$	249.0988	249.0987	-0.36	8
P7	16.3	$C_{14}H_{19}N_4O_5$	323.1350	323.1349	0.01	8
		$C_{14}H_{17}N_4O_4$	305.1247	305.1250	0.81	9
		$C_{13}H_{15}N_4O_4$	291.1097	291.1093	-1.29	9
		$C_{11}H_{13}N_4O_3$	249.0979	249.0988	3.54	8
		$C_{11}H_{11}N_4O_4$	231.0875	231.0882	3.06	9
P8	15.9	$C_{14}H_{19}N_4O_5$	323.1350	323.1349	0.01	8
		$C_{12}H_{11}N_4O_3$	259.0820	259.0831	4.27	10
		$C_{11}H_{11}N_4O_2$	231.0883	231.0882	-0.55	9
		$C_9H_9N_4O$	189.0761	189.0776	8.07	8
P9	15.3	$C_{14}H_{19}N_4O_5$	323.1349	323.1349	-0.3	8
		$C_{13}H_{15}N_4O_4$	291.1098	291.1093	-1.58	9
		$C_{12}H_{17}N_4O_4$	281.1249	281.1244	1.67	7
		$C_{11}H_{13}N_4O_3$	249.0998	249.1004	2.32	9
		$C_{10}H_{11}N_4O_3$	235.0825	235.0825	-0.28	8
		$C_{11}H_{11}N_4O_2$	231.0880	231.0882	-0.11	9
		$C_9H_9N_4O$	189.0771	189.0776	2.77	8
P10	14.9	$C_{14}H_{19}N_4O_5$	323.1358	323.1349	2.49	8
		$C_{13}H_{17}N_4O_5$	309.1197	309.1193	1.14	8
P11	13.9	$C_{12}H_{15}N_4O_4$	279.1095	279.1087	2.57	8
		$C_{10}H_{13}N_4O_4$	253.0926	253.0931	-2.10	7
		$C_8H_7N_4O_3$	207.0524	27.0512	5.47	8
		$C_8H_5N_4O_2$	189.0413	189.0407	3.16	9
		$C_7H_7N_4O$	163.0616	163.0614	1.00	7
P12	9.5	$C_{13}H_{17}N_4O_5$	309.1192	309.1194	0.44	8
		$C_{11}H_{11}N_4O_5$	279.0719	279.0724	1.88	9
		$C_9H_7N_4O_3$	219.0511	219.0513	0.77	9
P13	9.8	$C_{13}H_{17}N_4O_5$	309.1191	309.1194	0.91	8
		$C_{11}H_{15}N_4O_4$	267.1088	267.1088	-0.2	7
P14	11.9	$C_{13}H_{17}N_4O_5$	309.1191	309.1194	-0.46	8
P15	13.1	$C_{13}H_{17}N_4O_5$	309.1198	309.1194	-1.57	8
		$C_{13}H_{15}N_4O_4$	291.1101	291.1088	-4.61	9
		$C_{11}H_{13}N_4O_3$	249.0979	249.0982	1.32	8
P16	12.7	$C_{13}H_{17}N_4O_5$	309.1188	309.1194	1.76	8
P17	6.4	$C_{12}H_{15}N_4O_5$	295.1033	295.1036	-1.34	8
		$C_{11}H_{15}N_4O_3$	251.1134	251.1138	-1.86	7
P18	5.0	$C_{12}H_{15}N_4O_5$	295.1031	295.1036	-2.02	8
		$C_{11}H_{13}N_4O_4$	265.9290	265.0931	-0.87	8
		$C_5H_7N_4O_2$	155.0564	155.0563	0.31	5
P19	3.7	$C_{12}H_{15}N_4O_5$	295.1021	295.1037	5.5	8
P20	13.7	$C_{13}H_{17}N_4O_7$	341.1097	341.1091	1.54	8
		$C_{13}H_{17}N_4O_5$	309.1196	309.1193	0.82	8
P21	4.0	$C_{13}H_{17}N_4O_7$	341.1093	341.1091	0.36	8

		$C_{11}H_{15}N_4O_7$	315.0934	315.0935	-0.40	7
		$C_{10}H_{14}N_3O_6$	272.0877	272.0882	1.79	6
		$C_{10}H_{13}N_4O_4$	253.0983	253.0931	-1.31	7
		$C_9H_{11}N_4O_4$	239.0770	239.0774	-2.01	7
		$C_9H_{11}N_4O_2$	207.0878	207.0876	0.71	7
		$C_8H_9N_4O_2$	193.0725	193.072	2.58	7
P22	4.0	$C_{11}H_{13}N_4O_5$	281.0879	281.0880	-0.52	8
		$C_{10}H_{11}N_4O_4$	251.0759	251.0774	-6.3	8
		$C_{10}H_{13}N_4O_3$	237.0971	237.0992	-4.71	7
		$C_7H_9N_4O$	165.0768	165.0770	-1.74	6
		$C_5H_9N_4$	125.0818	125.0821	-2.98	4
P23	6.9	$C_{12}H_{13}N_4O_4$	277.0932	277.0931	0.25	9
P24	12.5	$C_{13}H_{15}N_4O_5$	307.1041	307.1036	1.31	9
		$C_{10}H_9N_4O_3$	233.0675	233.0675	-0.09	9
P25	14.9	$C_{14}H_{19}N_4O_7$	355.1243	355.1248	-1.48	8
		$C_{14}H_{19}N_4O_6$	339.1289	339.1299	-2.98	8
P26	2.9	$C_5H_9N_4O$	141.0768	141.0770	-2.04	4
		$C_5H_7N_4$	123.0673	123.0665	6.32	5
		$C_2H_4N_3O$	86.0352	86.0348	3.62	3
P27	3.7	$C_5H_7N_4O$	139.0611	139.0614	-2.43	5
P28	3.4	$C_5H_7N_4O_2$	155.0567	155.0563	2.24	5
		$C_5H_5N_4O$	137.0459	137.0457	0.82	6

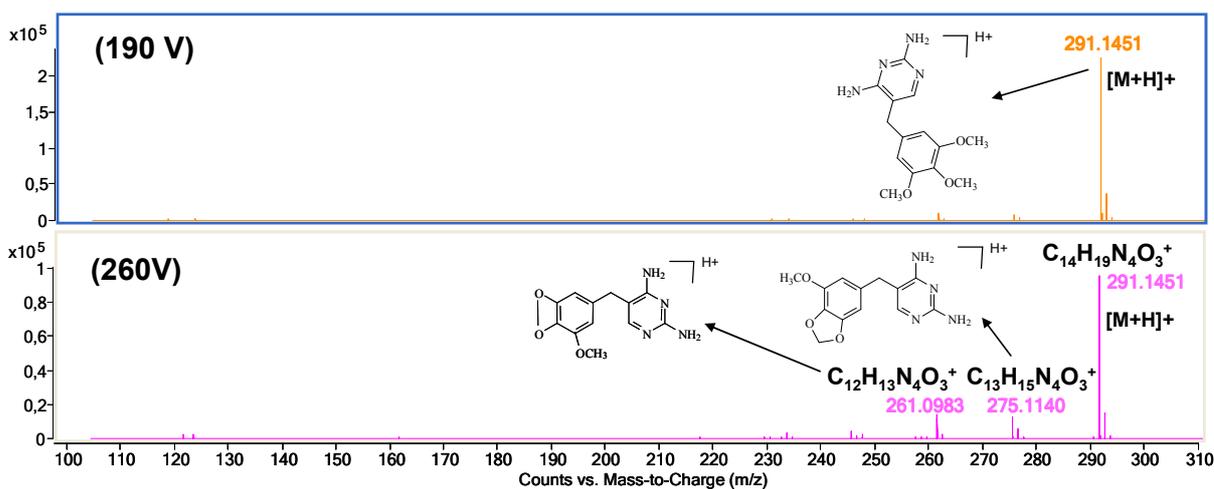


Figura 3.19 Espectro de masas del TMP obtenido por LC-TOF-MS para voltajes de fragmentación de 190V y 260V.

Tabla 3.4 Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para el TMP y los PT generados durante el proceso fotolítico en SW.

Comp.	R_t	Formula	Masa Experimental (m/z)	Masa Calculada (m/z)	Error ppm	DBE
TMP	15.2	$C_{14}H_{19}N_4O_3$	291.1464	291.1457	-1.81	8
P1	16.1	$C_{14}H_{17}N_4O_4$	305.1252	305.1250	-0.57	9
		$C_{13}H_{13}N_4O_4$	289.0940	289.0937	-1.16	10
		$C_{12}H_{11}N_4O_4$	275.0781	275.0780	-0.25	10
P2	13.18	$C_{14}H_{19}N_4O_4$	307.1412	307.1406	-1.72	8
		$C_{14}H_{17}N_4O_3$	289.1308	289.1301	-2.65	9
		$C_{12}H_{11}N_4O_3$	259.0840	259.0831	-3.53	10
P26	2.68	$C_5H_9N_4O$	141.0770	141.0770	0.55	4
P27	4.02	$C_5H_7N_4O$	139.0622	139.0620	-1.49	5

P28	2.84	C ₅ H ₇ N ₄ O ₂	155.0559	155.0563	2.45	5
P29	15.82	C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O ₆	337.1151	337.1148	-0.74	9
		C ₁₃ H ₁₃ N ₄ O ₅	305.0872	305.0886	4.44	10
		C ₁₁ H ₁₁ N ₄ O ₄	263.0778	263.0780	0.83	9
		C ₁₁ H ₉ N ₄ O ₃	245.0670	245.0675	1.83	10
		C ₁₀ H ₇ N ₄ O	199.0605	199.0620	7.43	10
P30	17.2	C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O ₆	337.1151	337.1148	-0.89	9
		C ₁₃ H ₁₃ N ₄ O ₅	305.0876	305.0886	3.23	10
		C ₁₁ H ₁₁ N ₄ O ₄	263.0773	263.0780	1.14	9
		C ₁₁ H ₉ N ₄ O ₃	245.0674	245.0675	0.18	10
		C ₁₀ H ₇ N ₄ O	199.0607	199.0620	6.53	10
		C ₅ H ₅ N ₄ O	137.0466	137.0463	-1.83	6
P31	18.23	C ₁₄ H ₁₅ N ₄ O ₄	303.1093	303.1093	0.11	10
		C ₁₂ H ₉ N ₄ O ₄	273.0630	273.0624	-0.64	11
		C ₁₂ H ₁₁ N ₄ O ₃	259.0832	259.0831	-0.43	10
P32	19.32	C ₁₀ H ₁₃ O ₅	213.0765	213.0763	-1.12	5
		C ₁₀ H ₁₂ NaO ₅	235.0582	235.0582	0.36	5
		C ₁₀ H ₁₁ O ₄	195.0654	195.0657	1.89	6
		C ₉ H ₁₃ O ₃	169.0864	169.0865	0.18	4
		C ₇ H ₇ O ₃	139.0406	139.0395	-7.99	5
P33	21.9	C ₁₀ H ₁₃ O ₄	197.0818	197.0814	-2.33	5
		C ₉ H ₁₃ O ₃	169.0865	169.0865	-0.31	4

El principal PT identificado fue la trimetoxibenzoilpirimidina (P1, m/z 305; C₁₄H₁₇N₄O₄, molécula protonada, véase **figura 3.17**). Este compuesto fue identificado durante la primera etapa del proceso de fotólisis y ha sido considerado como el promotor de una serie de fotorreacciones que incluyen la participación de radicales hidroxilo, como se ha discutido anteriormente. Estas reacciones comprenden reacciones de hidroxilación, demetilación y finalmente rotura de la molécula de TMP, tal y como se muestra en la **figura 3.20**.

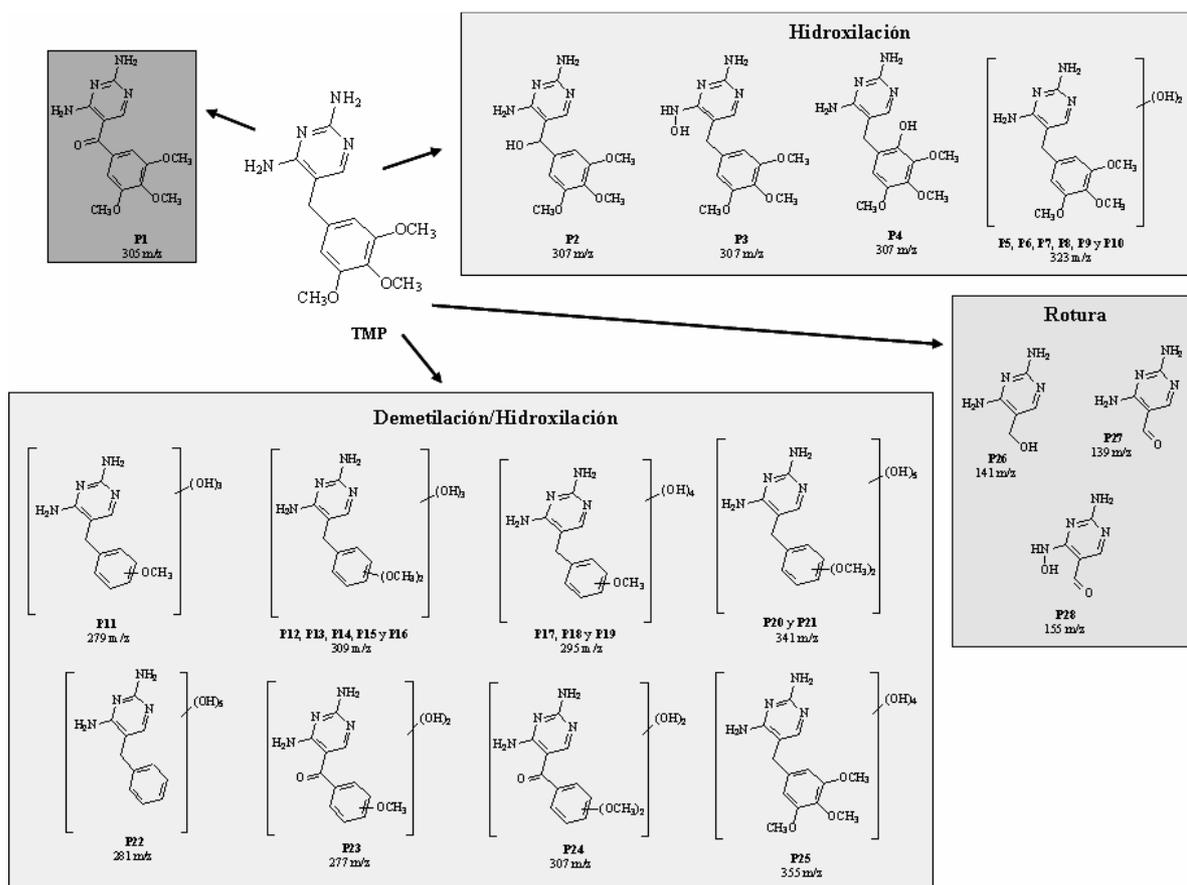


Figura 3.20 Estructuras químicas propuestas para los PT identificados para el proceso de fotólisis del TMP en DIW. La relación m/z es referida a la molécula protonada, tal como aparece en la **tabla 3.3**.

Las reacciones de hidroxilación dieron lugar a compuestos polihidroxiados con fórmula general $C_{14}H_{19}N_4O_{3+x}$, para el ion protonado, y con “x” variando desde 1 hasta 4. Como los radicales $\bullet OH$ no son selectivos se han detectado diversos compuestos con igual relación m/z que corresponden a isómeros posicionales. En general, no siempre es posible diferenciar los isómeros posicionales a través de la información suministrada por LC-TOF-MS. En algunos casos, como por ejemplo para los tres derivados monohidroxiados (P2, P3 y P4, m/z 307; $C_{14}H_{19}N_4O_4$) mostrados en la **figura 3.21**, la fragmentación adicional obtenida al aumentar el voltaje de fragmentación fue fundamental para realizar esta diferenciación. La estructura de P2 había sido propuesta previamente por Eichhorn y cols. (2005).

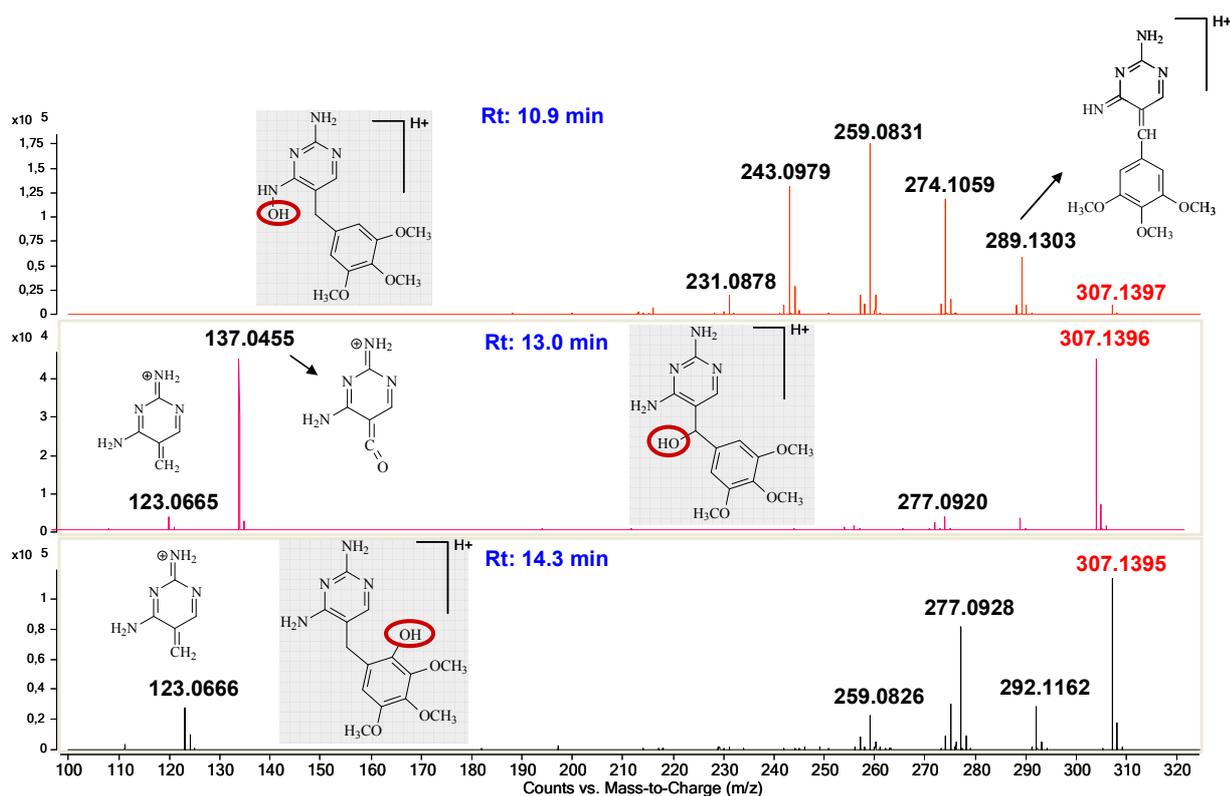


Figura 3.21 Espectros de masas de P2, P3 y P4 con las respectivas fragmentaciones de cada PT.

Por otro lado, un grupo de seis isómeros dihidroxilados (P5, P6, P7, P8, P9 y P10, m/z 323; $C_{14}H_{19}N_4O_5$) también fueron identificados, pero en este caso la diferenciación no fue posible. Finalmente, se observó la formación de un compuesto tetrahidroxilado (P25, m/z 355; $C_{14}H_{19}N_4O_7$). Paralelamente a la hidroxilación, se observó que tenían lugar reacciones de demetilación, evidenciadas por la presencia de iones protonados que presentaban la fórmula general $C_{14-y}H_{19-2y}N_4O_{3+x}$, con “y” variando de 1 a 3. Ejemplos de estas reacciones fueron los compuestos de m/z 309 (P12-P16; $C_{13}H_{17}N_4O_5$), m/z 341 (P20, P21; $C_{13}H_{17}N_4O_7$), m/z 295 (P17-P19; $C_{12}H_{15}N_4O_5$), m/z 279 (P11; $C_{12}H_{15}N_4O_4$) o m/z 281 (P22; $C_{11}H_{13}N_4O_5$). En ningún caso se apreció variación en el DBE, lo que confirmaba las reacciones propuestas. La mayor parte de los fotoproductos generados durante la fotólisis en DIW mantuvieron la estructura de dos anillos del TMP. Los cambios más importantes ocurrieron en el anillo trimetoxibenzílico de esta estructura. Sin embargo, la apertura foto-inducida de la molécula de TMP se ha confirmado mediante la identificación del (2,4-diaminopirimidin-5-il)metanol (P26, $C_5H_9N_4O$) y de los intermedios P27 ($C_5H_7N_4O$) y P28 ($C_5H_7N_4O_2$). Estos tres PT presentaron concentraciones más elevadas al final de los experimentos (**figuras 3.22 y 3.23**).

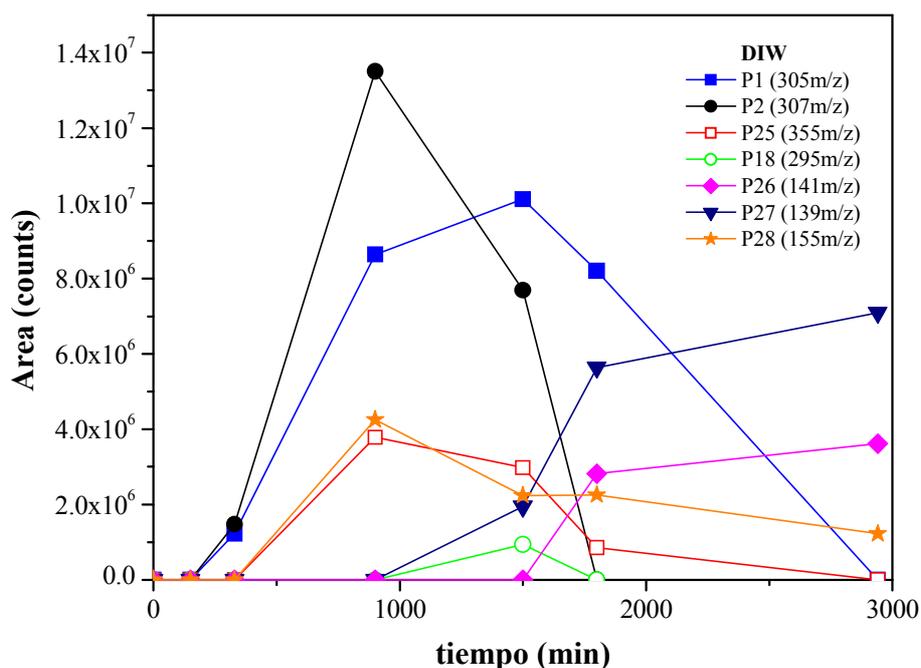


Figura 3.22 Abundancia de los principales PT del TMP generados para el proceso de fotólisis directa en DIW.

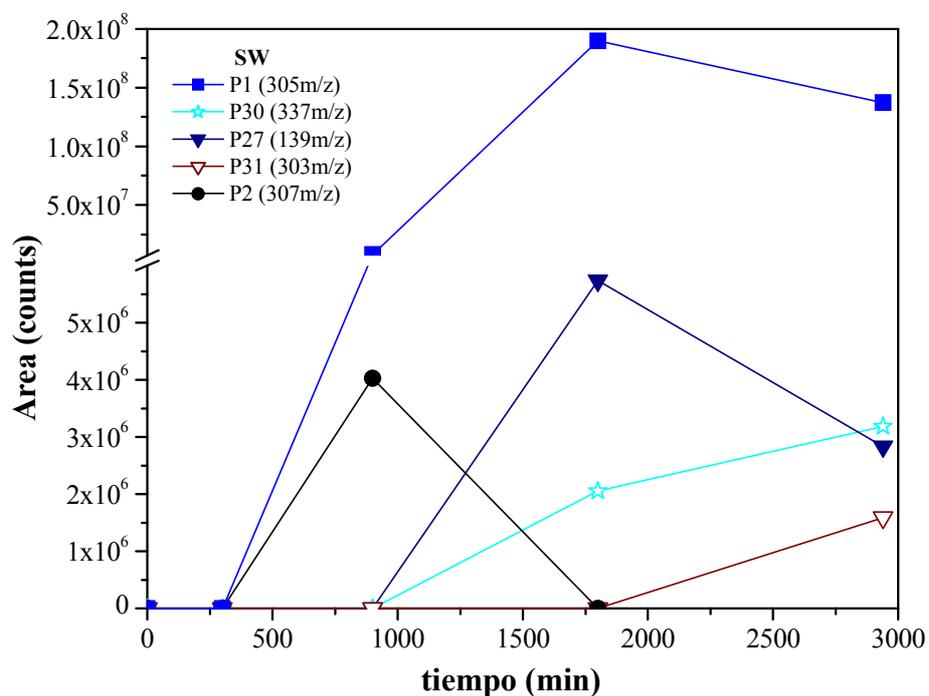


Figura 3.23 Abundancia de los principales PT del TMP generados para el proceso de fotólisis directa en SW.

La fotólisis directa del TMP en SW presentó un comportamiento muy distinto al observado en DIW. P1 fue también el principal intermedio generado, pero, a diferencia de lo que ocurría en DIW, este compuesto permanecía con una elevada abundancia en la solución hasta el

final del experimento (véase **figura 3.24**). La mayor parte de los derivados hidroxilados detectados en DIW no fueron determinados en SW. En este caso, los fotoproductos formados por reacciones de hidroxilación fueron P2, otros dos nuevos isómeros (P29 y P30) con relación m/z 337 ($C_{14}H_{17}N_4O_6$), formados por la hidroxilación del P1, y el compuesto P31 ($C_{14}H_{15}N_4O_4$), cuya estructura no pudo ser elucidada. Por otro lado, en SW se observó la presencia de P26, P27 y P28, así como de dos nuevos fotoproductos: el P32 (3,4,5-trimetoxibenzaldehído) y el P33 (ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico), que confirman la apertura de la molécula de TMP.

Estos resultados ponen de manifiesto que existen diferencias en el mecanismo de fotodegradación del TMP en función del medio en que se encuentre. En el caso del SW, es probable que la elevada concentración de Cl^- retarde o prevenga la formación del estado triplete del derivado cetónico (Gan y cols., 2008), inhibiendo así el mecanismo $\bullet OH$ -inducido y generando una ruta preferencial en la cual P1 permanece como el principal PT.

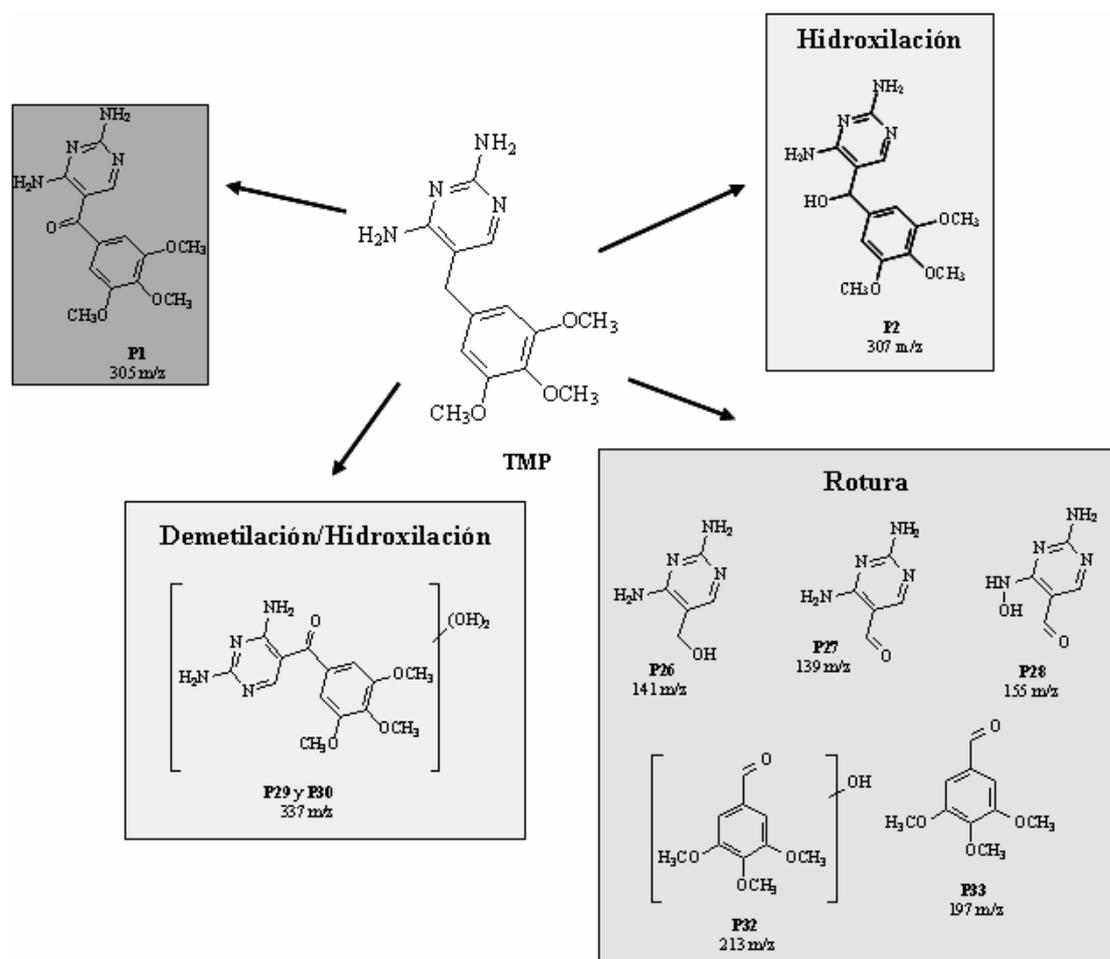


Figura 3.24 Estructuras químicas propuestas e iones protonados (m/z) de los PT identificados para el proceso de fotólisis del TMP en SW.

3.2.2 Toxicidad de trimetoprim y de los productos de transformación

La toxicidad del TMP y de los PT generados por fotólisis directa de ese antibiótico se estudió a través de un ensayo de toxicidad aguda basado en la inhibición de la luminiscencia emitida por la bacteria *Vibrio fischeri*. Inicialmente, así como se ha descrito en el estudio realizado con FLU, todas las muestras de SW, antes de realizarse el protocolo del bioensayo, fueron diluidas a una concentración final de cloruro de 2% para prevenir interpretaciones erróneas en los resultados del bioensayo de toxicidad. Según Hernando y cols. (2007) la salinidad podría ser la causa de una reducción en la toxicidad ya que el contenido de sales puede estimular luminiscencia.

Las soluciones iniciales de TMP (20 mg L^{-1}) en DIW y en SW no causaron inhibición en la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*. Después de un largo tiempo de exposición, los intermedios generados durante la fotólisis directa del TMP en DIW mostraron un aumento muy discreto en la toxicidad, observándose una inhibición de 13% en la bioluminiscencia después de 49 horas de exposición. A su vez, al final del proceso fotolítico en la matriz de SW, se ha observado una inhibición de sólo 4% en la luminiscencia emitida por la bacteria *Vibrio fischeri*. A la vista de los resultados obtenidos, no cabe esperar que el TMP o sus PT produzcan efectos tóxicos en el medio ambiente, a las concentraciones a las que estos puedan estar presentes.

Capítulo 4

DEGRADACIÓN DE TRIMETOPRIM, FLUMEQUINA Y ÁCIDO NALIDÍXICO MEDIANTE FOTOCATÁLISIS. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA TOXICIDAD

En este capítulo se abordarán los estudios de degradación mediante fotocátalisis solar de diferentes fármacos, previamente descritos en la **sección 1.6** del **capítulo 1** de esta memoria, disueltos en aguas de diferentes calidades. Por tratarse de una temática distinta de la descrita en el capítulo anterior, se optó por presentar estos trabajos en un capítulo propio.

4.1 Degradación del trimetoprim mediante fotocátalisis con TiO_2

La susceptibilidad del TMP para sufrir importantes transformaciones en el medio ambiente acuático, favoreciendo así la formación de una gran cantidad de PT, constituye una temática descrita en detalle en el capítulo anterior. Además, la eliminación ineficaz del TMP en los sistemas de tratamiento biológico convencionales pone de manifiesto la necesidad de aplicar tecnologías de tratamiento más eficientes que sustituyan o complementen a las técnicas actuales (Castiglioni y cols., 2006). En este contexto, estudios relevantes relacionados con las nuevas tecnologías de tratamiento consideran, a menudo, los procesos avanzados de oxidación (PAO) como los procesos más efectivos para la eliminación de una amplia gama de compuestos farmacéuticos como, por ejemplo, el TMP (Esplugas y cols.,

2007; Klavarioti y cols., 2009). En la actualidad, la mayoría de los estudios de nuevas tecnologías para el tratamiento del TMP remiten a la utilización de sistemas de ozonización (Radjenovic y cols., 2009b; Nakadaa y cols., 2007; Wert y cols., 2009). Los estudios del uso de la fotocátalisis solar con TiO_2 son escasos (Abellán y cols., 2009) y, por tanto, se hacen necesarios ya que proponer el empleo de una nueva tecnología viene condicionado por una evaluación pormenorizada de la misma que muestre sus ventajas, inconvenientes y limitaciones técnicas.

En esta sección, se estudia la degradación del TMP en dos matrices de agua distintas (agua desmineralizada, DIW, y agua de mar simulada, SW) mediante fotocátalisis solar con TiO_2 . Se han identificado los principales PT generados en este proceso por LC-TOF-MS y se ha evaluado la influencia de la composición del agua en la ruta de degradación de este contaminante. Un objetivo adicional fue determinar la posible formación de PT halogenados en la matriz de agua de mar simulada. Finalmente, se han realizado bioensayos de toxicidad con *Vibrio fischeri* a lo largo de todo el proceso fotocatalítico en ambas matrices.

Los experimentos se llevaron a cabo en un fotorreactor solar con capacidad de tratamiento de 35L, como el descrito en el **capítulo 2, sección 2.7.1**. La concentración inicial del compuesto estudiado, tanto en DIW como en SW, era de 20 mg L^{-1} y se ha utilizado una concentración de TiO_2 P25-Degussa de 200 mg L^{-1} en todos los experimentos. Los resultados de la degradación del TMP mediante fotocátalisis solar con TiO_2 se presentan en la **figura 4.1**. No se observaron cambios significativos en la concentración del TMP después de la adición del TiO_2 en ningún caso, descartándose por tanto que tenga lugar una adsorción relevante en la superficie del catalizador. Después de la exposición a la luz solar, el TMP fue totalmente degradado en ambos tipos de agua. La desaparición del TMP durante la fotocátalisis con TiO_2 siguió una cinética de pseudo primer orden, como es usual en la fotocátalisis heterogénea para contaminantes a bajas concentraciones. El comportamiento lineal de $\ln(C_0/C)$ en función del t_{30W} (basado en una cinética de Langmuir Hinshelwood) observado fue utilizado para calcular los parámetros cinéticos (Herrmann, 1999). Las constantes cinéticas (k) encontradas para cada situación en concreto son 0.22 min^{-1} para los experimentos en DIW y 0.081 min^{-1} para la matriz de SW, y los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) determinados correspondían a 3.2 min y 8.6 min para DIW y SW, respectivamente. La desaparición total del TMP en DIW se alcanzó después de 29 min de iluminación. Sin embargo, la mineralización del contenido orgánico fue bastante lenta. La concentración del COD se redujo en 64% después de 107 min de iluminación. En SW, la degradación y la mineralización observadas fueron más lentas (véase **figura 4.1**), por la presencia de especies inorgánicas que pueden actuar como captadores de los radicales hidroxilo, disminuyendo así la eficacia del proceso fotocatalítico. Por otro lado, el alto contenido en Cl

presente en SW, podría generar especies menos reactivas a partir de la reacción del ion cloruro con los radicales hidroxilo, tales como los radicales $Cl\dot{I}$ y $Cl_2\dot{-}$, los cuales son menos reactivos que los $\cdot OH$. (De Laat y cols., 2006). Además, los carbonatos y bicarbonatos (CO_3^{2-} y HCO_3^-) presentes en el agua compiten con los contaminantes orgánicos por los radicales hidroxilo, hecho que disminuye apreciablemente la eficacia de la degradación de la materia orgánica. Las **reacciones (4.1-4.7)** muestran estos procesos perjudiciales para la degradación de contaminantes orgánicos.

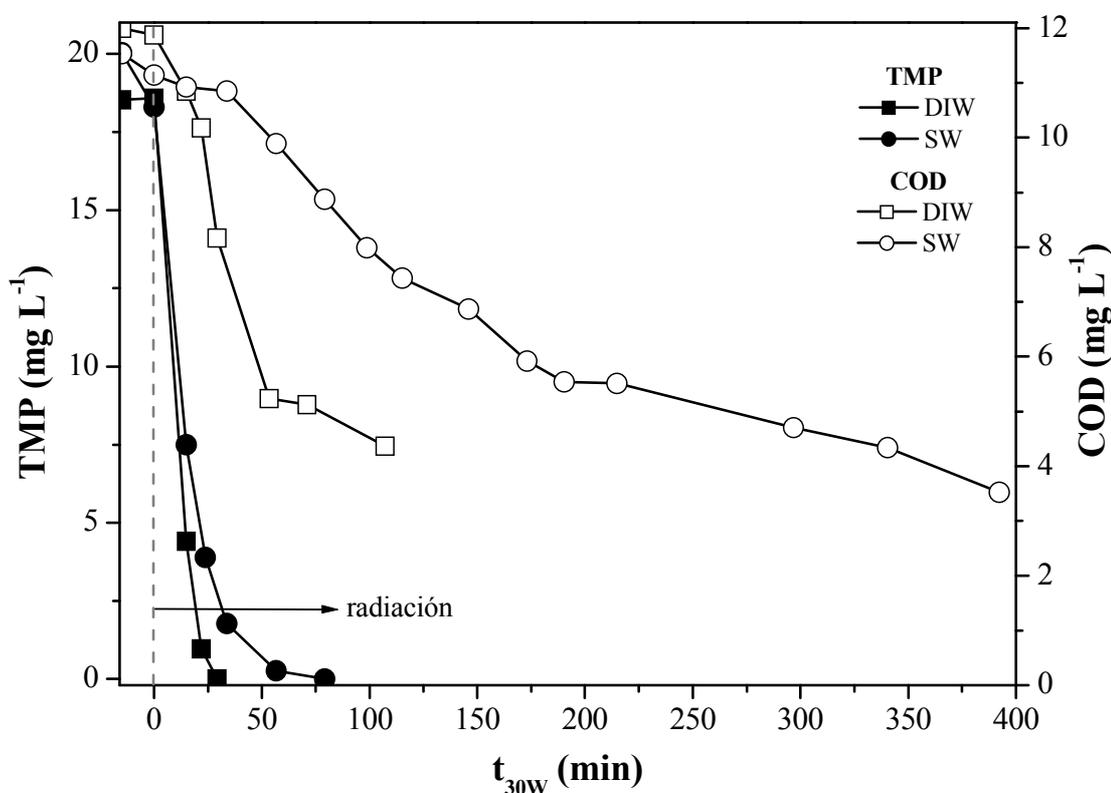
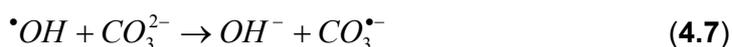
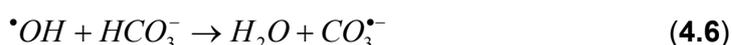
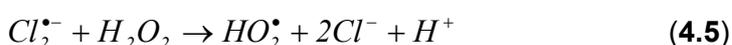
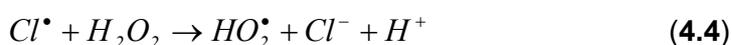


Figura 4.1 Degradación del TMP y COD durante el proceso de fotocatalisis con TiO_2 en ambos tipos de agua estudiados.

Durante los experimentos realizados en DIW se pudo evaluar la formación de compuestos inorgánicos nitrogenados (NH_4^+ y NO_3^-) durante la degradación del TMP. Estos resultados se presentan en la **figura 4.2**. La concentración de amonio más elevada (0.56 mg L^{-1}) se observó para un tiempo de iluminación de 37 min y, después de este punto, el NH_4^+ permaneció constante hasta el final del experimento. La concentración de nitrato presentó un incremento continuo durante el proceso de degradación fotocatalítica, con una concentración final de 1.17 mg L^{-1} . Estos resultados ponen de manifiesto que solamente el 20% del N presente en la composición inicial del TMP fue mineralizado a nitrato y/o amonio durante la fotocatalisis con TiO_2 , indicando así la presencia de una cantidad significativa de PT nitrogenados al final del tratamiento. También se determinó la posible formación de ácidos carboxílicos a lo largo del tratamiento. Los ácidos propiónico y oxálico se detectaron tras 70 min de iluminación, a concentraciones máximas de 0.49 y 1.19 mg L^{-1} , respectivamente. A continuación, se observó que la concentración de estos dos ácidos se reduce hasta llegar a una concentración final de 0.13 mg L^{-1} y de 0.3 mg L^{-1} para el ácido propiónico y el ácido oxálico, respectivamente. Se puede justificar la baja concentración de ácidos carboxílicos a lo largo de todo el experimento por la posible formación y degradación continuas de los mismos, lo que hace que estas especies no se acumulen y, por lo tanto no puedan ser determinadas a concentraciones significativas (mg L^{-1}) (Perez Estrada y cols., 2007).

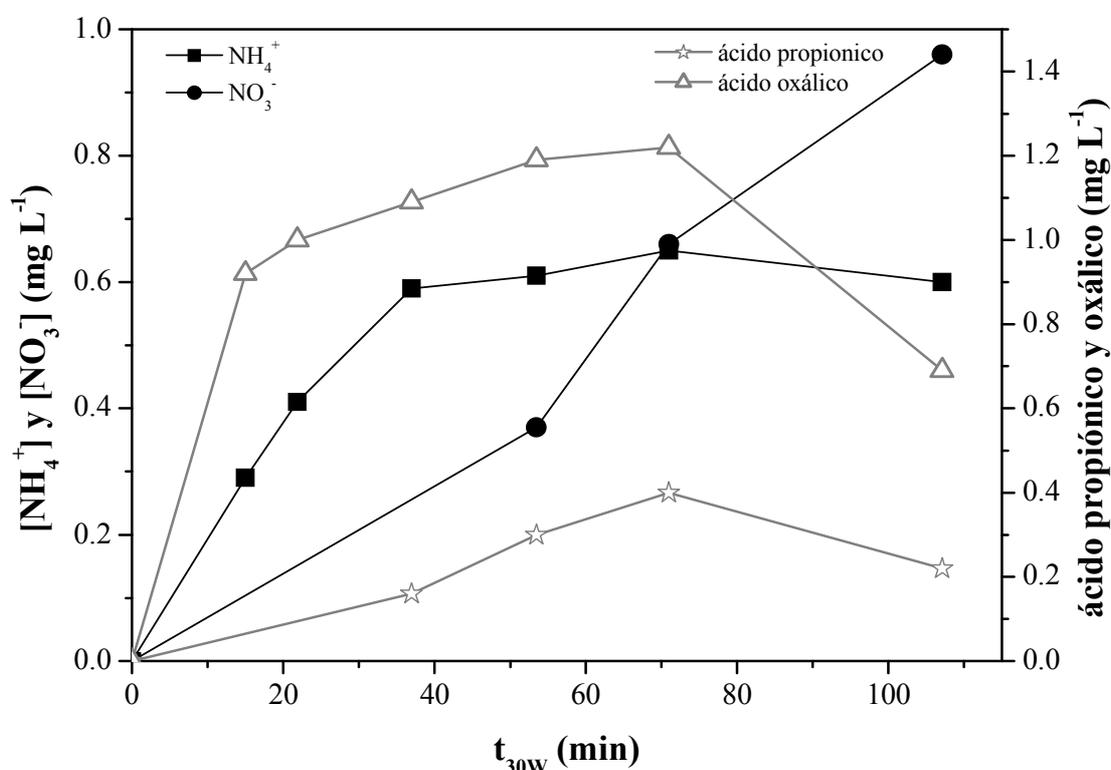


Figura 4.2 Concentraciones de NH_4^+ , NO_3^- y formación de ácidos carboxílicos durante el proceso fotocatalítico en ambas matrices estudiadas.

Se ha realizado un seguimiento de la toxicidad de la disolución a lo largo del proceso de degradación fotocatalítica del TMP. Como en la fotólisis directa, el tratamiento mediante fotocatalisis solar con TiO_2 produjo un aumento discreto en la inhibición de la luminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*. Al final del proceso de tratamiento se observaron inhibiciones del 33% en DIW y 54% en SW. Tales resultados permiten considerar que, una vez finalizado el tratamiento, los PT remanentes en DIW no eran tóxicos, pero que para SW, los productos remanentes eran moderadamente tóxicos para el organismo ensayado.

4.1.1 Identificación de los productos de transformación del trimetoprim mediante LC-TOF-MS

La identificación de los principales PT generados durante el tratamiento de fotocatalisis con TiO_2 se realizó a través del análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos de iluminación mediante LC-TOF-MS con interfaz *electrospray* (ESI), operando en modo positivo. Los resultados obtenidos han permitido evaluar la influencia de la composición de la matriz acuosa en la ruta de degradación del TMP, del mismo modo que se ha descrito en el estudio de fotólisis detallado en el **capítulo 3**. Para la realización de los análisis, alícuotas de las muestras tomadas en los ensayos realizados con ambos tipos de agua se mezclaron con el disolvente orgánico en la proporción correspondiente a la fase móvil y fueron introducidas directamente en el sistema cromatográfico. Los cromatogramas obtenidos con muestras a distintos tiempos de reacción (véase **figura 4.3**) confirman la formación de PT a lo largo del proceso fotocatalítico, más evidente en el caso de DIW.

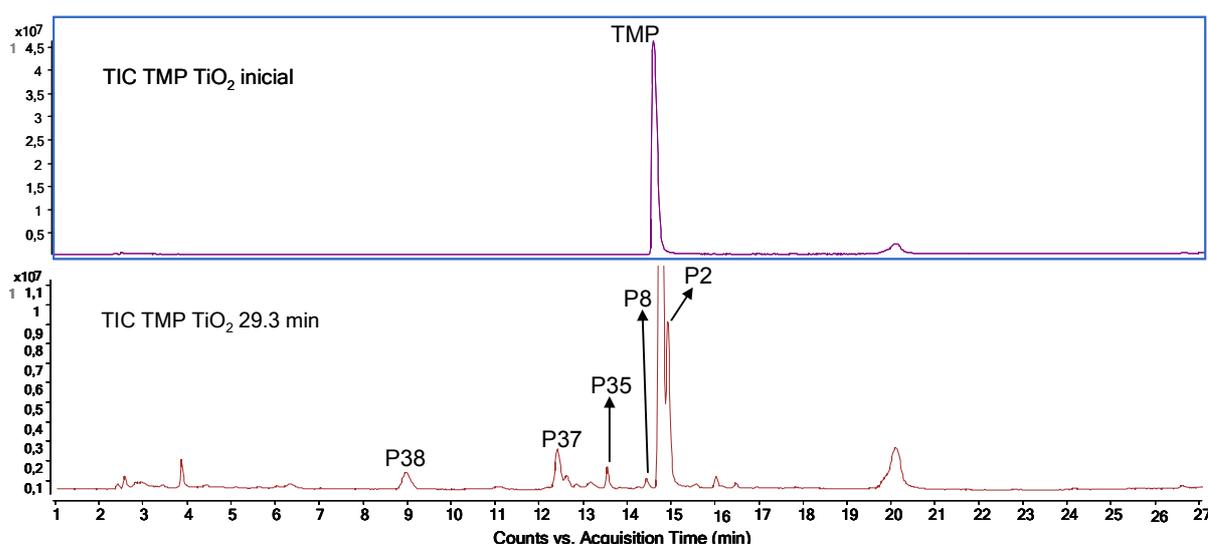


Figura 4.3 Cromatogramas de iones totales (TIC) obtenidos para la muestra inicial y una muestra intermedia obtenida durante el tratamiento fotocatalítico del TMP en DIW.

Los análisis mediante LC-TOF-MS generaron una gran cantidad de información que se registra en las **tablas 4.1 y 4.2**. En la mayoría de los casos, se han determinado errores muy pequeños entre las medidas de masa exacta experimentales y las fórmulas propuestas (< 5 ppm). Además, para aumentar la fragmentación en la fuente se emplearon dos voltajes de fragmentación distintos, de 190 V y 260 V. La propuesta de estructuras químicas fue posible tomando como base el conocimiento previo de la molécula precursora, del mecanismo del proceso oxidativo aplicado y de los PT ya identificados durante la fotólisis del TMP. Los resultados de los análisis por LC-TOF-MS permitieron identificar 24 PT del TMP durante el proceso de fotocatalisis con TiO₂ en DIW y 13 PT cuando la degradación fotocatalítica del TMP se realizaba en SW.

Tabla 4.1 Medidas de masa exacta obtenidas mediante LC-TOF-MS para el TMP y los PT generados durante el proceso de fotocatalisis con TiO₂ en DIW.

Comp.	R _t	Formula	Masa Experimental (m/z)	Masa Calculada (m/z)	Error ppm	DBE
TMP	14.7	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₃	291.1462	291.1457	1.67	8
		C ₁₃ H ₁₅ N ₄ O ₃	275.1142	275.1144	0.66	9
		C ₁₂ H ₁₃ N ₄ O ₃	261.0987	261.0988	0.31	9
P1	15.9	C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O ₄	305.1241	305.1250	2.85	9
P2	15.0	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₄	307.1398	307.1406	2.68	8
P3	14.2	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₃	291.1449	291.1457	2.94	8
		C ₁₂ H ₁₃ N ₄ O ₄	277.0937	277.0937	0.08	9
		C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₄	307.1393	307.1406	4.4	8
P4	12.5	C ₁₃ H ₁₅ N ₄ O ₄	291.1088	291.1093	1.91	9
		C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₄	307.1398	307.1406	2.65	8
		C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O ₃	289.1293	289.1301	2.7	9
P5	16.4	C ₁₂ H ₁₁ N ₄ O ₃	259.0829	259.0831	1.22	10
		C ₁₀ H ₁₆ N ₃ O ₆	274.1069	274.1039	-10.76	5
		C ₁₂ H ₁₁ N ₄ O ₂	231.0877	231.0882	2.14	9
		C ₁₁ H ₁₀ NO ₂	188.07	188.0711	6.13	8
		C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₅	323.1350	323.1355	1.75	8
P6	16.0	C ₁₁ H ₁₃ N ₄ O ₃	249.0988	249.0988	-0.17	8
		C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₅	323.1345	323.1355	3.3	8
P7	15.5	C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O ₄	305.1246	305.1250	1.21	9
		C ₁₂ H ₁₁ N ₄ O ₄	275.0781	275.078	-0.11	10
		C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₅	323.1349	323.1355	1.88	8
P8	14.4	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₅	323.1346	323.1355	2.95	8
		C ₁₃ H ₁₅ N ₄ O ₄	291.1099	291.1093	-1.9	9
		C ₁₁ H ₁₃ N ₄ O ₃	249.0982	249.0988	2.13	8
P9	12.1	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₅	323.1353	323.1355	0.85	8
		C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O ₄	305.125	305.125	0.1	9
P12	9.54	C ₁₃ H ₁₇ N ₄ O ₅	309.1192	309.1194	0.44	8
		C ₁₁ H ₁₁ N ₄ O ₅	279.0719	279.0724	1.88	9
		C ₉ H ₇ N ₄ O ₃	219.0511	219.0513	0.77	9
P13	9.8	C ₁₃ H ₁₇ N ₄ O ₅	309.1191	309.1194	0.91	8
		C ₁₁ H ₁₅ N ₄ O ₄	267.1088	267.1088	-0.2	7
P27	3.4	C ₅ H ₇ N ₄ O	139.0615	139.062	3.21	5
P34	13.1	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₆	339.1302	339.1304	0.75	8
		C ₁₃ H ₁₃ N ₄ O ₃	273.0985	273.0988	1.15	10
		C ₁₃ H ₁₅ N ₄ O ₄	291.1087	291.1093	2.06	9
		C ₁₀ H ₁₃ O ₆	229.0716	229.0712	-1.47	5
P35	13.5	C ₁₀ H ₁₃ O ₃	181.0862	181.0865	1.71	5
		C ₁₄ H ₂₁ N ₄ O ₅	325.1505	325.1512	2.27	7

		$C_{10}H_{13}O_3$	181.0858	181.0865	3.6	5
		$C_4H_7N_4O_2$	143.0561	143.0569	5.84	4
P36	12.8	$C_{14}H_{21}N_4O_6$	341.1458	341.1461	0.94	7
		$C_{14}H_{17}N_4O_3$	289.1296	289.1301	1.64	8
		$C_{13}H_{17}N_4O_3$	277.1299	277.1301	0.75	7
		$C_{10}H_{13}O_4$	197.0805	197.0814	4.29	5
		$C_4H_7N_4O_2$	143.0565	143.0563	-1.24	4
P37	12.3	$C_{13}H_{19}N_4O_4$	295.1401	295.1406	1.67	7
		$C_{13}H_{17}N_4O_3$	277.1296	277.1301	1.54	8
		$C_{11}H_{11}N_4O_3$	247.0835	247.0831	-1.47	9
		$C_{10}H_{11}N_4O_3$	219.0873	219.0882	4.08	8
		$C_{10}H_{13}O_3$	181.0862	181.0865	1.61	5
P38	8.9	$C_{13}H_{17}N_4O_3$	277.1296	277.1301	1.68	8
		$C_{11}H_{11}N_4O_3$	247.0829	247.0831	0.75	9
		$C_{10}H_{11}N_4O_2$	219.087	219.0882	5.72	8
P39	6.2	$C_{13}H_{17}N_4O_6$	325.1145	325.1148	0.83	8
		$C_{11}H_9N_4O_3$	245.067	245.0675	1.96	10
		$C_{10}H_{13}N_4O_3$	237.0988	237.0988	-0.17	7
P40	5.0	$C_{13}H_{17}N_4O_6$	325.1147	325.1148	0.22	8
		$C_{12}H_{15}N_4O_3$	263.1143	263.1144	0.56	8
P41	4.3	$C_{13}H_{17}N_4O_6$	325.1147	325.1148	0.38	8
		$C_{13}H_{17}N_4O_4$	293.1238	293.125	4.15	8
		$C_{11}H_{13}N_4O_3$	249.0981	249.0988	2.7	8
P42	3.8	$C_{13}H_{17}N_4O_6$	325.1147	325.1148	0.27	8
		$C_{11}H_{15}N_4O_6$	299.0993	299.0992	-0.3	7
		$C_{10}H_{15}N_4O_5$	271.1037	271.1042	2.09	6
		$C_9H_{11}N_4O_3$	223.0828	223.0831	1.61	7
P43	6.0	$C_{13}H_{19}N_4O_5$	311.1352	311.1355	1.06	7
		$C_9H_{11}N_4O_2$	207.0877	207.0882	2.41	7
		$C_9H_{11}O$	167.0698	167.0702	2.45	5
		$C_4H_7N_4O_2$	143.0552	143.0563	7.7	4
P44	4.7	$C_{12}H_{17}N_4O_6$	313.1146	313.1148	0.64	7
P45	2.9	$C_{12}H_{15}N_4O_7$	327.0929	327.0941	3.59	8
		$C_{12}H_{15}N_4O_6$	311.099	311.0992	0.48	8
		$C_6H_9N_4O_2$	169.0726	169.0725	0.02	5

Tabla 4.2 Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para el TMP y los PT generados durante el proceso de fotocatalisis con TiO_2 en SW.

Comp.	R _t	Formula	Masa Experimental (m/z)	Masa Calculada (m/z)	Error ppm	DBE
TMP	15.2	$C_{14}H_{19}N_4O_3$	291.1457	291.1457	0.06	8
		$C_{13}H_{15}N_4O_3$	275.1145	275.1144	-0.26	9
		$C_{12}H_{13}N_4O_3$	261.0987	261.0987	-1.43	9
P1	16.24	$C_{14}H_{17}N_4O_4$	305.1252	305.125	-0.6	9
		$C_{12}H_{11}N_4O_4$	275.0786	275.078	-2.03	10
P4	13.19	$C_{14}H_{19}N_4O_4$	307.1409	307.1406	-0.9	8
		$C_{14}H_{17}N_4O_3$	289.1299	289.1301	0.52	9
		$C_{12}H_{11}N_4O_3$	259.0834	259.0831	-0.89	10
		$C_{12}H_{11}N_4O_2$	243.0874	243.0882	3.41	10
		$C_{11}H_{10}NO_2$	188.0707	188.0712	2.6	8
P7	15.87	$C_{14}H_{19}N_4O_5$	323.1356	323.1355	-0.28	8
		$C_{14}H_{19}N_4O_3$	291.1466	291.1457	-2.95	8
P8	14.7	$C_{14}H_{19}N_4O_5$	323.1357	323.1355	-0.53	8
		$C_{12}H_{17}N_4O_4$	281.1257	281.125	-2.45	7
		$C_{11}H_{13}N_4O_3$	249.1014	249.0988	-10.67	8
P9	13.62	$C_{14}H_{19}N_4O_5$	323.1357	323.1355	-0.5	8
		$C_{13}H_{15}N_4O_4$	291.1097	291.1093	-1.17	9
		$C_{11}H_{15}N_4O_3$	251.1147	251.1144	-1.06	7

P26	2.7	C ₅ H ₉ N ₄ O	141.0777	141.0776	-0.69	4
P27	4.0	C ₅ H ₇ N ₄ O	139.0622	139.062	-1.69	5
P33	21.9	C ₁₀ H ₁₂ NaO ₄	219.0637	219.0633	-1.79	5
		C ₁₀ H ₁₃ O ₄	197.0816	197.0814	-1.2	5
		C ₉ H ₁₃ O ₃	169.0863	169.0865	1.13	4
P35	13.8	C ₁₄ H ₂₁ N ₄ O ₅	325.1517	325.1512	-1.4	7
		C ₁₀ H ₁₁ O ₃	181.0876	181.0865	-6.04	5
P39	4.0	C ₁₃ H ₁₇ N ₄ O ₆	325.114	325.1148	2.6	8
		C ₁₂ H ₁₅ N ₄ O ₆	311.0988	311.0992	1.02	8
		C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₄	281.1241	281.125	2.97	7
		C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₄	253.0943	253.0937	-2.24	7
P46	17.12	C ₁₀ H ₁₃ O ₃	181.0866	181.0865	-0.77	5
		C ₁₀ H ₁₂ NaO ₃	221.0794	221.079	-1.87	4
		C ₉ H ₁₃ O ₃	169.0871	169.0865	-3.49	4
P47	18.19	C ₁₁ H ₁₃ N ₄ O	217.1073	217.1089	7.39	8
		C ₁₁ H ₁₂ N ₄ NaO	239.0905	239.0988	1.61	8
		C ₉ H ₉ N ₄	173.0822	173.0827	3.27	8
P48	2.9	C ₁₂ H ₁₅ N ₄ O ₆	311.098	311.0992	3.81	8
		C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194.1182	194.1181	-0.43	5

Durante la fotocatalisis con TiO₂ en DIW, se han observado intermedios que corroboran la ocurrencia de reacciones de hidroxilación y demetilación (**figura 4.4**). Si bien estas reacciones son claramente manifiestas por la formula empírica de los compuestos, la posición de los sustituyentes no puede ser determinada con exactitud con la información disponible, como se refleja en la **figura 4.4**.

Así como durante la fotólisis del TMP, la trimetoxibenzoilpirimidina (P1) fue el principal intermedio detectado después de 15 minutos de exposición y en una concentración considerable (véase en la **figura 4.5**), pero en este caso su persistencia estuvo limitada a los tiempos iniciales de tratamiento. Después de 15 minutos, la concentración de P1 fue disminuyendo hasta su total desaparición a los 30 minutos de tratamiento. Otros PT anteriormente identificados en la fotólisis directa del TMP también fueron detectados durante el tratamiento fotocatalítico (P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P12, P13 y P27). Por otro lado, se identificó una nueva serie de PT (P35, P36, P37, P43 y P44). Uno de estos compuestos (P35) ha sido descrito en la literatura como un producto de degradación del TMP durante la etapa de nitrificación en un tratamiento por fangos activos (Eichhorn y cols., 2005).

Todos los PT identificados en los experimentos de fotocatalisis con TiO₂ pudieron ser totalmente degradados después de 54 minutos de tratamiento (**figura 4.5**).

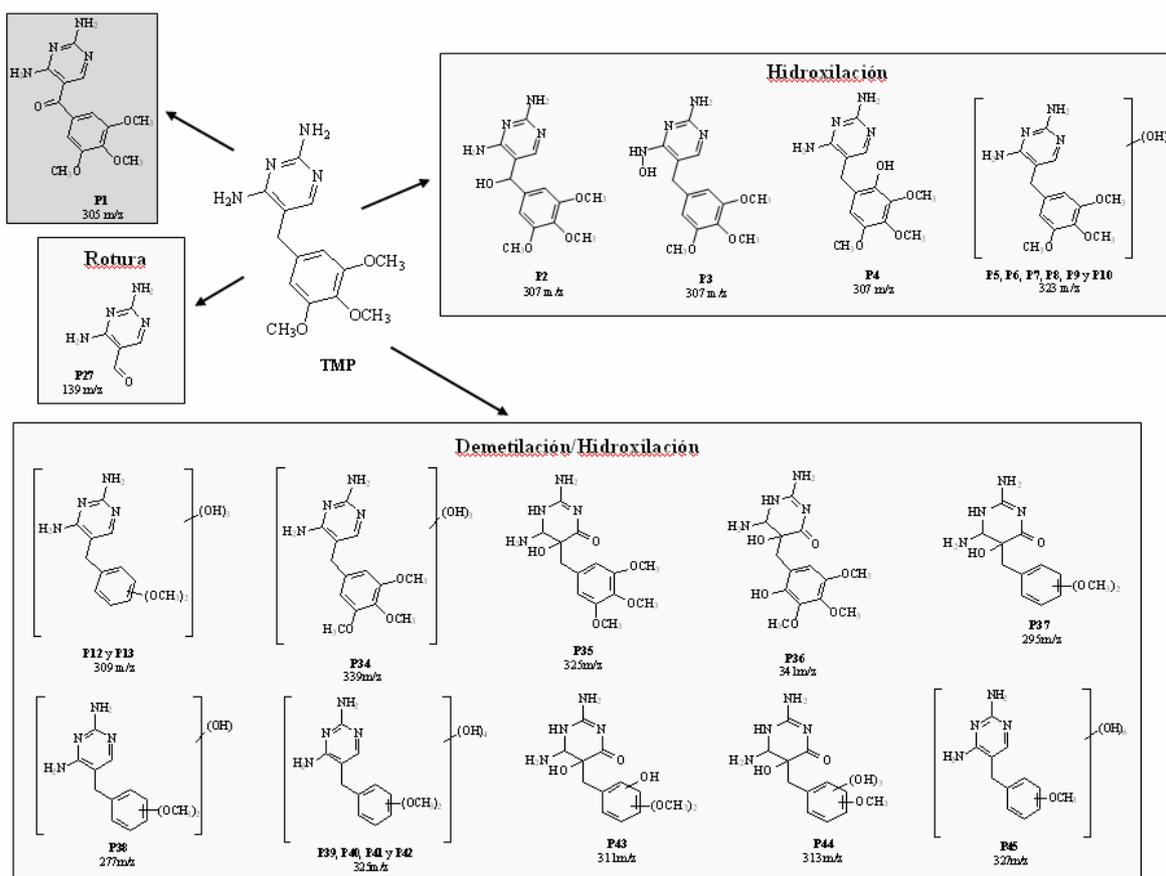


Figura 4.4 Estructuras químicas propuestas para los PT identificados durante el tratamiento de fotocatalisis con TiO₂ del TMP en DIW.

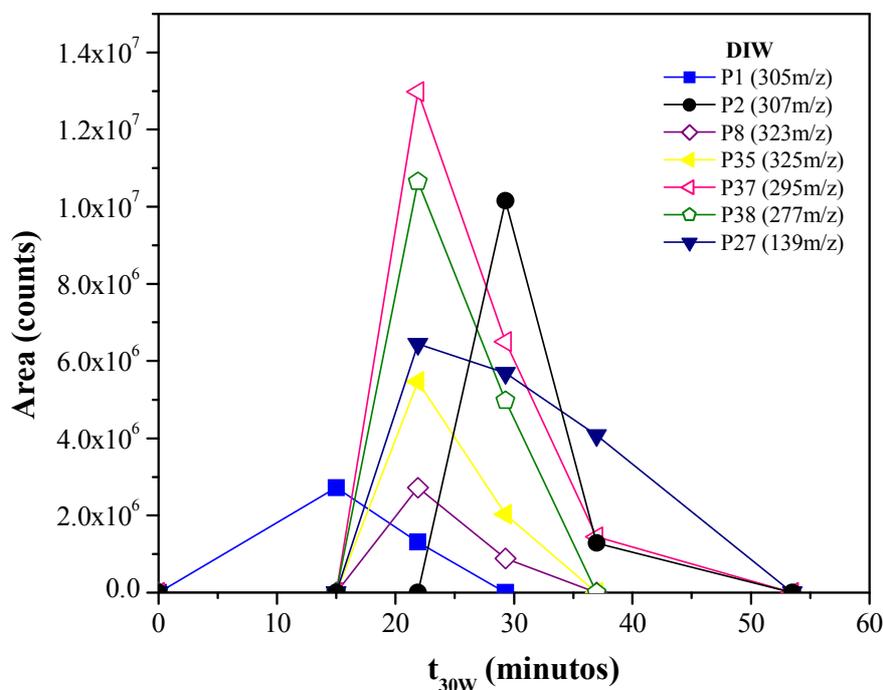


Figura 4.5 Abundancia de los principales PT del TMP generados en el proceso de fotocatalisis con TiO₂ en DIW.

Los ensayos realizados en SW, mostraron la presencia de PT comunes al proceso anterior, lo que indica que la degradación del TMP en SW transcurre mediante los mismos mecanismos (véase **figura 4.6**). En este caso, los nuevos compuestos identificados (P46, P47 y P48) solamente representan pasos intermedios en las rutas propuestas en DIW. Asimismo, la incompleta mineralización alcanzada durante los experimentos en SW está de acuerdo con la presencia de los intermedios P35 y P27 al final del tratamiento, como se muestra en la **figura 4.7**. La mayor persistencia de los PT en los tratamientos en SW pone de manifiesto, del mismo modo que se observó durante los estudios de fotólisis, que la elevada concentración de iones en la matriz inhibe la reacción con los radicales hidroxilo.

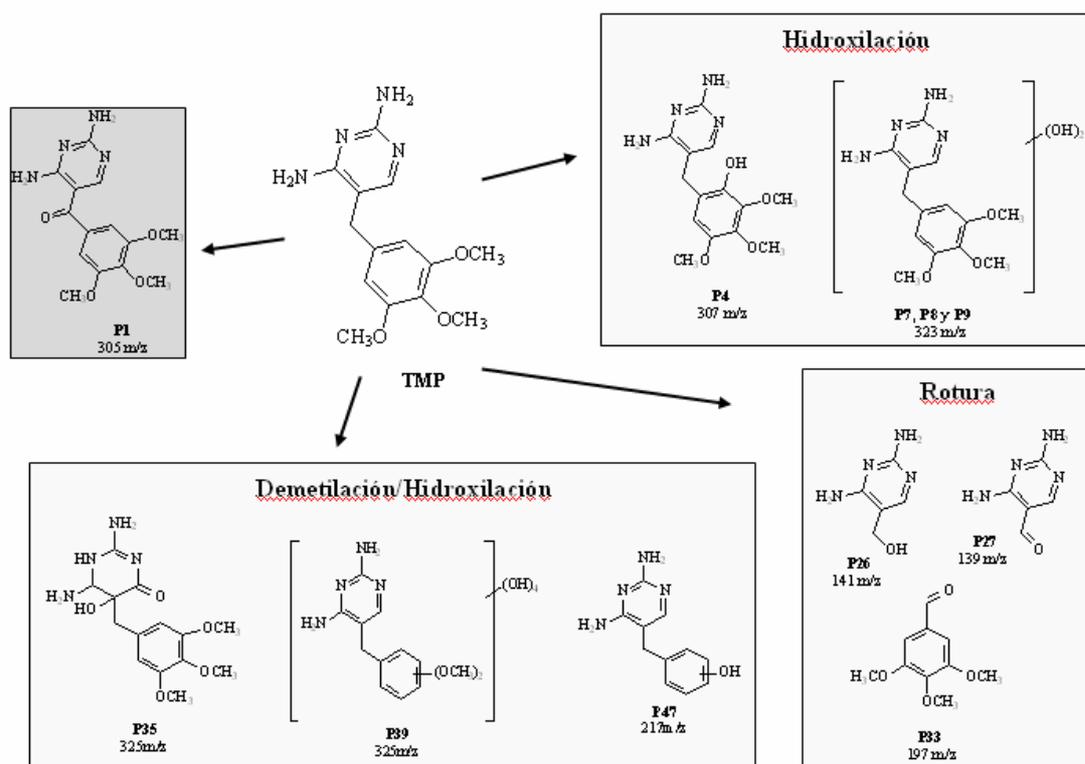


Figura 4.6 Estructuras químicas propuestas para los PT identificados durante el proceso de fotocatalisis con TiO₂ del TMP en SW.

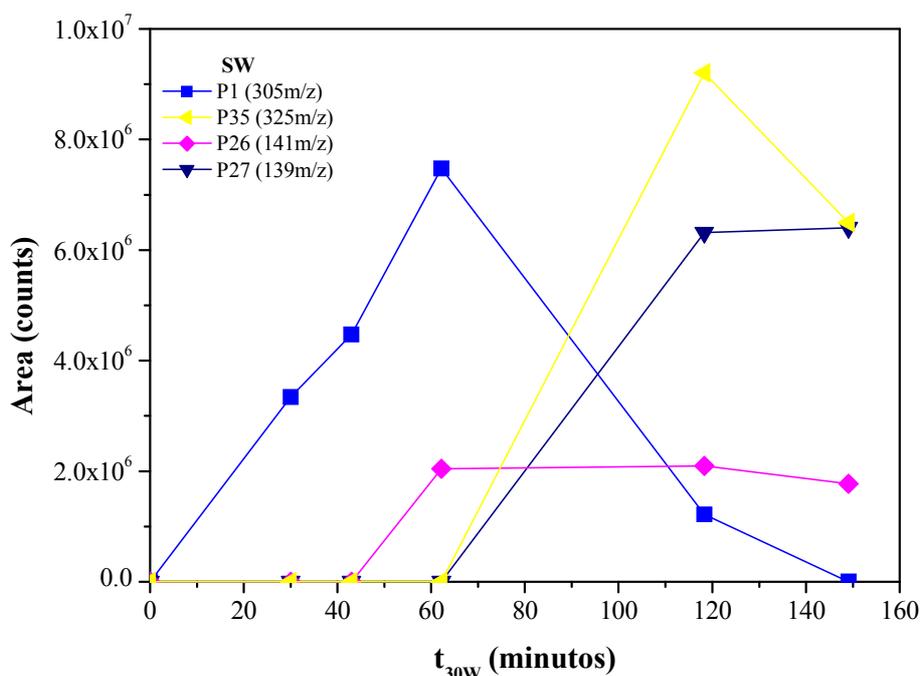


Figura 4.7 Abundancia de los principales PT del TMP generados durante el tratamiento mediante fotocatalisis con TiO₂ en SW.

4.2 Degradación de flumequina mediante fotocatalisis solar

La importancia de la FLU y su amplio uso por parte de la industria acuícola ya han sido mencionados anteriormente en el Capítulo 3. Como se ha descrito para el TMP, desafortunadamente, los tratamientos convencionales, como los que son empleados en las EDAR, no pueden eliminar totalmente la FLU y cantidades importantes de este contaminante son aportadas al medio acuático natural. Una vez en el medio ambiente, la FLU presenta una elevada persistencia y es susceptible de sufrir transformaciones y generar PT como los identificados en el capítulo anterior. Así, en este apartado se describen los estudios realizados para evaluar la eficiencia de los procesos de fotocatalisis solar (fotocatalisis con TiO₂ y foto-Fenton) en la degradación de FLU en una planta piloto con capacidad de tratamiento de 35L. Siguiendo un esquema similar al propuesto en el caso del TMP, se han evaluado los parámetros cinéticos, y se han identificado los principales intermedios originados durante el proceso. Por último, se ha determinado la toxicidad aguda asociada a los PT generados mediante la aplicación del bioensayo basado en la bioluminiscencia de la bacteria marina *Vibrio fischeri*.

4.2.1 Fotocatalisis con TiO₂

Los experimentos de fotocatalisis heterogénea fueron llevados a cabo en el fotorreactor descrito en el capítulo 2, sección 2.7.1. En estos ensayos, se llenaba el sistema con 35 L

de una solución de FLU a una concentración de 20 mg L^{-1} preparada con agua desmineralizada y se utilizaban 200 mg L^{-1} de TiO_2 P25-Degussa como fotocatalizador. No se observaron efectos significativos de adsorción de la FLU sobre el fotocatalizador; sin embargo, después de iniciado el experimento, la FLU fue rápidamente degradada (véase **figura 4.8**). Fueron necesarios alrededor de 30 minutos de iluminación para alcanzar la completa eliminación de la FLU de la disolución. Sin embargo, la mineralización del contenido orgánico presente en la muestra inicial fue más lenta e inexistente durante los primeros 20 minutos, lo que es consistente con la ruta de degradación propuesta a continuación, donde se puede apreciar que los intermedios detectados no proceden de la mineralización de ninguno de los enlaces C-C de FLU. Se determinó que después de 85 minutos de iluminación el COD inicial se había reducido aproximadamente en un 80%.

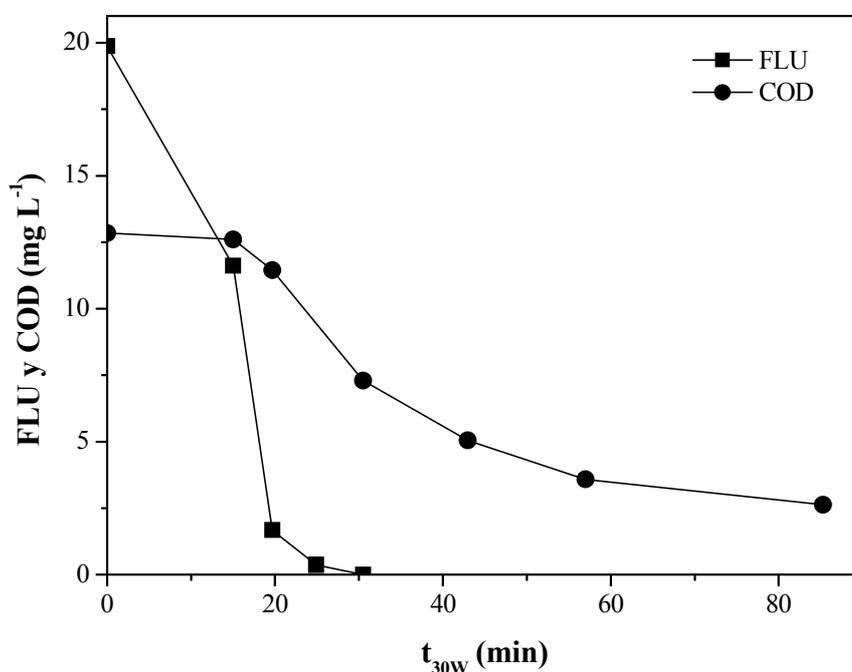


Figura 4.8 Degradación de la FLU y COD durante el proceso de fotocatalisis con TiO_2 en DIW.

4.2.2 Foto-Fenton

Para los experimentos mediante foto-Fenton solar se utilizó una concentración inicial de Fe^{2+} de 2 mg L^{-1} y una concentración inicial de H_2O_2 entre 150 y 350 mg L^{-1} , considerando siempre como fundamental que ésta concentración no disminuyera hasta niveles que pudieran detener el proceso. Es preciso remarcar que se ha utilizado una concentración de Fe^{2+} especialmente baja y alejada del óptimo (20 mg L^{-1}) descrito para estos fotorreactores (Malato y cols., 2004) porque se pretendía obtener una velocidad de reacción baja que permitiera una mayor persistencia de los productos de transformación. Estos experimentos fueron llevados a cabo en el mismo fotorreactor empleado en la fotocatalisis con TiO_2 . En

este caso, la FLU fue totalmente degradada después de 18 minutos de iluminación (**figura 4.9**). Así como se había constatado durante la fotocátalisis con TiO_2 , la mineralización mediante foto-Fenton fue también lenta. Al final del tratamiento, aproximadamente tras 100 minutos de iluminación, se detectó una reducción en el COD de tan solo el 76%. Además, después de 80 minutos de iluminación y hasta el final del tratamiento, el COD había permanecido prácticamente constante. El consumo total de H_2O_2 durante el proceso fue de 17 mM; sin embargo, para la degradación completa de la FLU se necesitó una concentración muy pequeña de H_2O_2 (3.5 mM).

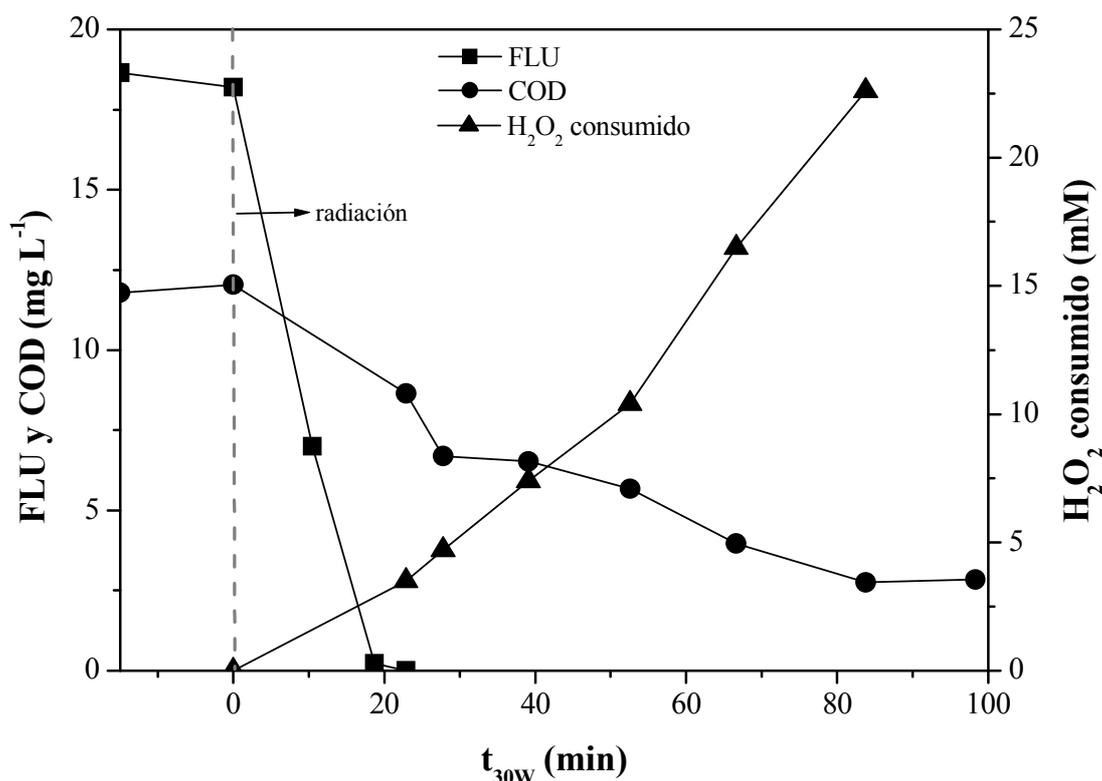


Figura 4.9 Degradación de la FLU, COD y consumo de peróxido de hidrógeno durante el proceso foto-Fenton en DIW.

Los análisis por cromatografía iónica permitieron constatar que prácticamente todo el contenido de F presente en la molécula de FLU (1.2 mg L^{-1} para la fotocátalisis con TiO_2 y 1.3 mg L^{-1} para el foto-Fenton) era liberado a la disolución al alcanzarse la total degradación de la FLU. A pesar de la rápida mineralización del fluor contenido en la molécula FLU, se observó la presencia de subproductos con flúor (véanse **figuras 4.10** y **4.11**). Las especies inorgánicas de nitrógeno monitoreadas a lo largo de la degradación de la FLU mostraron que parte del N era convertido en amonio. Por otra parte, se observó un aumento gradual y lento en la concentración de NO_3^- durante ambos tratamientos. Al final del proceso de fotocátalisis se detectaron 0.5 mg L^{-1} de NO_3^- y 0.54 mg L^{-1} de NH_4^+ , mientras que en foto-Fenton se han medido 0.4 y 0.68 mg L^{-1} de NO_3^- y NH_4^+ respectivamente. O sea, sólo 5.2 y

5.4% del contenido de N de la FLU fue mineralizado a nitrato y amonio por la fotocatalisis con TiO_2 y el proceso foto-Fenton, respectivamente. Los análisis de los ácidos carboxílicos presentes al final del proceso de fotocatalisis con TiO_2 permitieron identificar la presencia de tres ácidos: propiónico, oxálico y acético, pudiéndose atribuir a estas especies únicamente el 42% de COD remanente.

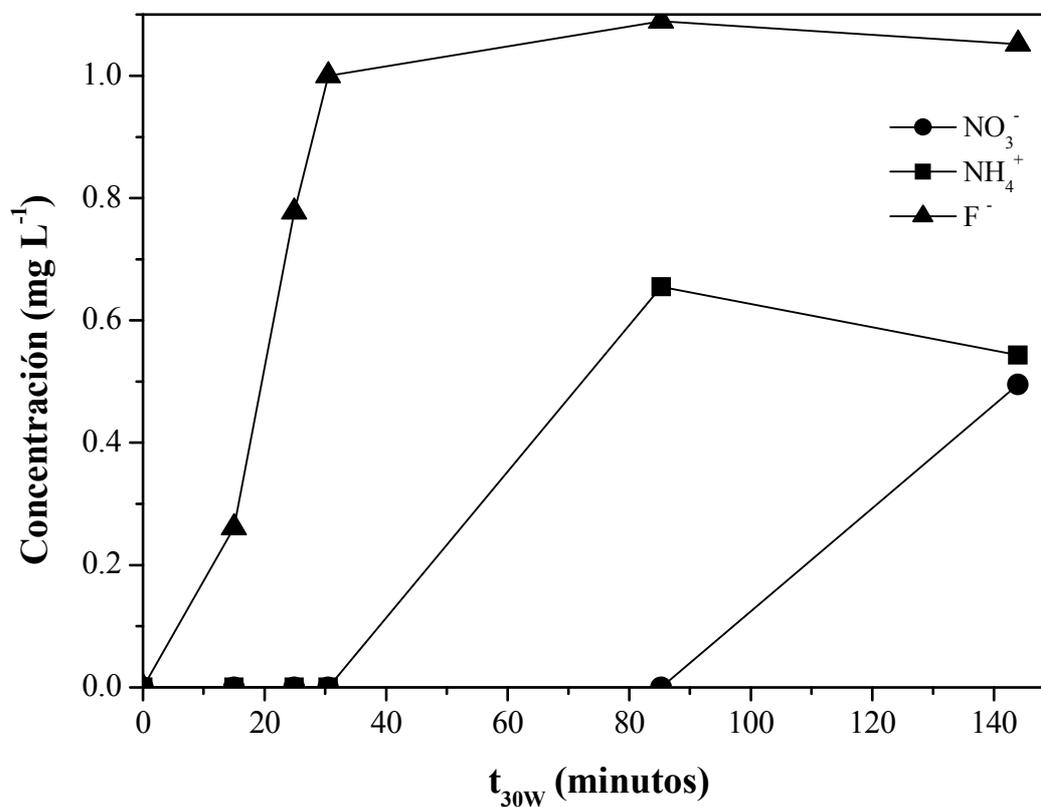


Figura 4.10 Concentraciones de NH_4^+ , NO_3^- y F^- durante la degradación de la FLU mediante el proceso de fotocatalisis con TiO_2 .

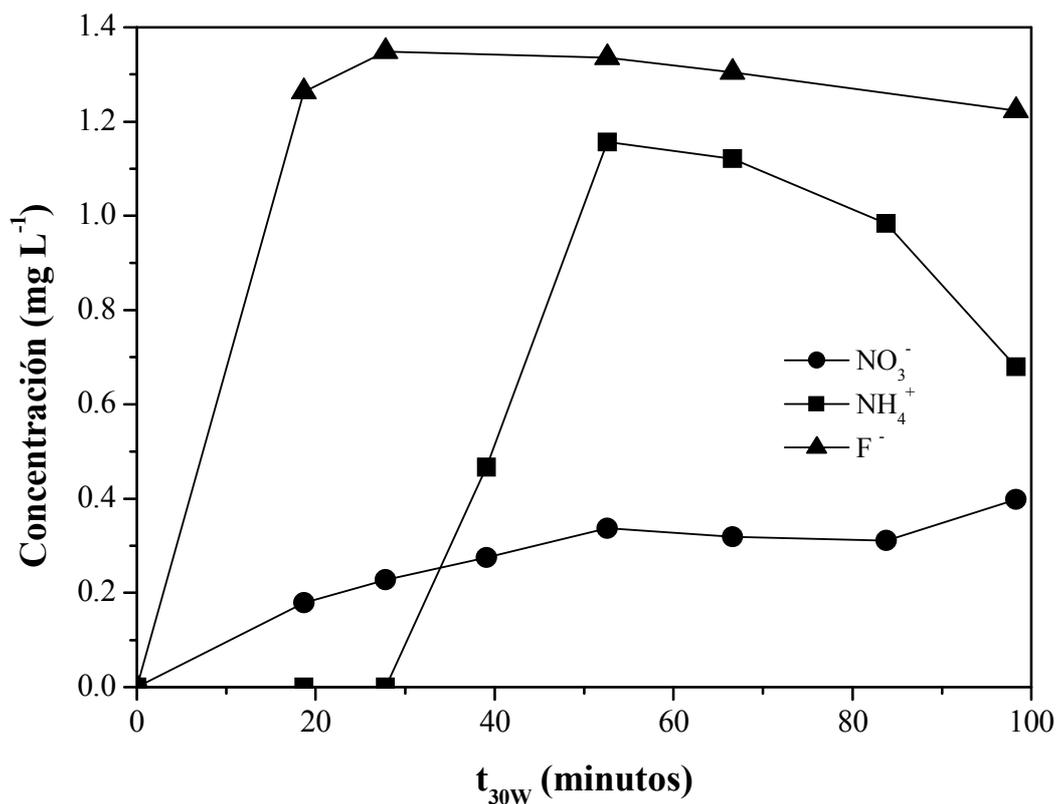


Figura 4.11 Concentraciones de NH_4^+ , NO_3^- y F^- durante la degradación de la FLU mediante el proceso foto-Fenton.

4.2.3 Estudio cinético

Como es usual en la fotocatalisis heterogénea cuando la concentración inicial del contaminante es suficientemente baja y no lleva a la saturación del catalizador, la eliminación fotocatalítica de la FLU con TiO_2 siguió una cinética de pseudo primer orden (**ecuación 4.1**), simplificación basada en el modelo cinético de Langmuir Hinshelwood. Por otro lado, cabe destacar que otros productos formados durante la descomposición de la FLU podrían también competir por la adsorción en la superficie del TiO_2 . La concentración de los mismos varía a lo largo de la reacción de mineralización, de acuerdo con la **ecuación 4.1**:

$$r = \frac{k_r K C}{1 + K C + \sum_{i=1}^n K_i C_i (i=1, n)} \quad (4.1)$$

Donde k_r es la constante de velocidad de reacción, K es la constante de adsorción de la FLU, C es la concentración de FLU, K_i es la constante de adsorción de los intermediarios y C_i es la concentración de los intermediarios en cada momento. Cuando C es suficientemente

baja, se puede simplificar la **ecuación 4.1** a una ecuación de velocidad de reacción de primer orden (**ecuación 4.2**):

$$r = k_{ap} C \quad (4.2)$$

Esto fue confirmado por el comportamiento lineal de $\ln(C_0/C)$ en función de t_{30W} , como se muestra en la **tabla 4.3**.

En el tratamiento mediante foto-Fenton se observó un comportamiento similar. En este caso, se supone que la reacción entre los radicales hidroxilo y la FLU es la etapa determinante en la velocidad de reacción, así se puede expresar la ecuación de velocidad también como una cinética de pseudo primer orden (**ecuación 4.3**):

$$r = k_{OH} [^{\bullet}OH] C = k'_{ap} C \quad (4.3)$$

Donde C es la concentración de FLU, k_{OH} es la constante de la reacción entre los radicales hidroxilo y el contaminante y k'_{ap} es una constante de pseudo primer orden que tiene en cuenta que la concentración de radicales hidroxilo $[^{\bullet}OH]$ puede considerarse constante (ya que depende fundamentalmente de la concentración de Fe, peróxido de hidrógeno y de la intensidad de iluminación).

Tabla 4.3 Parámetros cinéticos calculados para la degradación fotocatalítica de la FLU.

Degradación				
Proceso	$k_{ap} (min^{-1})$	Error k_{ap}	$t_{1/2} (min)$	r^2
Fotocatálisis con TiO_2	0.076	$4.6 \cdot 10^{-3}$	9.17	0.9925
foto-Fenton	0.146	$5.1 \cdot 10^{-4}$	2.38	0.9998
Mineralización				
Proceso	$t_{30W,75\%COD} (min)$	$r_{COD,0} (mg \cdot min^{-1})$	r^2	
Fotocatálisis con TiO_2	97.5	15.7	0.9951	
foto-Fenton	80.3	23.9	0.9735	

Ya que la mineralización no sigue modelos simples, como cinéticas de primer orden u orden cero, no se pueden calcular las constantes de velocidad de reacción. La complejidad de los resultados se debe al hecho de que el COD es un parámetro global que a menudo incluye varios intermedios que se someten a una multitud de reacciones. Así, se eligieron dos parámetros distintos para facilitar la comparación de los experimentos: por un lado, el tiempo necesario para que se alcance una determinada cantidad de mineralización ($t_{30W,75\%DOC}$ se define como el tiempo de iluminación necesario para mineralizar el 75% del COD inicial) y, por otro lado, la pendiente máxima de la curva de mineralización, es decir la pendiente de la tangente en el punto de inflexión ($r_{COD,0}$), que tiene unas dimensiones similares a una

constante de reacción de orden cero (mg min^{-1}) y por lo tanto es más fácil de manejar. Además, este parámetro puede asimilarse a la velocidad inicial de mineralización de la FLU, ya que está precedido por un período en que el COD es prácticamente constante. Como se observa, la velocidad inicial de mineralización de la FLU correspondiente al tratamiento foto-Fenton fue superior a lo observado para la fotocatalisis con TiO_2 (véase **tabla 4.3**).

4.2.4 Identificación de los productos de transformación de la flumequina mediante LC-TOF-MS

Como en los trabajos anteriormente descritos en esta Memoria, se ha utilizado la técnica de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa con detección por tiempo-de-vuelo (LC-TOF-MS) para identificar los PT generados durante la degradación fotocatalítica de la FLU. Los análisis se llevaron a cabo empleando las mismas condiciones operacionales utilizadas en el **capítulo 3, apartado 3.1.2**. La información analítica obtenida para los PT identificados se incluye en la **tabla 4.4**. Los errores encontrados son inferiores a 5 ppm en la mayoría de los casos, hecho que proporciona un alto grado de certidumbre en la asignación de la composición elemental de los iones.

Tabla 4.4 Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para la FLU y los PT generados durante la fotocatalisis con TiO_2 (gris) y el proceso foto-Fenton (naranja).

Comp.	R _t	Fórmula	Masa Experimental (m/z)	Masa Calculada (m/z)	Error ppm	DBE
FLU	23.3	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{F}$	262.0875	262.0873	0.38	9
		$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{F}$	244.0768	244.0768	-0.13	10
		$\text{C}_{11}\text{H}_5\text{NO}_2\text{F}$	202.0326	202.0226	-1.9	10
P1	26.7	$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{F}$	210.0924	210.0924	-0.39	6
		$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NOF}$	192.0820	192.0819	0.42	7
P2	25.6	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{F}$	264.103	264.1026	-1.6	8
		$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{F}$	246.0919	246.0924	-2.3	9
		$\text{C}_{10}\text{H}_5\text{NO}_2\text{F}$	190.0227	190.0226	-0.34	9
P3	24.4	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{F}$	220.0765	220.0768	-1.5	8
		$\text{C}_9\text{H}_5\text{NO}_2\text{F}$	178.0222	178.0226	2.46	8
P4	22.1	$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{F}$	276.0669	276.0666	0.85	10
		$\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3\text{F}$	258.0564	258.056	1.1	11
		$\text{C}_{11}\text{H}_3\text{NO}_3\text{F}$	216.0025	216.0019	-2.83	11
P5	20.2	$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{F}$	226.0872	226.0873	-0.87	6
		$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{F}$	208.0764	208.0768	-2.0	7
		$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NOF}$	190.0587	190.0590	1.37	8
		$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NF}$	162.0636	162.0641	3.16	7
P6	19.4	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{F}$	278.0822	278.0823	-0.40	9
		$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{F}$	260.0731	260.0717	5.1	10
		$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{NO}_3$	242.0717	242.0739	9.25	10
P7	19.1	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_4$	260.0917	260.0917	-0.13	9
		$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{NO}_3$	242.0809	242.0811	-1.1	10
P8	17.9	$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_2\text{F}$	206.0608	206.0611	-1.8	8
		$\text{C}_{11}\text{H}_7\text{NOF}$	188.0505	188.0506	-0.63	9
		$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NF}$	160.0554	160.0557	-1.8	8
P9	17.2	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{F}$	312.0874	312.0877	-1.2	8

		$C_{14}H_{13}NO_5F$	294.0772	294.0772	-0.09	9
		$C_{14}H_{11}NO_4F$	276.0659	276.0666	-2.7	10
		$C_{11}H_{11}NO_2F$	208.0771	208.0768	1.2	7
		$C_{11}H_9NOF$	190.0593	190.0590	-1.47	8
P10	15.2	$C_{13}H_{12}NO_5$	262.0709	262.0709	-0.37	9
		$C_{13}H_{10}NO_4$	232.0595	232.0604	-4.0	10
		$C_{10}H_4NO_4$	202.0066	202.0062	-1.79	10
P11	14.9	$C_{12}H_{12}NO_5$	250.0705	250.0709	-1.9	8
		$C_{12}H_{10}NO_4$	232.0598	232.0604	-2.7	9
P12	12.8	$C_{14}H_{14}NO_7$	308.0766	308.0764	0.39	9
		$C_{14}H_{12}NO_6$	290.0590	290.0586	-1.19	10
		$C_{13}H_{12}NO_4$	246.0758	246.076	-1.1	9
P13	17.4	$C_{13}H_{13}NO_4F$	266.0826	266.0823	1.0	8
P14	21.2	$C_{12}H_{13}NO_3F$	238.0875	238.0873	0.42	7
		$C_{12}H_{11}NO_2F$	220.0774	220.0768	2.5	8
		$C_{11}H_{13}NO_2F$	210.0851	210.0852	0.77	6
		$C_{11}H_{11}NOF$	192.0746	192.0746	0.42	7
P15	5.7	$C_{12}H_{12}NO_6$	266.0655	266.0659	-1.5	8
		$C_{12}H_{10}NO_5$	248.0553	248.0550	-1.4	9
		$C_{11}H_{10}NO_3$	204.0654	204.0655	-0.58	8

Durante la degradación de la FLU mediante fotocatalisis con TiO_2 se identificaron 14 posibles PT. Aunque la escasa fragmentación obtenida era insuficiente para realizar una segura asignación de las estructuras, éstas fueron propuestas en base a la reactividad de la molécula de FLU, así como al conocimiento de los mecanismos que rigen estos procesos. La **figura 4.12** muestra la ruta de degradación propuesta, en la cual se sugiere como principal ruta de degradación de la FLU la apertura de la estructura de la quinolona por ataque electrofílico de los radicales hidroxilo al doble enlace del anillo heterocíclico. Se genera así una especie altamente oxidada (identificada solamente a nivel traza) que sufre subsiguientes procesos de descarboxilación y descarbonilación, dando origen a los intermedios P13, P14 y P1.

Este mecanismo está respaldado por estudios previos sobre la estructura electrónica y la reactividad de la FLU. El estudio demostró que la región de la molécula de FLU más susceptible al ataque electrofílico es la región que contiene los grupos carboxilo y carbonilo, y que el H(21), el cual participa de un enlace de hidrógeno intramolecular, presenta un elevado carácter ácido, como se representa a continuación en la **figura 4.13** (Gulin y cols., 2007). Estos resultados apoyan las estructuras propuestas en ese estudio.

Como se ha divulgado en estudios preliminares, la defluorinación es también un mecanismo importante en la degradación de las fluoroquinolonas (Fasani y cols., 1998; Martinez y cols., 1997). Este mecanismo se ha confirmado mediante la detección del compuesto P7 y productos de oxidación subsiguientes (P10-P12).

El compuesto P2 fue identificado como una forma reducida de la FLU, en la cual se evidencia el aumento en dos átomos de hidrógeno ($C_{14}H_{15}NO_3F$) con respecto a la FLU

($C_{14}H_{13}NO_3F$) y la reducción del DBE en una unidad. Este compuesto fue detectado antes de comenzar los experimentos, por lo que no puede considerarse como un producto de degradación de la FLU. A su vez, este compuesto, presente en una concentración perceptiblemente más baja que la FLU, presentó una cinética y ruta de degradación similar, como reveló la identificación de P9.

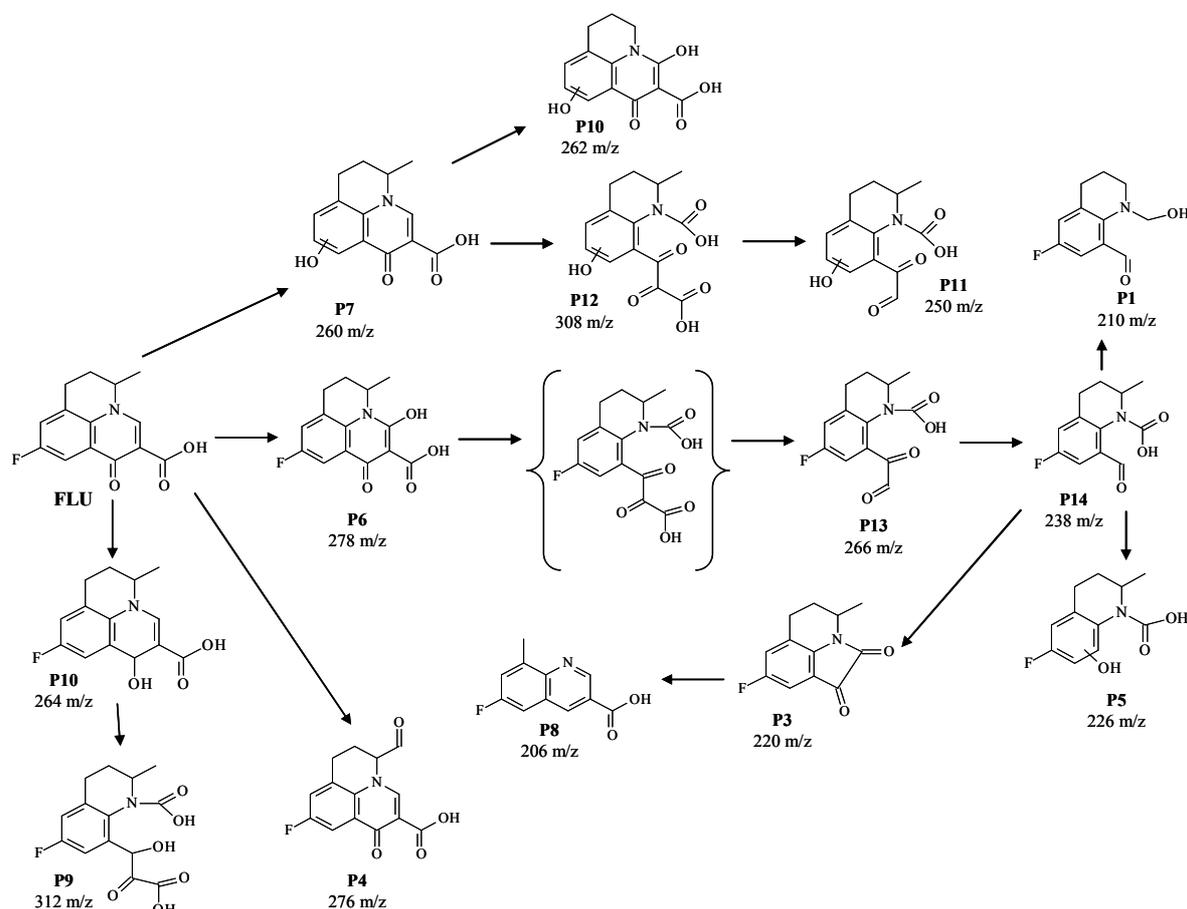


Figura 4.12 Ruta de degradación propuesta para la degradación fotocatalítica con TiO_2 de la FLU en DIW.

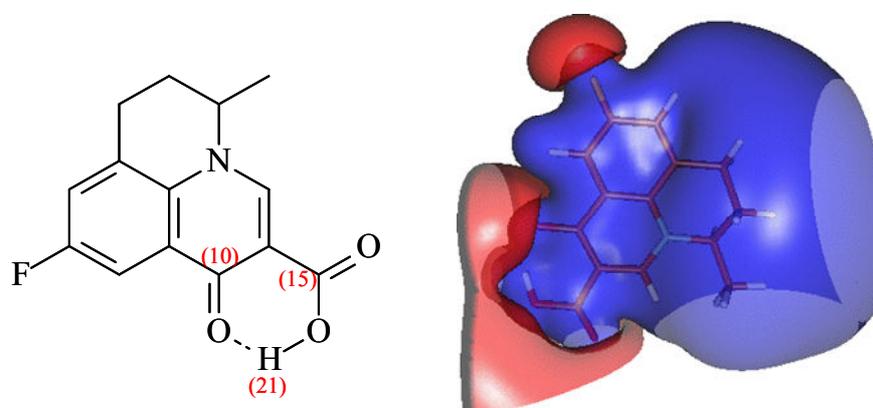


Figura 4.13 Estructura química de la FLU y superficie de potencial electrostático (rojo = negativo; azul = positivo).

La abundancia de los PT generados durante el tratamiento mediante fotocátalisis con TiO_2 está expresado en la **figura 4.14**. El PT de mayor abundancia durante todo el experimento fue P1. Los demás intermedios presentan abundancias inferiores; se ha observado que P2 al igual que P1 era generado ya al principio del proceso de fotocátalisis. Además, P7 y P4 fueron los PT que presentaron una mayor abundancia, de ellos P7 fue rápidamente reducido pero P4 disminuyó lenta y gradualmente hasta 43 minutos de iluminación. P8 y P12 tuvieron su aparición cerca de los 20 minutos de iluminación y a los 30 minutos ya habían sido totalmente degradados. A su vez, P10 fue el último PT a ser generado (después de 25 minutos) degradándose totalmente después de 43 minutos.

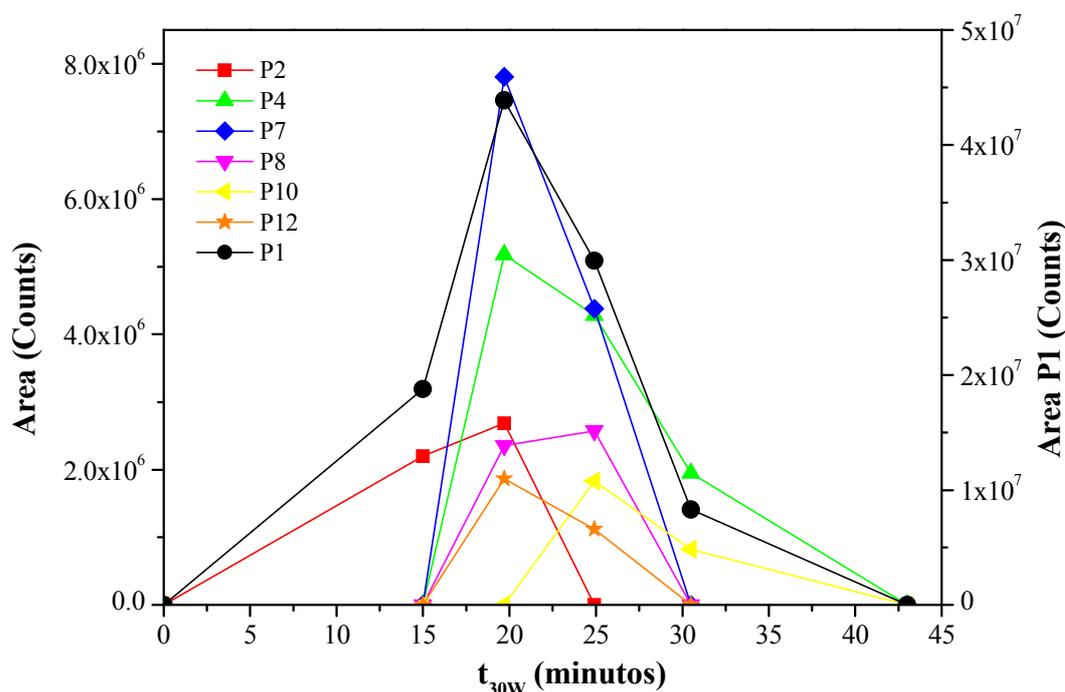


Figura 4.14 Abundancia de los principales PT de la FLU generados durante el tratamiento mediante fotocátalisis con TiO_2 en DIW.

Finalmente, en el caso del proceso foto-Fenton sólo fue posible la identificación de un PT, posiblemente por la eficiencia superior de este tratamiento. Así, no fue posible determinar los PT generados, y consecuentemente, la ruta de degradación seguida por la FLU a lo largo de este proceso. No obstante, considerando que los radicales hidroxilo constituyen la principal especie reactiva responsable de la degradación de la FLU en ambos procesos, se supone que el camino de degradación de la FLU tratada mediante foto-Fenton debe presentar muchas similitudes con el camino de degradación propuesto para la degradación fotocatalítica con TiO_2 .

4.2.5 Toxicidad de la flumequina y de los productos de transformación generados

La toxicidad de los PT generados durante ambos procesos fotocatalíticos se determinó a través del porcentaje de inhibición de la actividad bioluminiscente de la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Inicialmente, la FLU presentó una elevada toxicidad con porcentajes de inhibición superiores al 80%. A lo largo del experimento, se ha observado la disminución de la toxicidad que sigue el mismo perfil de degradación que la FLU en ambos procesos estudiados (véase **figura 4.15**).

Durante el tratamiento mediante foto-Fenton se observa un rápido y continuo descenso en la toxicidad. Se han alcanzado porcentajes de inhibición inferiores a 50% después de la total eliminación de la FLU, incluso cuando los valores de COD seguían siendo muy altos. Tal hecho evidencia que los PT generados presentan una toxicidad más baja que el compuesto de partida. Se ha observado un comportamiento similar durante la degradación de la FLU mediante fotocátalisis con TiO_2 , aunque en este caso se alcanzaran y se mantuvieran valores más altos de toxicidad al principio del proceso, probablemente debido a la transformación más lenta de la FLU y los PT iniciales. No obstante, una vez eliminada la FLU, el porcentaje de inhibición permaneció casi constante hasta el final del proceso de tratamiento donde se determinó una inhibición del 32% y 27%, en fotocátalisis con TiO_2 y foto-Fenton, respectivamente.

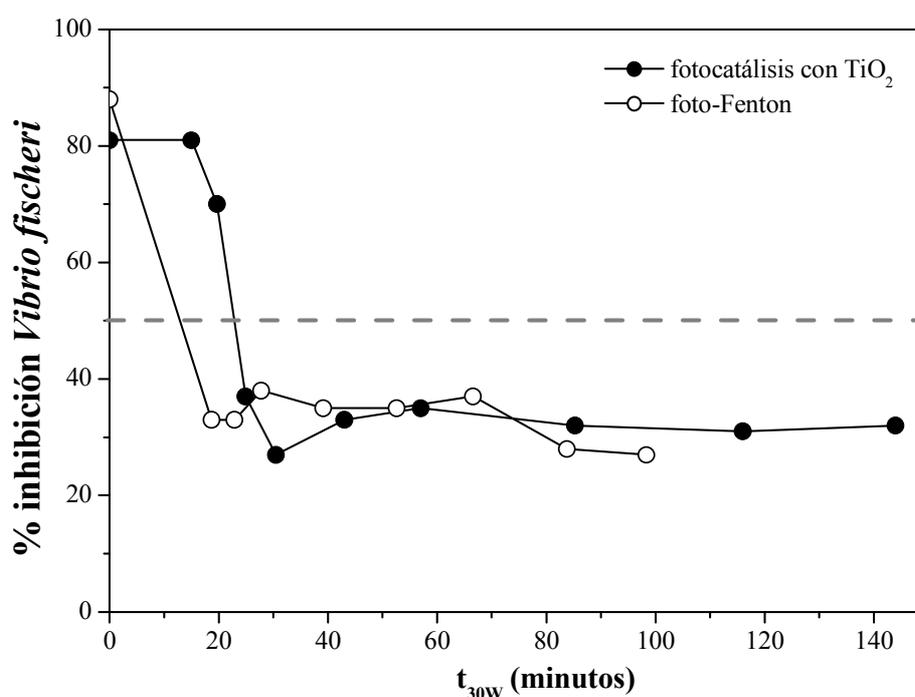


Figura 4.15 Toxicidad mediante *Vibrio fischeri* para la FLU en ambos procesos fotocatalítico solares estudiados.

4.3 Degradación del ácido nalidíxico mediante fotocátalisis solar

Las quinolonas constituyen un grupo heterogéneo de antibióticos que son ácidos carboxílicos de la 4-piridona, con uno o más anillos aromáticos conjugados y que presentan una amplia gama de usos clínicos. El ácido nalidíxico (NXA) fue la primera quinolona utilizada comercialmente para el tratamiento de infecciones de las vías urinarias, ya que demostró ser efectivo contra una amplia variedad de patógenos Gram-negativos. Este compuesto fue descubierto hace 50 años como una impureza en la fabricación química de un lote de un compuesto utilizado para el tratamiento de la malaria (Mitscher, 2005). Seguidamente, la producción de derivados fluorados del NXA llevó al desarrollo de una gran cantidad de fármacos (Jeffrey y Christian, 1996), como por ejemplo la flumequina, el ciprofloxacino, el ofloxacino y el norfloxacino, los cuales se caracterizan por: poseer un espectro de acción más amplio; tener elevada biodisponibilidad oral; producir pocos efectos adversos y presentar menor desarrollo de resistencias. Por eso, actualmente, las quinolonas de segunda, tercera o cuarta generación constituyen una clase de antibióticos ampliamente utilizados, con elevados niveles de detección y persistencia en el medio ambiente, así como se ha descrito en el **Capítulo 1** en la **sección 1.2.2** (véase **tabla 1.6**). Además, en general estas “nuevas” quinolonas están constituidas por estructuras relativamente más complejas (compuestos tricíclicos o tetracíclicos) que el NXA, pero que, al igual que éste, presentan la 4-quinolona como “esqueleto” común. Este factor asociado a la disponibilidad de un efluente real de una industria farmacéutica, el cual contenía NXA, fueron los puntos determinantes para que se eligiera trabajar con este compuesto como fármaco modelo.

En este contexto, el objetivo del estudio detallado en este epígrafe es aumentar el conocimiento sobre la degradación del NXA mediante procesos fotocatalíticos solares en distintas matrices de agua, además de evaluar, desde un punto de vista analítico, los PT generados en cada situación y valorar si la diferencia en la composición de las aguas modelo testadas implica un cambio en las rutas de degradación.

4.3.1 Fotocátalisis con TiO₂

En los experimentos de degradación de una solución de 20 mg L⁻¹ de NXA en agua desmineralizada (DIW) mediante fotocátalisis heterogénea se han utilizado 200 mg L⁻¹ de TiO₂ (P25-Degussa) como fotocatalizador. Los experimentos fueron llevados a cabo en un fotorreactor CPC con capacidad de tratamiento de 35L, descrito con detalles en el **capítulo 2**, **sección 2.7.1**. Como se observa en la **figura 4.16**, el NXA fue rápidamente degradado (~30 minutos) y no se determinaron efectos significativos de adsorción de este compuesto

sobre el fotocatalizador. Por otro lado, el grado de mineralización alcanzado por este proceso fue lento, hecho que se refleja en una reducción de 71% del COD inicial después de 137 minutos de iluminación, permaneciendo estable hasta el final del tratamiento (193 minutos).

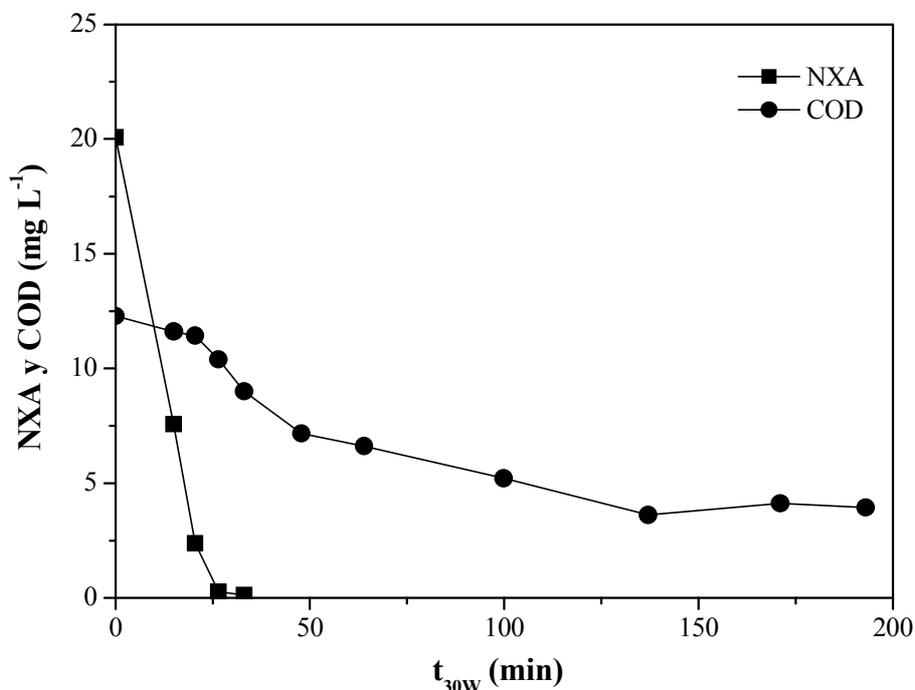


Figura 4.16 Degradación del NXA y COD durante el proceso de fotocatalisis con TiO_2 en DIW.

Los análisis mediante cromatografía iónica de las muestras de NXA sometidas al tratamiento fotocatalítico con TiO_2 demostraron que al principio del proceso tiene lugar una rápida formación de NO_3^- , seguida de un aumento más discreto hasta alcanzar un valor de concentración de 0.94 mg L^{-1} al final del experimento (**figura 4.17**). A su vez, el NH_4^+ alcanzó concentraciones crecientes hasta los 100 minutos de iluminación y, a partir de este tiempo permaneció prácticamente constante hasta el final del proceso, donde se detectó una concentración final de 0.93 mg L^{-1} de esta especie. Así, se constató que sólo el 9.4% del N presente en el NXA fue oxidado a nitrato y amonio por el proceso de fotocatalisis solar con TiO_2 . Este hecho puede considerarse como un indicio de la presencia de PT que contienen N en su composición elemental. El análisis de los ácidos carboxílicos al final del proceso de tratamiento permitió determinar la presencia de los ácidos propiónico, oxálico y acético. Sólo el 48% del COD remanente era proveniente de estos ácidos carboxílicos.

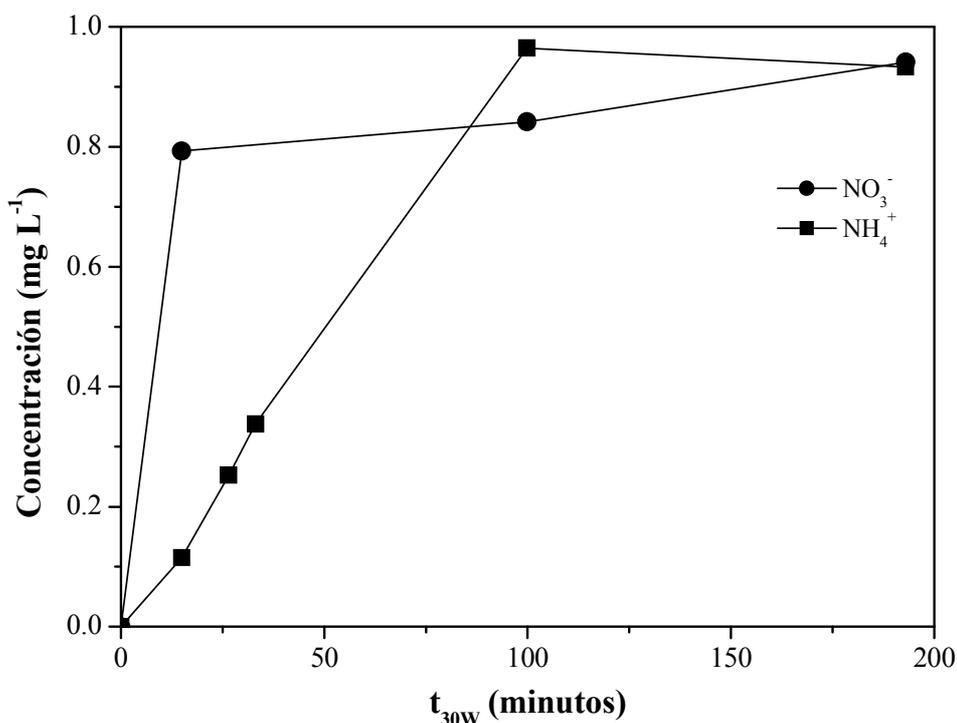


Figura 4.17 Concentraciones de NH₄⁺ y NO₃⁻ durante la degradación del NXA mediante el proceso de fotocatalisis con TiO₂.

Teniendo en cuenta las mismas consideraciones hechas para el estudio cinético de la FLU, presentado en el epígrafe 4.2.3, los parámetros cinéticos calculados para la degradación fotocatalítica con TiO₂ del NXA presentaron los valores descritos en la tabla 4.5. Al comparar estos resultados con los obtenidos para la degradación de la FLU mediante fotocatalisis heterogénea, se observa que el NXA presenta un tiempo de vida medio inferior al observado para la FLU, pero que este comportamiento no se refleja en la mineralización, ya que el valor de $t_{30W,75\%COD}$, para el NXA es prácticamente el doble del valor determinado para la FLU.

Tabla 4.5 Parámetros cinéticos calculados para la degradación fotocatalítica con TiO₂ del NXA.

Degradación				
Proceso	k_{ap} (min ⁻¹)	Error k_{ap}	$t_{1/2}$ (min)	r^2
Fotocatalisis con TiO ₂	0.098	$3.3 \cdot 10^{-4}$	7.10	0.9853
Mineralización				
Proceso	$t_{30W,75\%COD}$ (min)	$r_{COD,0}$ (mg min ⁻¹)	r^2	
Fotocatalisis con TiO ₂	> 193	13.8	0.9819	

4.3.1.1 Identificación mediante LC-TOF-MS de los productos de transformación del ácido nalidíxico generados durante la fotocatalisis con TiO₂

Los análisis mediante LC-TOF-MS se llevaron a cabo empleando las mismas condiciones operacionales utilizadas en el estudio de degradación de la FLU. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 4.6**.

Tabla 4.6 Medidas de masa exacta obtenidas por LC-TOF-MS para el NXA y los PT generados durante la fotocatalisis con TiO₂ en DIW.

Comp.	R_t	Fórmula	Masa Experimental (m/z)	Masa Calculada (m/z)	Error ppm	DBE
NXA	23.1	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₃	233.0923	233.092	0.99	8
		C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₂	215.0824	215.0824	4.1	9
		C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₂	187.0501	187.0502	-0.55	9
P1	19.3	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₄	237.0869	237.0869	-0.35	7
		C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₃	219.0767	219.0764	1.2	8
		C ₉ H ₁₃ N ₂ O	165.1022	165.1022	-0.23	5
		C ₇ H ₉ N ₂ O	137.0706	137.0709	-2.4	5
P2	17.9	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₄	249.0867	249.0869	-1.1	8
		C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₃	231.0760	231.0764	-1.8	9
P3	17.9	C ₁₀ H ₉ N ₂ O ₃	205.0607	205.0607	-0.33	8
		C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₂	187.0498	187.0502	-2.1	9
P4	17.6	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₃	209.0919	209.092	-0.80	6
		C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₂	181.0973	181.0971	0.80	5
		C ₉ H ₁₁ N ₂ O	163.0864	163.0865	-1.1	6
P5	15.9	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₄	211.0711	211.0713	-1.1	6
		C ₉ H ₉ N ₂ O ₃	193.0612	193.0607	2.2	7
		C ₈ H ₉ N ₂ O ₂	165.0656	165.0658	-1.5	6
P6	14.1	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₄	237.0872	237.0869	0.91	7
		C ₉ H ₁₁ N ₂	147.0844	147.0836	5.64	5
P7	12.8	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₄	225.0865	225.0869	-2.1	6
		C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃	207.0758	207.0764	-2.9	7
		C ₈ H ₁₁ N ₂ O ₃	183.0707	183.0691	-8.3	5
		C ₈ H ₉ N ₂ O ₂	165.0586	165.0584	1.3	6
P8	11.1	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₂	181.0972	181.0971	0.25	5
		C ₉ H ₁₁ N ₂ O	163.0863	163.0865	-1.7	6
		C ₇ H ₇ N ₂ O	135.0479	135.0480	1.01	6
P9	9.1	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₆	269.0767	269.0768	-0.41	7
		C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₅	251.0666	251.0662	-0.21	8
		C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₅	227.0662	227.0662	-0.21	6
		C ₉ H ₉ N ₂ O ₄	209.0557	209.0556	0.07	7
		C ₉ H ₇ N ₂ O ₃	191.0378	191.0378	0.15	8
P10	8.0	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₅	239.0662	239.0662	-0.20	7
		C ₁₀ H ₉ N ₂ O ₄	221.0560	221.0556	1.43	8
		C ₉ H ₉ N ₂ O ₃	193.0533	193.0535	1.12	7
P11	4.8	C ₇ H ₉ N ₂ O ₂	153.0656	153.0658	-1.66	5
		C ₇ H ₇ N ₂ O	135.055	135.0552	-2.14	6
		C ₆ H ₇ N ₂	107.0605	107.0603	1.17	5

La degradación del NXA mediante fotocatalisis con TiO₂ siguió una ruta de degradación similar a la propuesta para la FLU (véase **figura 4.18**). En este caso, se identificaron 11 PT. La hidroxilación del anillo piridínico se observó en los compuestos P5-P11, aunque la

posición del ataque de los radicales hidroxilo no pudo ser clarificada con la información analítica disponible.

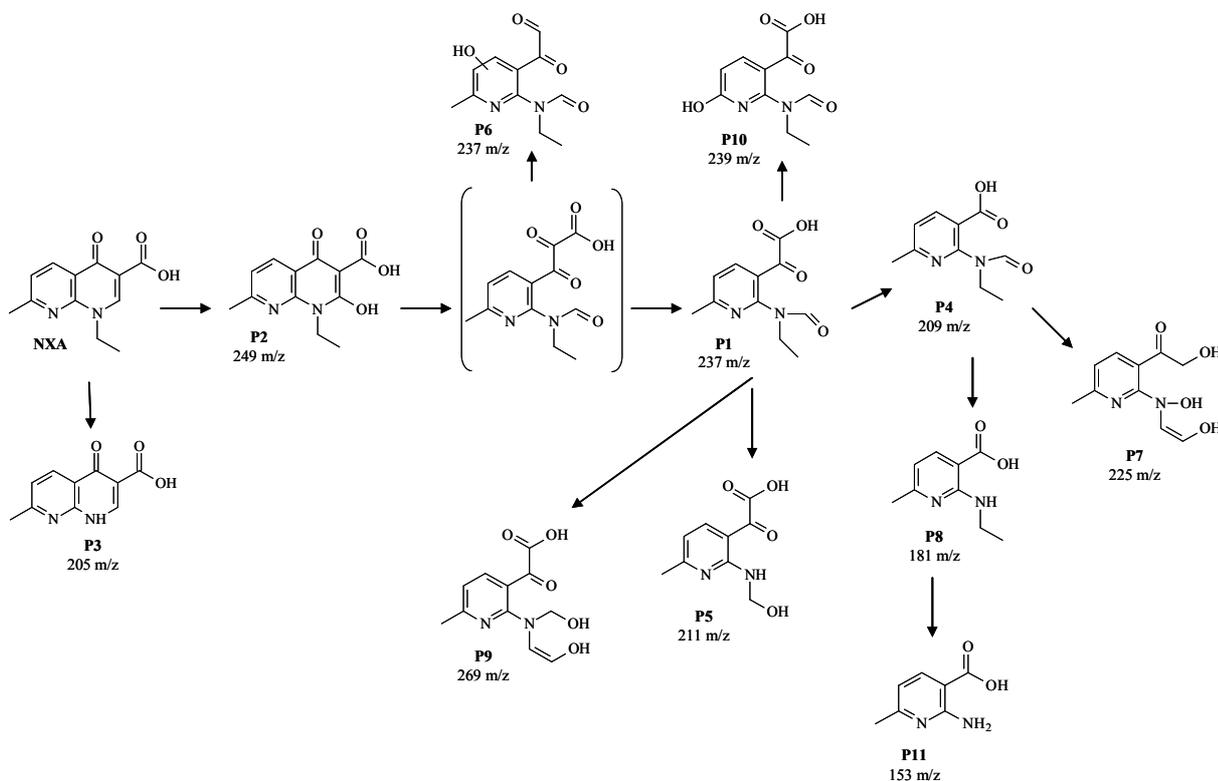


Figura 4.18 Ruta de degradación propuesta para la degradación fotocatalítica con TiO_2 del NXA en DIW.

El análisis de la cinética de aparición/desaparición de los principales PT a lo largo del tratamiento fotocatalítico con TiO_2 puede ser observada en la **figura 4.19**, la cual evidencia que los productos mayoritarios fueron generados después de 20 minutos de tiempo de iluminación (P4, P5 y P8). Además, estos tres compuestos se generan a partir de la apertura del anillo heterocíclico en la estructura de la quinolona. Todos los compuestos identificados desaparecían al final del proceso, por lo que no contribuyen a explicar el DOC remanente que correspondería en parte a la formación de compuestos nitrogenados de cadena corta, difíciles de eliminar mediante el tratamiento propuesto (García-Montaño y cols., 2008; Pérez-Estrada y cols., 2007; Maldonado y cols., 2007).

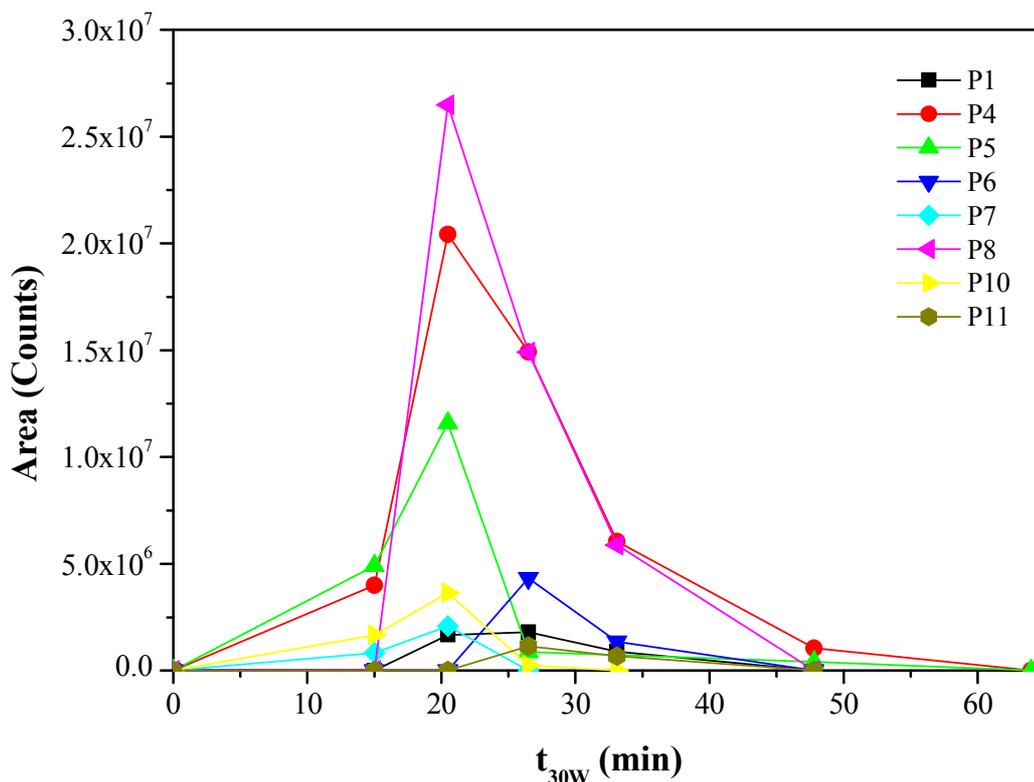


Figura 4.19 Abundancia de los principales PT del NXA generados durante el tratamiento mediante fotocatalisis con TiO_2 en DIW.

La ruta de degradación propuesta para el NXA y, sobre todo para la FLU, mediante fotocatalisis con TiO_2 se diferencia de otros trabajos divulgados previamente para las fluoroquinolonas, en los cuales se considera una elevada estabilidad del anillo piridona (Burhenne y cols., 1999). Calza y cols. (2008) también proponen la estabilidad de la estructura de la quinolona durante la degradación del ofloxacino mediante fotocatalisis con TiO_2 pero sugiere el ataque de los radicales al doble enlace del anillo piridona como una ruta secundaria.

4.3.1.2 Toxicidad del ácido nalidixico y de los productos de transformación generados mediante fotocatalisis con TiO_2

La toxicidad aguda de los PT generados durante el proceso de fotocatalisis con TiO_2 se determinó mediante el empleo del bioensayo con la bacteria *Vibrio fischeri*. Inicialmente, la disolución de NXA presentó un porcentaje de inhibición de aproximadamente el 73%, es decir que la solución inicial de NXA era tóxica para el organismo testado (véase **figura 4.20**). Después de iniciado el tratamiento mediante fotocatalisis con TiO_2 , la toxicidad disminuyó gradualmente hasta la total degradación del NXA. A partir de este momento, se observa que los PT producidos proporcionan un aumento discreto en la inhibición de la

bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*, alcanzándose un 35% de inhibición al final del tratamiento.

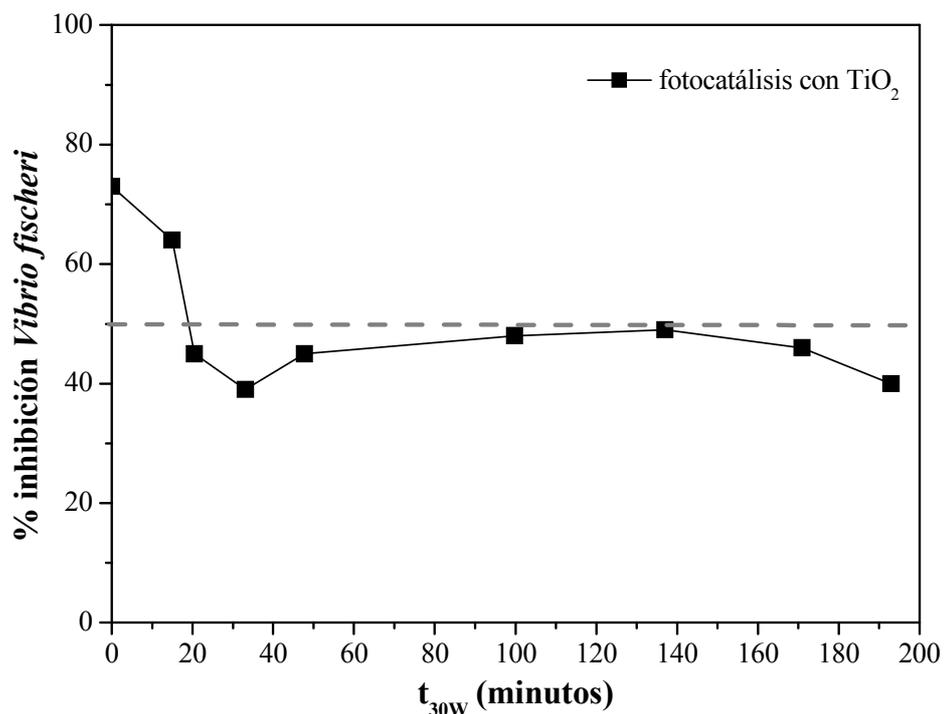


Figura 4.20 Toxicidad mediante *Vibrio fischeri* para el NXA durante el proceso de fotocatalisis solar con TiO_2 .

4.3.2 Foto-Fenton

Considerando los escasos resultados obtenidos para la elucidación de los PT generados a lo largo del proceso de tratamiento de la FLU, en especial mediante foto-Fenton, posiblemente debido a la rápida degradación de los intermedios generados, en el estudio de la degradación fotocatalítica del NXA en presencia de Fe^{2+} y H_2O_2 la toma de muestras se realizó a intervalos de tiempo más cortos para que se pudieran evaluar de forma satisfactoria los PT.

Para este estudio se emplearon disoluciones de NXA en agua desmineralizada (DIW), en agua desmineralizada conteniendo una concentración elevada de NaCl (5g L^{-1} ; DIW_{NaCl}) y con un agua residual industrial simulada (SIE), cuya composición está descrita en la **tabla 4.7**.

Tabla 4.7 Composición del agua residual industrial simulada (SIE).

Compuesto	Concentración (mg L ⁻¹)
NaCH ₃ COO	3840
NH ₄ HCO ₃	334
(NH ₄) ₂ HPO ₄	62
NaCl	4200
NXA	45

Este estudio ha tenido como objetivo la ampliación del conocimiento actual respecto al comportamiento del NXA y de sus principales PT durante el tratamiento por foto-Fenton solar, evaluando aspectos relacionados con la composición del agua. El empleo de diferentes aguas modelo tiene como objetivo simular las condiciones que se darán en el estudio con aguas residuales reales que se recoge en el **capítulo 5**, permitiendo desarrollar una metodología y obtener conclusiones que se puedan utilizar allí.

La reducción del COD presentó un comportamiento distinto para cada matriz de agua estudiada (véase **figura 4.21**). En los experimentos realizados con DIW, se alcanzó una reducción del 86% del COD inicial después de 92 minutos de iluminación, habiéndose consumido en este punto 49.8 mM de H₂O₂. Para la matriz de agua salina (DIW_{NaCl}), el 73% de reducción del COD se obtuvo después de 107 minutos de iluminación. En este momento el consumo de H₂O₂ era de 75.5 mM.

En los ensayos realizados utilizando la disolución correspondiente al efluente industrial simulado (SIE), solamente el 20% del COD inicial pudo ser eliminado después de un largo tiempo de iluminación (240 minutos), lo cual estuvo asociado con un consumo de H₂O₂ de 47 mM. Estos resultados están en concordancia con el alto contenido en COD del SIE, en comparación con los valores de COD presentes en DIW y DIW_{NaCl}.

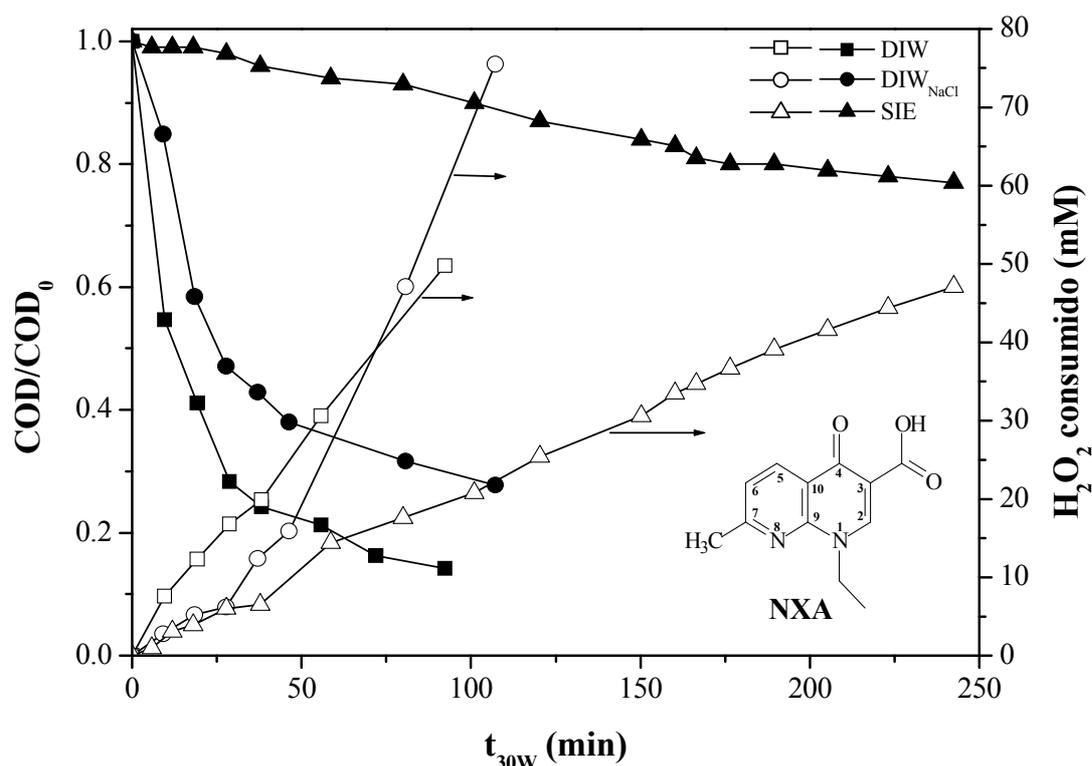


Figura 4.21 Reducción del COD (sólidos) y consumo de H_2O_2 (abiertos) durante la degradación del NXA mediante foto-Fenton en DIW y DIW_{NaCl} con el 2 mg L^{-1} de Fe^{2+} y SIE con 20 mg L^{-1} de Fe^{2+} .

Teniendo en cuenta la composición del DIW_{NaCl} y del SIE, se podrían considerar los iones cloruro (de entre todos los componentes inorgánicos presentes en las disoluciones) como los principales responsables de los resultados observados, ya que es esta especie iónica la que presenta una mayor concentración, si se compara con otras especies inorgánicas presentes. Ya se ha publicado que la velocidad de reacción del proceso foto-Fenton muestra una sustancial reducción cuando el ion cloruro está presente en el medio en el cual ocurre la reacción (Le Truong y cols., 2004). Hay dos razones distintas que justifican tal comportamiento: (i) la disminución en la generación de radicales hidroxilo debido a la formación de complejos de Fe (III)-cloro, los cuales afectan a la distribución y reactividad del hierro (FeCl^+ , FeCl_2^+); (ii) captura de los radicales hidroxilo y formación de $\text{Cl}\cdot$ y otros radicales inorgánicos (véanse **reacciones 4.1-4.7**), que son menos reactivos que los $\cdot\text{OH}$ (De Laat y Le Truong, 2006). Según estas consideraciones, y tal y como se muestra en la **figura 4.21**, la velocidad de mineralización del COD fue bastante más lenta en DIW_{NaCl} si se compara con la determinada para DIW. El consumo de peróxido de hidrógeno asociado a la mineralización del COD también aumentó perceptiblemente con la concentración de Cl^- . Asimismo, los radicales de $\text{Cl}\cdot$ menos activos formados en el medio podrían también reaccionar con el H_2O_2 (**reacciones 4.1-4.5**), hecho que acarrearía un aumento en el consumo de este reactivo.

Es interesante observar que la degradación del NXA en las tres matrices estudiadas (DIW, DIW_{NaCl} y SIE) no mostraba tanta diferencia como la observada en el caso del COD. La velocidad de degradación en DIW_{NaCl} y SIE fue muy similar, ya que el efecto provocado por el elevado valor de COD contenido en SIE comparado con el COD inicial en DIW_{NaCl} era compensado por la mayor dosis de Fe²⁺ utilizada en el experimento con SIE. No obstante, el principal resultado se relaciona con el consumo de H₂O₂ realizado para alcanzar la degradación completa de NXA, que fue muy similar en los tres casos (alrededor de 6-7 mM). Este hecho se puede justificar por la acción de los radicales Cl• y Cl₂•-, que son también fuertes oxidantes ($E_{\text{OSHE}}, \text{Cl}\cdot/\text{Cl}^- = 2.41 \text{ V}$; $E_{\text{OSHE}}, \text{Cl}_2\cdot^-/2\text{Cl}^- = 2.09 \text{ V}$), y, considerando que tales especies podrían estar presentes a altas concentraciones, éstas también podrían fácilmente oxidar el NXA, reduciendo el consumo de H₂O₂. Por lo tanto, en situaciones donde se observa una elevada concentración de iones cloruro, los radicales Cl• y los radicales formados de la reacción entre los radicales Cl• y el peróxido de hidrógeno podían compensar, en parte, la captura de los •OH por los Cl⁻. En este contexto, los experimentos realizados con DIW, DIW_{NaCl} y SIE han puesto de manifiesto, no solo las dificultades encontradas al intentar diseñar un proceso de tratamiento basado solamente en experimentos con el compuesto puro en DIW, sino también el diferente comportamiento de éste cuando se encuentra disuelto en aguas conteniendo sales inorgánicas o cualquier otro COD, que no provenga del compuesto de partida. En todo caso, es interesante observar que para el proceso foto-Fenton, el consumo de H₂O₂ podría ser un parámetro interesante a ser observado si se pretende conocer cuando se ha degradado NXA por completo y que compensaría de cierta forma las incertidumbres que se originan cuando sólo se tienen en cuenta los tiempos de tratamiento. Es decir, cuando se haya consumido alrededor de 8 mM de H₂O₂ se puede estar seguro que NXA se ha degradado por completo.

Los experimentos realizados con 20 mg L⁻¹ de Fe²⁺ en SIE demostraron una rápida degradación del NXA. Así, se consideró que utilizar esta misma concentración de Fe²⁺ durante los experimentos con DIW y DIW_{NaCl} no permitiría hacer un seguimiento detallado de los mismos (consumo de H₂O₂ y detección de PT) y por esta razón, en los experimentos de degradación del NXA en DIW y DIW_{NaCl} se ha utilizado una concentración inicial de Fe²⁺ de 2 mg L⁻¹ y se han tomado muestras con más frecuencia. Como se muestra en la **figura 4.22**, este procedimiento ha permitido apreciar correctamente la degradación del NXA y realizar un seguimiento más completo de los PT generados, especialmente durante las primeras etapas del tratamiento. Por otro lado, el alto valor de COD₀ del SIE justifica el uso de 20 mg L⁻¹ de Fe²⁺.

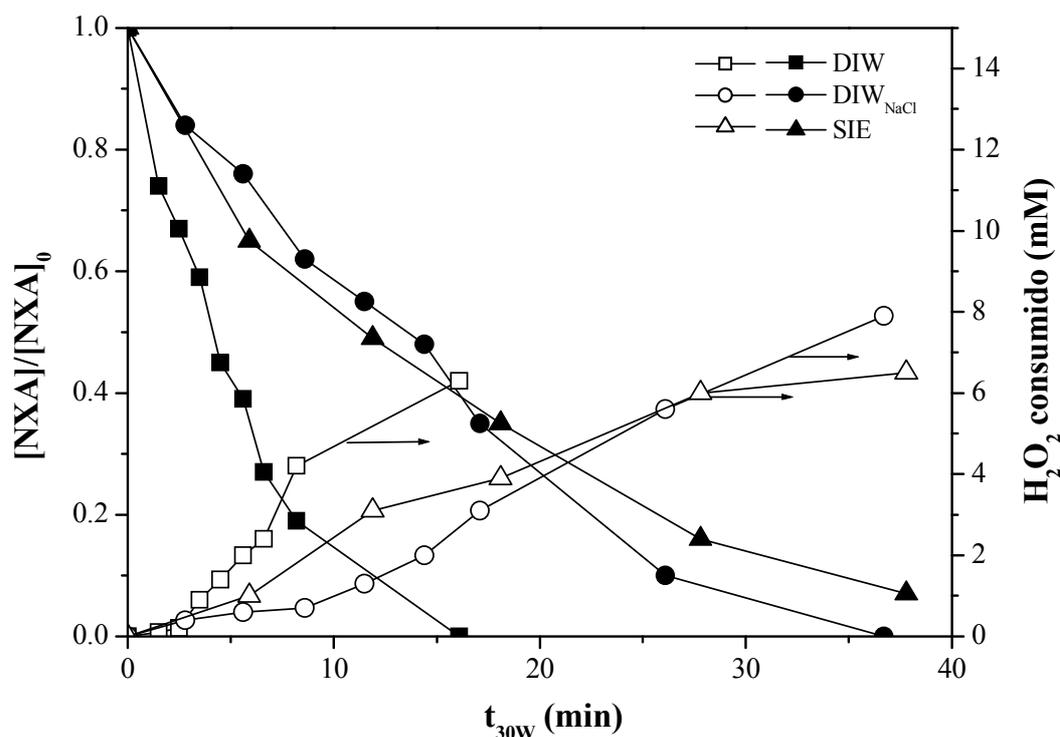


Figura 4.22 Degradación del NXA (sólidos) y consumo de H₂O₂ (abiertos) para el proceso foto-Fenton en DIW y DIW_{NaCl} con el 2 mg L⁻¹ de Fe²⁺ y SIE con 20 mg L⁻¹ de Fe²⁺.

4.3.2.1 Identificación de los productos de transformación del ácido nalidíxico generados durante el proceso foto-Fenton mediante LC-TOF-MS

Para detectar los PT generados durante la degradación de NXA mediante foto-Fenton se tomaron muestras periódicamente durante los experimentos y éstas fueron analizadas mediante LC-TOF-MS operando en modo positivo. En la **tabla 4.8** se recoge la información analítica obtenida a partir de los espectros de masa exacta del NXA y de los PT detectados. La escasa fragmentación generalmente asociada a instrumentos de una etapa (en comparación con los sistemas en tándem) fue superada, en parte, por el uso de elevados voltajes de fragmentación, 230V, en la fuente de ionización. Así, para la mayor parte de los PT identificados se pudieron obtener tres o más fragmentos. Los fragmentos más comunes correspondieron a la pérdida no específica de una molécula neutra de H₂O para dar el ion [M+H-18]⁺, asociado a un aumento de una unidad en el DBE. Esta pérdida es característica de compuestos que contienen grupos funcionales alcohol o carboxilo. Las pérdidas de C₂H₄ y de C₂H₂O también eran comunes y correspondían al grupo etilo y a su forma oxidada. Estas pérdidas se han observado en los compuestos P11, P20, P21, P24, P26, P28 y P29. En el primer caso, no iban asociada a variación en el DBE pero en el segundo, la pérdida del grupo -CH=CHOH dio lugar a la reducción de DBE en una unidad. Las pérdidas de 28 uma (CO) y 44 uma (CO₂) indicaron la presencia de grupos funcionales aldehído y ácido

carboxílico. Así, pérdidas consecutivas de CO₂ y de CO observadas en P4 llevaron a la pérdida de la cadena -CO-COOH. La misma fragmentación ocurre en P25 o P32. En P23, dos pérdidas consecutivas de CO confirmaron la presencia de la cadena lateral -CO-COH. A su vez, la pérdida de agua también corroboró la presencia de un grupo -OH probablemente en la cadena NH-CH₂-OH.

El estudio detallado de los cromatogramas y de los espectros de masa exacta obtenidos a lo largo del proceso de tratamiento permitió la identificación de un total de 35 PT en todas las matrices de agua estudiadas. Las estructuras propuestas se muestran en las **figuras 4.23-4.24** y en la **tabla 4.9**. Todos los PT mantuvieron el anillo metilpiridina sin cambios y las principales reacciones tuvieron lugar en la fracción del ácido 1-etil-1,4,5,6-tetrahydro-4-oxopiridina-3-carboxílico. En muchos casos, los compuestos identificados estaban presentes en varias de las matrices de agua estudiadas, sugiriendo la presencia de rutas de degradación comunes independientemente del tipo de agua usado. Por ejemplo, el compuesto P2, con [M+H]⁺ a m/z 249.0799 (C₁₂H₁₃N₂O₄; DBE: 8), era el compuesto más abundante detectado en DIW, pero también fue detectado en DIW_{NaCl}. El aumento en un átomo de oxígeno con respecto al NXA (C₁₂H₁₃N₂O₃), sin variación del DBE, sugirió que este compuesto procedía del ataque de los radicales hidroxilo en la posición de la molécula de NXA más susceptible a un ataque electrofílico, es decir en el doble enlace C(2)=C(3) (véase **figura 4.21**). En particular, el carbono C(2), directamente unido a un átomo de nitrógeno, el cual posee pares de electrones libres, es el más susceptible de sufrir un ataque electrofílico. Este intermedio (P2) es el precursor de una serie de reacciones que implican la apertura del anillo y posteriores oxidaciones y pérdidas en las cadenas alifáticas originadas. Ésta fue identificada como la principal ruta de transformación del NXA. Otras reacciones paralelas, que incluían la oxidación y la pérdida del grupo etilo y la reducción del grupo carbonilo, dieron lugar a los compuestos P5-P6 y P14-P1, respectivamente.

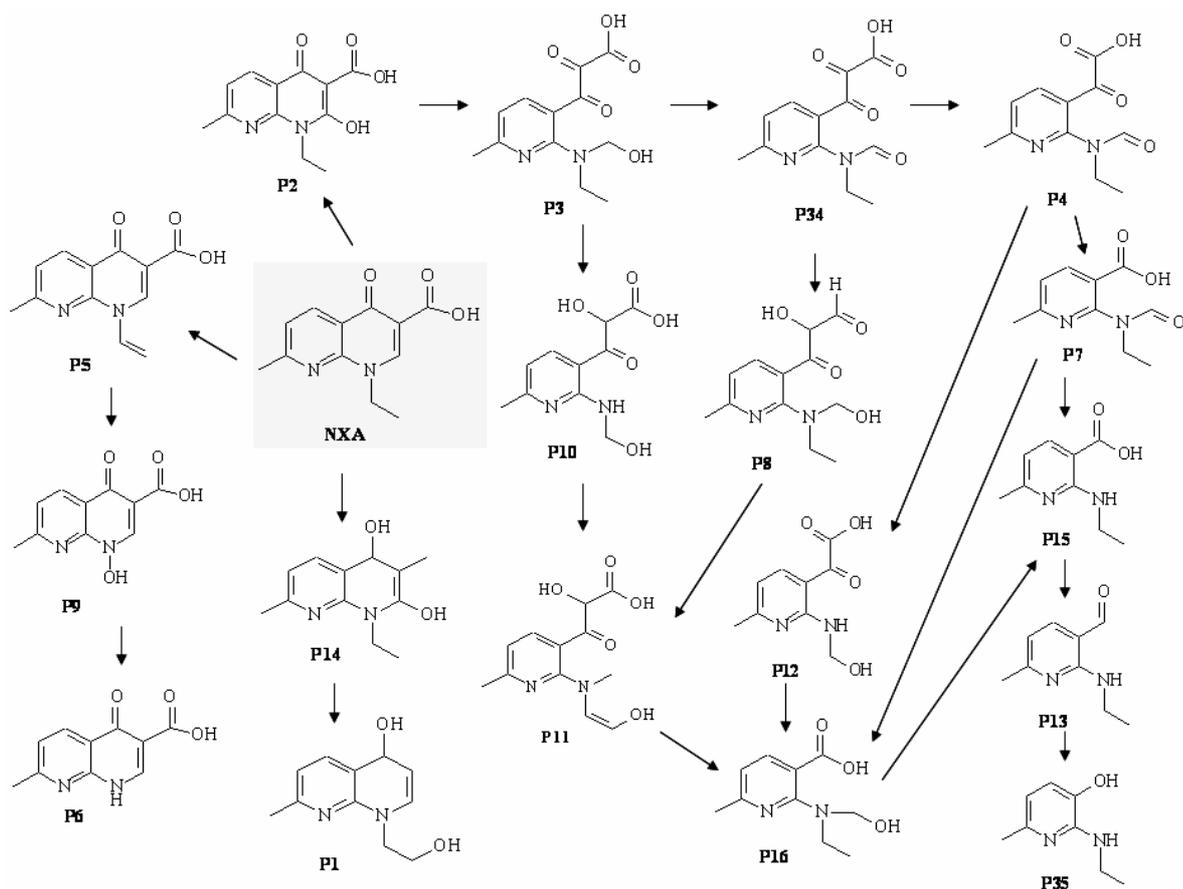


Figura 4.23 Ruta de degradación propuesta para el NXA mediante foto-Fenton en DIW.

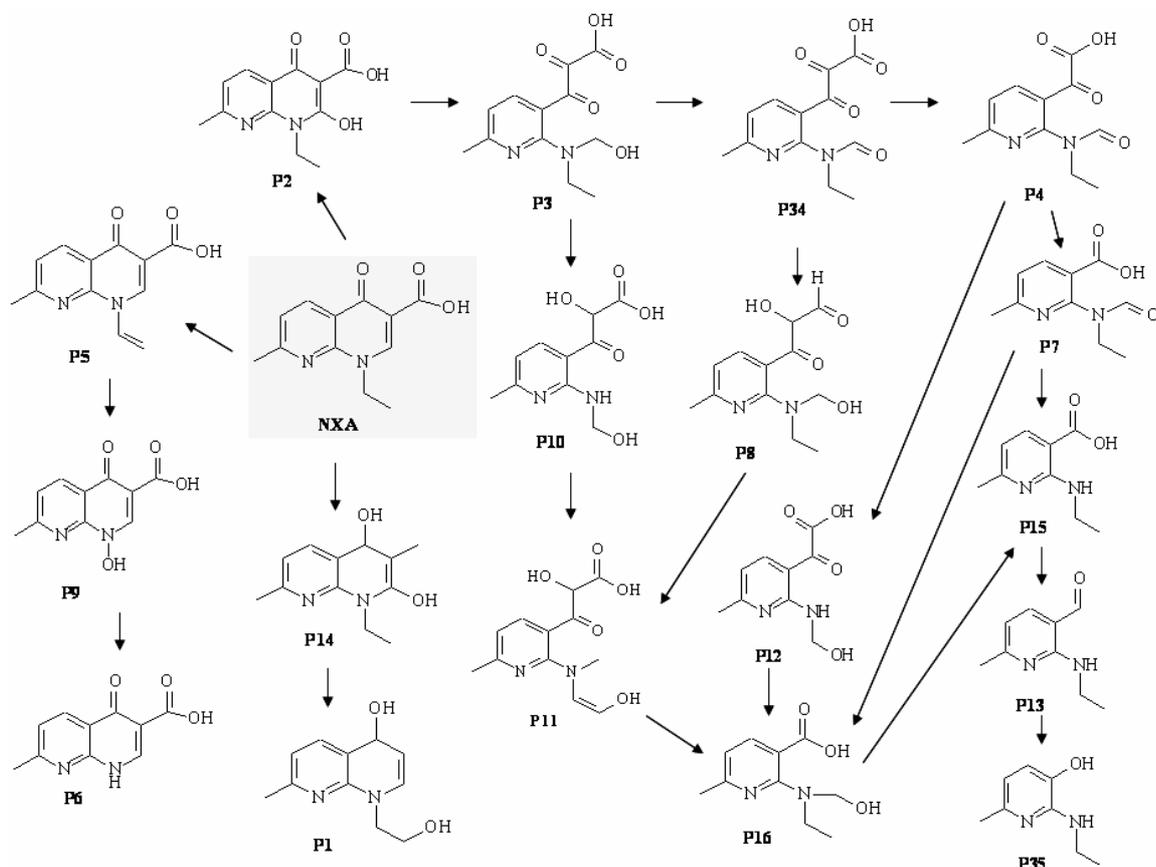


Figura 4.24 Camino de degradación determinado para el NXA mediante foto-Fenton en DIW_{NaCl}.

Tabla 4.8 Medidas de masa exacta determinadas mediante LC-TOF-MS para el NXA y sus principales PT en todas las matrices de agua estudiadas.

Comp.	Fórmula	Masa Experimental	Error ppm	DBE	Matriz
NXA	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₃	233.0923	0.99	8	DIW, DIW _{NaCl} , SIE
	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₂	215.0824	4.1	9	
	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂	205.0899	0.09	7	
	C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₂	187.0504	1.85	9	
P1	C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₂	207.106	-2.2	6	DIW, DIW _{NaCl} , SIE
	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O	189.1054	-14.2	7	
	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O	177.1029	-1.1	6	
	C ₉ H ₁₁ N ₂ O	163.0871	0.47	6	
P2	C ₉ H ₉ N ₂	145.0762	2.81	7	DIW, DIW _{NaCl}
	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₄	249.0799	-0.95	8	
	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₃	231.0695	-1.51	9	
	C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₃	203.0444	3.64	9	
P3	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₅	267.091	-2.7	7	DIW, DIW _{NaCl}
	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₄	249.0809	-4.88	8	
P4	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₄	235.0649	-3.59	8	DIW, DIW _{NaCl}
	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₄	237.0802	-2.1	7	
	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₃	219.0692	-0.23	8	
	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₂	193.0907	-4.29	6	
P5	C ₉ H ₁₃ N ₂ O	165.0949	0.21	5	DIW, DIW _{NaCl} , SIE
	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₃	231.0687	1.97	9	
	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₂	215.0845	-11.46	9	
	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂	203.0821	-0.11	8	
P6	C ₉ H ₁₁ N ₂ O	163.087	0.88	6	DIW, DIW _{NaCl} , SIE
	C ₉ H ₉ N ₂	145.0756	7.24	7	
	C ₁₀ H ₉ N ₂ O ₃	205.0526	4.25	8	
	C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₂	187.0424	3.06	9	
P7	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₃	209.084	3.65	6	DIW, DIW _{NaCl} , SIE
	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₂	191.0739	1.99	5	
	C ₉ H ₁₁ N ₂ O	181.0891	4.27	6	
	C ₇ H ₇ NO ₂	163.0784	5.58	6	
P8	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₄	253.1097	5.09	6	DIW, DIW _{NaCl} , SIE
	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₂	195.1044	5.8	5	
	C ₉ H ₁₁ N ₂ O	163.07844	5.4	6	
P9	C ₁₀ H ₉ N ₂ O ₄	221.0491	-3.22	8	DIW, DIW _{NaCl}
	C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₃	203.0376	1.01	9	
P10	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₅	241.0756	-4.15	6	DIW
	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₄	223.0712	-3.3	7	
	C ₉ H ₉ N ₂ O ₄	209.0551	3.0	7	
	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃	197.0853	-2.8	5	
	C ₉ H ₇ N ₂ O ₃	191.0452	-0.3	8	
	C ₇ H ₉ N ₂ O	137.0721	-8.52	5	
P11	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₅	267.0909	-2.22	7	DIW, DIW _{NaCl}
	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₄	225.0806	-4.18	6	
	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₂	193.0907	-4.15	6	
	C ₁₀ H ₁₀ NO ₂	176.0699	3.0	7	
P12	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₄	211.0649	-4.16	6	DIW, DIW _{NaCl} , SIE
	C ₉ H ₉ N ₂ O ₃	193.0611	1.18	7	
	C ₇ H ₈ N	106.0659	-1.96	5	
P13	C ₉ H ₁₃ N ₂ O	165.0952	-1.15	5	DIW, DIW _{NaCl} , SIE
	C ₇ H ₉ N ₂ O	137.0644	-5.38	5	
	C ₇ H ₈ N ₂ O	106.0659	-7.5	5	
P14	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₂	221.1199	5.86	6	DIW, DIW _{NaCl}
	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O	189.0946	2.14	7	
	C ₉ H ₁₁ N ₂ O	163.0786	4.78	6	
	C ₉ H ₉ N ₂	145.0766	-0.3	7	
	C ₇ H ₉ N ₂	121.0765	0.38	5	

P15	$C_9H_{13}N_2O_2$	181.0892	3.84	5	DIW, DIW _{NaCl} , SIE
	$C_9H_{11}N_2O$	163.0786	4.42	6	
	$C_7H_7N_2O$	135.0556	1.92	6	
P16	$C_{10}H_{15}N_2O_3$	211.0994	5.05	5	DIW
	$C_8H_{16}N_2O_3$	189.1152	4.89	2	
P17	$C_{12}H_{12}ClN_2O_4$	283.0419	-3.97	8	DIW _{NaCl}
	$C_{12}H_{10}ClN_2O_3$	265.0374	0.2	9	
	$C_{10}H_{11}N_2O_3$	231.0689	1.05	9	
	$C_{12}H_9N_2O_2$	213.0651	3.6	10	
	$C_{10}H_{11}N_2O_2$	191.0817	-1.3	7	
P18	$C_{11}H_{15}N_2O_3$	223.1002	1.05	6	SIE
	$C_{10}H_{15}N_2O_2$	195.1055	0.05	5	
	$C_9H_{13}N_2O$	165.0946	2.43	5	
P19	$C_{10}H_{15}N_2O_2$	195.1056	0.13	5	DIW, SIE
	$C_9H_{11}N_2O$	163.0871	0.09	6	
	$C_9H_9N_2$	145.0763	2	7	
	$C_7H_7N_2O$	135.0558	0.14	6	
P20	$C_{10}H_{11}N_2O_2$	191.0736	3.24	7	SIE
	$C_8H_9N_2O$	149.0709	4.01	6	
	C_7H_8NO	122.0601	3.69	5	
P21	$C_9H_{11}N_2O_3$	195.0764	2.56	6	SIE
	$C_7H_9N_2O_2$	153.0659	2.67	5	
	$C_7H_7N_2O$	135.0554	2.9	6	
P22	$C_{11}H_{15}N_2O_4$	239.0946	3.06	6	DIW _{NaCl} , SIE
	$C_{10}H_{11}N_2O_3$	207.0765	2.24	7	
	$C_{10}H_9N_2O_2$	189.0656	4.39	7.5	
	$C_9H_{11}N_2O_2$	179.0813	3.98	6	
	$C_9H_{11}N_2O$	163.0867	1.23	7	
	$C_8H_7N_2O$	147.0557	1.23	7	
	C_7H_6NO	120.0451	-1.67	6	
	$C_9H_{11}N_2O_3$	195.0688	1.71	6	
P23	$C_9H_9N_2O_2$	177.0584	1.22	7	SIE
	$C_8H_{11}N_2O_2$	167.0741	0.87	5	
	$C_8H_9N_2O$	149.063	4.7	6	
	$C_9H_{11}N_2O_2$	179.074	1.51	6	
P24	$C_9H_9N_2O$	161.0631	3.67	7	SIE
	$C_7H_9N_2O$	149.063	4.7	6	
	$C_{10}H_{13}N_2O_5$	241.0743	1.4	6	
P25	$C_{10}H_{13}N_2O_2$	193.0896	1.4	6	SIE
	$C_9H_{11}N_2O_2$	179.0742	0.42	6	
	$C_8H_{11}N_2O$	151.079	1.99	5	
	$C_{10}H_{13}N_2O_4$	225.0794	1.38	6	
P26	$C_{10}H_{11}N_2O_3$	207.0693	-0.76	7	SIE
	$C_8H_{11}N_2O_3$	183.0768	3.56	5	
	$C_8H_9N_2O_2$	165.0581	2.98	6	
	$C_8H_7N_2O$	147.0556	1.54	7	
	$C_7H_7N_2O$	135.0557	1.29	6	
	$C_{10}H_{13}N_2O_4$	225.0791	2.56	6	
	$C_{10}H_{11}N_2O_3$	207.069	0.83	7	
P27	$C_8H_9N_2O_4$	197.0484	-0.12	6	DIW _{NaCl} , SIE
	$C_8H_9N_2O_2$	165.0581	2.92	6	
	$C_8H_7N_2O_3$	179.0371	4.02	7	
	$C_6H_5N_2O_2$	137.0272	0.75	6	
	$C_{11}H_{13}N_2O_6$	269.0691	1.71	7	
	$C_{11}H_{11}N_2O_5$	251.0588	0.56	8	
	$C_9H_{11}N_2O_5$	227.0584	2.38	6	
P28	$C_9H_9N_2O_4$	209.0483	0.73	7	SIE
	$C_9H_7N_2O_3$	191.0371	4.06	8	
	$C_9H_{11}N_2O_3$	195.0687	2.05	6	
	$C_8H_9N_2O_2$	165.0575	6.67	6	
P29	$C_8H_{11}N_2O$	151.0791	1.36	5	SIE
	$C_7H_9N_2O_2$	153.0583	1.62	5	
P30	$C_7H_7N_2O$	135.0478	1.67	6	SIE
	$C_7H_9N_2O_2$	153.0583	1.62	5	

P31	C ₆ H ₇ N ₂	107.0531	0.01	5	SIE
	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃	197.0844	2.19	5	
	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₂	179.0815	3.21	6	
	C ₈ H ₁₁ N ₂ O ₂	167.0818	1.3	5	
P32	C ₈ H ₇ N ₂ O	147.0556	1.79	7	SIE
	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₅	253.0746	0.03	7	
	C ₇ H ₉ N ₂ O ₂	153.0584	1.26	5	
P33	C ₇ H ₉ N ₂ O	137.0638	-1.24	5	SIE
	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₃	209.0839	4.3	6	
	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃	197.0836	6.24	5	
	C ₇ H ₉ N ₂ O ₂	153.0576	6.25	5	
P34	C ₇ H ₉ N ₂ O	137.0628	6.48	5	DIW, DIW _{NaCl}
	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₅	265.0794	11.46	8	
	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₄	247.0705	5.67	9	
P35	C ₈ H ₁₃ N ₂ O	153.1023	2.91	4	DIW
	C ₆ H ₉ N ₂ O	125.0705	-7.74	4	

Durante los experimentos realizados en DIW_{NaCl} se identificaron un número menor de intermedios. La mayor parte ellos ya habían sido identificados previamente en DIW, confirmando así una ruta de degradación común para el NXA en esta matriz. Sin embargo, los espectros de masa evidenciaron la formación de un subproducto clorado (P17), cuando la degradación de NXA tenía lugar en medio salino (véase **figura 4.25**). La composición elemental y las abundancias isotópicas del ion $[M+H]^+$ a m/z 283.0419 (C₁₂H₁₂ClN₂O₄; DBE: 8) confirmó la presencia de un átomo de cloro en la molécula. La asignación de la estructura propuesta está basada en el patrón de fragmentación mostrado en la **figura 4.25**.

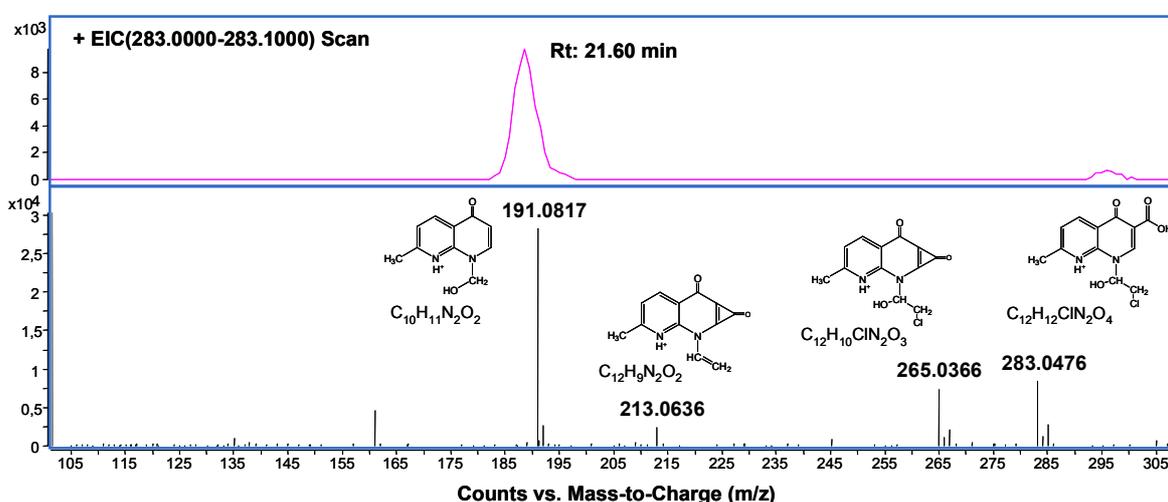
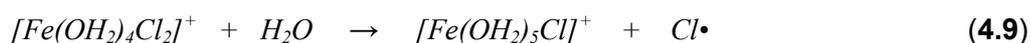
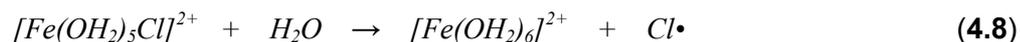


Figura 4.25 Cromatograma de iones seleccionados y espectro de masas del PT clorado determinado durante el proceso de degradación del NXA en DIW_{NaCl}.

Según Lim y cols. (2006), en presencia de Cl⁻ se podrían generar algunos complejos de Fe y Cl, tales como el $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_5\text{Cl}]^{2+}$ y el $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_4\text{Cl}_2]^+$. A su vez, estos complejos pueden ser fotolizados a longitudes de onda entre 270-400 nm, lo que llevaría a la formación de $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ y Cl[•], como aparece descrito en las **reacciones 4.8-4.9**.



A su vez, los radicales $Cl\cdot$ formados a partir de las reacciones de foto-disociación son rápidamente capturado por los Cl^- que generan especies menos reactivas, tales como $Cl_2\cdot^-$ y $ClOH\cdot^-$. Tal hecho desfavorece la formación de subproductos clorados y explicaría la escasa abundancia de P17.

Los análisis mediante LC-TOF-MS también permitieron determinar las cinéticas de formación-degradación de los principales PT generados en las distintas matrices, lo cual es útil para identificar aquellos intermedios más relevantes por su abundancia o persistencia. En DIW los subproductos más abundantes eran P2 y P15 (véase **figura 4.26**). Estos compuestos fueron detectados en etapas iniciales del proceso de degradación, mostrando la concentración más alta a un tiempo de iluminación $t_{30W} = 3.5$ minutos. Después de este punto, su concentración decae gradualmente. Este comportamiento también se observó para los compuestos P1, P13 o P14. Sin embargo, otros PT como P7 y P13 se formaron y acumularon durante el tratamiento. La mayoría de los intermedios identificados persistía después de la total degradación de NXA.

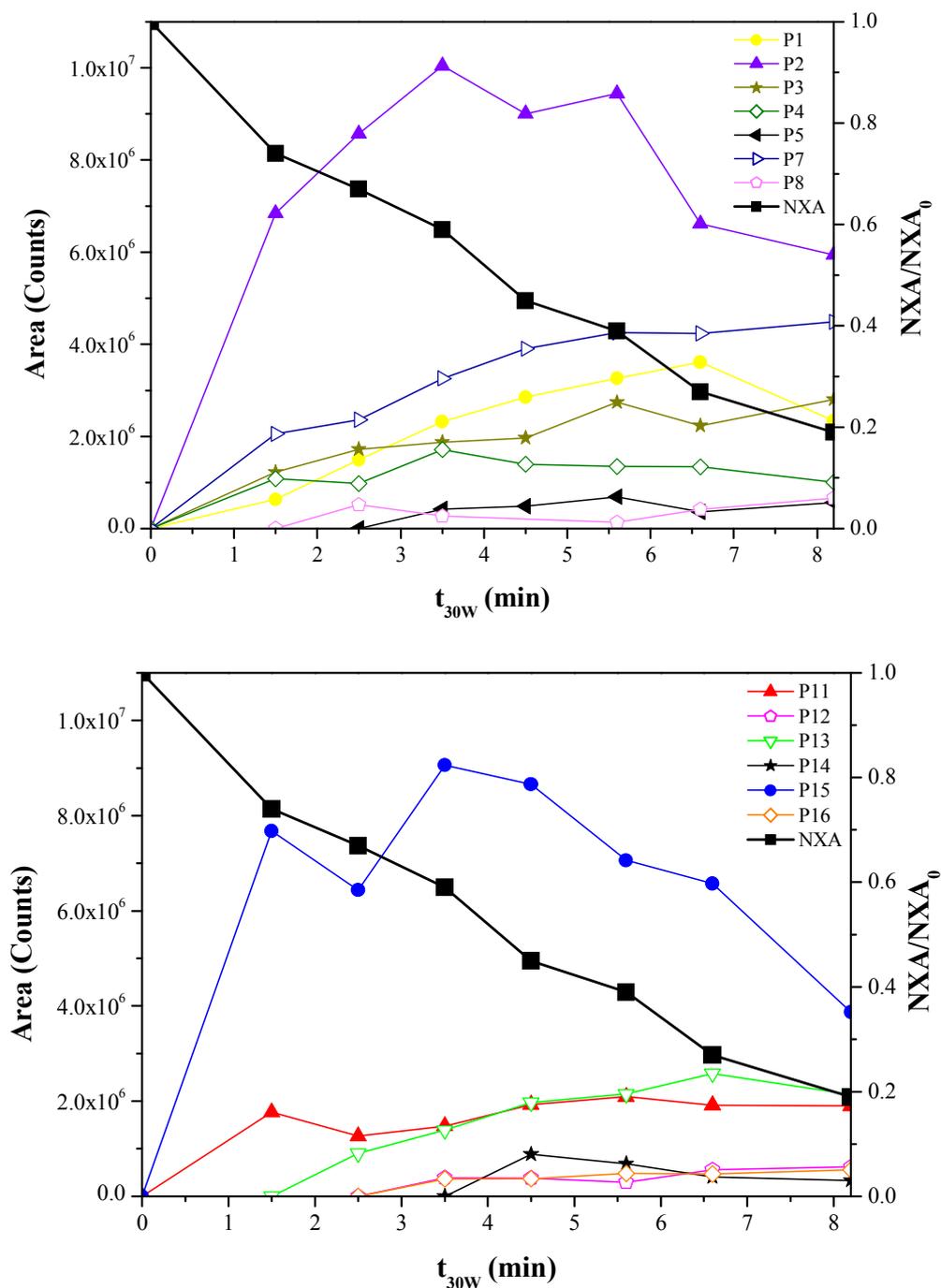


Figura 4.26 Abundancia de los principales PT del NXA generados durante en el proceso foto-Fenton en DIW.

Durante los experimentos en DIW_{NaCl}, P2 también se detectó con abundancia significativa desde el principio del tratamiento (**figura 4.27**). Sin embargo, fue totalmente degradado tras 14 minutos de iluminación. Un comportamiento similar se observó para P3, que fue detectado a alta concentración pasados 8 minutos del tratamiento, experimentando a partir de ese momento una drástica reducción en su concentración. Por el contrario, P7 y P13, que representan etapas más avanzadas del proceso de oxidación, fueron los PT más abundantes para la matriz de DIW_{NaCl} durante el proceso foto-Fenton. Este comportamiento

distinto en relación a la matriz de DIW se podría explicar por la concurrencia de diversos mecanismos que, en el caso de DIW_{NaCl} , implican la acción de radicales $Cl\cdot$ y $Cl_2\cdot^-$, como se ha mencionado previamente.

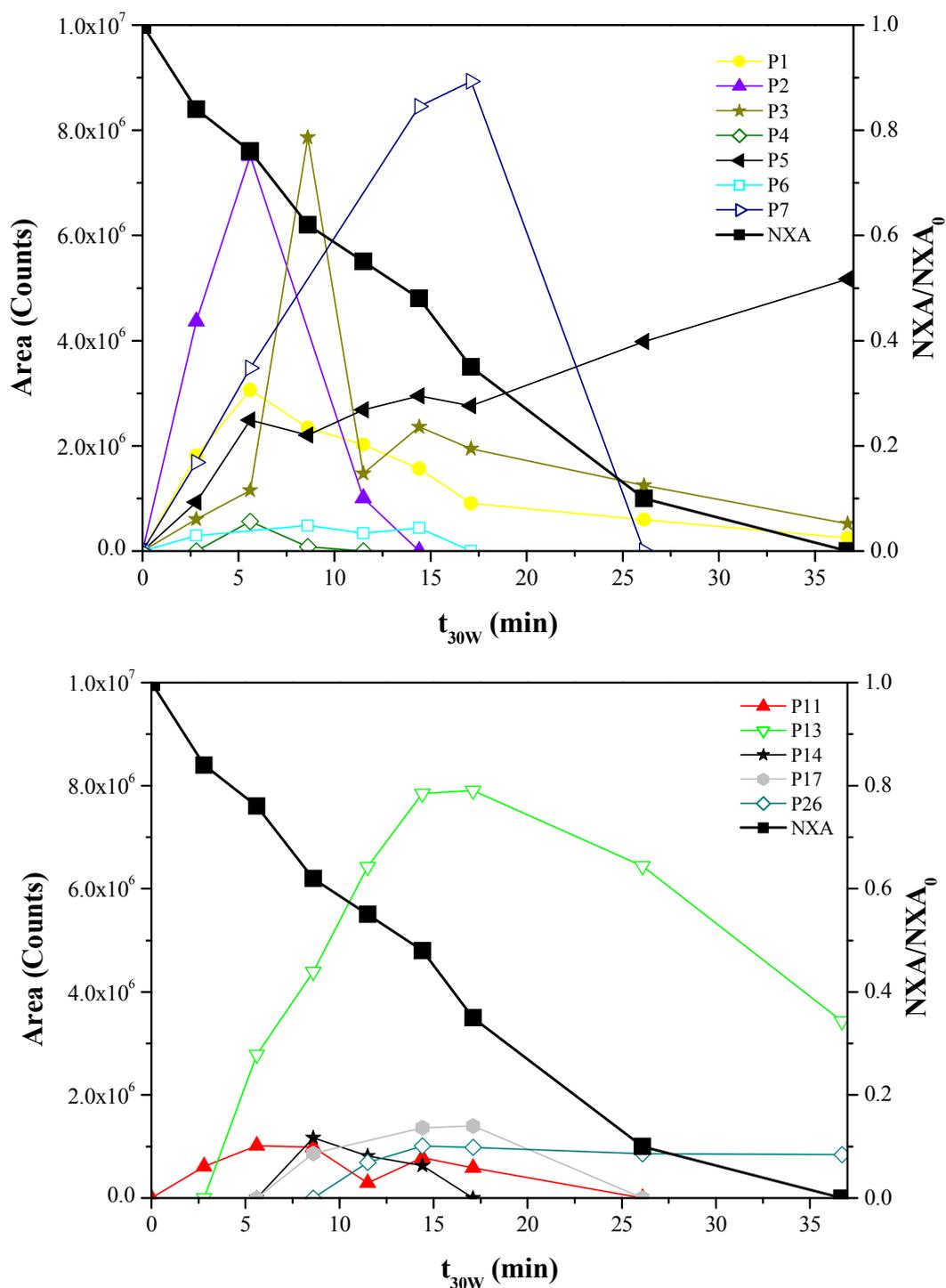
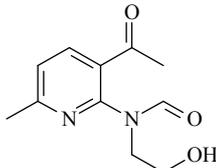
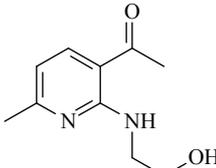
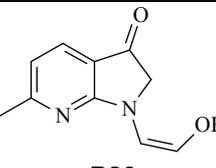
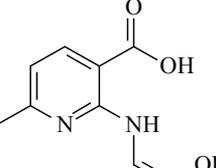
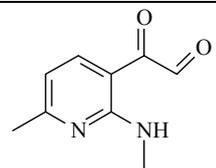
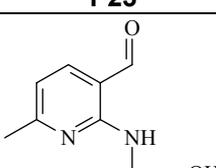


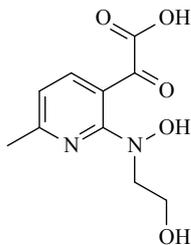
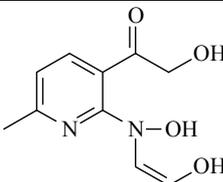
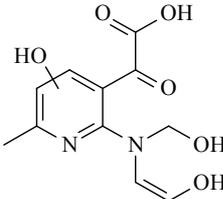
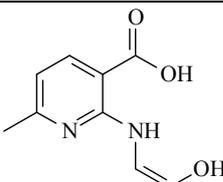
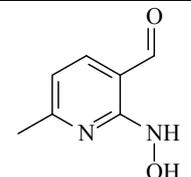
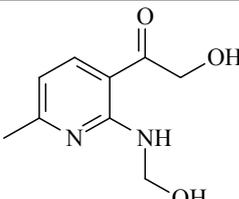
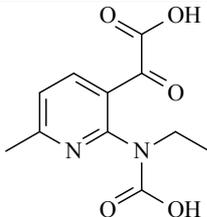
Figura 4.27 Abundancia de los principales PT del NXA generados durante en el proceso foto-Fenton en DIW_{NaCl} .

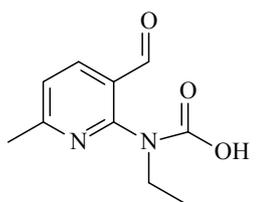
Una vez asumido que el NXA se puede degradar mediante tratamiento con foto-Fenton solar, se tomaron muestras durante los experimentos con SIE después de la total

desaparición del NXA, para investigar la persistencia de los principales intermedios formados. Los experimentos en SIE no revelaron la presencia de rutas de degradación alternativas en esta matriz. Por el contrario, los PT adicionales identificados, enumerados en la **tabla 4.9**, representaron pasos intermedios en las rutas de oxidación anteriormente presentadas. Los resultados mostrados en la **figura 4.28** demuestran que, aunque se es posible reducir o eliminar convenientemente todos los PT empleando el proceso de foto-Fenton solar, se requieren tiempos de tratamiento muy elevados.

Tabla 4.9 PT adicionales identificados por LC-TOF-MS en SIE.

Estructura propuesta	Fórmula	Masa Experimental	DBE
 <p>P18</p>	$C_{11}H_{15}N_2O_3$	223.1002	6
 <p>P19</p>	$C_{10}H_{15}N_2O_2$	195.1056	5
 <p>P20</p>	$C_{10}H_{11}N_2O_2$	191.0736	7
 <p>P21</p>	$C_9H_{11}N_2O_3$	195.0764	6
 <p>P23</p>	$C_9H_{11}N_2O_3$	195.0688	6
 <p>P24</p>	$C_9H_{11}N_2O_2$	179.074	6

 <p>P25</p>	$C_{10}H_{13}N_2O_5$	241.0743	6
 <p>P26</p>	$C_{10}H_{13}N_2O_4$	225.0794	6
 <p>P28</p>	$C_{11}H_{13}N_2O_6$	269.0691	7
 <p>P29</p>	$C_9H_{11}N_2O_3$	195.0687	6
 <p>P30</p>	$C_7H_9N_2O_2$	153.0583	5
 <p>P31</p>	$C_9H_{13}N_2O_3$	197.0844	5
 <p>P32</p>	$C_{11}H_{13}N_2O_5$	253.0746	7

 <p>P33</p>	$C_{10}H_{13}N_2O_3$	209.0839	6
---	----------------------	----------	---

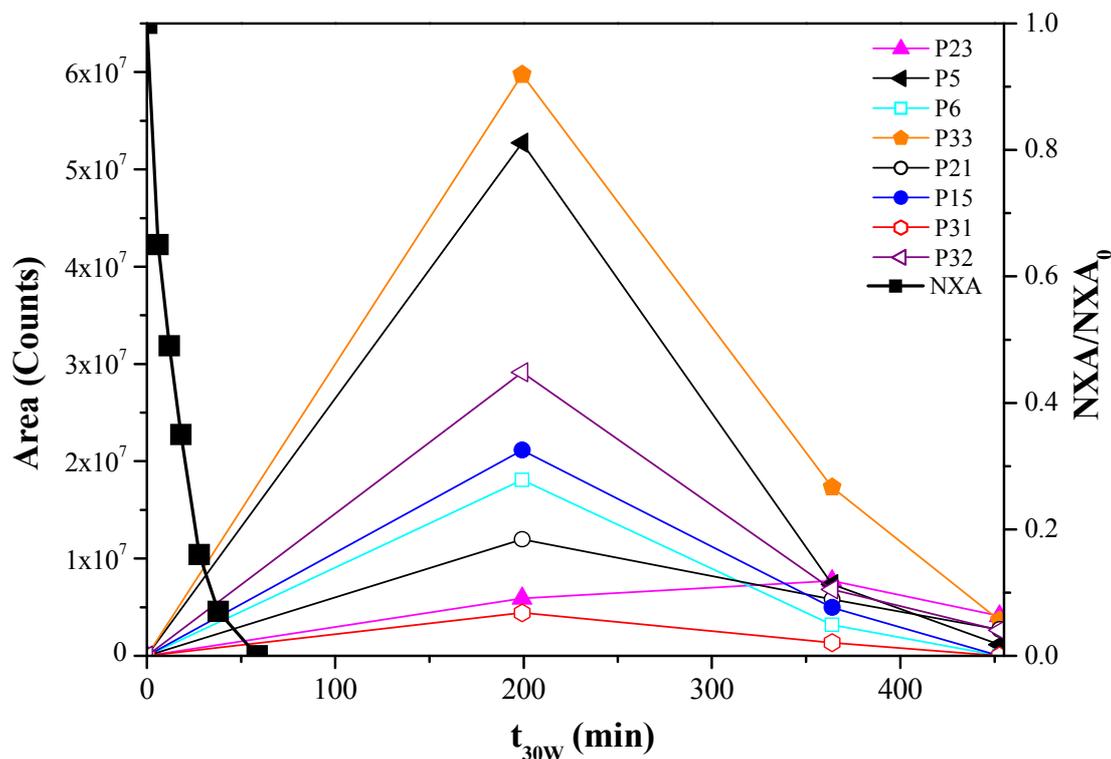


Figura 4.28 Abundancia de los principales PT del NXA generados durante en el proceso foto-Fenton en SIE.

4.3.2.2 Toxicidad del ácido nalidíxico y de los productos de transformación generados mediante foto-Fenton

La toxicidad aguda de los PT generados durante el tratamiento con foto-Fenton en DIW se valoró mediante la aplicación de bioensayos de toxicidad con la bacteria *Vibrio fischeri*, como se muestra en la **figura 4.29**. Inicialmente, la solución de NXA presentó un porcentaje de inhibición de aproximadamente 80%, es decir que la solución inicial de NXA era tóxica para el organismo probado. Después de empezado el tratamiento mediante foto-Fenton, ya en la primera muestra tomada, la toxicidad se redujo prácticamente a la mitad y, permaneció a continuación, en un nivel inferior al 50% de inhibición de la *Vibrio fischeri*, demostrando que los PT generados mediante foto-Fenton, no presentan un carácter tóxico para el organismo ensayado.

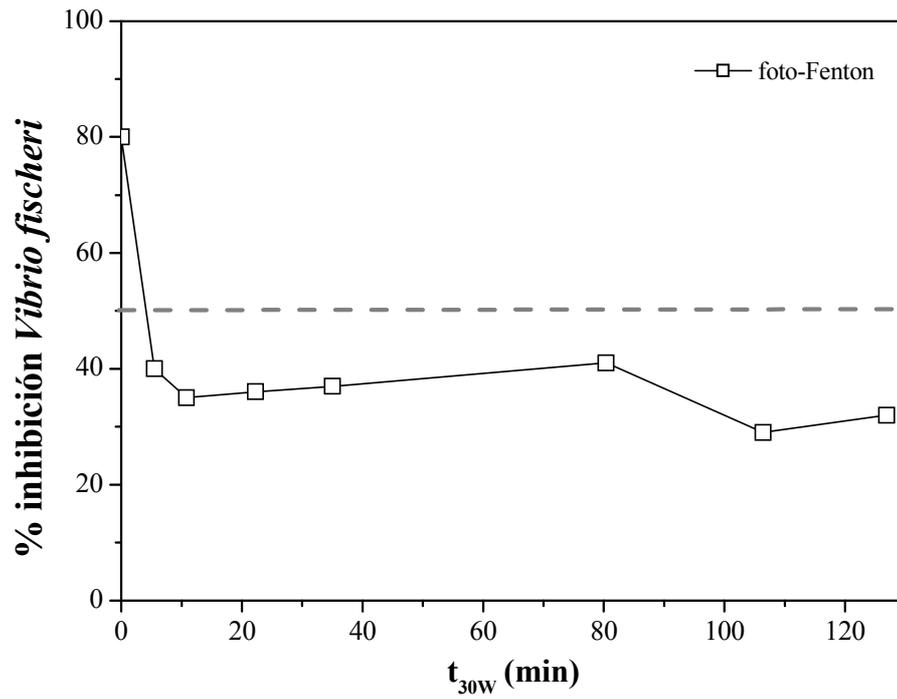


Figura 4.29 Toxicidad mediante *Vibrio fischeri* para el NXA durante el proceso de foto-Fenton solar en DIW.

Capítulo 5

COMBINACIÓN DE FOTOCATÁLISIS SOLAR (FOTO-FENTON) Y TRATAMIENTO BIOLÓGICO AEROBIO PARA LA DESCONTAMINACIÓN DE AGUAS INDUSTRIALES REALES CONTENIENDO ÁCIDO NALIDÍXICO

5.1 Foto-Fenton solar como pre-tratamiento de un proceso biológico aerobio

A menudo las aguas residuales industriales contienen compuestos orgánicos tóxicos o recalcitrantes. Actualmente, se ha prestado especial atención a la problemática de los productos farmacéuticos (Joss y cols., 2005; Joss y cols., 2006) por su amplio consumo, tanto en la medicina humana como veterinaria, hecho que hace que una amplia gama de agentes contaminantes (productos farmacéuticos + metabolitos) alcancen el medio ambiente acuático natural, donde, posteriormente, pueden sufrir transformaciones (productos de transformación) (Jones y cols., 2001; Heberer, 2002). Es necesario, por tanto, proponer alternativas al tratamiento biológico convencional con fangos activos, especialmente cuando se aborda el tratamiento de aguas residuales industriales no biodegradables o tóxicas. Como se ha discutido en la introducción y en capítulos previos, los PAO representan una alternativa viable para la degradación efectiva de un gran número de fármacos (Trovó y cols., 2008; Bautitz y Nogueira, 2007; Yaping y Jiangyong, 2008). Asimismo, se ha descrito

el empleo de PAO para el tratamiento de aguas residuales no biodegradables. La eficacia de los PAO en el tratamiento de estas aguas depende en gran medida de i) la composición y concentración del agua residual en cuestión y ii) del tratamiento seleccionado, de forma que cuanto mayor sea la carga contaminante y mayor el grado de depuración requerido, más intensivas deben ser las condiciones del tratamiento seleccionado. En este sentido, la eficacia del tratamiento puede mejorarse mediante la aplicación del PAO como primera etapa de tratamiento, con el fin de aumentar la biodegradabilidad y reducir la toxicidad, transfiriéndose a continuación el efluente a un tratamiento biológico que siempre es más sencillo y económico. Este concepto, que ha sido objeto de gran interés en los últimos años (Tabrizi y Mehrvar, 2004; Mantzavinos y Psillakis, 2004), es relativamente sencillo y se fundamenta en dos hechos principales: i) el tratamiento biológico es menos costoso y más respetuoso con el medio ambiente que otros tratamientos y ii) la completa mineralización de una disolución mediante PAO puede ser muy costosa debido a la formación de productos finales altamente oxidados que pueden ser muy resistentes a la degradación. Estudios previos han demostrado que los compuestos que persisten después del tratamiento de fármacos mediante PAO, son biodegradables (Varatharajan y Kanmani, 2007; Alaton y cols., 2004; Tunay y cols., 2004; González y cols., 2007) y por tanto fácilmente eliminables mediante tratamiento biológico. Sin embargo, son escasos los estudios que abordan el tratamiento de aguas residuales reales, y aún más escasos los que consideran que las aguas residuales a menudo contiene un número significativo de compuestos biodegradables junto con aquellos considerados como biorrecalcitrantes.

La clave para optimizar los costes de tratamiento cuando se realizan tratamientos combinados es minimizar el tiempo de residencia y el consumo de reactivos en la etapa más costosa, que es la que corresponde al PAO (Scott y Ollis, 1997). Se ha demostrado que el proceso foto-Fenton permite tratar satisfactoriamente aguas residuales reales que contienen altas cargas orgánicas (Da Hora Machado y cols., 2004; Gernjak y cols., 2007; Maciel y cols., 2004; Moraes y cols., 2004; Rodrigues de Souza y cols., 2006). Sin embargo, muy pocos estudios combinan informaciones provenientes del análisis químico, el análisis de la toxicidad y el análisis de la biodegradabilidad para estudiar la viabilidad de la combinación del proceso foto-Fenton y del tratamiento biológico en aguas residuales industriales reales (Malato y cols., 2007; Zapata y cols., 2008). En general, estos trabajos presentan resultados diferentes con respecto a la estrategia de combinación para distintas aguas residuales. Por lo tanto, todavía hay una necesidad imperiosa de un análisis científico razonado que mejore el conocimiento actual del tema y ayude a proponer metodologías que permitan abordar casos complejos. Así, el objetivo del estudio pormenorizado en este epígrafe es proporcionar una estrategia para determinar la mejor manera de combinar los PAO (en este caso el proceso foto-Fenton) a un tratamiento biológico (reactor biológico aerobio de lecho

fijo), a través de la determinación de la evolución de los parámetros pertinentes. Estos parámetros son, básicamente, la degradación y mineralización de los contaminantes, toxicidad y biodegradabilidad del agua contaminada. Para este estudio se ha utilizado un efluente contaminado real (RIE) procedentes de una industria farmacéutica conteniendo NXA.

5.1.1 Caracterización de la matriz real estudiada

En primer lugar se evaluaron los principales parámetros del agua residual proveniente de la industria farmacéutica (véase **tabla 5.1**). Una característica relevante fue la alta conductividad, asociada a la presencia de grandes cantidades de iones inorgánicos, tales como cloruro y sodio, encontrados en cantidades de g L^{-1} . Además, la muestra contenía una concentración significativa de sólidos totales en suspensión (STS), un COD de alrededor de 775 mg L^{-1} y una DQO (disuelta y en suspensión) de 3420 mg L^{-1} . El contaminante más importante en la matriz era el ácido nalidíxico (NXA). La concentración de este compuesto en las aguas residuales era de 45 mg L^{-1} .

Tabla 5.1 Composición del agua residual industrial (RIE).

Parámetro	Valor
pH	3.98
conductividad	7 mS cm^{-1}
COD	775 mg L^{-1}
DQO	$3420 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$
STS	407 mg L^{-1}
NXA	45 mg L^{-1}
Cl^-	2800 mg L^{-1}
PO_4^{3-}	10 mg L^{-1}
SO_4^{2-}	160 mg L^{-1}
Na^+	2000 mg L^{-1}
Ca^{2+}	20 mg L^{-1}

Se realizó una prueba inicial de biodegradabilidad con dos diluciones (1:2 y 1:8) del agua residual inicial. La dilución 1:2 fue seleccionada de acuerdo con el COD inicial recomendado en la metodología estándar del ensayo de Zahn-Wellens (ZW). La otra dilución (1:8) fue estudiada para entender el comportamiento del fango activo en contacto con pequeñas concentraciones del NXA. Tal y como se muestra en la **figura 5.1**, ambas muestras eran biodegradables, aunque la más concentrada precisaba de un periodo de adaptación. La concentración de NXA se mantuvo, no obstante, constante en ambos casos, demostrando la escasa biodegradabilidad de este compuesto que, sin embargo, resultaba poco tóxico para el fango activo.

La adaptación de la biomasa para la muestra diluida en proporción 1:2 se extendió por un periodo largo (alrededor de 15 días), debido principalmente a la mayor concentración de

NXA presente en esta muestra. Este fármaco puede, por lo tanto, ser considerado biorrecalcitrante y posiblemente inhibitorio para el metabolismo de la biomasa, aunque no presenta un efecto tóxico agudo. La inhibición del metabolismo de la biomasa por la presencia del NXA también fue confirmada durante las pruebas de foto-Fenton, como se describe a continuación. En todo caso, estos resultados demuestran que el tratamiento de esta agua puede ser dificultoso en una depuradora convencional al inhibir el metabolismo de la biomasa durante un tiempo mucho mayor que el utilizado en estos tratamientos, que suele ser de algunas horas a unos pocos días. Por tanto, un pre-tratamiento mediante PAO puede ser pertinente.

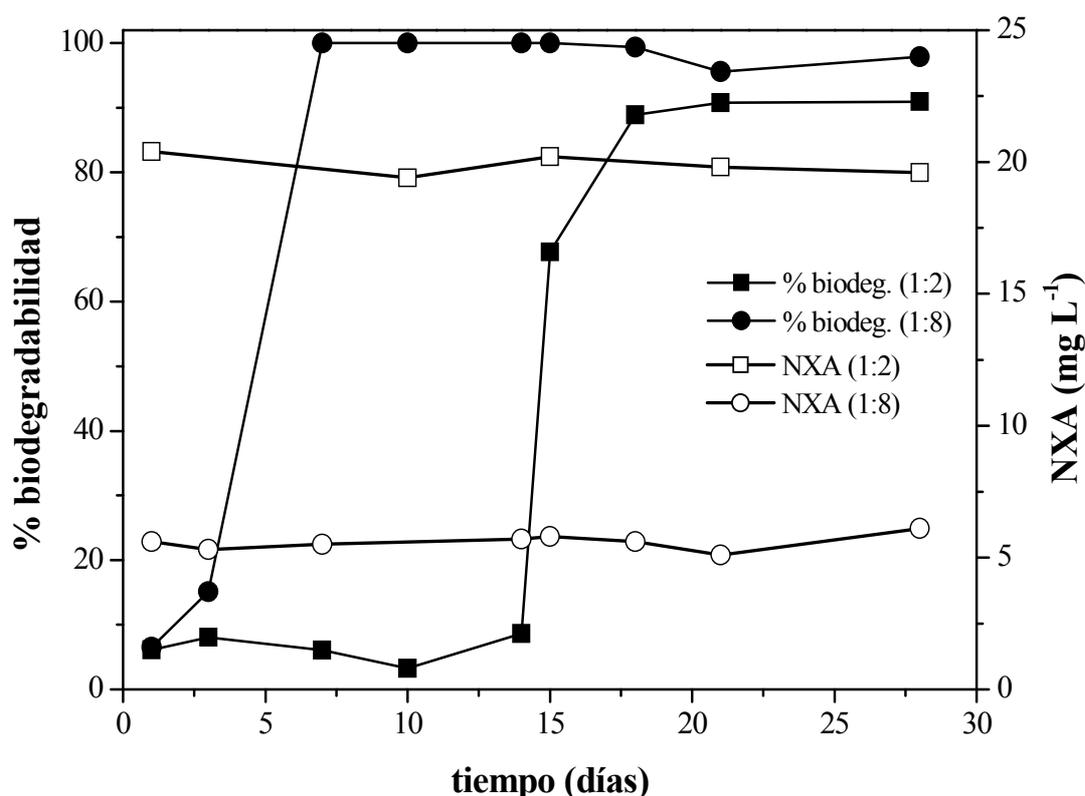


Figura 5.1 Tests de biodegradabilidad inherente mediante ensayo de Zahn-Wellens (ZW) para muestras del agua residual diluida 1:2 y 1:8.

5.1.2 Tratamiento mediante foto-Fenton solar

La **figura 5.2** muestra el tratamiento mediante foto-Fenton del agua residual real descrita en la **tabla 5.1**. Se empleó una concentración inicial de 20 mg L^{-1} de hierro total y la concentración de H_2O_2 se mantuvo entre 200 y 400 mg L^{-1} . En estas condiciones, como se puede observar en la **figura 5.2**, tuvo lugar una reducción del 90% del COD inicial, después de 400 minutos de tiempo de iluminación. En este punto se había consumido 180 mM de H_2O_2 . El NXA se eliminó pasados 190 minutos de tratamiento, después de que se hubieran consumido 72 mM de H_2O_2 . En ese momento solo se había reducido un 15% del COD inicial. Teniendo en cuenta estos resultados, no es conveniente, desde un punto de vista

económico, plantear mineralizar el 90% del COD mediante foto-Fenton, debido al largo período de tiempo y la enorme cantidad de peróxido de hidrógeno necesaria (alrededor 6 g L⁻¹) para alcanzar un nivel de mineralización tan elevado. Por otra parte, los resultados mostrados en la **figura 5.1** demostraban que el agua residual objeto de estudio era biodegradable, y que el único compuesto presente en ella que no presentaba tales características era el NXA. Por lo tanto, se consideró que la degradación del NXA fuera el principal objetivo del tratamiento mediante fotocatalisis solar. Así, es fundamental llevar a cabo estudios de biodegradabilidad y de toxicidad del agua residual real durante el tratamiento mediante foto-Fenton, principalmente a lo largo de la degradación del NXA, para determinar el tiempo de tratamiento mínimo necesario que además conlleve el consumo mínimo de peróxido de hidrógeno.

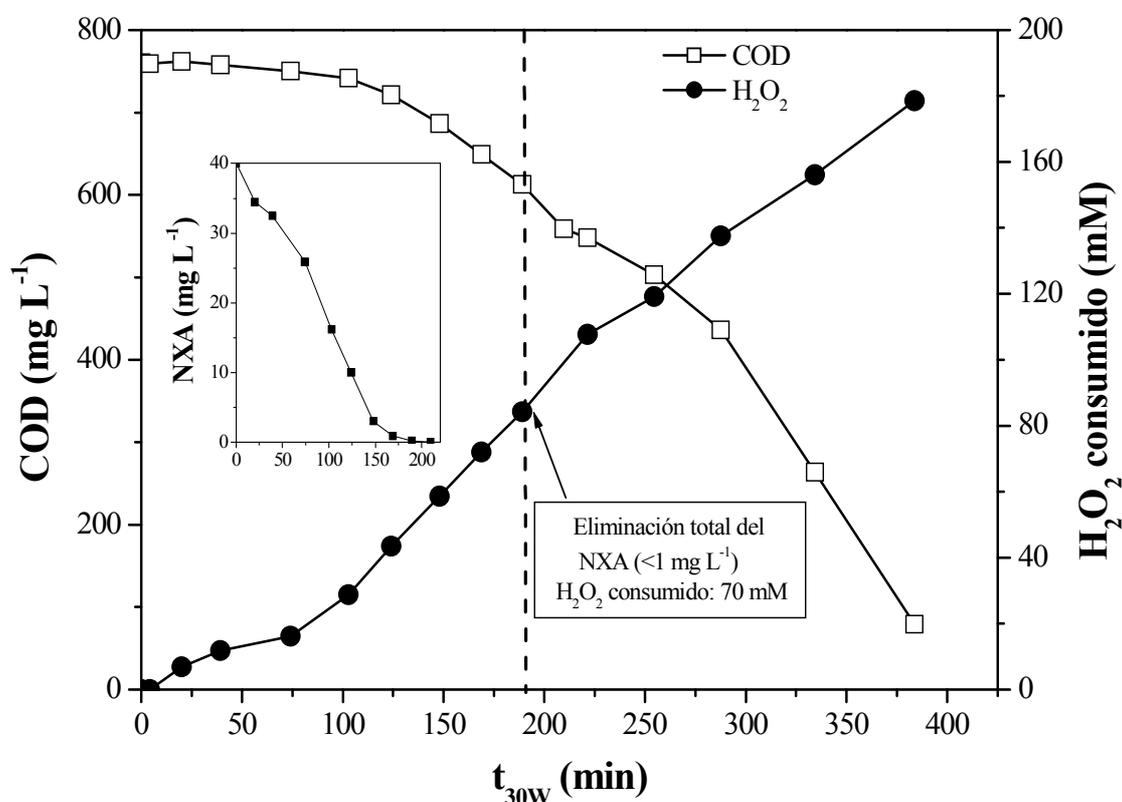


Figura 5.2 Evolución del COD y consumo de H₂O₂ durante el proceso foto-Fenton en RIE. En el detalle, degradación del NXA durante el mismo ensayo.

5.1.2.1 Evaluación de la toxicidad y de la biodegradabilidad a lo largo del fototratamiento

La toxicidad y la biodegradabilidad del agua residual real tratada mediante foto-Fenton se evaluaron en diversas etapas del proceso para determinar el punto óptimo para combinar el PAO al proceso biológico subsiguiente. Para ello, se reprodujo el experimento anterior, manteniendo todos los parámetros iguales, excepto la dosificación de H₂O₂. En este caso, se añadía H₂O₂ en pequeñas cantidades, del orden de algunos mM, al fotorreactor, y su

consumo se monitorizaba hasta que el peróxido de hidrógeno era totalmente consumido. En este momento, se tomaba una muestra y se realizaban análisis de toxicidad y de biodegradabilidad. Seguidamente, se volvía a añadir más H_2O_2 y, de nuevo, una vez consumido, se tomaba otra muestra. Este procedimiento de “adición-consumo total-adición” se repitió hasta la mineralización del 70% del COD inicial, asegurándose en todo caso que en cada muestra a evaluar todo el H_2O_2 había sido totalmente consumido, ya que la presencia de este oxidante podía alterar, por su toxicidad, los ensayos de toxicidad y biodegradabilidad. Asimismo también se evitaba cualquier reacción en la oscuridad después de la toma de muestra. En estos experimentos, también se determinaba la concentración de NXA y COD, estos resultados pueden ser comparados con los resultados cinéticos mostrados en la **figura 5.2**.

Otra opción hubiera sido trabajar con un exceso de H_2O_2 (como el experimento mostrado en la **figura 5.2**), y eliminar el H_2O_2 remanente antes de realizar los ensayos toxicológicos y de biodegradabilidad. Pero los métodos para eliminar el H_2O_2 , basados en catalasa, MnO_2 , etc. podían cambiar la composición de la matriz, y/o las sustancias químicas añadidas para llevar a cabo tales procedimientos experimentales podían cambiar la respuesta de estos ensayos. Por lo tanto, los resultados mostrados están directamente relacionados con el consumo H_2O_2 , en lugar de con el tiempo de iluminación. Sin embargo, estos resultados se pueden comparar directamente con los resultados cinéticos mostrados en **figura 5.2** utilizando el consumo de H_2O_2 para compararlos. En estos experimentos, se tomaron 12 muestras para los análisis de toxicidad y de biodegradabilidad (véase **figura 5.3**).

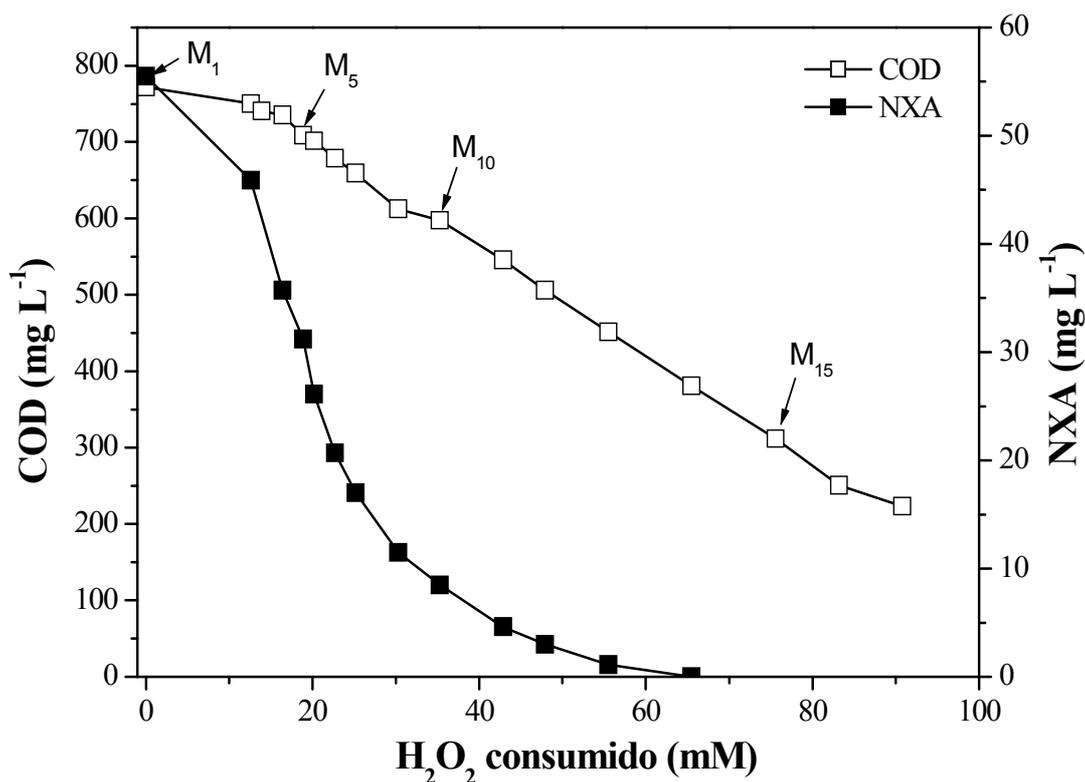


Figura 5.3 Mineralización y degradación de NXA en RIE en función del consumo de peróxido de hidrógeno durante el proceso foto-Fenton solar. M_x (desde M_1 hasta M_{17}) son algunas de las muestras tomadas para los ensayos de toxicidad y biodegradabilidad.

La degradación total del NXA se alcanzó tras el consumo de 66 mM de H_2O_2 , un consumo muy similar al obtenido en el experimento mostrado en la **figura 5.2**, confirmando que los resultados obtenidos en los experimentos que fueron realizados con el procedimiento de “adición-consumo total-adición” son comparables a los obtenidos cuando se añadía un exceso de H_2O_2 . Esto es debido a que una cantidad determinada de H_2O_2 produce una mineralización específica del COD y una degradación determinada de NXA.

Un primer grupo de muestras fue seleccionado para los bioensayos de toxicidad con *Vibrio fischeri* y para el análisis de la DQO (M_1 , M_5 , M_6 , M_7 , M_8 , M_9 , M_{11} , M_{12} , M_{13} , M_{14} , M_{15}), y un segundo grupo para las pruebas de biodegradabilidad y para los bioensayos de toxicidad con *Daphnia magna* (M_6 , M_9 , M_{10} , M_{12} , M_{13} , M_{14}). La toxicidad frente a *Vibrio fischeri* se evaluó en muestras sin diluir, y con diluciones 1:3 y 1:6. La **figura 5.4** muestra solamente resultados del bioensayo de toxicidad con las muestras diluidas 1:3, junto con el COD correspondiente a cada muestra. No obstante, los valores de toxicidad obtenidos en todos los casos fueron muy similares, pudiéndose concluir que el tratamiento mediante foto-Fenton no disminuía la toxicidad para *Vibrio fischeri*.

Los bioensayos con *Daphnia magna* mostraron un comportamiento similar. Todos los micro crustáceos en todas las muestras murieron después de 24 horas. Tales resultados demuestran que según los bioensayos de toxicidad el proceso foto-Fenton no alcanzaba el objetivo inicialmente definido. Estos resultados no son extraordinarios ya que ambos bioensayos han sido descritos como muy sensibles (Hernando y cols., 2007) y, en general, la mayoría de las aguas residuales reales contienen concentraciones elevadas de compuestos orgánicos diversos (como por ejemplo, ácidos carboxílicos) que pueden ser responsables de esta toxicidad.

Aunque los ensayos de toxicidad pueden considerarse como métodos rápidos y sencillos para identificar la etapa del tratamiento en la cual el agua deja de ser tóxica y se convierte, probablemente, en biodegradable (Gutiérrez y cols., 2002; Hernando y cols., 2005; Lapertot y Pulgarin, 2006; Lapertot y cols., 2008) en este caso, no aportaron información útil indicativa de cambios significativos durante el tratamiento. Así, fue necesario realizar ensayos de determinación de la biodegradabilidad (generalmente un método más largo).

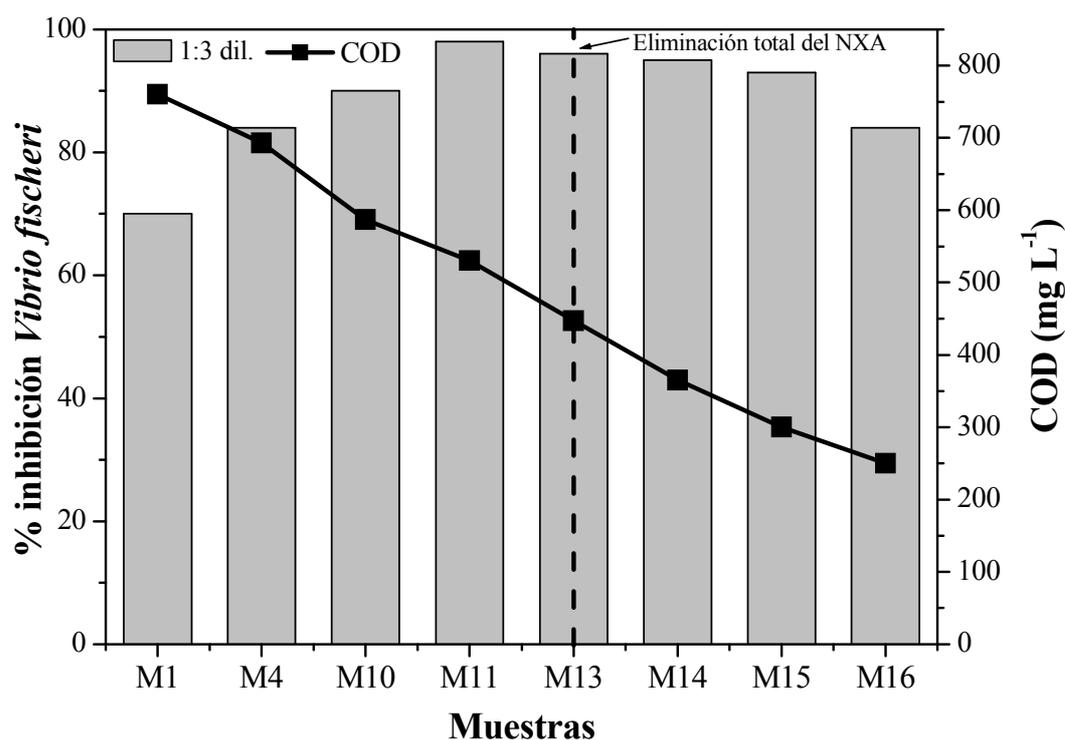


Figura 5.4 Bioensayo de toxicidad para *Vibrio fischeri* en muestras diluidas 1:3 y evolución de COD durante el proceso foto-Fenton.

La variación en la DQO durante el experimento se determinó en las mismas muestras en las que se determinó el COD (véase **figura 5.5**). La disminución significativa de este parámetro está relacionada con una fuerte oxidación de la materia orgánica. La eficacia de un proceso de oxidación se demuestra claramente mediante el parámetro EOM (estado de oxidación

medio), que puede ser calculado por la **ecuación 1.2**, descrita con más detalles en la parte introductoria de esta memoria (véase **sección 1.4.4**) en el cual el COD y la DQO están expresados en moles de C/L y de O₂/L, respectivamente, a lo largo del tiempo del muestreo. El valor del EOM varía entre +4, correspondiente al estado más oxidado del carbono (cuando todo el C está en forma de CO₂), y -4 que corresponde al estado más reducido del carbono (cuando se encuentra en forma de CH₄). Según lo observado en la **figura 5.5**, el valor máximo del EOM fue de 0.3 y se alcanzó después de un consumo de H₂O₂ de aproximadamente 25 mM, permaneciendo estable en este valor hasta el final del experimento. Generalmente, el EOM aumenta con el tiempo de tratamiento fotocatalítico hasta alcanzar un máximo a partir del cual permanece aproximadamente constante. Estos resultados sugieren que se están formando PT más oxidados al principio del proceso fotocatalítico, y que, después de cierto tiempo, la naturaleza química de la mayor parte de estos PT no varía substancialmente (Sarria y cols., 2002), incluso si el tratamiento mediante foto-Fenton continúa. La formación de intermedios más oxidados (sin que se produzca una mineralización sustancial) demuestra indirectamente que el tratamiento puede mejorar la biodegradabilidad de la matriz en estudio. En el momento en que el EOM se estabiliza, el tratamiento está mineralizando los contaminantes orgánicos. Los cambios en el EOM fueron tenidos en cuenta para la selección de la etapa del tratamiento en la cual la matriz en estudio era considerada biodegradable. Así, las pruebas de Zahn-Wellens (un método largo y tedioso) se realizaron solamente en las muestras >M6 (20 mM de consumo de H₂O₂), ya que antes de esta etapa del tratamiento la concentración de NXA y la toxicidad eran elevadas y el EOM aumentaba significativamente.

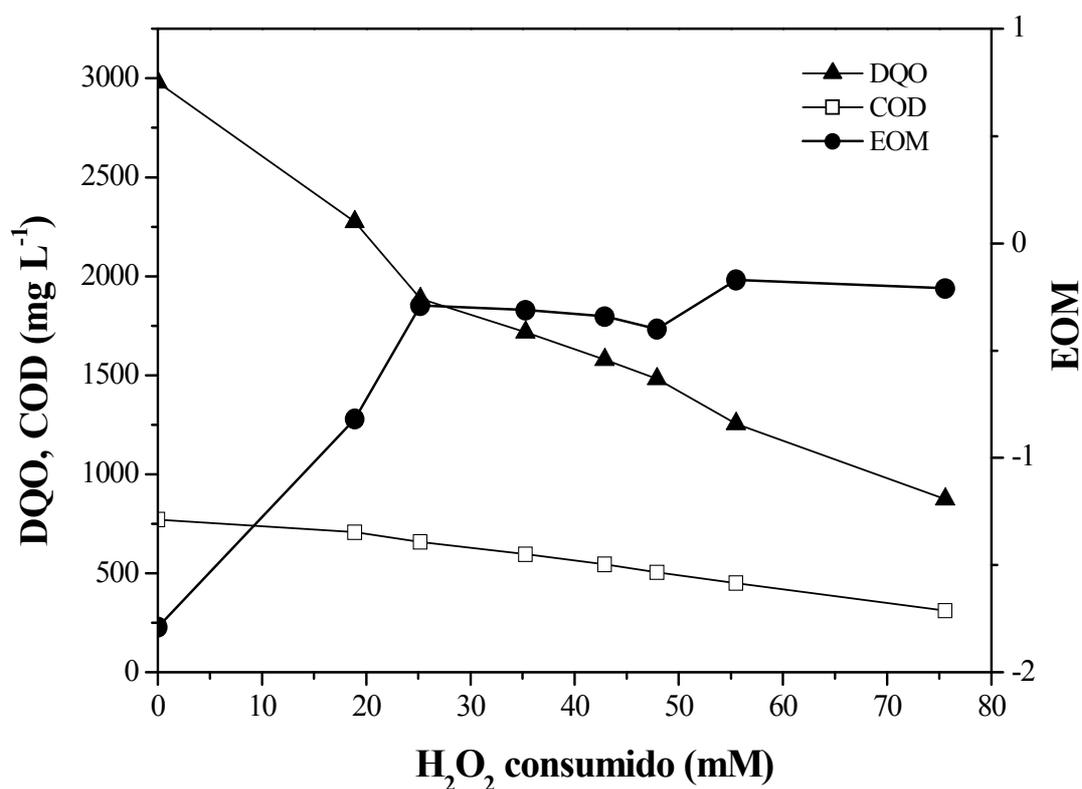


Figura 5.5 Evolución del EOM, DQO y COD en función del consumo de H₂O₂ durante el proceso foto-Fenton.

El ensayo de Zahn-Wellens (véase **figura 5.6**) se realizó con seis muestras no diluidas correspondientes a diversas etapas del proceso foto-Fenton. Al final del ensayo de ZW, todas las muestras presentaron una biodegradabilidad igual o superior al 90%. En tres de las muestras analizadas (M7, M10 y M11), en las cuales las concentraciones de NXA eran de 20.7, 8.5 y 4.6 mg L⁻¹, respectivamente, se logró una biodegradabilidad de 70% después de varios días de biotratamiento (muestras M10 y M11 después de 8 días, M7 después de 10 días). Por otra parte, las muestras con concentraciones de NXA muy bajas (<1mg L⁻¹) o sin NXA (M13, M14 y M15) eran biodegradables después de 3 días. Los resultados demuestran que la muestra no tratada (inicial) necesita un período de adaptación más amplio que las muestras tratadas y que la presencia de NXA (en concentraciones superiores a 4.6 mg L⁻¹) es perjudicial ya que reduce la eficacia de la biodegradación. Estos resultados demostraron que el proceso foto-Fenton debe ser llevado a cabo hasta la total degradación del NXA antes de la combinación con un tratamiento biológico posterior y que el EOM es un parámetro apropiado para seleccionar las muestras a ensayar mediante ZW.

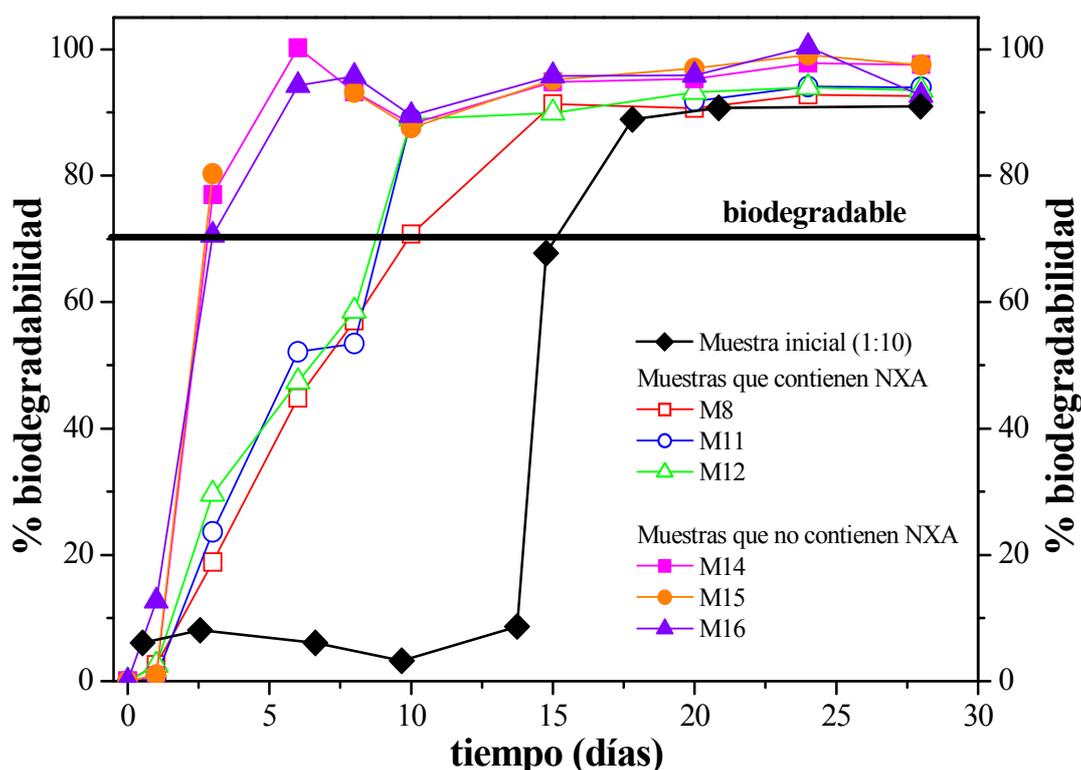


Figura 5.6 Ensayo de Zahn-Wellens de la muestra inicial y para las muestras seleccionadas durante el proceso foto-Fenton.

5.1.3 Combinación de foto-Fenton solar y tratamiento biológico

Una vez determinado el tiempo de tratamiento mediante foto-Fenton necesario para alcanzar un grado de biodegradabilidad adecuado para su combinación con un tratamiento biológico, éste se realizó mediante el empleo de un reactor aerobio de lecho fijo (IBR).

Antes de realizar el experimento combinado, el IBR fue inoculado con 150 L de fango activado concentrado proveniente de la depuradora de aguas residuales de El Ejido (Almería, España). Durante el proceso de inoculación de la biomasa, se mantuvo la recirculación entre el tanque acondicionador y el IBR para asegurar un grado óptimo de fijación de la biomasa en los anillos de polipropileno utilizados como soporte. Se realizaron determinaciones diarias de COD y de la concentración de iones (principalmente amoníaco y nitrato). Al principio el sistema se mantuvo con la adición controlada de glucosa y NH_4Cl observando siempre que la relación carbono:nitrógeno fuera de 100:20 y, finalmente se utilizó un efluente de EDAR simulado (véase **tabla 2.4**) para ir enriqueciendo el IBR en biomasa. El paso siguiente fue la adaptación de la biomasa inmovilizada a la alta salinidad del agua residual real que contenía el NXA (RIE) (véase **tabla 5.1**). Durante todo el proceso de aclimatación, se aumentó gradualmente la concentración de NaCl en cinco pasos desde 1 a 5 g L^{-1} . En la **figura 5.7**, se presenta una fotografía del IBR y de los anillos con la biomasa fijada.

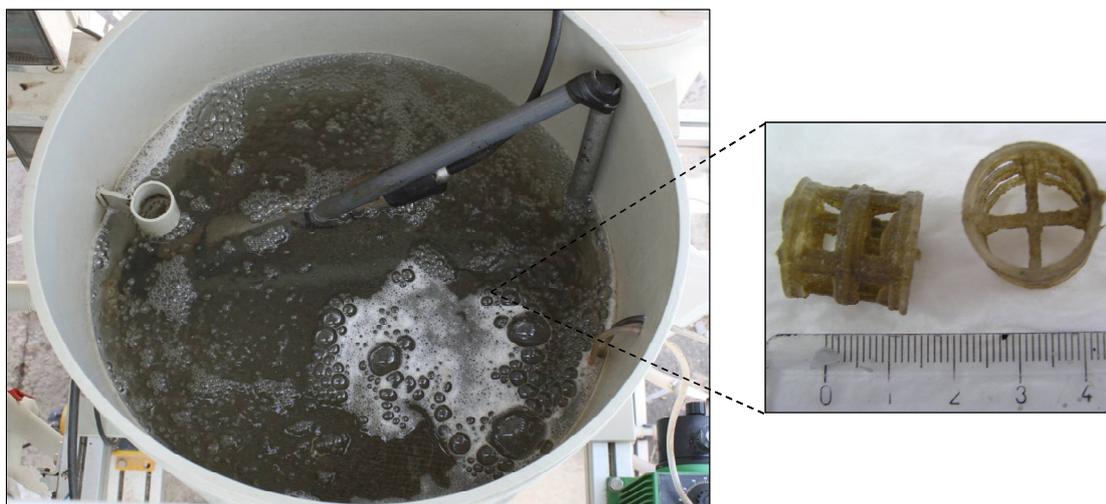


Figura 5.7 Fotografía del IBR (izquierda) y de los anillos con la biomasa soportada una vez finalizado en proceso de inoculación.

Durante el pre-tratamiento del agua residual real, que contenía 45 mg L^{-1} de NXA, el proceso foto-Fenton se prolongó hasta la total eliminación del mismo, después de 190 minutos de tiempo de iluminación y con un consumo de H_2O_2 de 66 mM . En este momento el agua contenía una concentración de COD de 530 mg L^{-1} y 6.5 g L^{-1} de NaCl. Es oportuno destacar que en este experimento, la misma dosis de H_2O_2 (66 mM) no logró exactamente la misma mineralización que el experimento previo (véase **figura 5.2**). Según lo observado en la **figura 5.8**, el COD fue menor de 530 mg L^{-1} . No obstante, en ambos casos se alcanzó la completa degradación del NXA ($<1 \text{ mg L}^{-1}$).

El agua fototratada se trasladó a un tanque de neutralización, conectado al biorreactor y se ajustó el pH hasta aproximadamente 7. El agua fue entonces bombeada del tanque de neutralización al tanque de acondicionamiento conectado con el IBR. El sistema fue operado en discontinuo, con un flujo de recirculación de 500 L h^{-1} entre el tanque de acondicionamiento y el IBR hasta que el agua objeto de estudio fue casi totalmente mineralizada (COD final 35 mg L^{-1}). El COD y la evolución del contenido en nitrógeno liberado como NH_4^+ y NO_3^- durante el tratamiento biológico se muestra en la **figura 5.8**. El COD presentó un resultado similar a la prueba de ZW con una reducción de 495 mg L^{-1} en 4 días. El primer día se añadió NH_4 (como NH_4Cl , 68 mg L^{-1} de N) para permitir a las bacterias nitrificantes la metabolización del carbono orgánico. El consumo de NH_4^+ y la generación de NO_3^- indicaron que el proceso de nitrificación transcurría adecuadamente y, que el N era asimilado por la biomasa ya que el contenido total de N disminuía.

La eficacia global del proceso combinado, en lo que concierne a la tasa de mineralización fue del 95%, siendo el 33% correspondiente al proceso fotoquímico solar y el 62% al tratamiento biológico. Los bioensayos con *Vibrio fischeri* y *Daphnia magna* demostraron una

reducción de la toxicidad por debajo del 50%. Por lo tanto, el tratamiento combinado fue acertado también, desde el punto de vista de la evolución de la toxicidad.

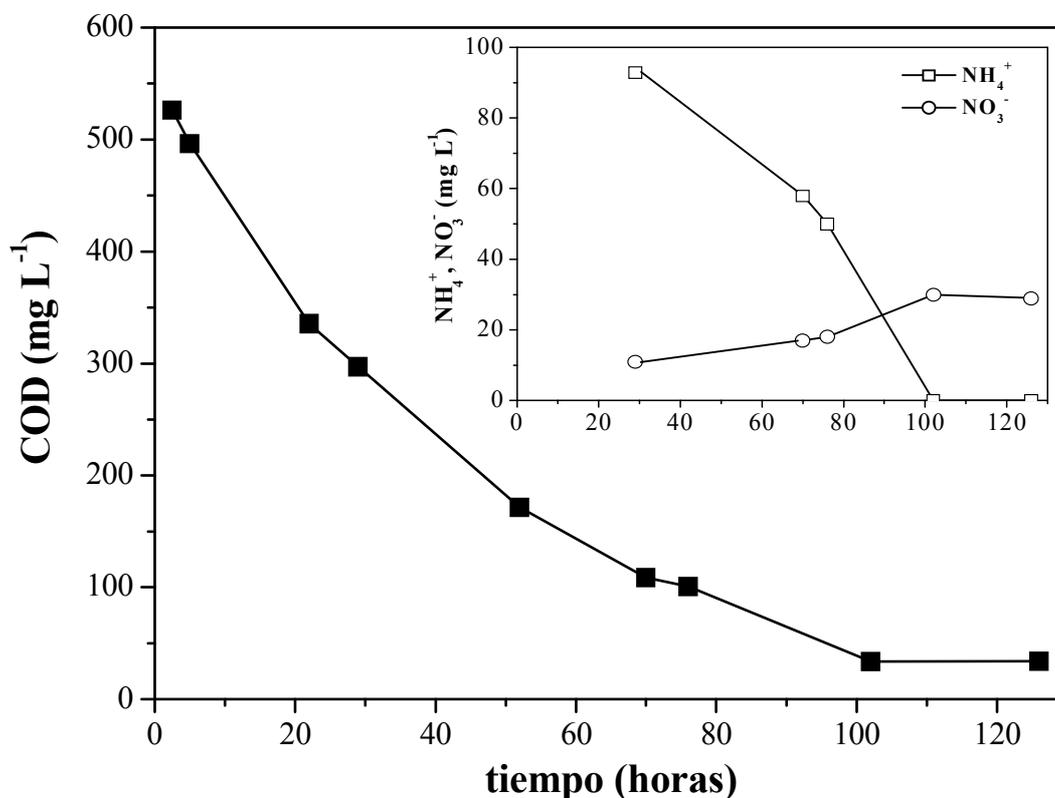


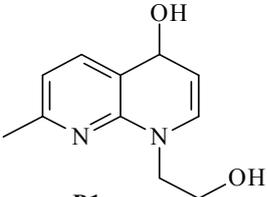
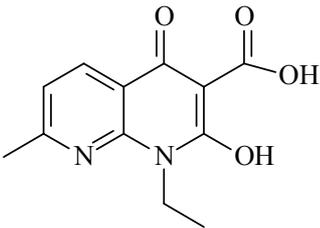
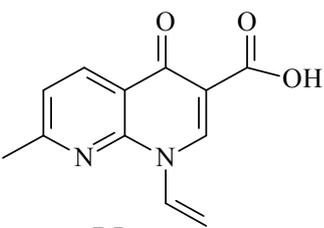
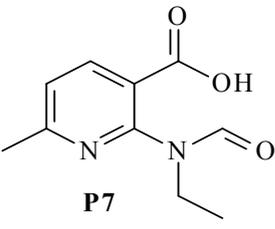
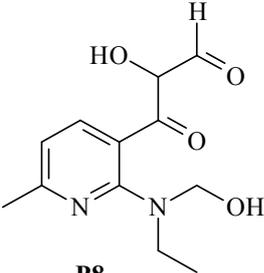
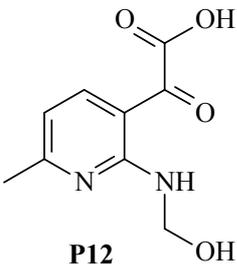
Figura 5.8 Mineralización durante el proceso biológico del agua fototratada mediante foto-Fenton.

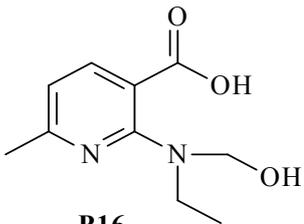
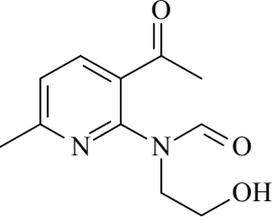
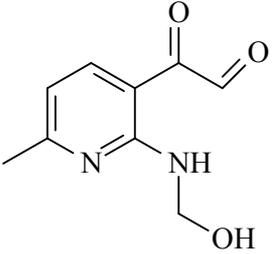
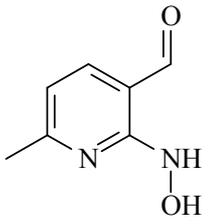
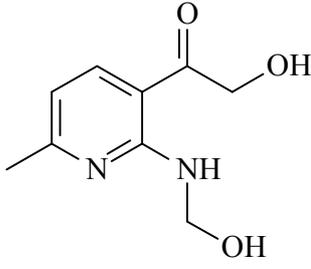
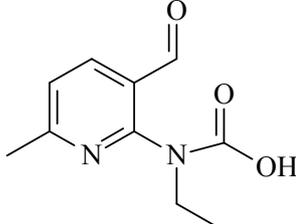
5.1.4 Evaluación de los productos de transformación para la combinación entre fotocatalisis solar y biotratamiento

La aplicación de técnicas de LC-(ESI)TOF-MS durante el tratamiento mediante foto-Fenton de un efluente industrial real (RIE), permitieron identificar las estructuras recogidas en la **tabla 5.2**. La estrategia seguida para la identificación es la misma descrita en capítulos anteriores. En este caso, sin embargo, por tratarse de un agua residual real con un alto contenido en sales que podían interferir en los resultados y con la intención de mejorar la detección de los PT generados, se efectuó la extracción en fase sólida de las muestras seleccionadas para el estudio. El procedimiento experimental utilizado está descrito con detalle en el **Capítulo 2, epígrafe 2.3.1**.

Los compuestos identificados habían sido previamente descritos en los estudios de degradación del NXA realizados en distintas aguas modelo, en especial en agua residual industrial simulada (SIE), como se ha descrito en la **sección 4.3.2.1 del Capítulo 4**. La notación propuesta en la **tabla 5.2** coincide con la utilizada en la **tabla 4.8**, en la cual se recoge información analítica adicional para estos compuestos.

Tabla 5.2 PT identificados por LC-TOF-MS durante el tratamiento mediante foto-Fenton de un efluente industrial real (RIE) conteniendo NXA.

Estructura propuesta	Fórmula	Masa Experimental	DBE
 <p>P1</p>	C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₂	207.1060	6
 <p>P2</p>	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₄	249.0799	8
 <p>P5</p>	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₃	231.0687	9
 <p>P7</p>	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₃	209.0840	6
 <p>P8</p>	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₄	252.1097	6
 <p>P12</p>	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₄	211.0649	6

 <p>P16</p>	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₃	211.0994	5
 <p>P18</p>	C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₃	223.1002	6
 <p>P23</p>	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₃	195.0688	6
 <p>P30</p>	C ₇ H ₉ N ₂ O ₂	153.0583	5
 <p>P31</p>	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃	197.0844	5
 <p>P33</p>	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₃	209.0839	6

Estos resultados demuestran la utilidad de realizar estudios de degradación en aguas modelo, previos a los estudios en aguas reales, ya que la complejidad de éstas puede

dificultar la identificación de los compuestos, especialmente de aquellos presentes a más baja concentración.

Una vez finalizado el tratamiento con foto-Fenton, en el momento en el que ya no se detectaba presencia de NXA en la disolución, los PT presentes a mayor concentración fueron los señalados en la **figura 5.9**. En ese momento el efluente fue sometido al tratamiento biológico, realizándose un seguimiento de la evolución de los PT durante este periodo. P7 resultó ser el compuesto más abundante y persistente identificado, el cual presentaba solo una lenta y parcial degradación durante el proceso biológico. P2, P5 y P33 permanecían prácticamente inalterados durante el tratamiento. P30 fue el único intermedio no detectado al final del experimento, probablemente por presentar una estructura más sencilla y, por tanto, más fácilmente biodegradable.

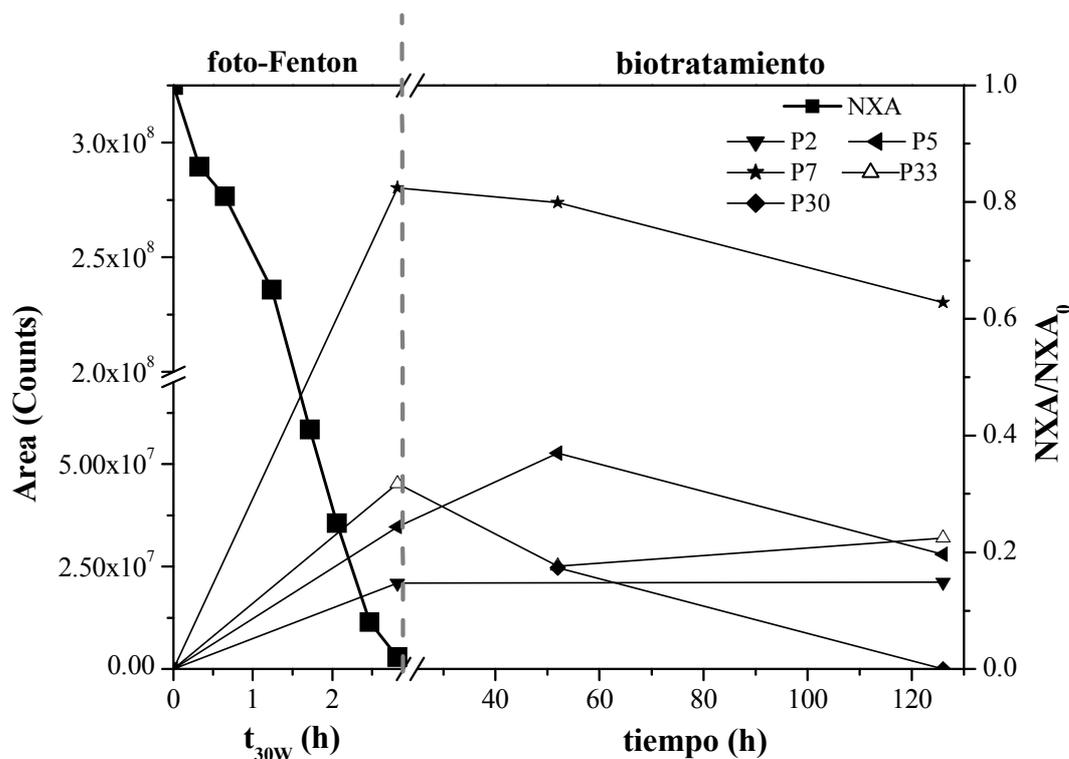


Figura 5.9 Comportamiento de los PT identificados durante cada etapa del tratamiento combinado.

Los resultados obtenidos evidenciaran que no solo NXA, sino también sus PT, eran resistentes al tratamiento biológico y, por tanto, la combinación de tratamientos propuesta no garantizaba la ausencia de estos intermedios en el efluente final.

5.2 Empleo del foto-Fenton solar como etapa final del tratamiento de un agua residual proveniente de la industria farmacéutica

Los resultados obtenidos en el apartado anterior ponían de manifiesto que el diseño experimental planteado, combinando un tratamiento previo del agua residual con foto-Fenton seguido de un tratamiento biológico, presentaba algunas limitaciones, como la eliminación parcial de los PT del NXA o el relativamente elevado tiempo de tratamiento necesario para eliminar este compuesto, que puede encarecer el coste total del proceso. En este contexto, se planteó la posibilidad de modificar la secuencia de operación, planteando, inicialmente un tratamiento biológico para reducir la elevada carga orgánica de la matriz objeto de estudio y, a continuación, un PAO para llevar a cabo la completa eliminación de los compuestos biorrecalcitrantes, como son el NXA y sus PT. Este planteamiento se veía reforzado por los resultados obtenidos de las pruebas de ZW, que demostraron que la matriz de agua residual presentaba una significativa biodegradabilidad (alrededor del 80%) solamente después de 15 días, es decir, que la mayor parte del contenido orgánico del agua residual podía ser biodegradado, si bien requería un largo período de adaptación. Así, un sistema biológico podía tratar la matriz estudiada después de un periodo de adaptación, pero no el NXA presente en la misma, que es un compuesto biorrecalcitrante que podría ser eliminado con el empleo de un post-tratamiento mediante un proceso fotocatalítico solar.

5.2.1 Combinación de un tratamiento biológico con foto-Fenton solar para la depuración de un agua residual industrial

Al principio del biotratamiento, se llenó el IBR con el agua residual objeto de estudio, después de ajustar previamente el pH de la misma a un valor próximo a 7, el cual se mantuvo constante entre 7 y 8 mediante el empleo de un sistema de control automático de pH. El COD y la concentración de NXA fueron monitorizados a lo largo de todo el tratamiento biológico. Después de 4 días de tratamiento, el 96% del COD inicial había sido eliminado. En el primer día, la concentración de NXA se redujo a 14 mg L⁻¹ y, a partir de este punto hasta el final del proceso de tratamiento biológico, se mantuvo constante. La significativa reducción en la concentración del NXA se explica por una adsorción del compuesto en la biomasa soportada en los anillos de polipropileno del IBR. Por otro lado, como el agua residual real no contenía fuentes de nitrógeno inorgánico, éste se añadió al sistema biológico como cloruro de amonio, para mantener la relación C:N constante en 100:20. Esta relación de C:N es necesaria para garantizar el buen funcionamiento de los sistemas biológicos aerobios. El nitrógeno inorgánico (NH₄⁺ y NO₃⁻) fue monitorizado durante el biotratamiento, pero no se observó que el proceso de nitrificación tuviera lugar.

El NXA es un ácido orgánico muy débil con un pKa de 5.95 que puede estar presente en su forma neutra y aniónica en el rango de pH exigido por el biotratamiento. Por lo tanto, la capacidad de adsorción de este compuesto también varía según el pH. Lorphensri y cols. (2007) estudiaron la adsorción y el transporte de algunos productos farmacéuticos, incluyendo el NXA, en la arena de un acuífero con bajo contenido orgánico. En dicho estudio, el NXA mostró una adsorción mucho más fuerte que la esperada por su hidrofobicidad. La adsorción del NXA demostró ser altamente dependiente del pH, siendo las fuerzas electrostáticas la componente dominante del fenómeno de absorción. Asimismo, Stackelberg y cols. (2007) estudiaron la eliminación de fármacos durante procesos convencionales de tratamiento de agua potable, comprobando que los compuestos hidrofóbicos, como el NXA, se detectaron a concentraciones elevadas en muestras sólidas secas y, generalmente, no están presentes en las muestras acuosas finales.

Después del tratamiento biológico, el agua residual parcialmente biotratada fue tratada mediante foto-Fenton (véase **figura 5.10**). Se realizaron dos estudios de degradación. En el primero, el agua residual biotratada, la cual presentaba una concentración de NXA de 13 mg L⁻¹ y un COD de 22 mg L⁻¹, fue directamente tratada por fotocatalisis solar. En el segundo estudio, las aguas residuales biotratadas fueron enriquecidas mediante la adición de NXA hasta una concentración de 38 mg L⁻¹, simulando así la saturación de la biomasa en NXA, que provocaría la ausencia de adsorción si se opera el biorreactor rutinariamente. El resto de parámetros fueron comunes a ambos estudios: concentración de hierro (20 mg L⁻¹), pH inicial (2.7) y concentración constante de H₂O₂ (entre 200 y 400 mg L⁻¹).

En ambos casos, el NXA fue totalmente degradado en aproximadamente 25 minutos de tiempo de iluminación y con un consumo de 12 mM de H₂O₂, alcanzando al final del proceso un COD de 20 mg L⁻¹ que es suficientemente bajo para el vertido. En ambos experimentos, después de 50 minutos de tiempo de iluminación, el COD se mantuvo prácticamente constante, sin embargo el consumo de H₂O₂ se mantuvo. Este hecho puede explicarse por la presencia de Cl⁻ en la matriz estudiada, los cuales, como se ha observado en los estudios precedentes de degradación fotocatalítica de los compuestos modelo en presencia de una alta concentración de Cl⁻, reaccionan con los •OH, generando así especies menos oxidantes que el •OH. Tales especies no son capaces de llevar a la mineralización total de los intermedios oxidados presentes después de la completa eliminación del NXA. Un estudio detallado de esta cuestión se incluye en **sección 4.1**.

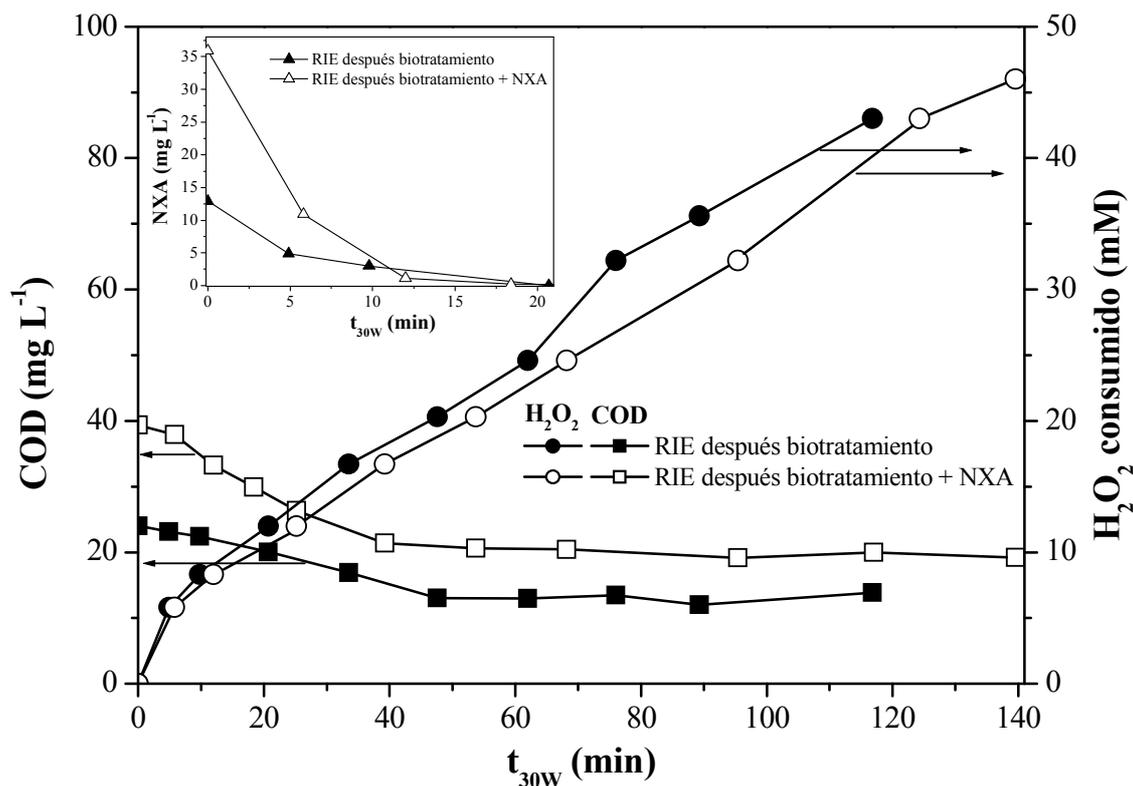


Figura 5.10 Mineralización del agua residual real (RIE) y consumo de H_2O_2 durante el proceso foto-Fenton. En el detalle, degradación del NXA.

La eficacia total del tratamiento combinado entre biotratamiento y foto-Fenton solar, en términos de eliminación del COD, fue del 97%. En este caso, los compuestos biorrecalcitrantes no son tóxicos para la biomasa, y la biodegradación antes del empleo del PAO es acertada, ya que con esto se evitan las principales desventajas de los PAO, las cuales son (i) los largos tiempos de tratamiento y (ii) el elevado consumo de reactivos químicos. En este caso, el tratamiento mediante PAO es más conveniente como una etapa de afino que como un tratamiento previo.

La toxicidad aguda, a lo largo de todo el proceso combinado, se evaluó usando dos bioensayos distintos: *Vibrio fischeri* y *Daphnia magna*. El test con *Vibrio fischeri* mostró una elevada toxicidad (inhibición del 97%) para la muestra inicial del agua residual real, pero después del biotratamiento no presentó toxicidad, enfatizando la validez del biotratamiento en la reducción de los parámetros toxicológicos de la muestra. Después del foto-Fenton, una inhibición de 59% indicó un ligero ascenso durante el tratamiento fotocatalítico. La toxicidad final presentada en el bioensayo realizado con la *Vibrio fischeri* puede estar relacionada con la presencia de ácidos orgánicos, característicos de las etapas finales del proceso de oxidación.

El bioensayo con *Daphnia magna* demostró una toxicidad muy elevada de la matriz original (muerte de todos los micro crustáceos después de 24 horas). La muestra biotratada no reveló toxicidad y, al final del foto-Fenton la muestra no presentó toxicidad aguda frente a la *Daphnia magna*, ya que los dáfidos manifestaron movilidad en 95% de los casos, después de 48 horas.

5.2.2 Evaluación de la exposición continua de la biomasa al ácido nalidíxico

Por ser el NXA un bactericida, es de suponer que la biomasa podría presentar efectos de toxicidad crónica en el IBR después de un largo período de exposición a este compuesto. Por ello, se realizaron estudios de estabilidad de la biomasa y de adsorción durante la exposición continua del IBR al NXA. Para evaluar mejor este efecto, en vez de utilizar el agua residual real, se optó por trabajar con un agua residual sintética que contenían NXA y una concentración de COD similar a la determinada para la matriz de agua residual real. Este procedimiento fue desarrollado para evaluar solamente el efecto del NXA, evitando cualquier interferencia de otros compuestos desconocidos presentes en el agua residual real. El estudio se dividió en cinco ciclos, donde al principio de cada etapa se llevaba a cabo la adición de un influente simulado de depuradora municipal (SI; COD inicial alrededor de 600 mg L⁻¹ y 45 mg L⁻¹ de NXA) (véase **figura 5.11**). La composición química del SI fue adaptada de la guía OECD y consistía en: 960 mg L⁻¹ de peptona, 660 mg L⁻¹ de extracto de carne, 180 mg L⁻¹ de urea, 28 mg L⁻¹ de K₂HPO₄, 4 mg L⁻¹ de CaCl₂·2H₂O y 2 mg L⁻¹ de Mg₂SO₄·7H₂O (OECD, 1999).

Al final de cada ciclo, el IBR era vaciado y en el quinto ciclo se mantuvo el funcionamiento del biorreactor durante siete días para observar el progreso de los parámetros estudiados durante períodos más largos y para determinar cualquier cambio en la concentración de NXA en presencia de COD bajo. Se siguió este procedimiento también para detectar una posible muerte de parte de la biomasa debido a cualquier efecto tóxico (el COD debería aumentar al liberarse COD contenido en la biomasa). Posteriormente, el sistema se vació y se llenó de nuevo con SI sin NXA (sexto ciclo) para evaluar la posible desorción de este compuesto. En todos los pasos el pH se mantuvo entre 6.8-8 y se observó siempre una significativa reducción del COD (mineralización >90%) indicando el buen estado de la biomasa.

La concentración de NXA se redujo solamente durante el primer ciclo y al principio del segundo ciclo, debido a adsorción en la biomasa; después de esto la concentración alcanzó de nuevo el nivel inicial, tras apenas 26 horas de tratamiento. Sin embargo, en el tercero y cuarto ciclos, la concentración del NXA aumentó. Esto significa que la adsorción del NXA en la biomasa disminuyó a medida que aumentaba el tiempo de exposición de la biomasa al

NXA. De hecho, durante las etapas 3 y 4, el NXA adsorbido durante el primer ciclo (alrededor 25 mg L^{-1}) era desorbido. Durante el quinto ciclo se detectó una leve adsorción del NXA. Finalmente, durante la sexta etapa (SI sin NXA) no se detectó desorción y solamente se detectaron trazas de NXA. Según lo comentado anteriormente, el NXA es un ácido orgánico muy débil que puede estar presente en formas neutras y aniónicas en el rango de pH utilizado en el IBR. Por lo tanto, la capacidad de adsorción de este compuesto puede también variar con el pH. Como este parámetro varió entre 6.8 y 8 durante el biotratamiento y la composición del agua también varió debido a la biodegradación del COD, los fenómenos de adsorción/desorción del NXA no siguieron un modelo predecible.

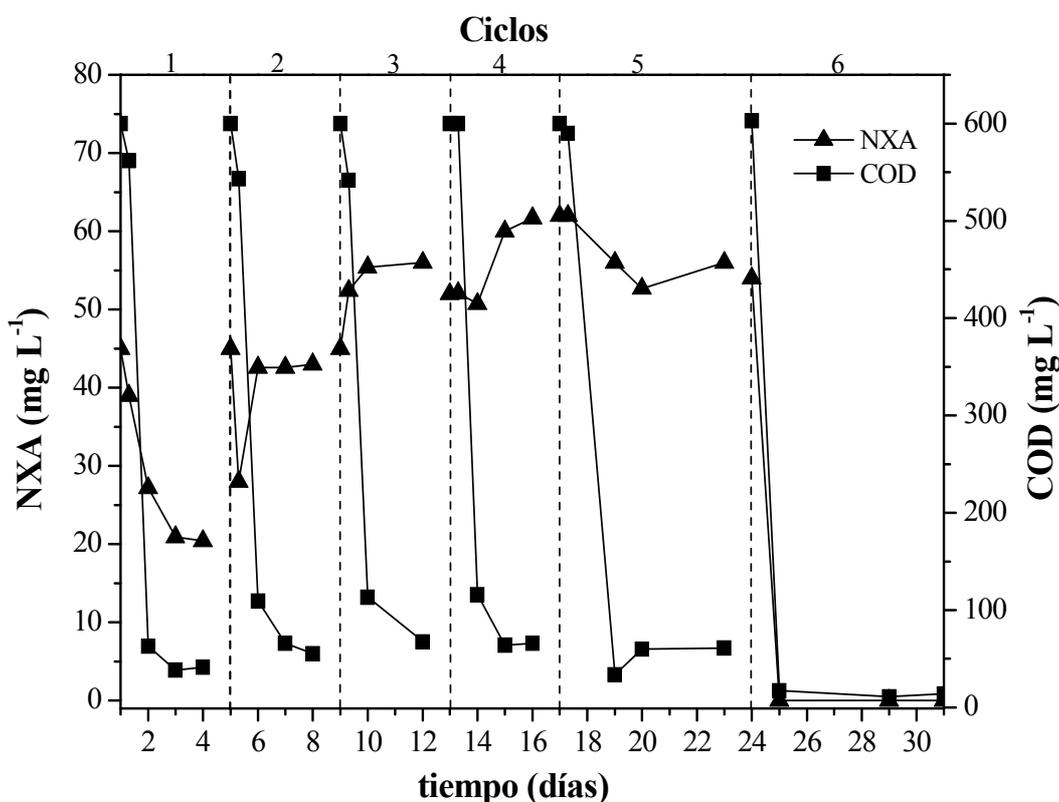


Figura 5.11 Estudio de la estabilidad de la biomasa y adsorción de NXA durante su exposición a 45 mg L^{-1} de NXA disuelto en SI durante 5 ciclos. El 6º ciclo contenía solo SI.

También se llevaron a cabo análisis del nitrógeno inorgánico (NO_3^- y NH_4^+) durante todo el estudio para conocer la nitrificación. En los tres ciclos iniciales se determinó una alta concentración de NO_3^- al final de cada etapa (entre 415 y 530 mg L^{-1}), mientras que la concentración de amonio disminuyó. Durante los pasos subsiguientes, la nitrificación disminuyó ya que la concentración de nitrato aumentó poco comparada con la concentración de NH_4^+ en el biorreactor. Cuando el biorreactor se mantuvo solamente con SI, se observó una elevación en los niveles de nitrato (300 mg L^{-1}) y la reducción en los niveles de NH_4^+ ($<0.1 \text{ mg L}^{-1}$) al final del sexto ciclo de tratamiento, demostrando que, una vez más, el proceso de nitrificación tenía lugar.

5.2.3 Evaluación de los productos de transformación mediante LC-TOF-MS para la combinación entre biotratamiento y foto-Fenton

En un intento de realizar un seguimiento lo más detallado posible de los principales componentes orgánicos de la matriz a lo largo del proceso de tratamiento, se procedió a la caracterización inicial del agua residual industrial real. La **figura 5.12(A)** muestra el cromatograma de iones totales obtenido para una muestra de agua residual antes del tratamiento. Además del NXA, pudieron identificarse a menor concentración otros compuestos de estructura similar que fueron tentativamente asignados en la **figura 5.13**. En general, estos compuestos mantienen la estructura del 4-oxo-1,4-dihidroquinolina. El compuesto (P1), que estaba presente en mayor concentración que el resto, fue identificado como un derivado decarboxilado del NXA, que también se ha descrito como producto de la fotodescomposición y de la termólisis del NXA (Fernández y Cárdenas, 1990). También se ha identificado un compuesto isobárico (P14) que podría corresponder a un isómero posicional de P1, probablemente generado durante la síntesis del NXA, y cuya estructura no ha sido propuesta. Otros picos, presentes con menor intensidad en el cromatograma, revelaron la presencia de una mezcla compleja de derivados del NXA presentes a concentraciones más reducidas. Tales compuestos, presentes inicialmente en el efluente industrial, podían corresponder a etapas previas de la síntesis del NXA o a productos de degradación generados en el agua residual durante su almacenamiento. El compuesto P3 fue identificado como 7-hidroximetil-NXA, descrito previamente como el principal metabolito del NXA. Este compuesto presentaba, al menos *in vitro*, una actividad antibacteriana idéntica en espectro y potencia a la del NXA (Cabanillas y cols., 2007; Pérez-Ruiz y cols., 1999; Cuisinaud y cols., 1980).

Después del biotratamiento, los compuestos originalmente presentes en el agua residual fueron degradados totalmente (P3-P10, P13, P17), o su concentración se reducía considerablemente, como se puede observar en la **figura 5.12(B)** (véase la escala de intensidad de los cromatogramas). El NXA y P1 todavía seguían siendo los principales componentes de la mezcla, y un nuevo grupo de compuestos (P19-P22) fue identificado. La ausencia de estándares comerciales para los compuestos identificados hace su evaluación cuantitativa imposible, y, por lo tanto el balance de masa no podría cerrarse.

Después del tratamiento con foto-Fenton, el NXA y el resto de compuestos análogos presentes en el agua pudieron ser totalmente eliminados, no observándose la presencia de nuevos PT después del tiempo de tratamiento aplicado (véase **figura 5.12(C)**).

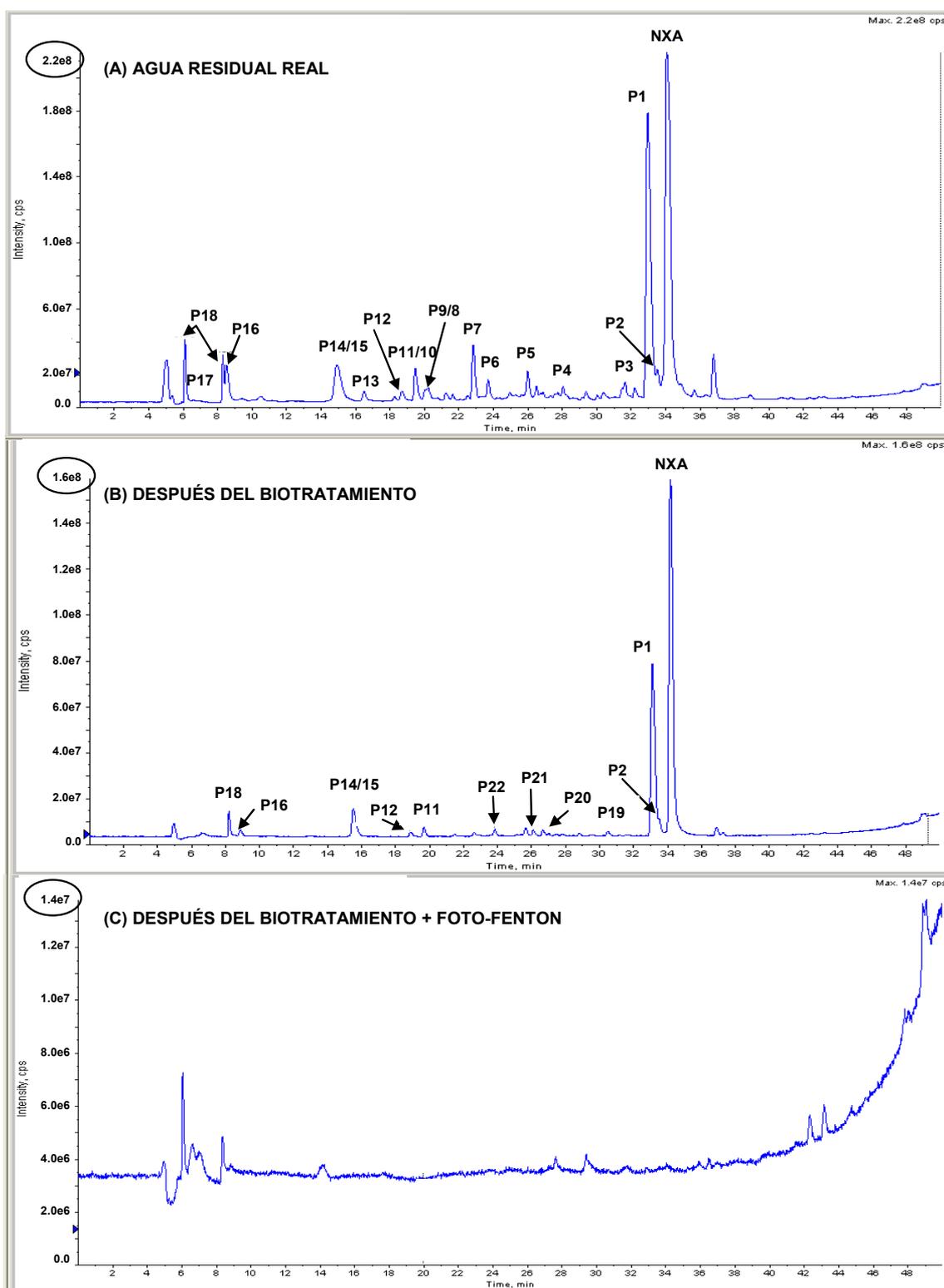


Figura 5.12 Cromatograma de iones totales del (A) agua residual real, (B) después del tratamiento biológico y (C) después de la combinación tratamiento biológico+foto-Fenton.

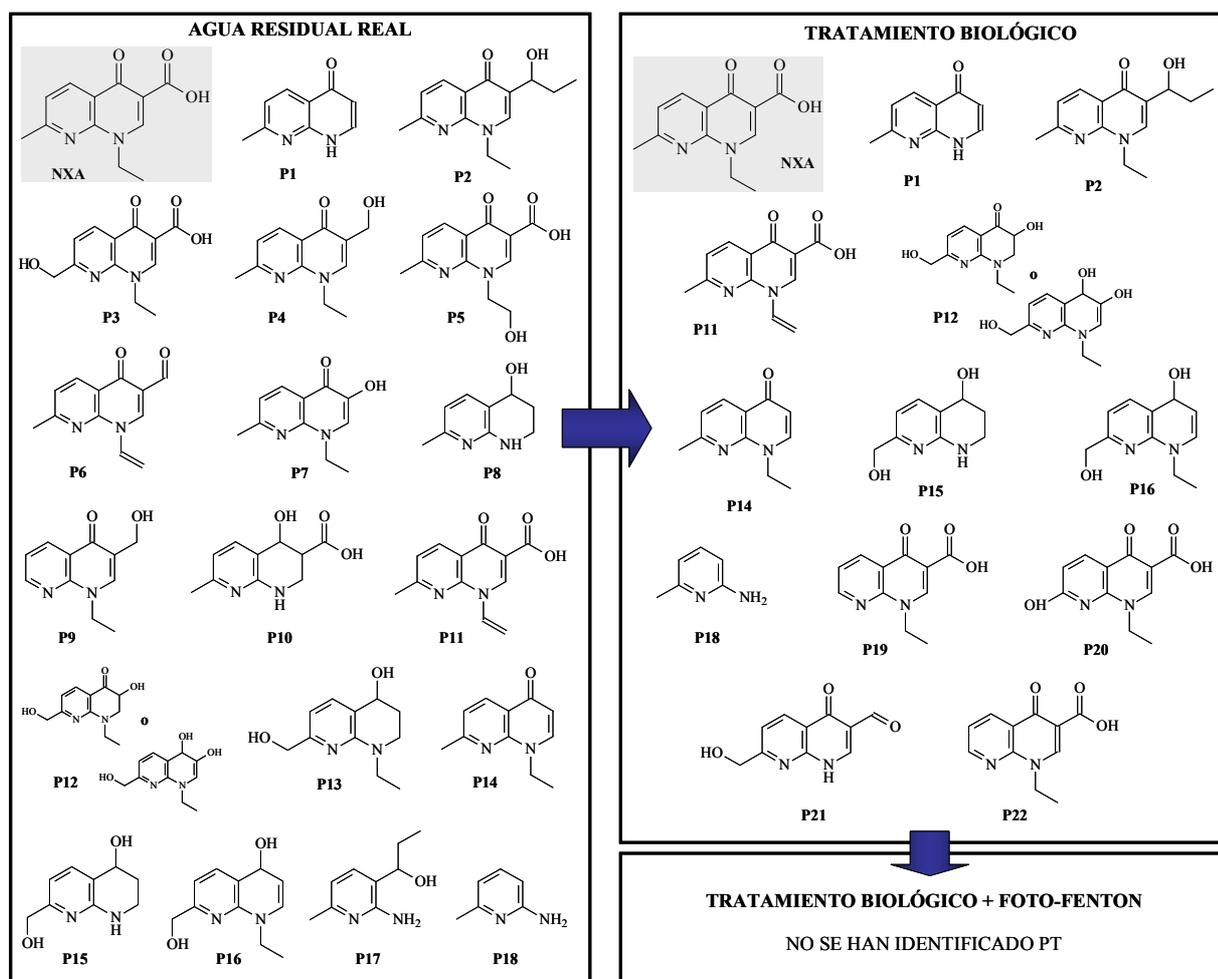


Figura 5.13 Estructuras químicas propuestas para los principales PT identificados por LC-TOF-MS para la combinación de procesos estudiada (biotratamiento+foto-Fenton).

El DOC residual medido al final del tratamiento combinado (biológico+foto-Fenton) podía atribuirse a la presencia de ácidos orgánicos característicos de las últimas etapas del proceso oxidativo.

En conclusión puede decirse que en ambas combinaciones entre procesos se ha observado una reducción total y/o muy significativa de los compuestos presentes inicialmente en el agua residual objeto de estudio y los PT generados a lo largo de cada proceso individual. Estos resultados, asociados a las determinaciones toxicológicas y de degradación del NXA y del COD, permiten considerar que ambos procesos son eficaces para el tratamiento de esta agua residual industrial, aunque hay que sopesar que el proceso que combina un biotratamiento inicial seguido por un tratamiento fotocatalítico solar representa la asociación más satisfactoria de estas tecnologías puesto que utiliza una tecnología ya consolidada que permite degradar la fracción orgánica biodegradable (biotratamiento) agregada a una tecnología emergente (fotocatálisis solar), la cual permite la total eliminación de los contaminantes orgánicos, con una disminución del uso de reactivos, tales como el H_2O_2 , y el tiempo de tratamiento, lo que llevaría a la reducción de los costes asociados al tratamiento.

Capítulo 6

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos planteados al principio de este trabajo y todos los aspectos discutidos en los capítulos anteriores, se proponen unas conclusiones finales generales y otras más específicas, que se describen a continuación.

6.1 Conclusiones Generales

La selección de los compuestos modelo utilizados en esta tesis esta respaldada por la presencia significativa de los mismos en el medio ambiente acuático debido a su amplio uso, tanto en la medicina humana como veterinaria, y por las limitaciones de los tratamientos convencionales comúnmente empleados para su eliminación.

El estudio del comportamiento medioambiental durante la transformación fotolítica de los contaminantes mediante la simulación de las condiciones reales de irradiación solar es fundamental para conocer el comportamiento y el impacto de los mismos en el medio ambiente. Además, de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de fotólisis de flumequina y trimetoprim, se observa la formación de una amplia gama de productos de transformación, los cuales en muchos casos son más persistentes y/o tóxicos que los compuestos de partida.

El empleo de nuevas tecnologías, como los procesos avanzados de oxidación (PAO), permite alcanzar la degradación de fármacos como flumequina, trimetoprim y ácido nalidíxico en las distintas matrices de agua estudiadas. La fotocatalisis solar con TiO_2 y, en especial el proceso foto-Fenton, han demostrado ser alternativas viables, ya que permiten la degradación del compuesto inicial y reducción del COD en tiempos de iluminación reducidos. Sin embargo, la eficacia de los PAO está directamente influenciada por la composición del agua en que se llevan a cabo tales procesos. Se ha comprobado que la presencia de sales, en especial de iones Cl^- que actúan como captadores de radicales $\bullet\text{OH}$, ralentiza la mineralización, si bien no afecta en igual medida a la degradación de los contaminantes, que son degradados por mecanismos alternativos en los que se ven involucradas otras especies oxidantes generadas durante el proceso.

La utilización de diversas herramientas analíticas como COD, HPLC-UV y cromatografía iónica, permite una evaluación global adecuada de los procesos fotolíticos y fotocatalíticos estudiados. A su vez, el empleo de técnicas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS) permite la identificación de una amplia gama de productos de transformación generados durante los procesos de estudiados. La información proporcionada por la técnica de LC-TOF-MS (medidas de masa exacta, composición elemental, fragmentación en la fuente) la convierte en una herramienta valiosa para la identificación de compuestos desconocidos.

La realización de bioensayos de toxicidad demostró ser un análisis complementario muy importante tanto para los estudios de fotólisis como de fotocatalisis y biodegradación, toda vez que permite conocer la evolución de la toxicidad de los productos de transformación generados aunque no se conozcan éstos en detalle.

En el caso de aguas residuales reales es muy importante realizar ensayos de biodegradabilidad, tales como el de Zahn-Wellens, con el fin de conocer fiablemente la respuesta de un tratamiento biológico ante un vertido industrial o para diseñar adecuadamente un tratamiento mediante foto-Fenton.

El tratamiento biológico llevado a cabo en un reactor de lecho fijo (IBR) colonizado con fangos activos representa ventajas adicionales a los tratamientos biológicos convencionales ya que permite la reducción del volumen del reactor gracias al empleo de un soporte que proporciona una superficie específica elevada. A ello se une la sencillez de operación y control de este tipo de reactores y el hecho de que estos sistemas mejoran la eficiencia

global del proceso por una mayor especialización de la biomasa. Además hay que destacar la facilidad con la que estos sistemas se adaptan a influentes de composición variable.

6.2 Conclusiones Específicas

6.2.1 Fotólisis directa de la flumequina y del trimetoprim

La **flumequina** presenta una elevada estabilidad en medio salino (tiempos de vida media superiores a 900 minutos) cuando es sometida a procesos de fotólisis directa. Durante el proceso se observa una escasa mineralización, lo que evidencia la formación de productos de transformación altamente estables. Los análisis mediante LC-TOF-MS permitieron la identificación de 21 posibles fotoproductos. La transformación de flumequina se inicia con la apertura del anillo heterocíclico por oxidación del doble enlace. La pérdida del átomo de fluor y la hidroxilación del anillo aromático también aparecen como mayoritarias, en especial en los primeros estadios del proceso. Los ensayos de toxicidad demostraron que la flumequina y sus fotoproductos presentan una toxicidad moderada frente a dos organismos de distintos niveles tróficos (*Vibrio fischeri* y *Daphnia magna*).

El **trimetoprim** sufre una lenta degradación mediante fotólisis directa, tanto en agua desmineralizada como en agua de mar simulada, si bien la velocidad de degradación se ve incrementada por la formación de un intermedio fotorreactivo, identificado como trimetoxibenzoilpirimidina, que producía un efecto autocatalítico, actuando como un fotosensibilizador, e induciendo la degradación del trimetoprim mediante un mecanismo que involucra la acción de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). En total, durante los ensayos de fotodegradación se pudieron identificar un total de 33 productos de transformación, lo que da idea de la complejidad del proceso. Tanto el trimetoprim como sus productos de transformación no produjeron efectos tóxicos apreciables frente a la bacteria *Vibrio fischeri*.

6.2.2 Fotocatálisis solar del trimetoprim, flumequina y ácido nalidíxico

La fotocatálisis solar con TiO_2 ha demostrado ser capaz de degradar concentraciones elevadas de trimetoprim (20 mg L^{-1}) en aguas de distinta composición (agua desmineralizada y agua de mar simulada), si bien se ha evidenciado que la presencia de sales, en especial de iones Cl^- afecta a la velocidad de degradación de este contaminante, y especialmente a la tasa de mineralización, ya que los radicales hidroxilo generados son capturados por los iones cloruro presentes en la solución. Durante el proceso fotocatalítico se forman un gran número de intermedios. No se observaron diferencias en los mecanismos o rutas de degradación en las diferentes matrices ensayadas, si bien la eliminación de los

productos de transformación generados requiere mayor tiempo de tratamiento en aguas salinas.

La flumequina fue degradada con éxito por los procesos fotocatalíticos solares estudiados (fotocatálisis con TiO_2 y foto-Fenton), con un alto grado de mineralización de este contaminante en tiempos de iluminación inferiores a los 100 minutos. Los parámetros cinéticos obtenidos demostraron que ambos procesos degradaron la flumequina con velocidad similar. El análisis de los productos de transformación realizado mediante LC-TOF-MS permitió identificar un total de 15 compuestos. Así, se ha podido proponer una ruta de degradación para la flumequina durante el proceso de fotocatalisis con TiO_2 , que transcurría principalmente a través de la apertura de la estructura de la flumequina por oxidación del doble enlace en posición $\text{C}(2)=\text{C}(3)$. El seguimiento de la toxicidad de los intermedios generados durante ambos procesos fotocatalíticos evidencia que éstos presentan una toxicidad más baja que el compuesto de partida.

La degradación fotocatalítica solar del **ácido nalidíxico** presentó eficacias distintas para cada uno de los procesos estudiados. La fotocatalisis con TiO_2 demostró valores reducidos de degradación y mineralización, en comparación con el proceso foto-Fenton. Por otra parte, el tiempo corto del tratamiento requerido, empleando condiciones suaves de tratamiento en relación a los reactivos (2 mg L^{-1} de Fe^{2+} y baja concentración de H_2O_2), permite considerar al proceso foto-Fenton como una alternativa viable para degradar ácido nalidíxico. El estudio de la degradación del ácido nalidíxico mediante foto-Fenton para agua desmineralizada, agua con elevado contenido en sales y un agua residual industrial simulada dio resultados similares. Asimismo, el consumo de H_2O_2 , necesario para alcanzar la total degradación del ácido nalidíxico fue muy similar en los tres casos. Este efecto se puede justificar por la presencia, en altas concentraciones, de Cl^- y Cl_2^- , que son fuertes oxidantes y podrían fácilmente oxidar el ácido nalidíxico. Sin embargo, la reducción del COD fue ralentizada en las matrices de agua que contenían sales en su composición.

Las determinaciones por LC-TOF-MS identificaron 18 PT en agua con alto contenido en sales y 24 PT en un efluente industrial simulado. La composición de la matriz no afecta substancialmente al tipo de compuestos identificados, sino que afectó a su abundancia relativa durante el proceso. Además, los experimentos en agua con alto contenido en sales revelaron la formación de subproductos con cloro durante el tratamiento, aunque sólo se ha determinado un PT clorado con una abundancia poco significativa y que era finalmente degradado. Tal hecho evidenció que el ácido nalidíxico no era especialmente susceptible a reacciones que llevaban a la formación de PT clorados, si bien éstos pueden formarse. Así, la identificación y el análisis de los PT generados durante el proceso foto-Fenton es

fundamental para ampliar la comprensión de los mecanismos que gobiernan los procesos de degradación y, con estos resultados, alcanzar una optimización viable de los tratamientos garantizando la calidad del agua tratada. Las técnicas de LC-MS usando analizadores de masa exacta, representan el mejor acercamiento para conseguir estos propósitos.

6.2.3 Estudio de procesos combinados de fotocátalisis solar y tratamiento biológico

Se ha demostrado que un agua residual industrial con una elevada toxicidad inicial, una biodegradabilidad aceptable pero conteniendo un compuesto biorrecalcitrante, el ácido nalidíxico, puede ser tratada con éxito mediante foto-Fenton. Sin embargo, solo después de un largo tratamiento con un elevado consumo de peróxido de hidrógeno.

Durante los experimentos de foto-Fenton, los ensayos de Zahn-Wellens demostraron que aumentó la biodegradabilidad del agua residual y por tanto parecía viable una combinación foto-Fenton/biológico. Esto se ha demostrado en planta piloto, mediante un pretratamiento de foto-Fenton solo hasta alcanzar la biodegradabilidad adecuada y un posterior tratamiento biológico aerobio hasta alcanzar condiciones idóneas de vertido (bajo COD y baja toxicidad). La eficacia global de la combinación fue del 95% de eliminación del COD inicial (33% mediante foto-Fenton solar y 62% mediante tratamiento biológico).

Los análisis mediante LC-TOF-MS durante el proceso foto-Fenton revelaron la presencia de compuestos que ya habían sido identificados previamente en los estudios de degradación del NXA realizados en distintas aguas modelo. Una vez finalizado el tratamiento con foto-Fenton, en el momento en el que ya no se detectaba presencia de NXA en la disolución, se han identificado cinco PT presentes a mayor concentración. Al final del tratamiento biológico, los resultados obtenidos evidenciaran que estos PT procedentes de foto-Fenton eran resistentes al biotratamiento. Por tanto, la combinación de tratamientos propuesta eliminaba el NXA pero no garantizaba la ausencia de PT en el efluente final.

La otra alternativa, basada en la biodegradabilidad aceptable del agua residual industrial, fue la combinación biológico/foto-Fenton. Los resultados obtenidos en planta piloto demostraron que el 98% del COD inicial era eliminado. El 96% fue logrado por el tratamiento biológico y el 2% por el proceso foto-Fenton. En este caso, el ácido nalidíxico permanecía inalterado durante el tratamiento biológico pero era rápidamente degradado mediante foto-Fenton (25 minutos de tiempo de iluminación) y con un bajo consumo de H₂O₂ (12 mM). Además los bioensayos de toxicidad, tanto para *Vibrio fischeri* como para *Daphnia magna*, indicaron que la toxicidad se reducía drásticamente.

A su vez, en este caso, los análisis mediante LC-TOF-MS evidenciaron que, después del biotratamiento, el NXA y parte de los compuestos originalmente presentes en el agua aun persistían, pero éstos podían ser completamente degradados después del tratamiento con foto-Fenton. Por tanto, la combinación de tratamientos biológico/foto-Fenton resultó ser más eficaz en la depuración de las aguas tratadas.

REFERENCIAS

- Abellán M.N., Giménez J., Esplugas S. Photocatalytic degradation of antibiotics: The case of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Catalysis Today*, 144 (2009) 131–136.
- Agüera A., Perez Estrada L.A., Ferrer I., Thurman E.M., Malato S., Fernandez-Alba A.R. Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight. *Journal of Mass Spectrometry*, 40 (2005) 908-915.
- Alaton I.A., Dogruel S., Baykal E., Gerone G. Combined chemical and biological oxidation of penicillin formulation effluent. *Journal Environment Manage* 73 (2004) 155–163.
- Alegría A.E., Ferrer A., Santiago G., Sepúlveda E., Flores W. Photochemistry of water-soluble quinones. Production of the hydroxyl radical, singlet oxygen and the superoxide ion. *Journal of Photochemical & Photobiology A* 127 (1999) 57–65.
- Alexander M. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, New York, 1994.
- Amat A.M., Arques A., García-Ripoll A., Santos-Juanes L., Vicente R., Oller I., Maldonado M.I., Malato S. A reliable monitoring of the biocompatibility of an effluent along an oxidative pre-treatment by sequential bioassays and chemical analyses. *Water Research*, 43 (2009) 784-792.
- Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50 (2003) 1319-1330.
- Antignac J.P., Wasch K.D., Monteau F., Brabander H.D., Andre F., Bizec B.L. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its

- consequences in the field of residue analysis. *Analytical Chimica Acta*, 529 (2005) 129-136.
- APHA, *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA), 20th ed., WPCF, New York, 1998.
- Arslan-Alaton I., Dogruel S., Baykal E., Gerone G. Combined chemical and biological oxidation of penicillin formulation effluent. *Journal of Environmental Management*, 73 (2004) 155–163.
- Augugliaro V., Litter M., Palmisano L., Soria J. The combination of heterogeneous photocatalysis with chemical and physical operations: A tool for improving the photo process performance. *Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 7 (2007) 123-144.
- Backhaus T., Scholze M., Grimme L.H. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic Toxicology* 49 (2000) 49-61.
- Badawy M.I., Wahaab R.A., El-Kalliny A.S. Fenton-biological treatment processes for the removal of some pharmaceuticals from industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 167 (2009) 567–574.
- Bahnemann D. Photocatalytic water treatment: solar energy applications. *Solar Energy*, 77 (2004) 445-459.
- Barb W.G., Baxendale J.H., George P., Hargrave K.R. Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. *Nature*, 163 (1949) 692-694.
- Barb W.G., Baxendale J.H., George P., Hargrave K.R. Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Part I. – The ferrous ion reaction. *Transactions of the Faraday Society*, 47 (1951a) 462-500.
- Barb W.G., Baxendale J.H., George P., Hargrave K.R. Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Part II. – The ferric ion reaction. *Transactions of the Faraday Society*, 47 (1951b) 591-616.
- Barber M., Bardoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A.H. Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7 (1981) 325-327.
- Barceló, D. Emerging pollutants in water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) xiv-xvi.
- Bartels P. y von Tümpling Jr. W. Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters. *Science of the Total Environment*, 374 (2007) 143–155.
- Bartelt-Hunt S.L., Snow D.D., Damon T., Shockley J., Hoagland K. The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environmental Pollution*, 157 (2009) 786-791.

- Batt A.L., Bruce I.B., Aga D.S. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharge. *Environmental Pollution* 142 (2006) 295-302.
- Batt A.L., Kim S., Aga D.A. Comparison of the occurrence of antibiotics in four fullscale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere* 68 (2007) 428-435.
- Bautitz I.R. y Nogueira R.F.P. Degradation of tetracycline by photo-Fenton process – Solar irradiation and matrix effects. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 187 (2007) 33–39.
- Beekman G.B. Gerenciamento Integrado de Recursos Hídricos, Instituto Interamericano de Cooperación para a Agricultura-IIICA, Agência de Cooperação Técnica do Brasil, Brasília, 1997.
- Ben W., Qiang Z., Pan X., Chen M. Removal of veterinary antibiotics from sequencing batch reactor (SBR) pretreated swine wastewater by Fenton's reagent. *Water Research*, 43 (2009) 4392–4402.
- Bergh J.J., Breytenbach J.C., Wessels P.L. Degradation of trimethoprim. *Journal of Pharmaceuticals Science* 78 (1989) 348–350.
- Berto J., Rothenbach G.C., Barreiros M.A.B., Corrêa A.X.R., Peluso-Silva S., Radetski C.M. Physico-chemical, microbiological and ecotoxicological evaluation of a septic tank/Fenton reaction combination for the treatment of hospital wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (2009) 1076–1081.
- Bird R.E., Hulstrom R.L., Lewis L.J. Terrestrial solar spectral data sets. *Solar Energy* 30 (1983) 563-573.
- Blanco J. (2002). Desarrollo de colectores solares sin concentración para aplicaciones fotoquímicas de degradación de contaminantes persistentes en agua. Tesis Doctoral. Universidad de Almería.
- Blanco J., Malato S., Fernández P., Vidal A., Morales A., Trincado P., Oliveira J.C., Minero C., Musci M., Casalle C., Brunotte M., Tratzky S., Dischinger N., Funken K-H., Sattler C., Vincent M., Collares-Pereira M., Mendes J.F., Rangel C.M. Compound parabolic concentrator technology development to commercial solar detoxification applications. *Solar Energy*, 67(2000) 317-330.
- Blanco J., Malato S., Fernández-Ibañez P., Alarcón D., Gernjak W., Maldonado M.I. Review of feasible solar energy applications to water processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13 (2009) 1437–1445.
- Blanco-Galvez J., Fernández-Ibañez P., Malato-Rodríguez S. Solar Photocatalytic Detoxification and Disinfection of Water: Recent overview. *Journal Solar Energy Engineering*, 129 (2007) 4-15.

- Blanco-Galvez J., Malato-Rodríguez S., Estrada-Gasca C.A., Bandala E.R., Gelover S., Leal, T. *in* Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea, Capítulo 3: Purificación de aguas por fotocatálisis heterogénea: estado del arte, 2001.
- Boreen A.L., Arnold W.A., McNeill K. Photochemical Fate of Sulfa Drugs in the Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups. *Environmental Science & Technology*, 38 (2004) 3933-3940.
- Boreen A.L., Arnold W.A., McNeill K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *Aquatic Science*, 65 (2003) 320-341.
- Boreen A.L., Arnold W.A., McNeill K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *Aquat. Sci.* 65 (2003) 320–341.
- Boreen A.L., Arnold W.A., McNeill K. Triplet-Sensitized Photodegradation of Sulfa Drugs Containing Six-Membered Heterocyclic Groups: Identification of an SO₂ Extrusion Photoproduct. *Environmental Science & Technology*, 39 (2005) 3630-3638.
- Borja A. The European water framework directive: A challenge for nearshore, coastal and continental shelf research. *Continental Shelf Research* 25 (2005) 1768–1783.
- Boyd G.R., Palmerib J.M., Zhang S., Grimm D.A. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Science of the Total Environment*, 333 (2004) 137-148.
- Braun A.M., Maurette M-T., Oliveros E. (1991) *Photochemical Technology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Brown R.F., Jamison S.E., Pandit U.K., Pinkus J., White G.R., Braendlin H.P. The reaction of Fenton's reagent with phenoxyacetic acid and some halogensubstituted phenoxyacetic acids. *Journal of Organic Chemistry*, 29 (1964) 146-153.
- Bruins A.P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794 (1998) 345-357.
- Bryskier A. y Chantot J. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs*, 49 (1995) 16-28.
- Bueno M.J.M., Agüera A., Gómez M.J., Hernando M.D., García J.F., Fernández-Alba A.R. Application of Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 9372-9384.
- Burhenne J., Ludwig M., Spittler M. Polar photodegradation products of quinilones determined by HPLC/MS/MS, *Chemosphere* 38 (1999) 1279–1286.
- Buth J.M., Arnold W.A., McNeill K. Unexpected Products and Reaction Mechanisms of the Aqueous Chlorination of Cimetidine. *Environmental Science & Technology*, 41 (2007) 6228-6233.

- Cabanillas A.G., Cáceres M.I.R., Cañas M.A.M., Burguillos J.M.O., Díaz T.G. Square wave adsorptive stripping voltametric determination of the mixture of NXA and its main metabolite (7-hydroxymethyl nalidixic acid) by multivariate methods and artificial neural network. *Talanta* 72 (2007) 932–940.
- Calza P., Medana C., Carbone F., Giancotti V., Baiocchi C. Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by HPLC/high resolution multiple-stage mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 22 (2008) 1533-1553.
- Calza P., Sakkas V.A., Medana C., Baiocchi C., Dimou A., Pelizzetti E., Albanis T. Photocatalytic degradation study of diclofenac over aqueous TiO₂ suspensions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 67 (2006) 197–205.
- Calza P., Sakkas V.A., Villioti A., Massolino C., Boti C., Pelizzetti E., Albanis T. Multivariate experimental design for the photocatalytic degradation of imipramine. Determination of the reaction pathway and identification of intermediate products. *Applied Catalysis B: Environmental*, 84 (2008) 379–388.
- Canonica S., Jans U., Stemmler K., Hoigné J. Transformation kinetics of phenols in water: photosensitization by dissolved natural organic material and aromatic ketones. *Environmental Science & Technology* 29 (1995) 1822–1831.
- Caprioli R.M. Continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 477A-485A.
- Carey J.H., Lawrence J., Tosine H.M. Photodechlorination of PCB's in the presence of titanium dioxide in aqueous suspensions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 16 (1976) 697-701.
- Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli R., Zuccato E. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1092 (2005) 206-215.
- Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., Pomati F., Calamari D., Zuccato E. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science & Technology* 40 (2006) 357-363.
- Chen H-C., Wang P-L., Ding W-H. Using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry to determine pharmaceutical residues in Taiwanese rivers and wastewaters. *Chemosphere*, 72 (2008) 863-869.
- Chen Y., Hu C., Qu J., Yang M. Photodegradation of tetracycline and formation of reactive oxygen species in aqueous tetracycline solution under simulated sunlight irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 197 (2008) 81–87.

- Chiron S., Minero C., Vione D. Photodegradation Processes of the Antiepileptic Drug Carbamazepine, Relevant To Estuarine Waters, *Environmental Science & Technology* 40 (2006), 5977 -5983.
- Coelho A.D., Sans C., Agüera A., Gómez M.J., Esplugas S., Dezotti M. Effects of ozone pre-treatment on diclofenac: Intermediates, biodegradability and toxicity assessment. *Science of the Total Environment*, 407 (2009) 3572–3578.
- Comisión Europea, Implementación de la Directiva 91/27/EEC del 21 de mayo de 1991 con respecto al tratamiento de las aguas residuales urbanas, enmendada por la Directiva 98/15/EC del 27 de febrero de 1998, Comisión de las Comunidades Europeas, Bruselas, 2004.
- Comninellis C., Kapalka A., Malato S., Parsons S.A., Poulios I., Mantzavinos D. Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83 (2008) 769–776.
- Convenio de Estocolmo, 2001. http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_sp.pdf (accedido en 2010).
- Cuisinaud G., Ferry N., Seccia M., Bernard N., Sassard J. Determination of NXA and its major metabolites in human plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal Chromatography* 181 (1980) 399–406.
- Daughton C.G. y Ternes T.A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the environment: Agentes of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 107 (1999) 907-938.
- De Laat J. y Le Truong G. Effects of chloride ions on the iron(III)-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide and on the efficiency of the Fenton-like oxidation process. *Applied Catalysis B: Environment*, 66 (2006) 137-146.
- Directive 2000/60/CE of the European Parliament and the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy. OJ L 327 of 22/12/2000.
- Directive 2008/105/EC of the European Parliament and the Council establishing on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC. Official Journal L 348, 24/12/2008.
- Directive 2455/2001/CE, of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. Official Journal L 331, 15/12/2001.
- Doll T.E. y Frimmel F.H. Fate of pharmaceuticals – photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere*, 52 (2003) 1757-1769.
- Doll T.E. y Frimmel F.H. Kinetic study of photocatalytic degradation of carbamazepine, clofibric acid, iomeprol and iopromide assisted by different TiO₂ materials–determination of intermediates and reaction pathways. *Water Research*, 38 (2004) 955–964.

- Doll T.E. y Frimmel F.H. Photocatalytic degradation of carbamazepine, clofibric acid and iomeprol with P25 and Hombikat UV100 in the presence of natural organic matter (NOM) and other organic water constituents. *Water Research*, 39 (2005) 403–411.
- Eichhorn P. y Aga D.S. Identification of a Photooxygenation Product of Chlortetracycline in Hog Lagoons Using LC/ESI-Ion Trap-MS and LC/ESI-Time-of-Flight-MS. *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 6002-6011.
- Eichhorn P., Ferguson P.L., Pérez S., Aga D.S. Application of Ion Trap-MS with H/D Exchange and QqTOF-MS in the Identification of Microbial Degradates of Trimethoprim in Nitrifying Activated Sludge. *Analytical Chemistry* 77 (2005) 4176–4184.
- Eichhorn P., Ferguson P.L., Pérez S., Aga D.S. Application of Ion Trap-MS with H/D Exchange and QqTOF-MS in the Identification of Microbial Degradates of Trimethoprim in Nitrifying Activated Sludge. *Analytical Chemistry* 77 (2005) 4176–4184.
- Elmolla E.S. y Chaudhuri M. Degradation of the antibiotics amoxicillin, ampicillin and cloxacillin in aqueous solution by the photo-Fenton process. *Journal of Hazardous Materials*, 172 (2009) 1476–1481.
- Esplugas S. y Ollis D.F. Economic Aspects of Integrated (Chemical + Biological) Processes for Water Treatment. *Journal of Advanced Oxidation Technology*, 2 (1997) 197-202.
- Esplugas S., Bila D.M., Krause L.G.T., Dezotti M. Ozonation and advanced oxidation Technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal Hazardous Materials* 149 (2007) 631-642.
- Farré M. y Barceló D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 299-310.
- Farré M., Ferrer I., Ginebreda A., Figueras M., Olivella L., Tirepu L., Vilanova M., Barceló D. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A*, 938 (2001) 187-197.
- Farré M., Pérez S., Kantiani L., Barceló D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 991-1007.
- Fasani E., Profumo A., Albini A. Structure and Medium-Dependent Photodecomposition of Fluoroquinolone Antibiotics, *Photochemistry and Photobiology* 68 (1998) 666–674.
- Fatta D., Achilleos A., Nikolaou A., Meriç S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 515-533.
- Feng X., Tu J., Ding S., Wu F., Deng N. Photodegradation of 17 β -estradiol in water by UV-vis/Fe(III)/H₂O₂ system. *Journal of Hazardous Materials*, B127 (2005) 129-133.

- Fenn J.B., Whitehouse C.M., Dreyer R.N., Yamashita M. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 675-679.
- Fenton H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of Chemical Society*, 65 (1984) 899-910.
- Fernández C., González-Doncel M., Pro J., Carbonell G., Tarazona J.V. Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jarama-tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. *Science of The Total Environment*, 408 (2010) 543-551.
- Fernández E. y Cárdenas A.M. The mechanism of photohaemolysis by photoproducts of NXA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 4 (1990) 329–333.
- Fernández-Alba A.R., García P.L., García R.R., Valiño M.D., Fernández S.V., García J.M.S. Informe de Vigilancia Tecnológica, VT2, Tratamientos Avanzados de Aguas Industriales, Madrid, 2009.
- Fernández-Alba A.R., Hernando D., Agüera A., Cáceres J., Malato S. Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. *Water Research*, 36 (2002) 4255–4262.
- Fujishima A., Rao T.N., Tryk D.A. Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 1 (2000) 1-21.
- Gallard H., De Laat J., Legube B. Influence du pH sur la vitesse d'oxydation de composés organiques par Fel/ H_2O_2 . *Mechanismes réactionnels et modelization New Journal of Chemistry* (1998) 263-268.
- Gan D., Jia M., Vaughan P.P., Falvey D.E., Blough N.V. Aqueous photochemistry of methylbenzoquinone. *Journal of Physical Chemistry A* 112 (2008) 2803–2812.
- García-Montaño J., Torrades F., Pérez-Estrada L.A., Oller I., Malato S., Maldonado M.I., Peral J. Degradation Pathways of the Commercial Reactive Azo Dye Procion Red H-E7B under Solar-Assisted Photo-Fenton Reaction. *Environmental Science & Technology* 42 (2008) 6663–6670.
- García-Reyes J.F., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A.R. Identification of Pesticide Transformation Products in Food by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry via “Fragmentation–Degradation” Relationships. *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 307-321.
- Gebhardt W. y Schröder H.F. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *Journal of Chromatography A*, 1160 (2007) 34–43.
- Gernjak W., Krutzler T., Malato S., Bauer R., Photo-Fenton treatment of olive mill wastewater applying a combined Fenton/flocculation pretreatment. *Journal of Solar Energy Engineering* 129 (2007) 53–59.

- Göbel A., McArdell C.S., Joss A., Siegrist H., Giger W. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of The Total Environment* 372 (2007) 361-371.
- Gogate P.R. y Pandit A.B. A review of comparative technologies for wastewater treatment. I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, 8 (2004a) 501-551.
- Gogate P.R. y Pandit A.B. A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Advances in Environmental Research*, 8 (2004b) 553–597.
- Gómez M.J., Bueno M.J.M., Lacorte S., Fernández-Alba A.R., Agüera A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66 (2007) 993-1002.
- Gómez M.J., Gómez-Ramos M.M., Agüera A., Mezcua M., Herrera S., Fernández-Alba A.R. A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4071-4082.
- Gómez M.J., Sirtori C., Mezcua M., Fernández-Alba A.R., Agüera A. Photodegradation study of three dipyrone metabolites in various water systems: Identification and toxicity of their photodegradation products. *Water Research*, 42 (2008) 2698–2706.
- Gómez M.J.R. (2008). Determinación de Contaminantes Orgánicos en Aguas Residuales y Evaluación de su Impacto Ambiental. Tesis Doctoral. Universidad de Almería.
- Gonçalves A.M.M., Castro B.B., Pardal M.A., Gonçalves F. Salinity effects on survival and life history of two freshwater cladocerans (*Daphnia magna* and *Daphnia longispina*) *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 43 (2007) 13-20.
- González O., Sans C., Esplugas S. Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton. Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. *Journal of Hazardous Materials* 146 (2007) 459–464.
- González O., Esplugas M., Sans C., Torres A., Esplugas S. Performance of a Sequencing Batch Biofilm Reactor for the treatment of pre-oxidized Sulfamethoxazole solutions. *Water Research*, 43 (2009) 2149–2158.
- Goswami, D.Y. Engineering of solar Photocatalytic Detoxification and Disinfection Processes. *Advances in Solar Energy*. K.W. Böer (ed.) American Solar Energy Society 165-209, (1995).
- Gros M., Petrovic M., Barceló D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, 70 (2006) 678-690.
- Gulin D.J., Sirtori C., Agüera A., Malato S., Haiduke R.L.A., de Sá E.L. Estrutura Eletrônica e Reatividade da Flumequina *in* XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica. 2007.

- Gutiérrez M., Etxebarria J., de las Fuentes L. Evaluation of wastewater toxicity: comparative study between Microtox® and activated sludge oxygen uptake inhibition. *Water Research* 36 (2002) 919–924.
- Haberl R., Urban W., Gehringer P., Szinovatz, W. Treatment of Pulp-Bleaching effluents by activated sludge. Precipitation. Ozonation and Irradiation. *Water Science & Technology*, 29 (1991) 229-239.
- Hapeshi E., Achilleos A., Vasquez M.I., Michael C., Xekoukoulotakis N.P., Mantzavinos D., Kassinos D. Drugs degrading photo catalytically: kinetics and mechanisms of ofloxacin and atenolol removal on titania suspensions. *Water Research*, 44 (2010) 1737-1746.
- Haque M.M. y Muneer M. Photodegradation of norfloxacin in aqueous suspensions of titanium dioxide. *Journal of Hazardous Materials*, 145 (2007) 51–57.
- Hayen H. y Karst U. Strategies for the liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of non-polar compounds. *Journal Chromatography A*, 1000 (2003) 549-565.
- Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131 (2002) 5–17.
- Heberer T., Fuhrmann B., Schmidt-Baumler, Tsipi D., Koutsouba V., Hiskia A. Occurrence of pharmaceuticals residues in sewage, river, ground and drinking water in Greece and Berlin (Germany) *in* *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment*. Edited by Daughton C.G and Jones-Lepp T.L. ACS symposium series (2001) 791. Chapter 4.
- Hernández-Ortega M., Ponziak T., Barrera-Díaz C., Rodrigo M.A., Roa-Morales G., Bilyeu B. Use of a combined electrocoagulation–ozone process as a pre-treatment for industrial wastewater. *Desalination*, 250 (2010) 144–149.
- Hernando M.D., De Vettori S., Martínez-Bueno M.J., Fernández-Alba A.R. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere* 68 (2007) 724–730.
- Hernando M.D., Fernández-Alba A.R., Tauler R., Barceló D. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65 (2005) 358–366.
- Hernando M.D., Gómez M.J., Agüera A., Fernández-Alba A.R. LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 581-594.
- Herrmann J.M. Heterogeneous photocatalysis: state of the art and present applications. *Topics in Catalysis*, 14 (2005) 48-65.
- Herrmann J-M. Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catalysis Today*, 53 (1999) 115–129.
- Hodson P.V. A comparison of the acute toxicity of chemicals to fish, rats and mice. *Journal of Applied Toxicology*, 5 (1985) 220-226.

- Hogenboom A.C., van Leerdam J.A., de Voogt P. Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography–hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 510-519.
- Hora Machado A.E. da, Xavier T.P., de Souza D.R., de Miranda J.A., Duarte E.T.F.M., Ruggiero R., Oliveira L. de, Sattler C. Solar photo-Fenton treatment of chipboard production wastewater. *Solar Energy* 77 (2004) 583–589.
- Hua L., Flanders P.M., Miller P.L., Strathmann T.J. Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents by TiO₂ photocatalysis. *Water Research*, 41 (2007) 2612–2626.
- Jeffrey S. y Christian, MD. The quinolone antibiotics. *Infectious Diseases Update*, 3 (1996) 87-92.
- Jones O.A.H., Voulvoulis N., Lester J.N. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Environmental Technology* 22 (2001) 1383–1394.
- Joss A., Keller E., Alder A.C., Göbel A., McArdell C.S., Ternes T.A., Siegrist H. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research* 39 (2005) 3139–3152.
- Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffmann B., Löffler D., McArdell C.S., Ternes T.A., Thomsen A., Siegrist H. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water Research* 40 (2006) 1686–1696.
- Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research* 42 (2008) 3498-3518.
- Khandal R.K., Thoisy-Dur J.-C., Terce M. Adsorption characteristics of flumequine on kaolinitic clay. *Geoderma*, 50 (1991) 95-107.
- Kim S.D., Cho J., Kim I.S., Vanderford B.J., Snyder S.A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking and waste waters. *Water Research*, 41 (2007) 1013-1021.
- Kiwi J., Lopez A., Nadtochenko V. Mechanism and Kinetics of the OH-Radical Intervention during Fenton Oxidation in the Presence of a Significant Amount of Radical Scavenger (Cl⁻). *Environmental Science & Technology*, 34 (2000) 2162-2168.
- Klamerth N., Malato S., Maldonado M.I., Agüera A., Fernández-Alba A.R. Application of photo-Fenton as a tertiary treatment of emerging contaminants in municipal wastewater. *Environmental Science & Technology*, 44 (2010b) 1792–1798.
- Klamerth N., Miranda N., Malato S., Agüera A., Fernández-Alba A.R., Maldonado M.I., Coronado J.M. Degradation of emerging contaminants at low concentrations in MWTPs effluents with mild solar photo-Fenton and TiO₂. *Catalysis Today*, 144 (2009) 124–130.

- Klamerth N., Rizzo L., Malato S., Maldonado M.I., Agüera A., Fernández-Alba A.R. Degradation of fifteen emerging contaminants at μL^{-1} initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluents. *Water Research*, 44 (2010) 545-554.
- Klavarioti M., Mantsavinos D., Kassinos D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ Int* 35 (2009) 402–417.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. Pharmaceuticals, Hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36 (2002) 1202-1211.
- Kosjek T., Heath E., Bajt O., Bavcon M., Cernigoj U., Trebse P., Kompare B. *in* M. Bavcon, P. Trebs (Editors), *Photodegradation of Pharmaceuticals and Determination of their Degradation Products*, 15th Int. Symp. Spectrosc. Theory Practice, Nova Gorica, Slovenia, 2007.
- Kosjek T., Heath E., Pérez S., Petrović M., Barceló D. Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole – time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Hydrology*, 372 (2009) 109-117.
- Kosjek T., Žigon D., Kralj B., Heath E. The use of quadrupole-time-of-flight mass spectrometer for the elucidation of diclofenac biotransformation products in wastewater. *Journal of Chromatography A*, 1215 (2008) 57-63.
- Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75 (2009a) 417–434.
- Kümmerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management* 90 (2009c) 2354-2366.
- Kümmerer. K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere* 75 (2009b) 435-441.
- Kusari S., Prabhakaran D., Lamshöft M., Spiteller M. *In vitro* residual anti-bacterial activity of difloxacin, sarafloxacin and their photoproducts after photolysis in water. *Environmental Pollution*, 157 (2009) 2722–2730.
- Kuster M., López de Alda M.J., Hernando M.D., Petrovic M., Martín-Alonso J., Barceló D. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*, 358 (2008) 112-123.
- Lacey C., McMahon G., Bones J., Barron L., Morrissey A., Tobin J.M. An LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta*, 75 (2008) 1089-1097.

- Lalumera G.M., Calmari D., Galli P., Castiglioni S., Crosa G., Fanelli R. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* 54 (2004) 661-668.
- Lambropoulou D.A., Hernando M.D., Konstantinou I.K., Thurman E.M., Ferrer I., Albanis T.A., Fernández-Alba A.R. Identification of photocatalytic degradation products of bezafibrate in TiO₂ aqueous suspensions by liquid and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1183 (2008) 38–48.
- Lapertot M. y Pulgarin C. Biodegradability assessment of several priority hazardous substances: choice, application and relevance regarding toxicity and bacterial activity. *Chemosphere* 65 (2006) 682–690.
- Lapertot M., Ebrahimi S., Oller I., Maldonado M.I., Gernjak W., Malato S., Pulgarin C. Evaluating Microtox® as a tool for biodegradability assessment of partially treated solutions of pesticides using Fe³⁺ and TiO₂ solar photo-assisted processes. *Ecotoxicology Environment Safety* 69 (2008) 546-555.
- Lapertot M., Ebrahimi S., Oller I., Maldonado M.I., Gernjak W., Malato S., Pulgarin C. Evaluating Microtox as a tool for biodegradability assessment of partially treated solutions of pesticides using Fe³⁺ and TiO₂ solar photo-assisted processes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69 (2008) 546–555.
- Le Truong G., De Laat J., Legube B. Effects of chloride and sulfate on the rate of oxidation of ferrous ion by H₂O₂. *Water Research*, 38 (2004) 2384-2394.
- Leech D.M., Snyder M.T., Wetzel R.G. Natural organic matter and sunlight accelerate the degradation of 17β-estradiol in water. *Science of the Total Environment*, 407 (2009) 2087–2092.
- Legrini O., Oliveros E., Braun A.M. Photochemical processes for water-treatment. *Chemistry Review*, 93 (1993) 671-698.
- Libro Blanco del Agua en España, 2000. Ministerio del Medio Ambiente. [http://hercules.cedex.es/Informes/Planificacion/2000-Libro Blanco del Agua en Espana](http://hercules.cedex.es/Informes/Planificacion/2000-Libro_Blanco_del_Agua_en_Espana) (accedido en 2010).
- Lim M., Chiang K., Amal R. Photochemical synthesis of chlorine gas from iron(III) and chloride solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 183 (2006) 126-132.
- Linsebigler A.L., Guangquan L., Yates J.T. Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: Principles, Mechanisms and Selected Results. *Chemical Reviews*, 95 (1995) 735-758.
- Lishman L., Smyth S.A., Sarafin K., Kleywegt S., Toito J., Peart T., Lee B., Servos M., Beland M., Seto P. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*, 367 (2006) 544-558.

- Liu B. y Liu X. Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. *Science of the Total Environment*, 320 (2004) 269–274.
- Lorphensri O, Sabatini DA, Kibbey TCG, Osathaphan K, Saiwan C. Sorption and transport of acetaminophen, 17 α ethynyl estradiol, nalidixic acid with low organic content aquifer sand. *Water Research* 41 (2007) 2180–2188.
- Lunestad B.T., Samuelsen O.B., Fjelde S., Ervik A. Photostability of eight antibacterial agents in seawater, *Aquaculture* 134 (1995) 217-225.
- Maciel R., Sant'Anna Jr. G.L., Dezotti M. Phenol removal from high salinity effluents using Fenton's reagents and photo-Fenton reactions. *Chemosphere* 57 (2004) 711–719.
- Malato S., Blanco J., Maldonado M.I., Oller I., Gernjak W., Pérez-Estrada L. Coupling solar photo-Fenton and biotreatment at industrial scale: main results of a demonstration plant. *Journal of Hazardous Materials* 146 (2007) 440–446.
- Malato S., Blanco J., Richter C., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M.I. Solar Photocatalytic Mineralization of Commercial Pesticides: Oxamyl. *Solar Materials and Solar Cells*, 64 (2000) 1-14.
- Malato S., Blanco J., Vidal A., Alarcón D., Maldonado M.I., Cáceres J., Gernjak W. Applied studies in solar photocatalytic detoxification: an overview. *Solar Energy* 75 (2003) 329-336.
- Malato S., Blanco J., Vidal A., Richter C. Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: an overview. *Applied Catalysis B: Environment*, 37 (2002) 1-15.
- Malato S., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M.I., Blanco J., Gernjak W. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147 (2009) 1–59.
- Malato-Rodríguez S., Blanco-Galvez J., Maldonado-Rubio M.I., Fernández-Ibáñez P., Alarcón-Padilla D., Collares-Pereira M., Farinha-Mendes J., Correia de Oliveira J. Engineering of solar photocatalytic collectors. *Solar Energy* 77 (2004) 513-524.
- Maldonado M.I., Passarinho P.C., Oller I., Gernjak W., Fernández P., Blanco J., Malato S. Photocatalytic degradation of EU priority substances: A comparison between TiO₂ and Fenton plus photo-Fenton in a solar pilot plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 185 (2007) 354–363.
- Mantzavinos D. y Psillakis E. Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *Journal Chemical Technology Biotechnology* 79 (2004) 431–454.
- Mantzavinos D. y Psillakis E. Review. Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79 (2004) 431-454.
- Marchese S., Gentili A., Perret D., D'Ascenzo G., Pastori F. Quadrupole time-of-flight versus triple-quadrupole mass spectrometry for the determination of non-steroidal

- antiinflammatory drugs in surface water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17 (2003) 879–886.
- Martinez L.J., Li G., Chignell C.F. Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacin and fleroxacin. *Photochemistry and Photobiology* 65 (1997) 599–602.
- Martínez N.S-S., Fernández J.F., Segura X.F., Ferrer A.S. Pre-oxidation of an extremely polluted industrial wastewater by the Fenton's reagent. *Journal of Hazardous Materials*, B101 (2003) 315–322.
- Martínez-Bueno M.J., Agüera A., Gómez M.J., Hernando M.D., García-Reyes J.F., Fernández-Alba A.R., Application of Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry to the Determination of Pharmaceuticals and Related Contaminants in Wastewater. *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 9372–9384.
- Martínez-Bueno M.J., Hernando M.D., Agüera A., Fernández-Alba A.R. Application of passive sampling devices for screening of micro-pollutants in marine aquaculture using LC–MS/MS. *Talanta* 77 (2009) 1518-1527.
- McFadden W.H., Schwartz H.L., Evans, S. Direct analysis of liquid chromatographic effluents. *Journal of Chromatography*, 122 (1976) 389-396.
- Méndez-Arriaga F., Esplugas S., Gimenez J. Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton. *Water Research*, 44 (2009) 589-595.
- Méndez-Arriaga F., Esplugas S., Gimenez J. Photocatalytic degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs with TiO₂ and simulated solar irradiation. *Water Research*, 42 (2008) 585-594.
- Méndez-Arriaga F., Maldonado M.I., Gimenez J., Esplugas S., Malato S. Abatement of ibuprofen by solar photocatalysis process: Enhancement and scale up. *Catalysis Today*, 144 (2009) 112–116.
- Metcalfe C.D., Miao X.S., W., H., R., L. Pharmaceuticals in the Canadian environment *in* Pharmaceuticals in the environment- Sources, fate, effects and risks. Kümmerer K. (ed). Berlin, Heidelberg, New York: Springer (2004) pp. 67-90.
- Miao X.S., Koenig B.G., Metcalfe C.D. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 952 (2002) 139-147.
- Mitscher L.A. Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chemical Reviews* 105 (2005) 559–592.
- Moldovan Z. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, 64 (2006) 1808-1817.
- Molinari R., Caruso A., Argurio P., Poerio T. Degradation of the drugs Gemfibrozil and Tamoxifen in pressurized and de-pressurized membrane photoreactors using

- suspended polycrystalline TiO₂ as catalyst. *Journal of Membrane Science*, 319 (2008) 54–63
- Mompelat S., Bot B. Le, Thomas O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International*, 35 (2009) 803–814.
- Moraes J.E.F., Quina F.H., Nascimento C.A.O., Silva D.N., Chiavone-Filho O. Treatment of saline wastewater contaminated with hydrocarbons by the photo-Fenton process. *Environmental Science and Technology* 38 (2004) 1183–1187.
- Muñoz R. y Guieysee B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, 40 (2006) 2799-2815.
- Nagulapally S.R., Ahmad A., Henry A. Occurrence of Ciprofloxacin-. Trimethoprim-Sulfamethoxazole-. and Vancomycin-Resistant Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Water Environmental Research* 81 (2009) 82-90.
- Nakada N., Komori K., Suzuki Y., Konishi C., Houwa I., Tanaka H. Occurrence of 70 pharmaceuticals and personal care products in Tone river basin in Japan *in* *Micropol and Ecohazard 2007*, Frankfurt/Main, Germany, pp. 57-66.
- Nakada N., Shinohara H., Murata A., Kiria K., Managakia S., Satob N., Takada H. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research* 41 (2007) 4373-4382.
- Niessen W.M.A. Advances in instrumentation in liquid chromatography–mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. *Journal Chromatography A*, 794 (1998) 407-435.
- Niessen W.M.A. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1999b.
- Niessen W.M.A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *Journal Chromatography A*, 1000 (2003) 413-436.
- Niessen W.M.A. State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 856 (1999) 179-197.
- Niessen W.M.A., Tjaden U.R., Greet J. Van der. Strategies in developing interfaces for coupling liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal Chromatography*, 554 (1991) 3-26.
- Niessen, W.M.A. y Tinke, A.P. *Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation*. *Journal Chromatography A*, 703 (1995) 37-57.
- Nieto J., Freer J., Contreras D., Candal R.J., Sileo E.E., Mansilla H.D. Photocatalyzed degradation of flumequine by doped TiO₂ and simulated solar light. *Journal of Hazardous Materials*, 155 (2008) 45-50.

- Nikolai L.N., McClure E.L., MacLeod S.L., Wong C.S. Stereoisomer quantification of the β -blocker drugs atenolol, metoprolol, and propranolol in wastewaters by chiral high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1131 (2006) 103–109.
- Nogueira R.F.P., Oliveira M.C., Paterlini W.C. Simple and fast spectrophotometric determination of H_2O_2 in photo-Fenton reactions using metavanadate. *Talanta*, 66 (2005) 86–91.
- OECD 2000, Guidance document for testing of chemicals. Phototransformation of Chemicals in water. Direct and indirect photolysis. Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris.
- OECD, 1999. Guidelines for Testing of Chemicals. Simulation Tests Aerobic Sewage Treatment 303A; Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris.
- Oller I., Malato S., Sánchez-Pérez J.A., Gernjak W., Maldonado M.I., Pérez-Estrada L.A., Pulgarín C. A combined solar photocatalytic-biological field system for the mineralization of an industrial pollutant at pilot scale. *Catalysis Today*, 122 (2007) 150–159.
- Oller I., Malato S., Sánchez-Pérez J.A., Maldonado M.I., Gasso R. Detoxification of wastewater containing five common pesticides by solar AOPs–biological coupled system. *Catalysis Today*, 129 (2007) 69–78.
- Overacre R., Clinton T., Pyne D., Snyder S., Dillon P. Reclaimed water aquifer storage and recovery: potential changes in water quality. Proceedings WEFTEC 2006, Dallas.
- Pagga U. Testing biodegradability with standardized methods. *Chemosphere*, 35 (1997) 2953-2972.
- Pailler J-Y., Krein A., Pfister L., Hoffmann L., Guignard C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment*, 407 (2009) 4736-4743.
- Palominos R., Freer J., Mondaca M.A., Mansilla H.D. Evidence for hole participation during the photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 193 (2008) 139-145.
- Palominos R.A., Mondaca M.A., Giraldo A., Peñuela G., Pérez-Moya M., Mansilla H.D., Photocatalytic oxidation of the antibiotic tetracycline on TiO_2 and ZnO suspensions. *Catalysis Today*, 144 (2009) 100–105.
- Parent Y., Blake D., Magrini-Bair K, Lyons C., Turchi C., Watt A., Wolfrum E. Prairie M. Solar Photocatalytic Process for the Purification of Water: State of Development and Barriers to Commercialization. *Solar Energy*, 56 (1996) 429-438.
- Park H-R., Kim T.H., Bark K-M. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry* 37 (2002) 443-460.

- Parmon V., Emeline A.V., Serpone N. Glossary of terms in photocatalysis and radiocatalysis - A Preliminary Version of IUPAC's Project 2001-036-1. *International Journal of Photoenergy*, 4 (2002) 91-131.
- Parra S., Malato S., Pulgarín C. New integrates photocatalytic-biological flow system using supported TiO₂ and fixed bacteria for the mineralization of isoproturon. *Applied Catalysis B: Environment*, 36 (2002) 131-144.
- Parra S., Sarria V., Malato S., Péringer P., Pulgarín C. Photochemical vs. coupled photochemical-biological flow system for the treatment of two biorecalcitrant herbicides: metobromuron and isoproturon. *Applied Catalysis B: Environment*, 27 (2000) 153-168.
- Peng X., Yu Y., Tang C., Tan J., Huang Q., Wang Z. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of The Total Environment*, 397 (2008) 158-166.
- Pérez S. y Barceló D. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 494-514.
- Pérez S. y Barceló D. Identification of photodegradates of enalapril and its human metabolite enalaprilat with advanced mass spectrometric techniques, *in Proc. 2nd Int. Workshop Liq. Chromatogr.-Tandem Mass Spectrom. Screening Trace Level Quantitation Environ. Food Samples*. Barcelona, Spain: IIQAB-BSIC; 2006. p. 39.
- Pérez-Estrada L.A., Agüera A., Hernando M.D., Malato S., Fernández-Alba A.R. Photodegradation of malachite green under natural sunlight irradiation: Kinetic and toxicity of the transformation products. *Chemosphere*, 70 (2008) 2068–2075.
- Pérez-Estrada L.A., Malato S., Agüera A., Fernández-Alba A.R. Degradation of dipyrone and its main intermediates by solar AOPs. Identification of intermediate products and toxicity assessment. *Catalysis Today*, 129 (2007) 207–214.
- Pérez-Estrada L.A., Malato S., Gernjak W., Agüera A., Thurman E.M., Ferrer I., Fernández-Alba A.R. Photo-Fenton Degradation of Diclofenac: Identification of Main Intermediates and Degradation Pathway. *Environmental Science & Technology*, 39 (2005) 8300-8306.
- Pérez-Estrada L.A., Maldonado M.I., Gernjak W., Agüera A., Fernández-Alba A.R., Ballesteros M.M., Malato S. Decomposition of diclofenac by solar driven photocatalysis at pilot plant scale. *Catalysis Today*, 101 (2005) 219–226.
- Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Sanz A., Bravo E. Separation and simultaneous determination of NXA, hydroxy-nalidixic acid and carboxy nalidixic acid in serum and urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal Chromatography B* 724 (1999) 319–324.

- Petrovic M. y Barceló D. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 2-11.
- Petrovic M. y Barceló D. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 385 (2006) 422-424.
- Petrović M., Gonzalez S., Barceló D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 685-96.
- Pichon V. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, 885 (2000) 195–215;
- Pietrogrande M.C. y Basaglia G. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 1086-1094.
- Pignatello J.J. Dark and photoassisted iron(3+)-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science & Technology*, 26 (1992) 944-951.
- Piram A., Salvador A., Gauvrit J-Y., Lanteri P., Faure R. Development and optimisation of a single extraction procedure for the LC/MS/MS analysis of two pharmaceutical classes residues in sewage treatment plant. *Talanta*, 74 (2008) 1463–1475.
- PNUD 2006, Una alianza mundial para el desarrollo, Informe Anual 2006 del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. http://www.undp.org/spanish/publicaciones/informeannual2006/IAR06_SP.pdf (accedido en 2009).
- Pouliquen H., Delépée R., Larhantec-Verdier M., Morvan M., Le Bris H. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. *Aquaculture*, 262 (2007) 23-28.
- Prabhakaran D., Sukul P., Lamshöft M., Maheswari M.A., Zühlke S., Spiteller M. Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems. *Chemosphere*, 77 (2009) 739–746.
- Prat M.D., Ramil D., Compañó R., Hernández-Arteseros J.A., Granados M. Determination of flumequine and oxolinic acid in sediments and soils by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-fluorescence. *Analytica Chimica Acta* 567 (2006) 229-235.
- Pulgarín C. y Kiwi J. Overview on photocatalytic and electrocatalytic pretreatment of industrial non-biodegradable pollutants and pesticides. *Chimia*, 50 (1996) 50-55.
- Pulgarín C., Invernizzi M., Parra S., Sarria V., Polaina R., Péringer P. Strategy for the coupling of photochemical and biological flow reactions useful in mineralization of biocalcitrant industrial pollutants. *Catalysis Today*, 54 (1999) 341-352.

- Qian Y., Wen Y., Zhang H. Efficacy of pre-treatment methods in the activated sludge removal of refractory compounds in coke-plant wastewater. *Water Research*, 28 (1994) 701-707.
- Quintana J.B., Rodil R., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. Investigating the chlorination of acidic pharmaceuticals and by-product formation aided by an experimental design methodology. *Water Research*, 44 (2010) 243-255.
- Radjenovic J., Godehardt M., Petrovic M. Evidencing Generation of Persistent Ozonation Products of Antibiotics Roxithromycin and Trimethoprim. *Environmental Science & Technology* 43 (2009b) 6808-6815.
- Radjenovic J., Pérez S., Petrović M., Barceló D. Identification and structural characterization of biodegradation products of atenolol and glibenclamide by liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1210 (2008) 142-153.
- Radjenovic J., Sirtori C., Petrovic M., Barceló D., Malato S. Solar photocatalytic degradation of persistent pharmaceuticals at pilot-scale: Kinetics and characterization of major intermediate products. *Applied Catalysis B: Environmental*, 89 (2009) 255–264.
- Reyes C., Fernández J., Freer J., Mondaca J.A., Zaror C., Malato S., Mansilla H.D. Degradation and inactivation of tetracycline by TiO₂ photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 184 (2006) 141–146.
- Rizzo L., Meric S., Kassinos D., Guida M., Russo F., Belgiorno V. Degradation of diclofenac by TiO₂ photocatalysis: UV absorbance kinetics and process evaluation through a set of toxicity bioassays. *Water Research*, 43 (2009) 979–988.
- Roberts P.H. y Thomas K.V. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, 356 (2006) 143-153.
- Rodrigues de Souza D., Duarte E.T.F.M., Girardi G.S., Velani V., Hora Machado A.E. da, Sattler C., Oliveira L. de, Miranda J.A. de. Study of kinetic parameters related to the degradation of an industrial effluent using Fenton-like reactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 179 (2006) 269–275.
- Romero M., Blanco J., Sánchez B., Vidal A., Malato S., Cardona A., García E. Solar photocatalytic degradation of water and air pollutants: challenges and perspectives. *Solar Energy*, 66 (1999) 169-182.
- Rosal R., Rodríguez A., Perdigón-Melón J.A., Petre A., García-Calvo E., Gómez M.J., Agüera A., Fernández-Alba A.R. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44 (2009) 578–588.

- Ruppert G., Bauer R., Heisler G. The photo-Fenton reaction - an effective photochemical wastewater treatment process. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 73 (1993) 75-78.
- Santos J.L., Aparicio I., Alonso E., Callejón M. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytical Chimica Acta*, 550 (2005) 116-122.
- Sarria V., Kenfack S., Guillod O., Pulgarin C. An innovative coupled solar-biological system at field pilot scale for the treatment of biorecalcitrant pollutants. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 159 (2003) 89–99.
- Sarria V., Kenfack S., Guillod O., Pulgarin C. An innovative coupled solar-biological system at field pilot scale for the treatment of biorecalcitrant pollutants. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 159 (2003) 89-99.
- Sarria V., Parra S., Adler N., Peringer P., Benitez N., Pulgarin C. Recent developments in the coupling of photoassisted and aerobic biological processes for the treatment of biorecalcitrant compounds. *Catalysis Today* 76 (2002) 301–315.
- Scott J.P. y Ollis D.F. Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: review and recommendations. *Environmental Progress*, 14 (1995) 88-103.
- Scott JP y Ollis DF. Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment II: recent illustrations and experiences. *Journal of Advanced Oxidation Technology* 2 (1997) 374–381.
- Scott R.P.W., Scott C.G., Munroe M., Hess J., Interface for On-Line Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Analysis. *Journal of Chromatography*, 99 (1974) 395-405.
- Sedlak D.L., Pinkston K., Huang C.H. Occurrence survey of pharmaceutically active compounds. Denver, CO: Awwa Research Foundation (2005).
- Shannon M.A., Bohn P.W., Elimelech M., Georgiadis J.G., Mariñas B.J., Mayes A.M. Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*, 452 (2008) 301-310.
- Shemer H., Kunukcu Y.K., Linden K.G. Degradation of the pharmaceutical Metronidazole via UV, Fenton and photo-Fenton processes. *Chemosphere*, 63 (2006) 269–276.
- Shiklomanov I.A. State Hydrogeological Institute (SHI, St. Petersburg) y United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation (UNESCO, Paris), 1999.
- Siemer C.J., VanStipdonk M.J., Kahol P.K., Eichhorn D.M. A coordination polymer from a cyanoscorpionate complex. *Polyhedron*, 23 (2004) 235-238.
- Sim W-J., Lee J-W., Oh J-E. Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environmental Pollution*, 158 (2010) 1938-1947.
- Skoog D. A. *Análisis Instrumental*. McGraw-Hill, D.L., 4ª ed. Madrid, 1996.

- Snyder S.A., Kelly K.L., Grange A.H., Sovocool G.W., Snyder E.M., Giesy J.P. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Waters of lake Mead, Nevada *in* Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. Edited by Daughton C.G and Jones-Lepp T.L. ACS symposium series (2001) 791. Chapter 7.
- Sponberg A.L., Witter J.D. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Science of the Total Environment*, 397 (2008) 148-157.
- Stackelberg P.E., Gibs J., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Lippincott R.L. Efficiency of conventional drinking-watertreatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Science of the Total Environment* 377 (2007) 255–272.
- Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.D., Rodrigues S.V., Baumann W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment* 225 (1999) 135-141.
- Sui Q., Huang J., Deng S., Yu G., Fan Q. Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. *Water Research*, 44 (2010) 417-426.
- Tabrizi G.B. y Mehrvar M. Integration of advanced oxidation technologies and biological processes: Recent developments, trends and advances. *Journal of Environmental Science Health A* 39 (2004) 3029–3081.
- Tamtam F., Mercier F., Le Bot B., Eurin J., Dinh Q.T., Clément M., Chevreuil M. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environment*, 393 (2008) 84-95.
- Tang W. and Huang C.P. 2,4-dichlorophenol oxidation kinetics by Fenton's reagent. *Environmental Technology* 17 (1996) 1371-1378.
- Tekin H., Bilkay O., Ataberk S.S., Balta T.H., Ceribasi I.H., Sanin F.D., Dilek F.B., Yetis U. Use of Fenton oxidation to improve the biodegradability of a pharmaceutical wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, B136 (2006) 258–265.
- Ternes T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32 (1998) 3245-3260.
- Ternes T.A., Bonerz M., Schmidt T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 938 (2001a) 175-185.
- Ternes T.A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 20 (2001b) 419-434.
- Ternes T.A., Bonerz M., Herrmann N., Teiser B., Andersen H.R. Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere*, 66 (2007) 894-904.
- Thomas K.V. y Hilton M.J. The occurrence of selected human pharmaceuticals compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 49 (2004) 436-444.

- Thurman E.M., Ferrer I., Zweigenbaum J.A., García-Reyes J.F., Woodman M., Fernández-Alba A.R. Discovering metabolites of post harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 1082 (2005) 71-80.
- Tixier C., Singer H.P., Oellers S., Muller S.R. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters. *Environmental Science & Technology*, 37 (2003) 1061-1068.
- Trovo A.G., Melo S.A.S., Nogueira R.F.P. Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process - Application to sewage treatment plant effluent. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 198 (2008) 215–220.
- Trovó A.G., Nogueira R.F.P., Agüera A. Fernández-Alba A.R., Sirtori C., Malato S. Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation. *Water Research*, 43 (2009) 3922–3931.
- Trovó A.G., Nogueira R.F.P., Agüera A., Sirtori C., Fernández-Alba A.R. Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: Persistence, toxicity and photoproducts assessment. *Chemosphere*, 77 (2009) 1292–1298.
- Tunay O., Samuk B., Olmez T., Kabdasli I. Application of advanced oxidation to enhance biodegradability of pharmaceutical industry wastewaters. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 (2004) 965–968.
- UNEP/GRID-Arendal 2009, United Nations Environment Programme y GRID-Arendal Centre. <http://maps.grida.no/go/graphic/water-withdrawal-and-consumption-the-big-gap> (accedido en 2009).
- UNESCO 2003, Water for People, Water for Life – Executive Summary of the UN World Water Development Report, Paris.
- Varatharajan B. y Kanmani S. Treatability study of pharmaceutical wastewater by combined solar photo Fenton and activated sludge process. *Journal of Industrial Pollution Control* 23 (2007) 157–164.
- Vargas F., Rivas C., Machado R. Decarboxylation and singlet oxygen production in the photolysis of nalidixic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 11 (1991) 81-85.
- Vialaton D. and Richard C. Phototransformation of aromatic pollutants in solar light: photolysis versus photosensitized reactions under natural water conditions. *Aquatic Science* 64 (2002) 207–215.
- Weigel S., Berger U., Jensen E., Kallenborn R., Thoresen H., Hühnerfuss H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites, *Chemosphere*, 56 (2004) 583-592.

- Weigel S., Kuhlmann J., Huhnerfuss H. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Science of the Total Environment*, 295 (2002) 131-141.
- Werner J.J., McNeill K., Arnold W.A. Environmental photodegradation of mefenamic acid *Chemosphere* 58 (2005) 1339–1346.
- Wert E.C., Rosario-Ortiz F.L., Zinder S.A. Effect of ozone exposure on the oxidation of trace organic contaminants in wastewater. *Water Research* 43 (2009) 1005-1014.
- Willoughby R.C., Browner R.E. Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 56 (1984) 2626-2631.
- Winkler P.C., Perkins D.D., Williams D.K., Browner R.E. Performance of an improved monodisperse aerosol generation interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 60 (1988) 489-493.
- Xing M., Deng C., Godefroid B., Yang J. Treatment of pharmaceutical wastewater containing recalcitrant compounds in a Fenton-coagulation process. *Journal of Environmental Sciences*, 18 (2006) 459-463.
- Yamamoto H., Nakamura Y., Moriguchi S., Nakamura Y., Honda Y., Tamura I., Hirata H., Hayashi A., Sekizawa J. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Research*, 43 (2009) 351–362.
- Yanga L., Yua L.E., Ray M.B. Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO₂ Photocatalysis. *Water Research*, 42 (2008) 3480–3488.
- Yaping Z. y Jiangyong H. Photo-Fenton degradation of 17β-estradiol in presence of R-FeOOHR and H₂O₂. *Applied Catalysis B* 78 (2008) 250–258.
- Yoon Y., Ryu J., Oh J., Choi B-G., Snyder S.A. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). *Science of the Total Environment*, 408 (2010) 636-643.
- Yu C-P. y Chu K-H. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products along the West Prong Little Pigeon River in east Tennessee, USA. *Chemosphere*, 75 (2009) 1281-1286.
- Yu J.T., Bouwer E.J., Coelhan M. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agriculture Water Manage*, 86 (2006) 72-80.
- Yurdakal S., Loddo V., Augugliaro V., Berber H., Palmisano G., Palmisano L. Photodegradation of pharmaceutical drugs in aqueous TiO₂ suspensions: Mechanism and kinetics. *Catalysis Today*, 129 (2007) 9–15.
- Zahn-Wellens biodegradability test. Directiva 88/302/EEC.

- Zapata A., Oller I., Bizani E., Sanchez-Perez J.A., Maldonado M.I., Malato S. Evaluation of operational parameters involved in solar photo-Fenton degradation of a commercial pesticide mixture. *Catalysis Today*, 144 (2009) 94-99.
- Zapata A., Oller I., Gallay R., Pulgarín C., Maldonado M.I., Malato S., Gernjak W. Comparison of photo-Fenton treatment and coupled photo-Fenton and biological treatment for detoxification of pharmaceutical industry contaminants. *Journal of Advanced Oxidation Technologies* 11 (2008) 261–269.
- Zepp R.G. y Cline D.M. Rates of direct photolysis in aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, 11 (1977) 359-366.
- Zepp R.G., Baughman G.L., Schlotzhauer P.F. Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water: I. Sunlight induced reactions of aquatic pollutants photosensitized by humic substances. *Chemosphere*, 10 (1981) 109-117.
- Zhang S., Zhang Q., Darisaw S., Ehie O., Wang G. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere*, 66 (2007) 1057-1069.
- Zhang X., Wu F., Wu X.W., Chen P., Deng N. Photodegradation of acetaminophen in TiO₂ suspended solution. *Journal of Hazardous Materials*, 157 (2008) 300–307.
- Zhang Y., Zhou J.L., Ning B. Photodegradation of estrone and 17β-estradiol in water. *Water Research*, 41 (2007) 19–26.
- Zhao J-L., Ying G-G., Wang L., Yang J-F., Yang X-B., Yang L-H., Li X. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, 407 (2009) 962-974.
- Zhou L.Z., *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC – Chapter 19 Applications of LC/MS in pharmaceutical analysis*. Elsevier (2005) 507-518.
- Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 122 (2005) 205-209.

GLOSARIO

ADN	ácido desoxirribonucleico
AM	Agua de Mar
APCI	ionización química a presión atmosférica
API	ionización a presión atmosférica
APPI	foto ionización a presión atmosférica
BIO	Tratamiento biológico
CC	contaminantes convencionales
CE	Convenio de Estocolmo
CF-FAB	FAB de flujo continuo
CI	ionización química
CI	Cromatografía Iónica
CID	disociación por colisión inducida
COD	Carbono Orgánico Disuelto
COP	contaminantes orgánicos persistentes
COPP	contaminantes orgánicos persistentes potenciales
COT	Carbono Orgánico Total
CPC	Captador parabólico-compuesto
DBO o DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxígeno

DC	corriente continua
DIW	Agua desionizada
DIW _{NaCl}	Agua desionizada conteniendo 5 g L ⁻¹ de NaCl
DLI	introducción líquida directa
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EC ₅₀	Concentración Efectiva que cause el 50% de mortalidad en determinado organismo
EDAR	estaciones depuradoras de aguas residuales
EI	ionización eletrónica
EOM	Estado de Oxidación Medio
ER	Efluente Real proveniente de EDAR
ES	Efluente Simulado
ESI	<i>electrospray</i>
FAB	fuentes de bombardeo atómico rápido
FF	foto-Fenton
FH	fotocatálisis heterogénea
FLU	flumequina
FTMS	analizador de Transformada de Fourier
GC-MS o GC-MS/MS	cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-UV	cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta
IBR	Reactor biológico aerobio de lecho fijo
IT-TOF	trampa de iones-tiempo de vuelo
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
k	Constante cinética
LC	Cromatografía líquida
LC-MS o LC-MS-MS	cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas
LC-TOF-MS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo
LD ₅₀	Dosis Letal que genera la mortalidad de 50% de los organismos testados
LIT	trampa de iones lineal
LIT-FT-ICR	trampa de iones lineal-transformada de Fourier resonancia ión ciclotrón
LTQ Orbitrap	trampa de iones lineal-Orbitrap
<i>m/z</i>	relación masa / carga del ion
MOD	materia orgánica disuelta
MS	Espectrometría de masas

MS/MS o MS ³	espectrometría de masas en tándem
MS ⁿ	técnica de masas-masas
NXA	Ácido nalidíxico
OECD	Organización para Cooperación Económica y Desarrollo
PAH	hidrocarburos aromáticos policíclicos
PAO	Procesos Avanzados de Oxidación
PB	<i>Particle Beam Interface</i>
PCB	bifenilos policlorados
PNUD	Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo
PSA	Plataforma Solar de Almería
PT	productos de transformación
PTC	Colectores cilíndrico-parabólico
Q-LIT o	cuadropolo-trampa de iones lineal
QTRAP	
QqQ-MS	analizador de triple cuadropolo
QqTOF o	cuadropolo-tiempo de vuelo
QTOF	
QTRAP-MS	cuadropolo-trampa de iones lineal
RC	factor de concentración
RF	potencial de radiofrecuencia
RIE	Agua residual industrial
SC	semiconductor
SIE	Agua residual industrial simulada
<i>SIM</i>	<i>selected ion monitoring</i>
SIMS	espectrometría de masas de iones secundarios
<i>SRM</i>	<i>selected-reaction monitoring</i>
t _{1/2}	Tiempo de vida medio
TIC	cromatogramas de iones totales
TMP	trimetoprim
TRAP-MS	Analizador de trampa de iones
TSP	<i>thermospray</i>
UAL	Universidad de Almería
UE	Unión Europea
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
UV	ultravioleta
<i>WFD</i>	<i>Water Framework Directive</i>
ZW	Zahn-Wellens

ANEXO

Los resultados de la presente investigación han dado lugar a seis artículos, detallados a continuación. Algunos de ellos ya han sido publicados por revistas científicas internacionales y otros se encuentran en la etapa de apreciación y/o finalización.

- SIRTORI, Carla; Zapata, A.; Malato, S.; Gernjak, W.; Fernández-Alba, A.R.; Agüera, A. Solar photocatalytic treatment of quinolones: intermediates and toxicity evaluation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8 (2009) 644.
- SIRTORI, Carla; Zapata, A.; Oller, I.; Gernjak, W.; Agüera, A.; Malato, S. Solar Photo-Fenton as Finishing Step for Biological Treatment of a Pharmaceutical Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 43 (2009) 1185-1191.
- SIRTORI, Carla; Zapata A; Oller I; Gernjak W; Agüera A.; Malato S. Decontamination industrial pharmaceutical wastewater by combining solar photo-Fenton and biological treatment. *Water Research*, 43 (2009) 661-668.
- SIRTORI, Carla; Agüera, A.; Gernjak, W.; Malato, S. Effect Of Water-Matrix Composition On Trimethoprim Solar Photodegradation Kinetics And Pathways. *Water Research* 44 (2010) 2735-2744.
- SIRTORI, Carla; Zapata A; Gernjak W; Malato S.; Lopez A.; Agüera A. Application of Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry in the analytical evaluation

of the solar photo-Fenton degradation of nalidixic acid in waters of different composition. A case study of the treatment of a real industrial effluent enviado a Analytical Chemistry.

- SIRTORI, Carla; Gernjak W., Malato S., Fernández-Alba A.R., Agüera A. Photolysis of a common antibiotic used in aquaculture and toxicity evaluation of its photoproducts, actualmente se encuentra en etapa de finalización.

Además durante los cuatro años de labor junto al Grupo de Destoxificación y Desinfección de Aguas de la PSA y en el Grupo de Residuos de Plaguicidas de la UAL, se han realizado trabajos de colaboración con investigadores externos que dieran lugar a las publicaciones descritas a continuación:

- Gomez, M.J.; SIRTORI, Carla; Mezcua M.; Fernandez-Alba, A.R.; Agüera A. Photodegradation study of three dipyrone metabolites in various water systems: Identification and toxicity of their photodegradation products. *Water Research* 42 (2008) 2698-2706.
- Trovó, A.G. ; Nogueira, R.F.P. ; Agüera, A.; SIRTORI, Carla ; Fernández-Alba, A.R. Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: Persistence, toxicity and photoproducts assessment. *Chemosphere* 77 (2009) 1292-1298.
- Trovó A.G.; Nogueira R.F.P.; Agüera, A.; Fernandez-Alba, A.R.; SIRTORI, Carla; Malato S. Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation. *Water Research* 43 (2009) 3922-3931.
- Radjenovic, J.; SIRTORI, Carla; Petrovic, M.; Barceló, D.; Malato S. Solar Photocatalytic degradation of persistent pharmaceuticals at pilot-scale: kinetics and characterization of major intermediate products. *Applied Catalysis. B, Environmental* 89 (2009) 255-264.
- Radjenovic, J.; SIRTORI, Carla; Petrovic, M.; Barceló, D.; Malato, S. Characterization of intermediate products of solar photocatalytic degradation of ranitidine at pilot-scale. *Chemosphere* 79 (2010) 368-376.
- Zapata, A.; Oller, I.; SIRTORI, Carla ; Rodríguez, A.; Sánchez-Pérez, J.A.; López, A.; Mezcua, M.; Malato, S. Decontamination of industrial wastewater containing pesticides by combining large-scale homogeneous solar photocatalysis and biological treatment. *Chemical Engineering Journal* (2010) *in press*.