

# 11

## Procedimientos para la evaluación de la degradación de contaminantes en agua mediante TAOs

*Sixto Malato*

Plataforma Solar de Almería (CIEMAT).  
Carretera Senés km. 4, Tabernas,  
Almería, 04200 España, correo electrónico: sixto.malato@psa.es.

### 1. Introducción

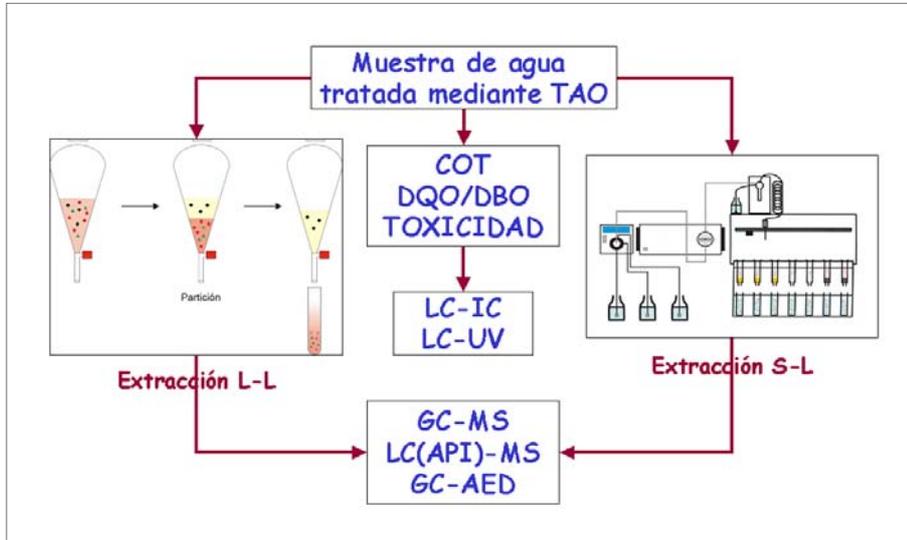
En la evaluación de los TAOs como métodos de tratamiento de aguas contaminadas con plaguicidas, existen dos aspectos claves para la obtención de mejores métodos de descontaminación:

- Optimización de los foto-reactores y los parámetros que gobiernan la reacción.
- Evaluación, lo más precisa posible, de la eficiencia de los métodos fotocatalíticos.

Este primer punto necesita de la Ingeniería Química, y su importancia radica en la obtención de métodos de descontaminación cada vez más eficientes y rentables. El segundo punto, necesita de la Química Analítica, la Toxicología e incluso de la Microbiología y tiene como fin, no solo controlar la efectividad de los procesos de degradación, mediante el seguimiento de la cinética de degradación de los contaminantes iniciales, sino determinar la presencia de intermedios, establecer posibles rutas de degradación y asegurar la inocuidad del vertido final, bien sea sobre el medioambiente o sobre otros métodos de tratamiento menos sofisticados y más económicos (por ej., tratamientos biológicos). En este segundo punto es en el que se centra este capítulo.

La relevancia de las líneas de trabajo mencionadas pone de manifiesto la necesidad de una cerrada colaboración entre distintas áreas de conocimiento. De esta forma, se puede conseguir un control integral del proceso fotocatalítico, mediante técnicas analíticas avanzadas (GC-MS, HPLC-MS, etc) y ensayos de biotoxicidad y/ o biodegradabilidad, que permita establecer comparaciones entre métodos de degradación alternativos. En la figura 1 se muestra una esquematización de los procedimientos de análisis y de los parámetros que es preciso evaluar correctamente si se quiere tener una visión completa de todo el proceso fotocatalítico, de su efectividad y de su eficiencia.

**Figura 1.** Procedimientos de análisis a aplicar durante el tratamiento de aguas mediante TAOs. Para explicación de los acrónimos, ver texto, especialmente sección 4.

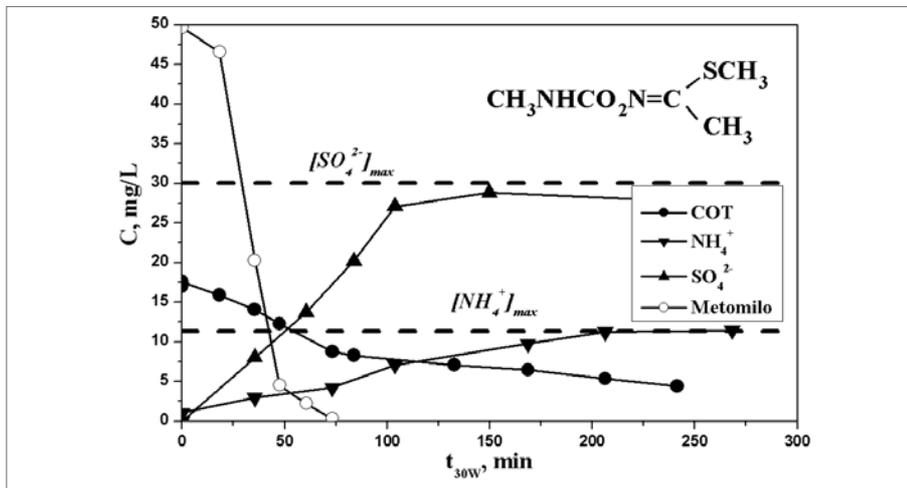


## 2. Evaluación de parámetros fundamentales

Los parámetros fundamentales (básicos para obtener información relevante respecto a la cinética del proceso y para garantizar la consistencia de los resultados) a evaluar en una muestra procedente de un tratamiento mediante TAOs son:

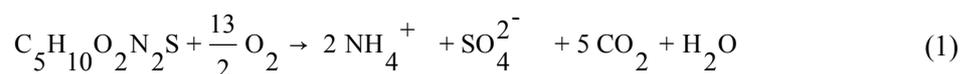
- Carbono Orgánico Total (COT), técnica específica para la que existe un equipamiento muy concreto, como se verá más adelante.
- Concentración del contaminante original y se propone como técnica más fiable y versátil, al analizar contaminantes orgánicos disueltos en agua, Cromatografía Líquida con detección UV (LC-UV).
- Concentración de iones inorgánicos, proponiéndose en este caso la Cromatografía Líquida con detector de conductividad (LC-IC)

**Figura 2.** Evolución del contaminante original (metomilo), del COT y de los iones inorgánicos generados mediante TAOs.



Evidentemente, además es conveniente siempre evaluar pH (fundamental para conocer la carga superficial del  $\text{TiO}_2$  y su evolución), contenido en  $\text{H}_2\text{O}_2$  o cualquier otro oxidante utilizado durante el tratamiento (con el objetivo doble de evaluar consumo del mismo y concentración en cada momento, que está íntimamente relacionada con la velocidad de reacción), contenido en Fe y su estado de oxidación (si se está trabajando con proceso de Fenton o foto-Fenton), y cualquier otro parámetro básico relacionado con cada tratamiento concreto. El análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) tiene sentido cuando no se dispone de COT, ya que es un método más económico que éste. Sin embargo, la información que proporciona respecto a la mineralización de los compuestos no es tan fiable como el COT. Fundamentalmente, porque el método no suele ser preciso para concentraciones de contaminantes del orden de unidades de mg/L (muy habituales en fotocatalisis) y porque al medir la DQO de un agua también intervienen especies no orgánicas oxidables (por ej.  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , etc.), no pudiendo distinguirse entre éstas y los contaminantes orgánicos. La medida de la DQO puede tener bastante utilidad para determinar la evolución de la biodegradabilidad de un agua, si se compara adecuadamente su valor con el de la Demanda Bioquímica de Oxígeno y con el del COT. En la sección 3.3 se comenta esto con más detalle.

En la figura 2 se muestra un ejemplo de lo comentado. El metomilo es degradado rápidamente (en 75 minutos ha desaparecido), sin embargo todavía permanece en ese momento casi el 50% del mismo en forma de intermedios orgánicos (COT). Además, esos intermedios todavía contienen azufre y nitrógeno (por tanto, potencialmente contaminantes), ya que estos heteroátomos no son recuperados en forma de iones inorgánicos hasta los 150 y 200 minutos de tratamiento, respectivamente. Después de 200 minutos de tratamiento podemos estar seguros de que el metomilo ha sido degradado completamente y de que además los intermedios presentes en ese momento (que ya solo corresponden al 25% del COT original) no contienen ni azufre ni nitrógeno en su estructura. Además, la obtención del total de sulfato y amonio esperado (según ecuación (1)) nos garantiza que el tratamiento aplicado ha sido eficaz y que el metomilo no ha desaparecido del agua por algún otro efecto (p.e. volatilización o adsorción en el fotorreactor utilizado). Es más, la concordancia de los resultados nos garantiza la exactitud de las técnicas analíticas empleadas. Evidentemente, a partir de estos resultados se podrán evaluar velocidades de reacción, no solo del contaminante original, si no de todos los otros parámetros, con lo que la consistencia de los cálculos aumentará. Pero además se podrán inferir toxicidades y biodegradabilidad, como se cometa más adelante.



### 2.1. Carbono Orgánico Total

Para la determinación del grado de mineralización de los contaminantes en procesos fotocatalíticos se utiliza un analizador específico para ello. Habitualmente, mediante este equipo se pueden realizar mediciones de Carbono Total (CT) y Carbono Inorgánico Total (CIT) en agua. El COT se obtiene por diferencia entre el CT y el CIT de las muestras acuosas. Casi todos los equipos modernos de alta calidad están

basados en el método de combustión de las muestras en reactor catalítico (600-800 °C) que contiene un catalizador de platino soportado sobre bolas de alúmina, y el posterior análisis del gas resultante (CO<sub>2</sub>) mediante un detector de infrarrojos (IR). La señal del detector de infrarrojo genera un pico, cuya área es proporcional a la concentración de CT o CIT de la muestra. Para las mediciones de CIT, el sistema añade automáticamente a las muestras ácido fosfórico y las purga con aire de alta pureza. De esta manera al disminuir el pH y burbujear aire se provoca la generación de CO<sub>2</sub> a partir de carbonatos y bicarbonatos, el cual es arrastrado por el aire al detector de IR. Los equipos suelen estar diseñados para realizar y almacenar calibraciones, cálculos estadísticos y de errores. Su precisión suele ser excelente y son extremadamente sensibles, obteniéndose valores fiables hasta concentraciones de COT de µg/L.

## 2.2. Concentración del contaminante original

Para hacer el seguimiento de los tratamientos fotocatalíticos y poder evaluar la degradación del contaminante orgánico estudiado lo más habitual y recomendable es la utilización de cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector Ultravioleta (HPLC-UV), siempre que el compuesto a estudiar lo permita. Esto suele ser así para casi todos los compuestos orgánicos contaminantes disueltos en agua: plaguicidas, fenoles, colorantes, etc. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en el medio ambiente. En la cromatografía líquida de alta resolución la fase móvil se bombea a alta presión por una columna (con un diámetro de entre 3 y 10 mm y una longitud de algunos centímetros) que contiene partículas de fase estacionaria. En la cromatografía en fase reversa (que es con la que se trabaja habitualmente en muestras procedentes de TAOs) 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. La preparación de la muestra suele restringirse a la dilución de ésta (normalmente 1:1, con el disolvente que forma parte de la fase móvil) y a la filtración de la misma a través de filtros de 0,22 µm de tamaño de poro. Dos ventajas adicionales se consiguen mediante este procedimiento, que están íntimamente relacionadas con el proceso fotocatalítico: (i) cuando las muestras proceden de un experimento con TiO<sub>2</sub>, al diluir con un disolvente orgánico se facilita la desorción del compuesto a analizar de la superficie del catalizador y la cuantificación completa del contaminante (adsorbido y no adsorbido); (ii) el denominado efecto «quenching», que se refiere a la paralización de una reacción por desnaturalización del medio de reacción, es decir, al diluir las muestras con el disolvente orgánico la reacción se detiene (esto es especialmente importante en experimentos con foto-Fenton, en los que puede ocurrir efectos relevantes en la oscuridad después de tomar la muestra del reactor).

Un método muy utilizado para la medida del contaminante original suelen ser la espectroscopia UV-Visible. Evidentemente, ante la falta de un equipo de HPLC-UV esta técnica es más sencilla y económica. Sin embargo, al no producirse una separación de los componentes de la mezcla reaccionante antes de su determinación, es muy

habitual que los intermedios generados durante la degradación de un contaminante orgánico interfieran en la medida del mismo, dando resultados inconsistentes.

### 2.3. Concentración de iones inorgánicos

La determinación de los iones inorgánicos durante los TAOs permite determinar el grado de mineralización de los contaminantes tratados. Al mineralizar compuestos orgánicos estos se transforman en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y los ácidos (o sales) minerales correspondientes, que provienen de los heteroátomos contenidos en las moléculas orgánicas. Mediante la monitorización de estas especies iónicas se puede evaluar el grado de mineralización de los compuestos originales y, además, se puede asegurar que la degradación ha sido completa y no se han producido pérdidas del contaminante. 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 y la cuantificación conductimétrica de los iones eluidos. Los más habituales en TAOs serían:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NH}_4^+$ . Todos ellos son analizables por cromatografía iónica. Este método analítico también permite la determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, ayudando al establecimiento de la ruta de degradación de los compuestos tratados ya que estos ácidos suelen ser el último paso antes de la mineralización del contaminante. Los más habituales son: ácido fórmico, acético, oxálico, glicólico, propanoico, pirúvico, etc.

La determinación de estos iones por técnicas colorimétricas o mediante electrodos selectivos, al igual que se comentó anteriormente para la determinación del contaminante original, se verá siempre influenciada por las interferencias provocadas por la presencia de otros compuestos en el medio.

### 3. Evaluación de toxicidad y biodegradabilidad

El problema de la destrucción de los contaminantes tóxicos biológicamente recalcitrantes debe ser abordado mediante tecnologías no-biológicas. La oxidación química logra la mineralización de los contaminantes y los convierte en dióxido de carbono, agua e inorgánicos. Como ya se ha comentado, los TAOs consiguen la destrucción completa del contaminante. Sin embargo, el principal problema de los TAOs suele ser su alto coste. Los costes de operación de TAOs son siempre superiores a los de tratamiento biológico, sin embargo, su utilización como pretratamiento podría justificarse para la mejora de la biodegradabilidad de aguas residuales que contienen compuestos recalcitrantes o inhibidores de estos tratamientos biológicos. Los productos de degradación intermedios podrían ser degradados por microorganismos en un post-tratamiento biológico. La determinación de la toxicidad del agua, en distintas fases del tratamiento de los contaminantes mediante bioensayos de toxicidad aguda (tiempo máximo de exposición de 96 horas), utilizando diferentes microorganismos es otra forma de reducir los costes de operación de los TAOs. En este caso, incluso la biodegradabilidad podría predecirse a menudo, y es más, es posible determinar la biocompatibilidad con el medioambiente de una agua tratada mediante TAOs sin necesidad de destruir completamente los contaminantes que contenía.

Actualmente, hay numerosos procedimientos disponibles para la realización de bioensayos de toxicidad [1], sin embargo, como la toxicidad es una respuesta biológica,

un sistema de monitorización universal de la misma no está disponible y por lo tanto, para aumentar la fiabilidad en la evaluación de toxicidad, es necesario utilizar diferentes organismos y que representen a distintos grupos taxonómicos del medio. En esta sección se comentarán dos de ellos, que han sido utilizados habitualmente para evaluar muestras procedentes de TAOs: la movilidad de *Daphnia Magna* y la luminiscencia de la bacteria *Vibrio Fischeri*. Ambos no precisan de una elevada inversión en equipos ni de una especialización excesiva en su manejo. Es necesario remarcar que, evidentemente, antes de la utilización de estos métodos, sean de toxicidad o biodegradabilidad, es necesario eliminar del medio cualquier sustancia tóxica utilizada durante el tratamiento (por ej. peróxido de hidrógeno, ozono, etc.) y fijar un pH cercano a 7.

En los últimos años hay un creciente interés por parte de todos los grupos de investigación especializados en TAOs en intentar combinar éstas con tratamientos biológicos [2]. Este interés está basado en la habilidad de los radicales hidroxilo para generar intermedios más oxidados que el contaminante original y por tanto, *a priori* más biodegradables. Mediante esta combinación se conseguirá reducir los costes de tratamiento ya que no será necesario mineralizar el contaminante, sino que será suficiente con degradarlo hasta que sea biodegradable. En este caso se comentarán los métodos más habituales (que tampoco son excesivamente sofisticados y/o costosos) para conseguir evaluar la biodegradabilidad de un agua sometida a un TAO y se hará hincapié en cómo combinar esos resultados con los parámetros químicos medidos durante el tratamiento.

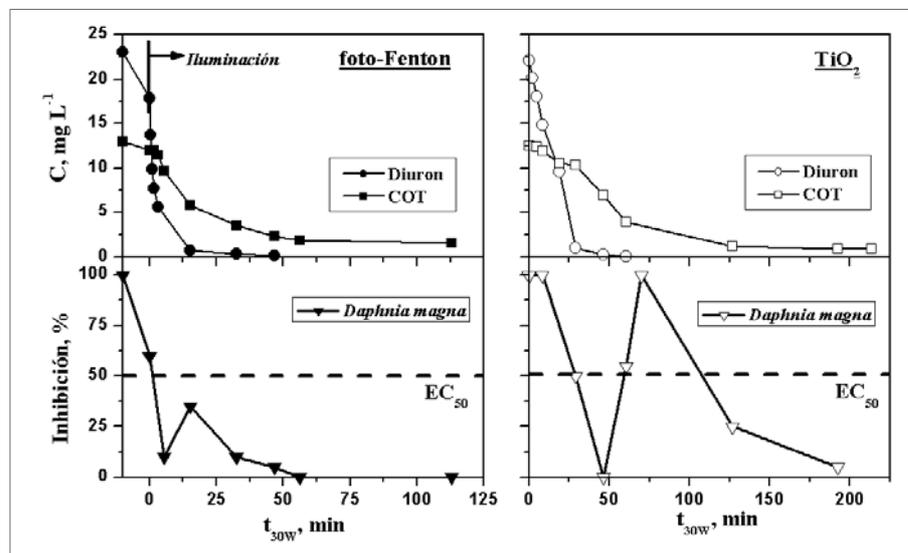
### 3.1. *Daphnia Magna*

*Daphnia* es un pequeño crustáceo de agua dulce. *Daphnia pulex* alcanza una longitud máxima de aproximadamente 3,5 mm, mientras que *Daphnia Magna* es mucho más larga y alcanza una longitud de 5 a 6 mm. Los invertebrados son seleccionados como organismos de los tests de toxicidad porque representan un eslabón intermedio en la cadena alimenticia. Estos organismos forman el zooplancton que se alimenta de algas y constituyen un eslabón importante entre los productores primarios y los peces. La especie *Daphnia Magna* es uno de los invertebrados más utilizados en los tests de toxicidad. La sensibilidad de *Daphnia Magna* a determinados contaminantes se pone de manifiesto en numerosos estudios relacionados con la evaluación toxicológica de determinados contaminantes como metales pesados, detergentes o plaguicidas [3]. La sensibilidad de *Daphnia Magna* hacia determinados compuestos, del orden de mg/L, ha hecho que éste sea un bioensayo muy utilizado en la evaluación de la toxicidad de los contaminantes en aguas. La presencia de agentes tóxicos en el medio puede afectar al sistema nervioso o digestivo de estos crustáceos, lo que se manifiesta en su capacidad de movilidad.

La figura 3 muestra la evolución de las curvas de toxicidad (% de inhibición) para los bioensayos realizados durante los tratamientos fotocatalíticos solares (foto-Fenton y TiO<sub>2</sub>) para la degradación de diurón. En este caso se han utilizado las larvas latentes de estos organismos (efipias) procedentes de un kit comercial (Toxkit Daphtoxkit®) incubadas en el laboratorio siguiendo el procedimiento de acuerdo con las condiciones de ensayo descritas por la guía de la OECD [4] y por la norma ISO 6341. El TiO<sub>2</sub> se

elimina por filtración, el  $H_2O_2$  mediante la adición de catalasa y el hierro por coagulación y filtración después de neutralizar las muestras. Al principio de los experimentos, la concentración inicial de diurón (22 mg/L) ha resultado tóxica, con un porcentaje de inhibición del 100%. Durante ambos fototratamientos ha sido posible evaluar el  $EC_{50}$  de los mismos, resultando ser de 2 mg/L. El  $EC_{50}$  en cada caso se determina a partir de la intersección de esta línea (concentración tóxica efectiva a la cual se produce un cambio del 50% en el parámetro de respuesta) y los datos de inhibición obtenidos durante los tratamientos fotocatalíticos. El  $EC_{50}$  corresponde a la concentración del plaguicida en este punto. En la literatura se describe un valor del  $EC_{50}$  para diurón de 12 mg/L para *Daphnia Magna* [5], pero es necesario remarcar que en este caso este valor para diurón es medido en presencia de los intermedios generados durante los tratamientos fotocatalíticos (obsérvese que para 2 mg/L diurón, el COT es de alrededor de 6-7 mg/L). Además, también hay que hacer hincapié en que se originan compuestos tóxicos después de la desaparición completa de diurón (alrededor de 35 min para foto-Fenton y 75 min para  $TiO_2$ ). Se puede apreciar que la toxicidad es superior en el caso del tratamiento con  $TiO_2$ . Esto puede deberse a diferentes efectos o a todos al mismo tiempo: (i) los intermedios generados pueden ser diferentes, (ii) la concentración de los intermedios tóxicos puede ser distinta, (iii) la muestra analizada en el caso del foto-Fenton puede haber sido tomada un poco antes o un poco después del máximo de toxicidad. Este efecto de toxicidad se elimina del medio después de unos minutos más de foto-tratamiento ya que la toxicidad se reduce.

**Figura 3.** Degradación mediante TAOs de diurón y COT (arriba) y evolución de la toxicidad (abajo).



Comparando los resultados de toxicidad y la liberación de heteroátomos procedentes del diurón (cloruro y amonio) se puede deducir que los intermedios responsables del aumento de la toxicidad, no son compuestos clorados, ya que todos los cloruros han sido liberados antes de la aparición de estos compuestos. Es más, no se han detectado intermedios aromáticos en dicho momento del tratamiento. También

se muestra en la figura 3 que la concentración de COT en ese momento es casi la misma, habiéndose confirmado por Cromatografía Iónica que el 50% de ese COT corresponde a ácidos carboxílicos. Atendiendo a todas estas consideraciones, se puede deducir que uno o más compuestos desconocidos y muy tóxicos (alta toxicidad a muy baja concentración) se forma al final del TAO. Esto demuestra que un control completo del proceso de degradación debe ser garantizado para demostrar la viabilidad del tratamiento mediante TAOs de un agua contaminada.

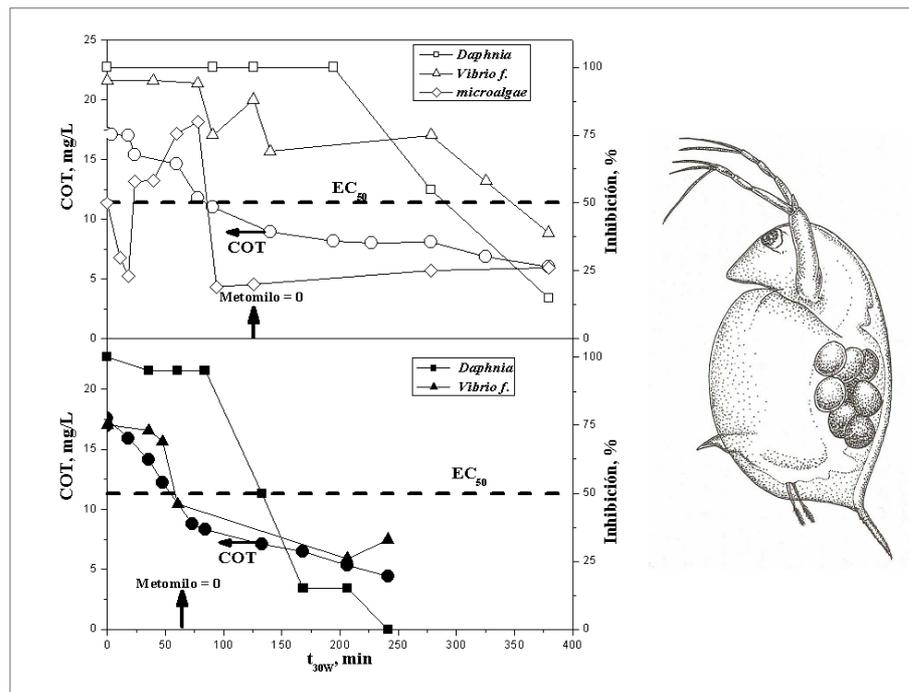
### 3.2. *Vibrio Fischeri*

Los bioensayos de bacterias bioluminiscentes son tests de inhibición metabólica que usan una suspensión estandarizada de bacterias luminiscentes bajo condiciones estándares. Los bioensayos de bacterias bioluminiscentes han sido validados para una gran variedad de aplicaciones medioambientales incluyendo la monitorización de efluentes, el análisis de sedimentos, de residuos peligrosos, aseguramiento de la eficiencia de procesos biológicos de depuración, y biomonitorización en general. Las bacterias luminiscentes tienen varios atributos que respaldan su uso para bioensayos de toxicidad. Su pequeño tamaño (menor que un micrómetro de diámetro) proporciona una relación superficie / volumen muy alta. Este hecho, así como su morfología relativamente sencilla y su carencia de compartimentación en las funciones internas, proporcionan muchos sitios activos en o cerca de la membrana citoplasmática. Ciertas especies de bacterias luminiscentes invierten parte de su energía respiratoria en una ruta metabólica específica que convierte la energía química en luz visible. Esta ruta está intrínsecamente ligada a la respiración; algún cambio en la respiración celular o alguna disfunción de la estructura de la célula lleva a un cambio en la respiración con un consecuente cambio en la cantidad de bioluminiscencia. En los bioensayos con bacterias luminiscentes, la luz que emiten es medida bajo condiciones estándares. Si estos organismos son sometidos a una determinadas condiciones (exposición de los organismos a muestras procedentes de TAOs) durante un tiempo específico y la luz emitida entonces es nuevamente medida, la reducción de la luminiscencia es esencialmente proporcional a la toxicidad de dichas muestras. El bioensayo (Biotox®) basado en la actividad bioluminiscente de la bacteria *Vibrio Fischeri*, es similar al bioensayo conocido como Microtox®, que utiliza la bacteria *Photobacterium Phophoreum*, regulándose ambos de acuerdo con la misma norma (ISO 11348).

La figura 4 muestra la evolución de la toxicidad en dos bioensayos aplicados en función del tiempo de iluminación ( $t_{30w}$ ) durante experiencias largas de degradación de metomilo con  $TiO_2$  y foto-Fenton. Estos resultados pretenden remarcar la importancia de utilizar diferentes métodos de evaluación de la toxicidad, con el objetivo de aumentar la fiabilidad de los resultados en la medida de lo posible. En este caso los experimentos han sido extendidos en el tiempo hasta que todos los bioensayos de toxicidad mostraron un porcentaje de inhibición por debajo del umbral de cada uno, es decir, por debajo del  $EC_{50}$ , ya que en ese instante el agua tratada puede ser considerada no tóxica. Los resultados para los dos bioensayos aplicados muestran que con foto-Fenton, después de 125 min de tratamiento, se reduce la toxicidad por debajo del 50% de inhibición, pero con  $TiO_2$  es claramente más lento, ya que solo después de 350 min de tratamiento se reduce la toxicidad por debajo del 50% de inhibición. Esta importante

diferencia entre ambos tratamientos fotocatalíticos en cuanto a la evolución de la toxicidad no es tan clara si solo se comparan los resultados de los análisis químicos realizados del compuesto original y TOC. En todo caso, para un valor de COT de 5 mg/L todos los bioensayos realizados muestran valores del porcentaje de inhibición por debajo del 50%. En todos los bioensayos de toxicidad aguda aplicados se observa un porcentaje de inhibición mayor del 50% después de haber obtenido la cantidad estequiométrica de sulfato y amonio. Se han utilizado los valores de COT para calcular el  $EC_{50}$  puesto que el metomilo ya había sido degradado cuando los bioensayos todavía mostraban porcentajes de inhibición mayores del 50%. Los resultados obtenidos con *Daphnia Magna* muestran un comportamiento similar para ambos tratamientos, en los que el porcentaje de inhibición es superior al 50% hasta que el COT es menor de 7,5 mg/L. Pero *Vibrio Fischeri* muestra un comportamiento distinto para cada tratamiento. Más aún, puede apreciarse que cuando los valores de COT son similares, los intermedios formados en los dos tratamientos tampoco son iguales, ya que los valores de la toxicidad medidos son claramente diferentes.

**Figura 4.** Evolución de la mineralización de metomilo (ejes izquierdos) y toxicidad (ejes derechos). Símbolos sólidos: foto-Fenton. Símbolos abiertos:  $TiO_2$ . Se incluye también un dibujo del crustáceo *Daphnia Magna*.



### 3.3. Biodegradabilidad

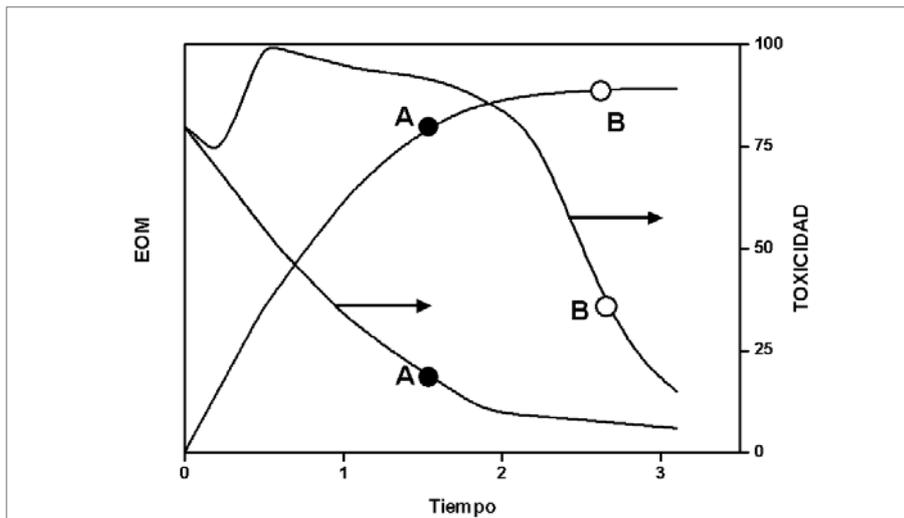
Los procesos biológicos constituyen una de las técnicas de tratamiento más sencillas y económicas, y por tanto puede tener pleno sentido su acoplamiento con TAOs debido a que la degradación de contaminantes no biodegradables normalmente trae aparejada tanto la reducción de la toxicidad como al aumento de la biodegradabilidad. Existen diferentes parámetros para estimar o medir la biodegradabilidad de un agua determinada. Uno de estos parámetros es la relación

existente entre la Demanda Bioquímica de Oxígeno y la Demanda Química de Oxígeno (DBO/DQO), que nos indica qué parte del contenido químico oxidable de un agua es susceptible de ser eliminada por acción de microorganismos. Un valor superior a 0,5 es considerado como indicador de biodegradabilidad aceptable. Otro de estos parámetros es el denominado Estado de Oxidación Medio (EOM), que se puede calcular mediante la ecuación (2) [6], donde el COT (Carbono Orgánico Total) y la DQO (Demanda Química de Oxígeno) están expresados en moles de C L<sup>-1</sup> y moles de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, respectivamente.

$$\text{EOM} = 4 \times \left( \frac{\text{COT} - \text{DQO}}{\text{COT}} \right) \quad (2)$$

EOM varía entre +4 (para el CO<sub>2</sub>, el estado más oxidado posible del carbono), y -4 (para el CH<sub>4</sub>, su estado más reducido). El EOM varía en función del tiempo de tratamiento e indica el grado de oxidación de los distintos compuestos orgánicos existentes en el agua y, cuando es aplicado a procesos de Oxidación Avanzada, puede servir para determinar el momento óptimo de transferencia a un tratamiento biológico. La figura 5 muestra la evolución típica del EOM para aguas conteniendo contaminantes no biodegradables y/o tóxicos tratadas mediante TAOs. Puede apreciarse que, después de un periodo inicial en el que crece rápidamente, se alcanza una fase en la que el EOM crece ya muy lentamente, lo que sugiere que la naturaleza química de los compuestos intermedios generados no varía significativamente. Como también se muestra, se tienen dos situaciones extremas posibles con respecto a la evolución de la toxicidad, que representan los momentos en los que se podría transferir el agua a un tratamiento biológico. El punto A indica el momento en el que EOM es prácticamente constante, pero además la toxicidad es baja. El punto B indica el momento idóneo de tratamiento biológico si se produce un aumento inicial de la toxicidad durante el proceso de degradación (similar a lo reflejado en figura 3). En este caso, es importante que el tratamiento fotocatalítico sea lo suficientemente largo para poder eliminar esa toxicidad.

**Figura 5.** Evolución habitual del Estado de Oxidación Medio y de la Toxicidad (se muestran dos situaciones típicas) durante la aplicación de un TAO a aguas conteniendo contaminantes.



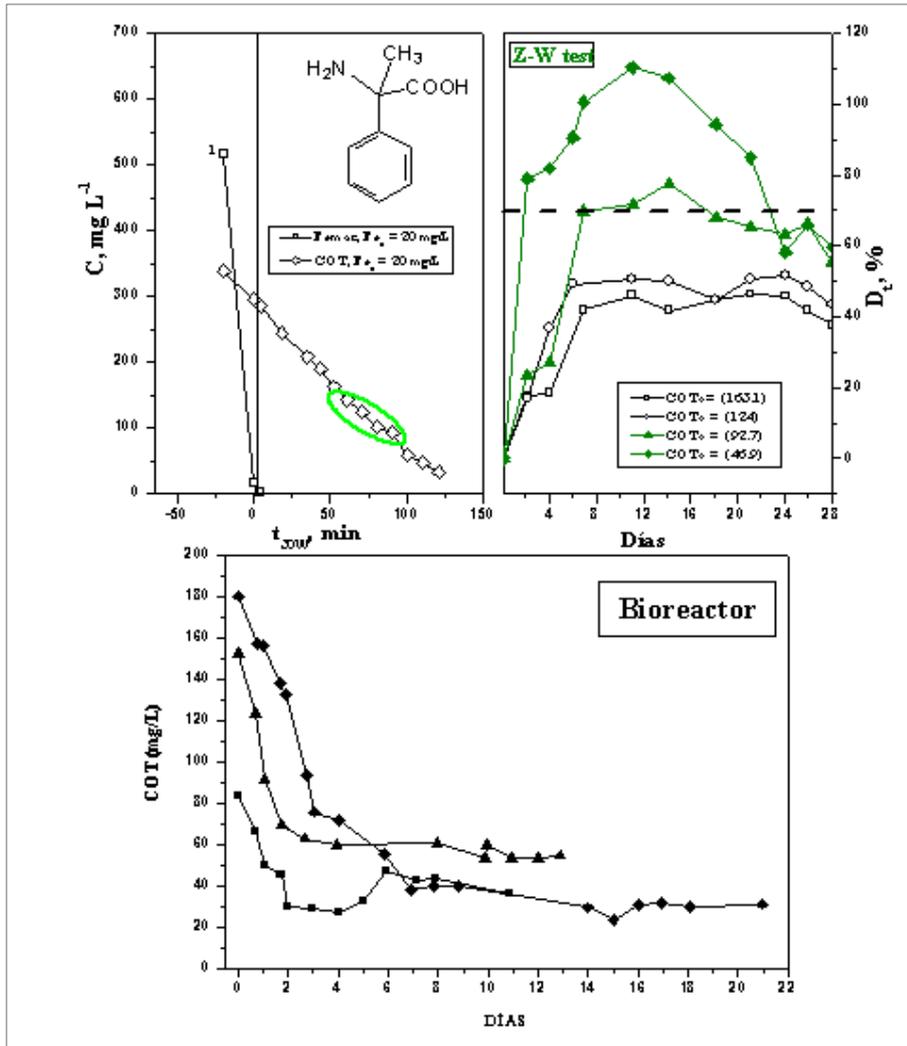
Evidentemente, las conclusiones anteriores no bastan para poder asegurar la biodegradabilidad de un agua pre-tratada con TAOs. Es necesaria la aplicación de metodologías específicas para evaluar la DBO y la biodegradabilidad real. Como las que a continuación se comentan son lentas (días o semanas) es conveniente elegir las muestras para su aplicación a partir de datos de toxicidad, DQO y TOC, que son medidas muy rápidas (minutos u horas), con la estrategia ya comentada. Es necesario remarcar que estas técnicas suelen proporcionar resultados conservadores. Es decir, que un bioreactor industrial suele dar mejores resultados (es capaz de biodegradar mejor que lo que pueden indicar la DBO o la medida de la biodegradabilidad) en la práctica. La técnica de la DBO está muy estandarizada, existen equipos en el mercado especialmente diseñados con este fin y consiste básicamente en lo siguiente. A partir de medidas de DQO o de COT se predicen los resultados máximos de DBO que se van a obtener y, por tanto, el volumen de muestra a emplear en las medidas. El método además exige réplicas para un cálculo estadístico fiable. Las muestras se inoculan con fangos activados procedentes de depuradora de aguas municipal y además se suele adicionar medio mineral que proporcione los nutrientes necesarios a las bacteria para su metabolismo. El manual suministrado con los equipos de DBO recoge la información necesaria para ello. El método habitual suele precisar 5 días, y a partir de ahí ya se puede obtener un resultado de DBO (habitualmente en mg de oxígeno por litro) que podremos utilizar para prever biodegradabilidad al contrastarlo con el resultado de DQO.

Sin embargo, el test denominado de Zahn-Wellens (Z-W), que está también estandarizado (protocolo de la Unión Europea, Directiva 88/302/EEC), es mucho más recomendable (con el objetivo de prever biodegradabilidad) que la DBO por diferentes razones. Por un lado porque el procedimiento es similar a lo que sería el comportamiento de un reactor biológico con fangos activados (ver descripción del método más abajo), permitiendo incluso una adaptación de la biomasa a los compuestos que forman parte de la muestra ya que el procedimiento se extiende durante 28 días. Por otro lado, la eficiencia de la biodegradación se evalúa mediante COT, lo cual asegura la precisión de los resultados. Z-W tiene como principales inconvenientes que no es aplicable a compuestos volátiles o semivolátiles o a compuestos con solubilidad en agua inferior a 50 mg de carbono por litro. En este procedimiento se ponen en contacto fangos activados (preferentemente de aquella depuradora que va a recibir nuestras aguas o de una depuradora municipal convencional), medio mineral de nutrientes y el compuesto en estudio como la única fuente de carbono, mezclados en una solución acuosa se mantienen con correcta aireación (y agitación) durante 28 días (20-25°C) y en la oscuridad. El seguimiento de la concentración de carbono orgánico total permite determinar el % biodegradabilidad en cada momento a partir de la ecuación (3), donde  $D_t$  es % de biodegradabilidad a tiempo  $t$ ,  $C_a$  es el COT (mg/L) de la muestra medido tres horas después del inicio del experimento,  $C_t$  es el COT medido a tiempo  $t$  (suele hacerse una medida por día),  $C_b$  es el COT de un blanco (que contiene únicamente fangos y agua, y cuyo objetivo es evaluar el COT producido por el metabolismo de la biomasa) medido a tiempo  $t$  y  $C_{ba}$  es el COT del mismo blanco medido tres horas después del inicio del experimento. Se considera el 70% de

biodegradabilidad el umbral a partir del cual el compuesto se puede considerar como biodegradable.

$$D_t = \left[ 1 - \left( \frac{COT_t - COT_b}{COT_a - COT_{ba}} \right) \right] \times 100 \quad (3)$$

**Figura 6.** Tratamiento de agua conteniendo un contaminante no biodegradable mediante combinación de foto-Fenton y reactor biológico.



En la figura 6 se muestra un ejemplo de lo anteriormente expuesto. Primero se aplica un tratamiento mediante foto-Fenton a un agua conteniendo 500 mg/L de un compuesto no biodegradable. A un grupo de muestras seleccionadas (en función de medidas de COT, HPLC-UV, iones inorgánicos y toxicidad) se les aplica el método de Z-W para evaluar su biodegradabilidad, demostrándose que en un intervalo de tiempos de tratamiento entre 50 y 75 minutos se ha conseguido aumentar la biodegradabilidad sustancialmente, alcanzándose el 70% de biodegradabilidad en

algunos días. De hecho, incluso los resultados que indican menos del 70% de biodegradabilidad pueden ser exitosos en un bioreactor real. Tal cual se muestra en el gráfico inferior de la figura 6, los resultados obtenidos mediante el método de Z-W nos ayudan a decidir un intervalo de tiempos de tratamiento y, por tanto, de nivel de degradación de un contaminante o mezcla de ellos con un margen suficiente para que el diseño de planta de TAOs y el subsiguiente biotratamiento pueda ser decidido con amplios márgenes de seguridad.

#### 4. Técnicas analíticas avanzadas

Desde un punto de vista analítico, la tarea que entraña mayor dificultad es, sin duda, la evaluación cualitativa y cuantitativa de los intermedios o productos de degradación (PDs). Como los radicales hidroxilo no son selectivos en sus ataques, se forman numerosos PDs en el camino hacia la completa mineralización de los contaminantes inicialmente presentes en las aguas a tratar. El análisis químico de estas complejas mezclas de reacción es dificultoso, de ahí que, en la mayoría de los casos donde los TAOs se han aplicado, no se haya prestado atención a la identificación de estos compuestos y la evaluación analítica se haya limitado al seguimiento de la desaparición del contaminante inicial, combinado con el seguimiento de la disminución del COT y la aparición de iones inorgánicos. De este modo se evalúa la cinética de degradación de los contaminantes y la velocidad de mineralización obtenida a lo largo del proceso. Sin embargo, sería necesario un mayor conocimiento de los PDs originados, ya que en muchos casos, esto puede ayudar a clarificar los resultados obtenidos mediante las técnicas descritas en la sección 2. Varios problemas aparecen durante una adecuada evaluación analítica de los PDs:

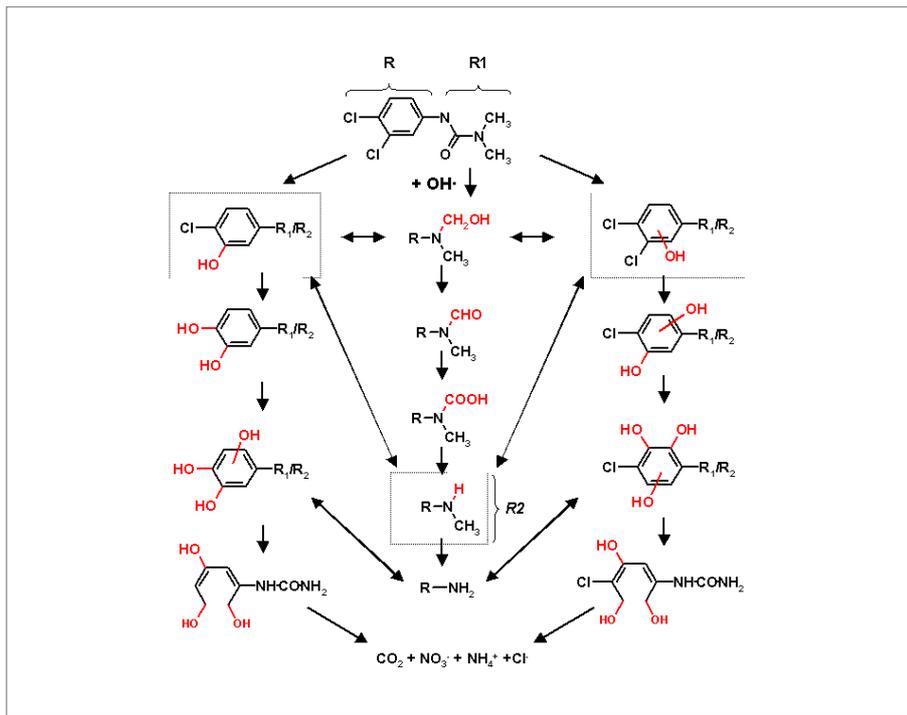
- El número de PDs generados es habitualmente alto y el intervalo de concentración amplio.
- Presentan propiedades químicas muy diferentes, sobre todo en lo que se refiere a polaridad.
- La identificación y evaluación cuantitativa de éstos es difícil debido a la ausencia de patrones analíticos disponibles en el mercado.

Por lo tanto, el análisis de mezclas de reacción conteniendo uno o varios contaminantes y sus PDs, requiere disponer de métodos analíticos que permitan la separación e identificación de gran número de compuestos, con muy diferentes propiedades químicas y presentes en un amplio intervalo de concentraciones. En la práctica, esto es posible mediante el empleo de sofisticadas herramientas analíticas, tales como: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC-HRMS); espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN); espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR); cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS); etc. Por su aplicabilidad y características de operación, las técnicas de GC-MS y LC-MS (que suelen ser complementarias) y su uso combinado supone una buena opción para un trabajo analítico rápido, aún cuando no sea posible una asignación definitiva de la estructura química de todos los PDs presentes. Evidentemente, tanto los métodos basados en GC-MS como en LC-MS precisan de disponer de estas sofisticadas herramientas analíticas y, de unos conocimientos técnicos muy especializados. Por tanto, en estas

secciones de este capítulo únicamente se darán unas nociones básicas que pueden permitir que el lector conozca estas técnicas y su utilidad al evaluar TAOs.

Además de la técnica analítica en sí, es fundamental contar con procedimientos adecuados de tratamiento de muestra para poder extraer y/o concentrar los PDs. Esta extracción debe permitir preconcentrar las muestras entre 10 y 50 veces, de forma que sean detectables compuestos minoritarios que, aunque presentes a concentraciones bajas ( $\mu\text{g/L}$  o menor), pueden tener importancia desde el punto de vista de la toxicidad.

**Figura 7.** PDs generados durante el tratamiento mediante TAOs ( $\text{TiO}_2$  y foto-Fenton) de diurón. Las estructuras se han determinado y cuantificado utilizando de manera combinada diferentes cartuchos de SPE e inyectando las muestras en LC-MS y GC-MS.



Sin embargo, disponer de un método de extracción adecuado, capaz de recuperar un elevado número de compuestos con propiedades químicas que pueden ser muy diferentes, no es tarea fácil. El método mayoritariamente aplicado ha sido la extracción líquido-líquido (ELL) con disolventes orgánicos adecuados, como acetato de etilo, diclorometano, éter dietílico, etc. Sin embargo, esta técnica presenta serias limitaciones, que incluyen pérdida de los compuestos más polares al desechar la fase acuosa y presencia de elevadas interferencias de matriz en los extractos, al tratarse de una técnica poco selectiva [7]. Desde un punto de vista práctico, la ELL presenta también importantes desventajas, como la dificultad de romper las emulsiones que pueden formarse durante la extracción y la necesidad de incluir diversas etapas en el proceso de extracción. Por todo ello, en los últimos años están ganando aceptación las técnicas de extracción en fase sólida (SPE, del inglés, Solid Phase Extraction). Estas técnicas, más selectivas, originan menos interferencias de matriz, lo que constituye una importante ventaja para el posterior análisis por GC-MS.

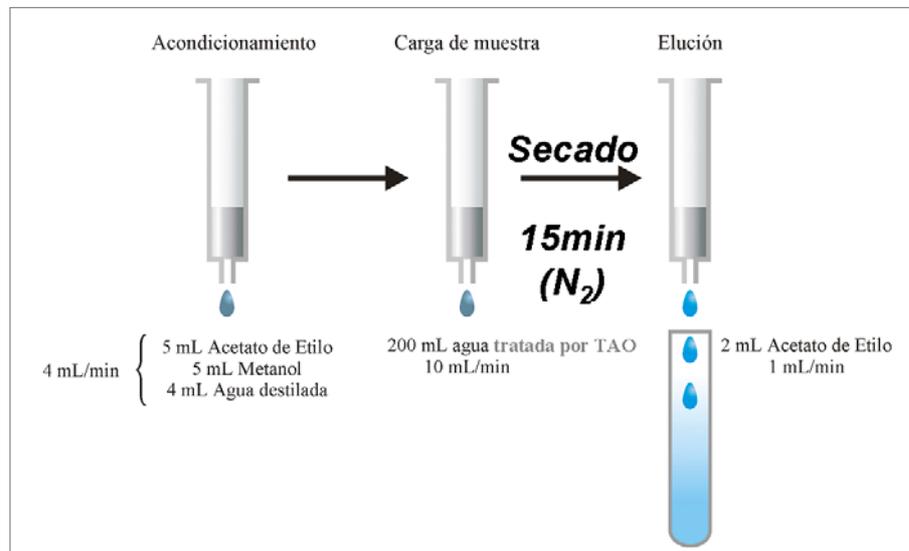
Por otro lado, existe en el mercado una amplia gama de adsorbentes, como las sílices enlazadas con cadenas alquílicas (C-18), polímeros porosos (estireno-divinilbenceno, PRP-1 o PLRP-S) o carbón modificado (PGC). Esto nos permite seleccionar adsorbentes adecuados para la determinación de analitos dentro de un mayor intervalo de polaridades.

#### 4.1. Extracción en fase sólida

Aunque el C-18 es el material más utilizado en la extracción de muestras acuosas, y recupera eficientemente un gran número de contaminantes, su aplicación al estudio de intermedios en mezclas de reacción presenta algunas limitaciones como i) escasa capacidad de retención para compuestos de elevada polaridad e ii) inestabilidad del adsorbente a valores de pH entre 2 y 10. Ambos aspectos representan un serio problema para la extracción de los metabolitos generados en los TAOs ya que éstos presentan a menudo mayor polaridad que los plaguicidas iniciales y pueden encontrarse en forma ionizada. La ventaja de los nuevos materiales poliméricos sobre los materiales de C-18 estriba en que pueden ser utilizados en un intervalo de pH más amplio sin descomposición del adsorbente y presentan mayor capacidad para retener compuestos polares. Así, analitos como fenol, compuestos ácidos o derivados de aminas aromáticas son recuperados más eficientemente con estos materiales [8].

Una ventaja adicional de la SPE consiste en la posibilidad de diseñar esquemas de extracción secuencial, utilizando diferentes adsorbentes y modificando adecuadamente el pH de las muestras [9]. La aplicación de esta técnica permite la extracción conjunta de un gran número de compuestos con polaridades muy diferentes. A modo de ejemplo, un posible esquema consistiría en hacer inicialmente una extracción con C-18 a pH 7, para recuperar compuestos hidrófobos neutros. Seguidamente, el volumen eluido por la fase C-18, a pH 7, puede ser pasado a través de un adsorbente polimérico, que permita retener compuestos de polaridad intermedia. Durante una tercera y cuarta etapa, las muestras pueden ser acidificadas a pH 4.5 y pH 2.5, respectivamente, para extraer la mayoría de compuestos ácidos mediante un adsorbente polimérico o de carbón.

Figura 8. Ejemplo de procedimiento de manejo de una muestra mediante SPE.



Finalmente, un último problema lo constituyen los PDs generados en la última fase del proceso de degradación. En general, se trata de moléculas pequeñas, de elevada polaridad, como ácidos alifáticos de menos de 4 átomos de carbono (por ej.: ácido fórmico, ácido oxálico), que no son recuperadas con los métodos de SPE. En estos casos, se suele realizar una extracción con éter dietílico y posterior esterificación, previa al análisis cromatográfico, o bien se realiza el análisis directo de las muestras mediante cromatografía iónica. Cabe esperar que, la micro-extracción en fase sólida (SPME) tenga un uso importante en un futuro próximo [10].

#### 4.2. Métodos basados en GC-MS

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es, con diferencia, la herramienta de análisis más frecuente para la identificación de los PDs. Las ventajas más importantes de los métodos basados en la GC-MS son:

- Alta sensibilidad y eficiencia de separación, que evita el solapamiento de compuestos de estructuras similares.
- Elevado potencial de identificación, gracias a la abundante información estructural que proporcionan los espectros de masas.
- Posibilidad de utilizar bibliotecas comerciales de espectros que facilitan la identificación de PDs desconocidos.

La identificación de los PDs se realiza habitualmente en base a los espectros obtenidos en impacto electrónico (EI). Este modo de ionización proporciona abundante información estructural y la ventaja de poder realizar identificaciones mediante comparación con librerías de espectros comerciales o con espectros publicados en artículos de investigación. Una desventaja, sin embargo, de este modo de trabajo es que, en muchos casos, no aporta información acerca del peso molecular de los compuestos, lo que dificulta su identificación. En estos casos, la utilización combinada con el modo de ionización química (CI) puede resultar de gran ayuda. La menor fragmentación obtenida mediante esta técnica de ionización blanda, permite identificar el ión molecular protonado  $[M+1]^+$  o desprotonado  $[M-1]^-$ , confirmándose así el peso molecular de los compuestos detectados. Agüera y col., (en uno de los primeros trabajos en los que se revisa el uso de GC-MS y LC-MS para la identificación de PDs de los TAOs), ilustra hasta dónde se puede utilizar la GC-MS como una poderosa herramienta analítica para la identificación de PDs [11]. A pesar del indudable potencial de las técnicas de GC-MS en la identificación de metabolitos, existen una serie de limitaciones inherentes a la técnica, como son su limitada capacidad para analizar compuestos muy polares, de escasa volatilidad o térmicamente inestables y en especial las dificultades para cuantificar PDs en ausencia de estándares comerciales. Con el fin de ampliar el rango de compuestos que pueden ser detectados por esta técnica, en ocasiones se ha recurrido a procesos de derivación [7] previos al análisis cromatográfico. Las técnicas de derivación, pese a representar una interesante alternativa, son en general complicadas y tediosas, pueden ocasionar la degradación de algunos PDs, como consecuencia de las severas condiciones de operación aplicadas (calentamiento, pH ácido), o afectar seriamente a su recuperación, lo que hace inviable una correcta evaluación cuantitativa de los intermedios. Por otro lado, la formación de compuestos indeseados durante el proceso de derivación, como consecuencia de

la presencia en las muestras de muchos compuestos desconocidos puede complicar la interpretación de los resultados. Como consecuencia, el uso de la derivación ha sido limitado.

#### 4.3. Métodos basados en LC-MS.

Para la determinación de los PDs más polares, por ejemplo los derivados hidroxilados, la técnica analítica más adecuada es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Mediante LC-MS se ha logrado la identificación de una gran variedad de intermedios de degradación, como alternativa a GC-MS, o sobre todo como dos técnicas complementarias [12]. LC-MS está ganando aceptación progresivamente en éste área, ya que presenta interesantes ventajas sobre la Cromatografía Gaseosa, para la evaluación de los TAOs:

- El análisis directo de las muestras acuosas evita la pérdida de PDs polares durante el proceso de extracción.
- Compuestos altamente polares, menos volátiles y/o térmicamente lábiles son analizados con más facilidad que utilizando técnicas de cromatografía gaseosa.
- El proceso de inyección es poco restrictivo, respecto a GC.

Actualmente las técnicas utilizadas para la introducción y análisis de muestras líquidas por LC-MS se pueden clasificar en dos grupos: (1) las que introducen la muestra en la fuente iónica del espectrómetro de masas, como es el caso de Haz de Partículas (PB, particle beam) y (2) las que realizan una ionización suave de la muestra con la participación de la fase móvil, como thermospray (TSP) o las interfases de ionización a presión atmosférica (API). Gracias a ellos, en unos pocos años la LC-MS ha empezado a ser una técnica ampliamente aceptada en diferentes campos de aplicación, pasando a ser la técnica preferida para la identificación y cuantificación de plaguicidas y otros compuestos polares y termolábiles en el medio ambiente y en alimentos.

El papel principal de los LC-MS en los estudios de muestras procedentes de TAOs es: (i) comprobar el peso molecular de los PDs, y (ii) detectar los PDs que no son directamente manejables con técnicas GC-MS. Aunque generalmente tiene capacidad suficiente, LC-MS presenta importantes debilidades como consecuencia de la falta de información estructural que se alcanza habitualmente y una menor sensibilidad y poder de discriminación con respecto a GC-MS. Estos factores pueden a menudo impedir la identificación de PDs como consecuencia de un bajo umbral de detección o solapado de picos de compuestos con estructura química similar, que es un caso común en los TAOs.

#### Referencias

- [1]. U.S. E.P.A. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5<sup>th</sup> Edition, Office of Water, Washington D.C 20460. EPA-821-R-02-012, (2002).
- [2]. V. Sarria, S.Parra, N. Adler, P. Péringer, N. Benitez y C. Pulgarin, Recent developments in the coupling of photoassisted and aerobic biological processes for the treatment of biorecalcitrant compounds, *Catalysis Today*, 76, 301-315, (2002).
- [3]. P. Van Beelen y P. Doelman, Significance and Application of Microbial Toxicity Tests in Assessing Ecotoxicological Risks of Contaminants in Soil and Sediments, *Chemosphere*, 34 (3), 455-499, (1997).

- [4]. OECD, *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test. Guidelines for the testing of chemicals, vol I, (1995).
- [5]. C.D.S. Tomlin, *The Pesticide Manual 11th Edition*: British Crop Protection Council. Farnham, Surrey, UK, (1997).
- [6]. S. Parra, V. Sarria, S. Malato, P. Péringier y C. Pulgarin, Photochemical versus coupled photochemical–biological flow system for the treatment of two biorecalcitrant herbicides: metobromuron and isoproturon, *Applied Catalysis B: Environmental*, 27, 153–168, (2000).
- [7]. S. Chiron, A. Rodríguez y A.R. Fernández-Alba, Application of Gas and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry to Evaluate Pirimiphos Methyl Degradation Products in Industrial Water under Ozone Treatment, *J. Chromatogr. A*, 823, 97-107, (1998).
- [8]. A. Zaleska, J. Hupta, M. Wiergowski, M. Biziuk, Photocatalytic Degradation of Lindane, pp-DDT and Methoxychlor in Aqueous Environment, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 135, 213-220, (2000).
- [9]. E. Benfenati, P. Facchini, P. Pierucci, R. Fanelli, Identification of organic contaminants in leachates from industrial waste landfills, *Trends Anal. Chem.* 15, 305, (1996).
- [10]. V.A. Sakkas, D.A. Lambropoulou, T.M. Sakellarides y T.A. Albanis, Application of solid-phase microextraction for monitoring the photocatalytic decomposition of fenthion and parathion in aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions, *Anal. Chim. Acta.*, 467 (1-2), 233-243, (2002).
- [11]. A. Agüera y A.R. Fernández-Alba, GC-MS and LC-MS Evaluation of Pesticide Degradation Products Generated Through Advanced Oxidation Processes: an Overview, *Analisis*, 26 (6), 123-130, (1998).
- [12]. A. Marinas, C. Guillard, J.M. Marinas, A. Fernández-Alba, A. Agüera y J.M. Herrmann, Photocatalytic Degradation of Pesticide-Acaricide Formetanate in Aqueous Suspension of TiO<sub>2</sub>, *Applied Catalysis B: Environ.*, 34, 241-252, (2001).