



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Departamento de Hidrogeología y
Química Analítica

***DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA DE
CONTAMINANTES EMERGENTES MEDIANTE
PROCESOS SOLARES. EVALUACIÓN ANALÍTICA.***

Leónidas Armando Pérez Estrada

TESIS DOCTORAL

Mayo 2008



Ciemat Centro de Investigaciones
Energéticas, Medioambientales
y Tecnológicas



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Departamento de Hidrogeología y
Química Analítica

***DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA DE
CONTAMINANTES EMERGENTES MEDIANTE
PROCESOS SOLARES. EVALUACIÓN ANALÍTICA.***

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

LEÓNIDAS ARMANDO PÉREZ ESTRADA

Fdo. Leónidas Armando Pérez Estrada

Visado en Almería a 12 de Marzo de 2008.

LOS DIRECTORES DE LA TESIS:

Dr. D. Sixto Malato Rodríguez
Investigador Titular OPI
CIEMAT
Ministerio de Educación y Ciencia

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



Ciemat Centro de Investigaciones
Energéticas, Medioambientales
y Tecnológicas

Antes de empezar los agradecimientos valga una mención especial y agradecimiento infinito para mis Padres, León Armando y Gloria Silvia, que me educaron de la mejor manera como persona para que llegara tan lejos como mis sueños, que me inculcaron la fe en Dios, que el valor de una persona está en lo que uno es, no en lo que sabe o lo que posee, y que las mejores cosas en la vida no son cosas. A ellos que aceptan mis decisiones y nunca se reservan palabras de cariño, aliento, ánimo y consejos. A mis queridos hermanos Yoyita y Daniel, les agradezco todos los buenos momentos y las pláticas que hemos tenido, su soporte siempre ha sido muy importante para mí.

Conocimientos correctos conducen a acciones correctas.

Y sólo el que hace esto se convierte en un «ser correcto». Cuando actuamos mal es porque desconocemos otra cosa. Por eso es tan importante que aumentemos nuestros conocimientos. Buscando definiciones claras y universales de lo que está bien y de lo que está mal. La capacidad de distinguir entre lo que está bien y lo que está mal se encuentra en la razón y no en la sociedad.

¿Alguien podría vivir feliz si constantemente haces cosas que en el fondo sabe que no están bien?, ¿Crees que eso les hace felices?

Sócrates (400 a.C.)

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación es el resultado de cuatro años de investigación, la cual se desarrolló en la Plataforma Solar de Almería, en el área de Aplicaciones Medioambientales de la Energía Solar y en la Universidad de Almería, en el Grupo de Investigación de Residuos de Plaguicidas.

Primeramente quiero agradecer la gran oportunidad que me brindaron el Dr. Sixto Malato y la Dra. Ana Agüera de formar parte de sus respectivos grupos de investigación, la paciencia que mostraron sobre todo al inicio de mi estancia, así como también la manera tan clara con la que me mostraron un ritmo de investigación y trabajo muy eficiente. Sixto y Ana muchas gracias.

Quiero dar las gracias a la PSA, al Director Diego Martínez Plaza y al CIEMAT por facilitarme siempre los medios necesarios para el buen desarrollo de los experimentos presentados en el presente trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Amadeo R. Fernández-Alba, Director del Grupo de Investigación de Residuos de Plaguicidas, por la colaboración prestada para el buen desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Julián Blanco, con el que tuve el primer contacto con la PSA en 2000 y que posteriormente derivó en la realización de una tesis doctoral en este centro de investigación. A los doctores M.I. Maldonado y W. Gernjak por la colaboración prestada.

Agradezco sinceramente a las instituciones que me otorgaron una beca para realizar esta investigación doctoral, primeramente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y posteriormente a la CIEMAT, dentro del Convenio de Colaboración entre la Universidad de Almería y el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas para becas de doctorado relacionadas con líneas de investigación en la Plataforma Solar de Almería.

A una persona que tuvo una gran influencia en mi vida y me brindó toda su ayuda, soporte y cariño en todo momento, gracias Cosima.

Un gran amigo y magnífica persona que día a día se esfuerza y hace lo mejor para que todos los experimentos salgan bien, y que nunca pierde el buen ánimo ni se reserva palabras de aliento para todos, gracias Agustín.

A mis compañeros del grupo de química: Isa, Aranza, Pilar, Ana, Carla, Eli, Nick, etc. A todos los que forman o formaron parte de otros grupos de la plataforma: José, Mingo, Lidia, Cristina, Carmen, Nono, Antonio, etc.

Durante este tiempo han pasado muchas personas por la PSA que he tenido la suerte de conocer, hacer buena amistad, recibir algún consejo, ánimo o algún comentario que repercutió en la mejora de mi trabajo: Cristina, Juan, Ing. Navntoft, Jordi, Nardi, Ana García, Ana Belén, Vittorio, Giuseppe.

A mis compañeros de la Universidad de Almería: Octavio, Maria José, Milagros, Paula, Carmen, Chusa, Loli, Imma Ferrer, Mike Thurman.

Un agradecimiento al Ministerio de Educación y Ciencia, y al Ministerio de Ciencia y Tecnología por los proyectos: Efecto de la radiación solar y tratamiento mediante procesos de oxidación avanzada (**CTQ2005-09269-C02-01**), y Estudio integrado de la eliminación, vigilancia avanzada e impacto ambiental de contaminantes emergentes en la depuración de aguas residuales urbanas e industriales (**CTM2004-06265-C03-03**), respectivamente, en los cuales se enmarca el presente trabajo de investigación.

Agradezco a todas las personas que de alguna u otra manera han contribuido a lograr que estos cuatro años en Almería hayan sido muy agradables, y que no los he mencionado, siéntanse aludidos.

Leónidas.

CONTENIDO

CONTENIDO

RESUMEN	ix
OBJETIVOS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 La contaminación en el medio ambiente	1
1.2 Contaminación del agua por compuestos orgánicos y normativa actual.....	2
1.3 Fuentes de contaminación en aguas	10
1.4 Comportamiento de los contaminantes en el medio ambiente acuático: Estudios de degradación fotoquímica.....	16
1.5 Descontaminación de aguas mediante procesos de oxidación avanzada	18
1.5.1 Fotocatálisis mediante TiO ₂	21
1.5.2 Foto-Fenton.....	25
1.6 Reactores fotocatalíticos solares	28
1.7 Evaluación analítica de los procesos de degradación y técnicas analíticas aplicadas a la identificación de productos de transformación y degradación.	31
1.7.1 Carbono Orgánico Total (COT).....	32
1.7.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	34
1.7.3 Cromatografía Iónica (CI).....	35
1.7.4 Técnicas analíticas aplicadas a la identificación de productos de transformación.....	37
1.7.5 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	44
1.7.6 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	52
EXPERIMENTAL.....	71
2.1 Compuestos modelo y reactivos	71
2.2 Dispositivo experimental	72
2.2.1 Fotoreactores y procedimiento experimental.....	72
2.2.2 Fotólisis e hidrólisis	76

2.3 Métodos analíticos convencionales	77
2.3.1 Carbono Orgánico Total (COT).....	77
2.3.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	79
2.3.3 Cromatografía Iónica (IC).....	82
2.3.4 Determinación de hierro (Fe ²⁺ , Fe ³⁺ y Fe total)	85
2.3.5 Determinación de H ₂ O ₂ por tritración iodométrica	87
2.4 Técnicas analíticas avanzadas	88
2.4.1 Pretratamiento de las muestras: extracción en fase sólida (SPE).....	88
2.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	90
2.4.3 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)	91
2.5 Evaluación de la toxicidad	93
2.5.1 Bioensayo basado en la actividad bioluminiscente de la bacteria <i>Vibrio fischeri</i>	93

DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA DE DICLOFENACO EN AGUA MEDIANTE FOTÓLISIS Y FOTOCATÁLISIS. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE RUTAS DE DEGRADACIÓN

3.1 Fotólisis del diclofenaco	97
3.1.1 Identificación de productos de transformación	102
3.1.2 Ruta de degradación fotolítica	116
3.2 Descomposición del diclofenaco	117
3.2.1 Aplicación de procesos de oxidación avanzada	117
3.2.2 Tratamiento foto-Fenton en agua estándar a pH neutro.	118
3.2.3 Tratamiento foto-Fenton en agua estándar a pH 2.8	123
3.2.4 Tratamiento foto-Fenton en agua destilada sin control de pH.....	127
3.2.5 Tratamiento fotocatalítico (TiO ₂ /UV) en medio neutro.....	129
3.3 Determinación de productos de degradación y ruta de degradación de diclofenaco mediante procesos de oxidación avanzada	130
3.3.1 Tratamiento foto-Fenton.....	131
3.3.2 Identificación de productos de degradación.	134
3.3.3 Ruta de degradación.....	140

DEGRADACIÓN DE DAPIRONA MEDIANTE FOTOCATÁLISIS CON TiO₂ Y FOTO-FENTON. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA TOXICIDAD	143
4.1 Introducción	143
4.2 Estudios de hidrólisis y fotólisis	146
4.3 Tratamiento con foto-Fenton.....	149
4.4 Tratamiento mediante fotocatalisis con TiO ₂	153
4.5 Identificación de productos de degradación: análisis por GC-MS	155
4.6 Identificación de productos de degradación: análisis por LC-TOF-MS.....	157
4.7 Evaluación de la toxicidad.....	163
DEGRADACIÓN DE VERDE MALAQUITA EN AGUA MEDIANTE IRRADIACIÓN CON LUZ SOLAR NATURAL. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA Y TOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN..	167
5.1 Introducción	167
5.2 Cinéticas de degradación	170
5.3 Identificación de los productos de transformación.....	172
5.4 Ruta de transformación	178
5.5 Evaluación de la toxicidad.....	182
CONCLUSIONES	187
REFERENCIAS	195
GLOSARIO	217
ANEXO	221

Índice de Figuras

Figura 1.1: Representación de proceso fotocatalítico heterogéneo en una partícula de catalizador TiO ₂ .	23
Figura 1.2: Referencias publicadas entre 1998 y 2007 relacionadas con el proceso de fotocatalisis mediante TiO ₂ . Fuente: www.scopus.com.	24
Figura 1.3: Referencias publicadas entre 1998 y 2007 relacionadas con el proceso de foto-Fenton. Fuente: www.scopus.com.	28
Figura 1.4: Esquema de un Captador Parabólico Compuesto, y como refleja la radiación solar que llega en diferentes ángulos de incidencia.	29
Figura 1.5: Evolución del COD y de la concentración del plaguicida pirimetanil en el transcurso de un experimento de degradación mediante fotocatalisis con TiO ₂ . [Agüera et al., 2000]	33
Figura 1.6: Seguimiento de la formación de cloruros y aniones de ácidos orgánicos durante la degradación del plaguicida imidacloprid mediante foto-Fenton (símbolos huecos) y fotocatalisis con TiO ₂ (símbolos sólidos) [Malato et al., 2001]	37
Figura 1.7: Esquema de un Espectrómetro de Masas.	43
Figura 1.8: Identificación de productos de degradación del bezafibrato basada en la interpretación de los espectros obtenidos mediante GC-El-MS [Lambropoulou y col., 2008]	47
Figura 1.9: Esquema de un cuadrupolo simple.	50
Figura 1.10: Esquema en 3D de una IT, electrodos en los extremos y anillo magnético central. Los iones eyectados siguen la dirección, marcada por la flecha, hacia el detector [www.simion.com/info/Image:Sltools_view.png].	51
Figura 1.11: Espectros de masas obtenidos para el plaguicida imidacloprid a diferentes valores de voltaje de fragmentación o "fragmentor".	56
Figura 1.12: Esquema del funcionamiento de un analizador de triple cuadrupolo. Q1: filtro de masas trabajando con una masa objetivo, Q2: celda de colisión, Q3: segundo filtro de masas trabajando en modo SIM.	58
Figura 1.13: Espectros de masas obtenidos con LC-IT-MS durante la identificación de un compuesto desconocido de diuron. A) MS, B) MS ² y C) MS ³ .	60
Figura 1.14: Esquema de los componentes de un analizador de masas de triple cuadrupolo con trampa lineal.	61
Figura 1.15: Detalle del funcionamiento de una trampa lineal.	63
Figura 1.16: Esquema de los componentes en un detector de Tiempo de Vuelo.	65
Figura 1.17: Ejemplo de la identificación de dos fármacos (codeína y acetaminofén), donde se obtuvieron errores menores a 1.5 ppm (0.5 mDa).	66
Figura 1.18: Espectros de masa exacta, obtenidos en LC-TOF-MS, para el benzafibrato, y algunos de los intermedios más relevantes identificados [Lambropoulou et al., 2008].	68
Figura 1.19: Esquema representativo de los componentes de un Q-TOF.	70
Figura 2.1: Esquema e imagen de los reactores solares fotocatalíticos.	73
Figura 2.2: Ejemplo de un experimento de degradación solar. (a) concentración contra el tiempo de experimentación, (b) concentración contra Q.	76
Figura 2.3: Imagen del analizador de COT. (a) Módulo de COT y (b) Automuestreador.	78
Figura 2.4: Datos de calibración del equipo en los rangos de concentraciones de CT y CIT utilizados en esta Tesis.	79
Figura 2.5: Imagen del HPLC Agilent serie 1100 (a). Detalle de los módulos (b): automuestreador, columna, y detector UV-VIS (DAD).	81
Figura 2.6: Sistema de IC Dionex utilizado. DX120 (cationes), DX600 (aniones/ácidos orgánicos) y automuestreador.	83
Figura 2.7 (a): Cromatograma del patrón de referencia de cationes.	84
Figura 2.7 (b): Cromatograma del patrón de referencia de aniones.	84
Figura 2.7 (c): Cromatograma del patrón de referencia de ácidos carboxílicos.	85

Figura 2.8: Complejo quelato de hierro y fenantrolina. (a) estructura molecular en 2D, (b) Estructura molecular en 3D.	86
Figura 2.9: Sistema utilizado para la pre-concentración de muestras con SPE.	89
Figura 2.10: GC-MS Agilent 6890, con un MSD 5973 inert.	91
Figura 2.11: TOF-MS Agilent	93
Figura 2.12: Fotografía de bacterias <i>Vibrio fischeri</i> .	94
Figura 2.13: Imagen de un luminómetro ToxAlert 100 de MERCK®	95
Figura 3.1: Espectro UV de 200 – 400 nm del diclofenaco (a pH 3 y 10) comparado con el espectro UV solar registrado en la Plataforma Solar de Almería.	98
Figura 3.2: Cinética de la desaparición del diclofenaco por fotólisis, y evolución del COT durante el experimento. A) Disolución recién preparada de diclofenaco en agua. B) Disolución al final del experimento.	101
Figura 3.3: Cromatograma obtenido mediante el análisis por GC-EI-MS de una disolución de diclofenaco tras tres días de exposición solar, donde se identifican seis productos de la degradación. El ejemplo del espectro de masas, en full-scan, corresponde al compuesto C-5.	105
Figura 3.4: Resultado obtenido de la búsqueda en la base de datos Wiley275 del compuesto C-8, de la Figura 3.3. A) Espectro de masas de referencia, B) Espectro de masas de la muestra.	107
Figura 3.5: Espectro de masas obtenido mediante PCI, utilizando metano como gas reactivo. En el espectro se observa la presencia de dos secuencias de iones características, las cuales se muestran en azul y rojo.	107
Figura 3.6: Selección de iones, provenientes del cromatograma PCI, con la cual se detecta la co-elución de dos compuestos a un tiempo de retención muy próximo.	108
Figura 3.7: Una vez detectada la co-elución de ambos compuestos, se procedió a identificarlos en base a sus correspondientes espectros de masas en EI.	109
Figura 3.8: Cromatograma LC-TOF-MS obtenido en modo negativo y espectro de masas utilizado para identificar al compuesto C-13 (8-clorocarbazol-1-ácido fórmico).	111
Figura 3.9: Espectro de masas del compuesto C-13, donde se muestran los posibles resultados, formulas empíricas y errores asociados a la masa exacta señalada. Se ha insertado la estructura de la formula empírica de este compuesto.	112
Figura 3.10: Esquema de la ruta propuesta de foto-transformación del diclofenaco, por el efecto de la exposición a la radiación solar.	115
Figura 3.11: Especies de hierro férrico presentes en solución acuosa a diferentes valores de pH. Constantes de equilibrio [Flynn, 1984], gráfica [Gernjak, 2006].	120
Figura 3.12: Tratamiento Foto-Fenton en agua estándar a pH neutro, a diferentes concentraciones de hierro (0.05, 0.075, 0.2, 0.75) mM. Comparación de (a) concentración de diclofenaco y consumo de peróxido, y (b) Carbono orgánico disuelto (COD).	121
Figura 3.13: Tratamiento Foto-Fenton de diclofenaco en agua estándar a pH 2.8, concentración de hierro 0.075 mM.	124
Figura 3.14: Tratamiento Foto-Fenton de diclofenaco en agua estándar a pH 2.8, a diferentes concentraciones de hierro (0.03, 0.075, 0.3 y 0.75 mM). (a) Evolución de cloruro, (b) Evolución de amonio, (c) Consumo de peróxido de hidrógeno. No se detectó consumo de peróxido antes de iniciar la iluminación.	126
Figura 3.15: Tratamiento Foto-Fenton de diclofenaco en agua destilada, con un pH inicial de 7 y una concentración de hierro de 0.05 mM.	128
Figura 3.16: Tratamiento fotocatalítico (TiO_2 , 0.2 g L^{-1}) en agua estándar, sin control de pH.	130
Figura 3.17: Evolución de la concentración de diclofenaco (50 mg/L), COD y del pH con el tiempo de iluminación, durante el tratamiento con foto-Fenton (concentración de Fe^{2+} 0.05 mM).	132
Figura 3.18: Evolución de Cloruro y Amonio durante el proceso foto-Fenton.	133
Figura 3.19: Cromatograma obtenido mediante LC-(ESI+)TOF-MS correspondiente al análisis de un extracto de la mezcla de reacción tras 10 min de tratamiento con	

foto-fenton. En él se muestran los PTs identificados y los espectros de masas, de los compuestos D1 y D2.	136
Figura 3.20: Ruta de degradación propuesta para la degradación del diclofenaco por medio del tratamiento foto-fenton.	139
Figura 3.21: Evolución de los principales productos de degradación (B), durante el proceso foto-Fenton. A) Evolución del diclofenaco y el carbono orgánico disuelto, C) Ácidos carboxílicos detectados.	140
Figura 4.1: Estructura química de (a) Dipirona como sal sódica, (b) 4-MAA principal metabolito hidrolizado.	144
Figura 4.2: Metabolitos de la Dipirona producidos naturalmente en el cuerpo humano [Gómez et al., 2007].	145
Figura 4.3: Cromatogramas superpuestos de HPLC-DAD ($\lambda = 254$ nm) dónde se muestran los resultados de la hidrólisis de dipirona (muestras tomadas cada 10 minutos) y su transformación en MAA.	147
Figura 4.4: (a) Comportamiento del COD y el pH durante la fotólisis del MAA. (b) Espectro solar en la superficie terrestre y espectro de absorción de MAA.	148
Figura 4.5: Degradación de MAA utilizando 20 mg/L de Fe^{2+} . Se muestra también el consumo de H_2O_2 durante el tratamiento.	150
Figura 4.6: (a) Cinética de degradación del MAA con el proceso foto-Fenton, utilizando 2 mg/L de Fe^{2+} . (b) Evolución de los principales ácidos carboxílicos y especies inorgánicas detectadas.	151
Figura 4.7: (a) Cinética de la degradación del MAA por medio de fotocatalisis con TiO_2 (200 mg/L). (b) Evolución de los principales ácidos carboxílicos y especies inorgánicas detectadas.	154
Figura 4.8: Cromatograma típico de GC-MS de un muestra tomada después de 10 min de tratamiento fotocatalítico con TiO_2 .	157
Figura 4.9: Cromatograma obtenido mediante LC-TOF-MS después de 15 min. de tratamiento fotocatalítico (TiO_2/UV), donde todos los productos de degradación identificados están presentes.	158
Figura 4.10: Espectro de masa en LC-TOF-MS del compuesto D3, sus fragmentos de ionización con la masa exacta detectada y las estructuras con la masa exacta teórica.	160
Figura 4.11: Ruta de degradación del MAA, durante el tratamiento fotocatalítico.	161
Figura 4.12: Evolución de los PDs mas importantes, formados durante el tratamiento fotocatalítico.	162
Figura 4.13: Evolución de la toxicidad y del carbono orgánico disuelto (COD) durante el tratamiento con foto-Fenton.	164
Figura 4.14: Evolución de la toxicidad y del carbono orgánico disuelto (COD) durante el tratamiento fotocatalítico.	165
Figura 5.1.: Estructura química de la sal del Verde Malaquita Oxalato.	168
Figura 5.2: Evolución del VM, COD y pH durante el experimento de fotólisis, radiación UV global promedio = $24.2 W \cdot m^{-2}$.	171
Figura 5.3: Cromatograma de iones totales obtenido mediante LC-(ESI)TOF-MS, donde son visibles 15 de los PTs identificados.	173
Figura 5.4: Espectro de masa exacta del Verde leucomalaquita (VLM), en el cual se observa la presencia simultánea de los iones $[M+H]^+$ y $[M+2H]^{2+}$.	176
Figura 5.5a: Ruta de transformación (I) y PTs propuestos. Los compuestos marcados con * se detectaron solo ocasionalmente.	179
Figura 5.5b: Rutas de transformación (II) y (III) y PTs propuestos.	180
Figura 5.6: Cinética de los PTs de la ruta de transformación (I) propuesta.	181
Figura 5.7: Curva de calibración para el $EC_{50, 30 \text{ min}}$ del compuesto D20. Ajustada a una curva sigmoideal de Dosis – Efecto ($r^2 = 0.99986$).	183
Figura 5.8: Cinética del compuesto D20 y el VM, durante la fotodegradación.	185

Índice de Tablas

Tabla 1.1A: Contaminantes considerados como “emergentes” hoy en día [Barceló, 2003].	4
Tabla 1.1B: Lista de Substancias Prioritarias (33) y de otros contaminantes (8) incluida en propuesta de Directiva de Substancias Peligrosas, (COM(2006) 397 final) (*)	6
Tabla 1.2: Algunos de los AOPs más conocidos.	21
Tabla 1.3: Tipos de adsorbentes más utilizados y sus estructuras.	40
Tabla 1.4: Revisión de métodos de LC-MS empleados en la identificación de PTs en procesos de transformación fotoquímica de fármacos [Petrovic y Barceló, 2007]	54
Tabla 2.1: Composición de la fase móvil utilizada para cada compuesto	80
Tabla 2.2: Método para la determinación de aniones.	82
Tabla 2.3: Método para la determinación de ácidos orgánicos.	82
Tabla 3.1: Resultados de los experimentos de fotólisis, expresados en % de desaparición del diclofenaco.	102
Tabla 3.2: Datos de masa exacta, error y fórmula empírica obtenidos para los productos de transformación del diclofenaco identificados por TOF-MS.	113
Tabla 3.3: Medidas de Masa Exacta obtenidas de los espectro LC-TOF-MS, de los productos de degradación protonados identificados.	137
Tabla 4.1: Concentraciones medias y más altas de los metabolitos de la dipirona encontradas en aguas residuales y medioambientales	146
Tabla 4.3: Información sobre los compuestos detectados por GC-MS.	156
Tabla 4.4: Información analítica obtenida mediante LC-TOF-MS, a partir de los espectros de masa exacta de los PDs identificados.	159
Tabla 5.1: Tiempos de retención y medidas de masa exacta obtenidas de los espectros del LC-TOF-MS para los productos de transformación identificados.	175
Tabla 5.2: Tiempos de retención e información estructural de los productos de transformación del VM identificados por GC-MS.	177

RESUMEN

RESUMEN

Los resultados y discusión contenidos en esta Tesis pretenden proporcionar una metodología analítica para evaluar adecuadamente procesos de fotodegradación solar de contaminantes en agua y procesos avanzados de oxidación (fotocatálisis mediante TiO_2 y foto-Fenton) llevados a cabo utilizando radiación solar. Para ello se han elegido diferentes contaminantes encontrados habitualmente en agua como son diclofenaco, dipirona y verde malaquita.

Se han realizado estudios de hidrólisis y fotólisis en fotoreactores expuestos directamente a la radiación solar en la Plataforma Solar de Almería. Los estudios relacionados con la aplicación de procesos de oxidación avanzada se han realizado solo con dipirona y diclofenaco, utilizando para ello captadores parabólicos compuestos que forman parte de una planta piloto de 35 litros también emplazada en la Plataforma Solar de Almería.

Los resultados se han evaluado mediante diferentes técnicas analíticas sencillas (cromatografía líquida, cromatografía iónica, carbono orgánico total, etc.) y avanzadas (cromatografía gaseosa y líquida acoplada a espectrometría de

masas) que han permitido conocer el grado de descomposición de los contaminantes, los principales productos de transformación/degradación y los mecanismos relacionados con ello, que han permitido establecer una ruta metabólica. Además, los resultados también se han evaluado mediante técnicas toxicológicas basadas en la bacteria *Vibrio fischeri*.

La fotólisis de diclofenaco se llevó a cabo en agua desmineralizada, pero también sobre agua dulce estándar. Las muestras se extrajeron mediante SPE (cartuchos Oasis® HLB y MAX) y la separación e identificación de PTs se consiguió mediante GC/MS y LC/TOFMS), que proporcionaron información complementaria permitiendo la identificación de hasta 13 PTs diferentes. Los fotoproductos formados permitieron establecer que el diclofenaco se transforma por el efecto de la radiación solar mediante una fotociclación que lo convierte en derivados carbazólicos, pero también a través de una descarboxilación y una oxidación subsiguiente de la cadena alquílica. El principal PT identificado fue 8-cloro-9H-carbazol-1yl-ácido acético.

Los experimentos en planta piloto solar mediante TiO₂ supusieron un tiempo de tratamiento de 200 minutos, siguiendo una cinética típica de orden 1 (aparente). En el caso del tratamiento de diclofenaco mediante foto-Fenton, los resultados muestran una oxidación completa después de 60 minutos y una mineralización total después de 100 minutos de iluminación. Se estableció la ruta de degradación mediante GC-MS y LC/TOF-MS, identificando 18 PDs y proponiendo dos rutas de degradación, que difieren sustancialmente de las propuestas anteriormente mediante otros procesos de oxidación diferentes (ozonización y UV/H₂O₂). En estos experimentos mediante foto-Fenton se detectó una oxidación, precipitación y redisolución simultánea provocada por el tratamiento a pH 2.8, que llevó a la completa descomposición de diclofenaco. Sin embargo, se propone el tratamiento más adecuado a un pH similar al pKa de diclofenaco: alrededor de pH = 4.

El tratamiento mediante TiO₂ y foto-Fenton de dipirona en planta piloto permitió la eliminación de la dipirona y sus metabolitos. Se compararon los dos tratamientos atendiendo a la velocidad de mineralización, formación de PDs (identificados mediante HPIC, GC/MS y LC/TOF-MS) y evolución de toxicidad (mediante *Vibrio fischeri*). El tratamiento de foto-Fenton fue más eficiente (más rápido) que el de TiO₂, pero sin ninguna diferencia relevante en cuanto al tipo de PDs generados y evolución de la toxicidad. Se ha propuesto un mecanismo de degradación, siendo ácidos carboxílicos los principales PDs antes de la mineralización completa. Un descenso de la toxicidad durante el tratamiento también se ha demostrado.

La evaluación de los PTs generados durante la fotodegradación de verde malaquita se llevó a cabo mediante LC-TOF-MS y GC-MS. Los 28 PTs identificados indican que tienen lugar tres reacciones principales: (i) N-desmetilación, (ii) hidroxilación y (iii) rotura de la estructura formando derivados benzofenónicos. Estos procesos tienen lugar en presencia de radicales hidroxilo que atacan el anillo aromático, el grupo N,N-dimetilamínico y el átomo de carbono central. La toxicidad evaluada mediante *Vibrio fischeri* demuestra que la disolución sigue siendo tóxica después de la desaparición del verde malaquita. Esta toxicidad se ha asignado al PT 4-(dimetilamina)benzofenona que tiene $EC_{50,30min} = 0.061 \text{ mg L}^{-1}$.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El trabajo de investigación que se recoge en esta Memoria ha sido desarrollado en las instalaciones de la Plataforma Solar de Almería y de la Universidad de Almería (Dep. de Química Analítica, G.I. Residuos de Plaguicidas).

Las operaciones de tratamiento actualmente implantadas en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), han demostrado no ser efectivas para la depuración de ciertos compuestos. Este hecho, junto con vertidos directos de ciertas sustancias químicas consecuencia de actividades en auge, como la acuicultura, hacen que multitud de compuestos químicos alcancen las aguas naturales. Por ello, resulta necesario ampliar las investigaciones sobre estos contaminantes en dos sentidos: ampliando los conocimientos acerca de su comportamiento e impacto en el medio ambiente y proponiendo procesos de tratamientos alternativos o complementarios que logren reducir el vertido de estos compuestos a las aguas naturales. Trabajos realizados recientemente ponen de manifiesto que el uso de la radiación solar para la aplicación de los AOPs (fotocatálisis heterogénea con TiO_2 y fotocatalisis homogénea mediante

foto-Fenton) usando Captadores Cilindro Parabólicos Compuestos (CPC) se plantea como un método atractivo para conseguir un tratamiento efectivo.

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

1. Evaluar procesos de fotodegradación solar de contaminantes orgánicos en agua, a fin de ampliar el conocimiento sobre el comportamiento e impacto de los contaminantes en el medio ambiente.
2. Evaluar la aplicación de Procesos de Oxidación Avanzada (AOPs) solares para conseguir la depuración de aguas contaminadas con sustancias orgánicas persistentes y poder diseñar un tratamiento adecuado para estas aguas.
3. Desarrollar una metodología analítica útil que permita la completa evaluación de estos procesos, en especial en lo que se refiere a la identificación de productos de transformación generados durante los mismos.

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

- Evaluar la fotodegradación de los contaminantes mediante la exposición de disoluciones acuosas de los mismos a la radiación solar directa.
- Descontaminar el agua mediante fotocátalisis utilizando los dos únicos procesos que se pueden llevar a cabo mediante radiación solar: fotocátalisis heterogénea con TiO_2 y fotocátalisis homogénea con $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$ (foto-Fenton).
- Operar una planta piloto que permita desarrollar la experimentación en las condiciones más reales posible, ajustando todos sus parámetros de control con el objetivo de conseguir los resultados más fiables posibles.
- Comparar cual de los dos procesos fotocatalíticos aplicados es el más adecuado en cada caso.

- Evaluar la descomposición de los contaminantes mediante el seguimiento de la desaparición del Carbono Orgánico Total (TOC) y la aparición de sus iones, tanto inorgánicos como orgánicos.
- Conocer la cinética de degradación tanto del compuesto original como de sus productos de transformación (PTs), mediante el análisis por cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-DAD) del compuesto original.
- Desarrollar una estrategia analítica basada en el empleo de técnicas de extracción en fase sólida seguidas de análisis mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS), a fin de identificar los PTs generados durante los procesos de degradación y establecer sus posibles rutas de degradación.
- Asegurar la correcta destoxificación de las aguas durante los procesos estudiados, mediante la aplicación de bioensayos de toxicidad aguda.

Demostrar que la combinación de toda la información obtenida permite evaluar mejor un tratamiento de oxidación avanzada y, por tanto, conocer mejor su comportamiento para intentar optimizarlo. Todo ello debe conducir a una reducción de costes que permita la implantación de esta tecnología

CAPITULO

1

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 La contaminación en el medio ambiente

El medio ambiente ha sido siempre esencial para la vida. Las preocupaciones acerca del equilibrio entre la vida humana y el medio ambiente alcanzaron dimensiones internacionales en la década de 1950. Durante los años siguientes, se comenzaron a ensamblar las piezas, supuestamente inconexas, de un rompecabezas mundial para revelar la imagen de un mundo con un futuro incierto. Para finales de los años sesenta, la voz de la preocupación ambiental sólo se escuchaba en Occidente. Dentro del mundo comunista, la destrucción incansable del medio ambiente en nombre de la industrialización continuó sin freno. En los países en desarrollo, las preocupaciones ambientales se consideraban lujos occidentales.

“La pobreza es la peor forma de contaminación”, afirmó la Primer Ministro de India, Indira Gandhi, quien desempeñó un papel clave al orientar la agenda de la

Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Humano celebrada en Estocolmo en 1972 hacia las preocupaciones de los países en desarrollo [Strong, 1999].

A principios del decenio de los setenta, la atención se centró en el ambiente biofísico, por ejemplo, en asuntos de manejo de la fauna y flora silvestres, conservación de los suelos, contaminación del agua, degradación de la tierra y desertificación, considerándose a las personas como la causa fundamental de tales problemas.

En Occidente convivían (y hasta cierto punto todavía lo hacen) dos importantes escuelas de pensamiento con opiniones divergentes sobre las causas de la degradación del medio ambiente. Una culpaba a la ambición sin medida y a la búsqueda incansable del crecimiento económico, mientras que la otra responsabilizaba al crecimiento demográfico. Sin embargo, la contaminación que no se combate y una población que no se estabiliza constituyen ambas verdaderas amenazas a nuestro modo de vida y a la vida misma [Stanley Foundation, 1971].

1.2 Contaminación del agua por compuestos orgánicos y normativa actual

Una de las características del desarrollo económico de los países es la generación de residuos, por tanto el volumen de éstos crece de manera exponencial con respecto al grado de industrialización. Actualmente se tiene registro de unos cinco millones de sustancias químicas, y se estima que cada año unas 1000 sustancias nuevas se integran al registro [GEO-3, 2002].

A medida que las sociedades desarrolladas evolucionaban, tuvieron que enfrentarse a problemas ambientales, sobre todo en función del uso del agua [Doménech *et al.*, 2001]. Por tanto, en los países desarrollados se han

establecido estrategias y soluciones para revolver la contaminación por altos niveles de metales pesados, uso intensivo de nutrientes (principalmente nitratos y fosfatos) y contaminantes orgánicos, éstos últimos hasta niveles de ultra-traza (< ng/L). Algunas de las herramientas utilizadas son el tratamiento de efluentes industriales y municipales, desinfección de aguas, limitación y sustitución de nitratos y fosfatos en productos de uso masivo, los desarrollos en ingeniería para el tratamiento de agua, química analítica, ecotoxicología, y una transferencia tecnológica cada vez más rápida de los centros de investigación a la industria. Todas estas herramientas, sin embargo, no están disponibles muy a menudo en los países en vías de desarrollo.

Contaminantes Emergentes

Se denominan contaminantes emergentes a contaminantes que vienen siendo detectados en las aguas desde hace poco tiempo (fundamentalmente porque no existían técnicas analíticas que los detectaran, o simplemente porque no se les había prestado atención antes) y que a menudo no cuentan con una regulación específica. Sin embargo, suelen ser candidatos a ser incluidos en normativas específicas, dependiendo sobretodo de los resultados que la investigación aporte sobre sus efectos nocivos sobre el medio ambiente (incluida la salud humana) y del monitoreo de datos concerniente a su incidencia. Esto último es de especial importancia ya que su presencia continuada en campañas de análisis medioambiental es indicadora de la necesidad de regular su vertido y/o su utilización. Los compuestos que han surgido recientemente, Tabla 1.1A, con una particular relevancia son los detergentes, productos farmacéuticos, productos de higiene personal y aditivos de gasolinas. Estos grupos de contaminantes tienen además la característica de que no necesitan ser muy persistentes en el medio ambiente para causar un efecto negativo, ya que su alto grado de transformación/eliminación es compensado por su constante ingreso en el medio ambiente debido a su utilización masiva [Barceló, 2003].

Tabla 1.1A: Contaminantes considerados como “emergentes” hoy en día [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, acetaminofen, ácido acetil salicílico, diclofenaco, fenoprofen
Fármacos psiquiátricos	Diazepan
Anti-epilépticos	Carbamazepina
Reguladores de lípidos	Bezafibrato, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico
β-bloqueadores	Metoprolol, propranolol, timolol
Rayos-X, contraste de	Iopromide, iopamidol, diatrizoato
Esteroides y hormonas (anticonceptivos)	Estradiol, estrona, estriol, dietilbestrol
Productos de higiene personal	
Fragancias	Nitro, policíclic y macrocíclic almizcle
Cremas solares, compuestos activos de	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 polibrominados (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

La Comunidad Europea y la Directiva Marco del Agua

Comparando la Comunidad Europea (CE) con otras regiones del mundo, la distribución y el saneamiento del agua tienen un desarrollo muy elevado, sin embargo persisten problemas de contaminación diversos. La CE basa su política

del agua en el uso de la información científica y los datos técnicos disponibles, tomando en cuenta la variabilidad de las condiciones ambientales en las diferentes regiones de la Comunidad, con el objetivo de mejorar la calidad de los recursos de agua dulce que posee [Malato *et al.*, 2003a]. La Directiva Marco del Agua (**Water Framework Directive**, WFD) 2000/60/CE, es la directiva de la CE que establece las bases para la protección de las aguas continentales, para los estados miembros. La WFD, entre otros muchos temas, detalla la estrategia de la CE contra la contaminación de agua por sustancias peligrosas.

Hace 30 años la CE dio el primer paso para controlar la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad. Para controlar éstos vertidos puntuales y difusos de sustancias peligrosas se formuló la directiva 76/464/CEE. La directiva WFD establece que se deben tomar medidas específicas a nivel comunitario contra la contaminación de las aguas, causada por determinados contaminantes o grupos de contaminantes que representen un riesgo significativo al medio acuático. Además, ésta directiva introdujo una metodología científica para seleccionar las sustancias prioritarias en función de su riesgo significativo. La primera lista de sustancias seleccionadas se incluyó en la decisión 2455/2001/CE, donde se incluyen 33 sustancias prioritarias. Esta lista de sustancias es examinada cada cuatro años, y las revisiones tienen en cuenta toda la información procedente de los estados miembros, el Comité de Toxicología, Ecotoxicología y Medio Ambiente, la Agencia Europea de Medio Ambiente, los programas comunitarios de investigación, las asociaciones empresariales europeas y las organizaciones de protección del medio ambiente. A través de proyectos como CADOX, EMCO, POSEIDON, P-THREE, la CE promueve que se generen soluciones tecnológicas para el tratamiento de contaminantes que hasta el momento no ha sido posible eliminar (http://ec.europa.eu/environment/water/index_en.htm).

Como consecuencia de todo este trabajo desarrollado desde que se publicó la WFD, en Julio de 2006 la CE acordó intentar establecer una nueva Directiva,

que se conocerá como “Directiva de Sustancias Prioritarias”, que apoya a la WFD (WISE Newsletter, Iss. 5, Jun 2007, ISSN-725-390X). Esta directiva está ahora mismo (Enero 2008) en fase de discusión en el Parlamento Europeo. Más información en: http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/surface_water.htm. Esta directiva establece estándares de calidad para 41 sustancias o grupos de sustancias (Tabla 1.1B). Esta propuesta, que se espera sea definitiva durante el año 2008, es parte de una nueva estrategia contra la contaminación química de aguas, introducida por la WFD para el establecimiento de un nuevo marco de trabajo. Gran parte de el establecimiento de estas nuevas propuestas, directivas y estándares de calidad, se debe a que existen los instrumentos legislativos, técnicos y científicos para llevar a cabo su implementación, provenientes principalmente de los proyectos financiados por la CE dentro de los programas marco, FP (<http://cordis.europa.eu/>).

Tabla 1.1B: Lista de Sustancias Prioritarias (33) y de otros contaminantes (8) incluida en propuesta de Directiva de Sustancias Peligrosas, (COM(2006) 397 final) (*)

	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	
(5)	n.a.	n.a.	Difenileters Brominados (**)	X(***)
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cadmio y sus compuestos	X
(7)	85535-84-8	287-476-5	C ₁₀₋₁₃ -cloro alcanos (**)	X
(8)	470-90-6	207-432-0	Clorfenvinfos	
(9)	2921-88-2	220-864-4	Clorpirifos	
(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	
(13)	330-54-1	206-354-4	Diuron	

(14)	115-29-7 959-98-8	204-079-4 n.a.	Endosulfan (alpha-endosulfan)	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 58-89-9	210-158-9 200-401-2	Hexaclorociclohexano (Lindano, isomero gama)	X
(19)	34123-59-6	251-835-4	Isoproturon	
(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)	25154-52-3 104-40-5	246-672-0 203-199-4	Nonilfenoles (4-(para)-nonilfenol)	X
(25)	1806-26-4 140-66-9	217-302-5 n.a.	Octilfenoles (para-tert-octilfenol)	
(26)	608-93-5	210-172-5	Pentaclorobenceno	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentaclorofenol	
(28)	n.a. 50-32-8 205-99-2 191-24-2 207-08-9 193-39-5	n.a. 200-028-5 205-911-9 205-883-8 205-916-6 205-893-2	Hidrocarburos poliaromáticos (Benzo(a)pireno), (Benzo(b)fluoranteno), (Benzo(g,h,i)perileno), (Benzo(k)fluoranteno), (Indeno(1,2,3-cd)pireno)	X
(29)	122-34-9	204-535-2	Simazina	
(30)	688-73-3 36643-28-4	211-704-4 n.a.	Compuestos de Tributiltin (cationes de Tributiltin)	X
(31)	12002-48-1 120-82-1	234-413-4 204-428-0	Triclorobencenos (1,2,4-Triclorobenceno)	
(32)	67-66-3	200-663-8	Triclorometano (Cloroformo)	
(33)	1582-09-8	216-428-8	Trifluralin	

* Donde se han elegido grupos de sustancias, normalmente se lista una sustancia individual representativa como un parámetro indicativo (entre paréntesis y sin número).

** Estos grupos de sustancias normalmente incluyen un considerable número de compuestos individuales. Actualmente no es posible dar un parámetro indicativo apropiado.

*** Solamente Pentabromobifenileter (número CAS 32534-81-9).

**** Fluoranteno está en la lista como indicador de otros más peligrosos, Hidrocarburos Poli aromáticos.

	Número CAS	Otros contaminantes
(1)	<i>No aplica</i>	DDT total ^[1]
	50-29-3	para-para-DDT
(2)	309-00-2	Aldrin
(3)	60-57-1	Dieldrin
(4)	72-20-8	Endrin
(5)	465-73-6	Isodrin
(6)	56-23-5	Carbontetracloruro
(7)	127-18-4	Tetracloroetileno
(8)	79-01-6	Tricloroetileno

^[1] DDT total y sus isómeros.

Estos últimos ocho contaminantes, los cuales caen dentro del alcance de la Directiva 86/280/EEC, e incluidos en el anexo de la Directiva 76/464/EEC, no están en la lista de sustancias prioritarias. Sin embargo, los estándares de calidad ambiental para estas sustancias se incluyen en la anteriormente mencionada propuesta de la Comisión, de forma que se mantenga la regulación sobre ellas.

Estados Unidos (EUA)

La situación en Europa es similar a la que se presenta en los Estados Unidos. En 1999, por iniciativa del gobierno, se realizó un estudio muy extenso con el fin de monitorear un amplio rango de compuestos orgánicos, incluyendo fármacos, antioxidantes, fitoesteroides, biocidas, y retardantes de flama [Kolpin *et al.*, 2002]. Algunos resultados de este estudio llaman la atención, como el hecho de que se detectó, cuando menos en una muestra, la presencia de 82 de los 95 compuestos monitoreados. Posteriormente se han publicado estudios como el de Metcalfe y colaboradores en Norteamérica [Metcalfe *et al.*, 2003], un poco mas concretos con respecto al lugar de estudio, las fuentes de contaminación y los compuestos detectados, que sin embargo remarcan la presencia y procedencia de contaminantes orgánicos como los fármacos y productos para el

cuidado personal, PPCPs por sus siglas en inglés, que se han integrado en el ciclo del agua, específicamente en el agua potable para consumo humano. Como una medida concreta en los Estados Unidos la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA), tiene un área específica donde se realizan proyectos sobre los PPCPs (<http://www.epa.gov/ppcp/>), enfocándose en áreas como: fuentes de contaminación, destino y transporte, rutas de exposición humana, rutas de exposición ecológica, herramientas de monitoreo y detección, valoración de efectos ecológicos potenciales, valoración de efectos potenciales a la salud humana, y comunicación de la gestión pública ambiental.

Aún con estos esfuerzos, los investigadores todavía carecen de un conocimiento completo de los efectos ambientales de la mayoría de los microcontaminantes del grupo de los PPCPs [Ternes *et al.*, 2004]. Realmente no se tiene claro cual es la concentración mínima a la cual estos contaminantes pueden producir efectos adversos en la biota acuática y terrestre o bien si la toxicidad de una mezcla compleja puede ser totalmente diferente a la de un compuesto individual, observándose efectos sinérgicos que potencian el efecto tóxico [Altenburger *et al.*, 2004].

Países en Desarrollo

En los países en desarrollo, donde la situación socio-económico-política dificulta la implementación de nuevas tecnologías para un control exhaustivo de la contaminación en agua, se empiezan a dar iniciativas legales que darán marco a la ejecución de medidas de protección del medio ambiente. Entre los organismos que promueven estas políticas principalmente se encuentran la Comisión Económica para América Latina y el Caribe, CEPAL (<http://www.eclac.org/>) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, OCDE (<http://www.oecd.org/>), ambas dependientes de las Naciones Unidas (ONU), engloban la realización de varios proyectos con el fin de constituir una política medioambiental en Latino América y el Caribe, la cual permita la competencia con otros mercados internacionales y un desarrollo sostenible.

Especialmente para la financiación de proyectos para la utilización racional y protección del medio ambiente, en países en desarrollo, se creó el Fondo para el Medio Ambiente Mundial, GEF por sus siglas en inglés, (<http://www.gefweb.org> ó <http://www.undp.org/gef/05/>). Con un financiamiento de hasta 5 millones de dólares (USD), el GEF financia proyectos a través del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, PNUD (<http://www.undp.org/>), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, PNUMA (<http://www.pnuma.org/>) y el Banco Mundial. El GEF concentra su trabajo en 6 áreas, dos de las cuales son complementarias en lo que a contaminantes orgánicos en aguas se refiere, Aguas Internacionales (IW) y Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs). Entre otros objetivos estas dos áreas dirigen acciones enfocadas al monitoreo, reducción y eliminación de los POPs y otros contaminantes.

1.3 Fuentes de contaminación en aguas

a) Productos farmacéuticos

La presencia de productos farmacéuticos en aguas naturales de la UE, se ha convertido en un problema ambiental importante (ver Tabla 1.1A), fundamentalmente debido a que esta presencia es causada por una incompleta eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas [Quinn *et al.*, 2007; Reemtsma *et al.*, 2006; Hernando *et al.*, 2006; Joss *et al.*, 2005;]. La preocupación por sus posibles efectos tóxicos o por su capacidad de trastornar a nivel hormonal tanto a humanos como a animales, ha hecho que su interés en eliminarlos correctamente sea cada vez mayor.

La contaminación por fármacos en el medio ambiente puede atribuirse a múltiples fuentes, como las emisiones en los lugares de producción, generación directa de residuos en casas, hospitales y granjas, excreción humana y animal, entre otras. Al hacer un balance de los fármacos que entran y salen de las plantas de tratamiento de aguas residuales, se revela que muchos no son

eliminados durante el tratamiento [Andreozzi *et al.*, 2003; Ferrer y Thurman, 2003; Ternes *et al.*, 2002]. Los compuestos farmacéuticos no suelen ser biodegradables, han sido diseñados para ser lipofílicos y biológicamente persistentes, con objeto de mantener su actividad terapéutica hasta que su función específica se haya desarrollado. Estas características hacen que la preocupación sobre este tipo de contaminantes sea aún mayor.

En muchos casos el agua procedente de plantas de tratamiento biológico es descargada directamente en el medio ambiente (ríos, lagos, embalses), lo que al ser aguas superficiales [Kolpin *et al.*, 2002] favorece que el problema se transmita de forma inmediata. En muchos casos esta agua es utilizada en la producción de agua potable. De esta manera se obtiene un ciclo donde el agua proveniente de una planta de tratamiento municipal puede ser utilizada a corto plazo para producir agua potable para consumo humano. Debido a que los recursos de agua son limitados y al incremento en la demanda de agua, se hace necesario incrementar y extender la reutilización de las aguas residuales [Kosjek, *et al.*, 2007], lo cual lleva aparejado el problema ya comentado. Esto hace, si cabe, más acuciante el resolver el problema de estas sustancias biorecalcitrantes que se vierten en grandes cantidades hoy en día. En la fabricación de productos medicinales humanos y veterinarios son utilizados del orden de 3000 diferentes compuestos [Ternes, 2001], lo que representa un amplio rango de estructuras químicas. Debido a este gran número de compuestos, a los que hay que añadir sus correspondientes productos de degradación, parece casi imposible desarrollar métodos eficaces de eliminación para todas estas sustancias y sus metabolitos.

Esta situación se agrava cuando los compuestos son además de elevada polaridad (muy solubles en agua). En esta situación, la eliminación (o retención mediante adsorción en los ciclos primarios o en la biomasa) en una planta de tratamiento de aguas convencional es aun menor.

Todo esto ha hecho que los compuestos farmacéuticos hayan sido considerados como un problema solo recientemente (contaminantes emergentes), cuando la implantación de los tratamientos biológicos en la UE ha sido generalizada y además, las técnicas analíticas se han desarrollado para poder detectar la presencia de estos compuestos aguas abajo de las plantas de tratamiento. Tradicionalmente los compuestos polares no eran incluidos en las campañas de monitoreo, lo que resultaba en una severa deficiencia de información de la presencia de este tipo de compuestos en el medio ambiente. A este respecto Reemtsma y col. han publicado un estudio reciente sobre el seguimiento de más de 40 contaminantes polares [Reemtsma *et al.*, 2006], en el cual se establece un índice con el cual medir la distribución en el ciclo del agua de este tipo de contaminantes.

La herramienta tradicionalmente utilizada para la detección, seguimiento y control de contaminantes en agua ha sido la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS). Es así que con esta herramienta y los métodos desarrollados las agencias ambientales encargadas de evaluar y controlar la liberación de contaminantes en el agua, constituyeron procedimientos estándares de análisis y establecieron niveles de concentración. Prueba de ello es que hace años la Agencia de Protección Medio Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) diseñó una lista de 126 contaminantes, y la Comisión Europea otra de 132 sustancias peligrosas (76/464/CE) utilizando GC-MS.

Como se ha comentado anteriormente, muchos de los fármacos se caracterizan por ser altamente polares, lo que hace necesario el desarrollo de métodos de preparación de las muestras, como son la extracción o derivación, para posteriormente analizarse. La utilización de GC-MS, para la determinación de un amplio abanico de sustancias es muy apreciada, por la reproducibilidad de los resultados y por que se cuenta con bases de datos que facilitan la identificación pero queda limitada para compuestos termolábiles, muy polares, y moléculas

orgánicas de gran tamaño. Para este tipo de compuestos orgánicos se utiliza la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), utilizada de manera generalizada en campañas de monitoreo solo recientemente. Por ello, muchos de los compuestos incluidos en la Tabla 1.1A y otros solo han podido detectarse, identificarse y cuantificarse recientemente [Buser *et al.*, 1999; Buser *et al.*, 1998; Buser y Müller, 1998; Heberer, 2002; Deng *et al.*, 2003; Lindqvist *et al.*, 2005; Richardson, 2003; Weigel *et al.*, 2004A; Joss *et al.*, 2005; Pérez-Estrada *et al.*, 2005; Petrovic *et al.*, 2007; Kosjek *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2008].

Debido a que los efluentes de las aguas residuales urbanas y los contaminantes en el medio ambiente se han vuelto cada vez más complejos, la identificación y cuantificación de las nuevas sustancias o contaminantes emergentes se podrá realizar haciendo uso y desarrollando técnicas analíticas cada vez más sofisticadas. Los métodos analíticos modernos, que más adelante se comentarán con detalle, que se utilizan en la determinación de productos farmacéuticos incluyen procesos de extracción en fase sólida (SPE), derivación, detección y confirmación por MS en tándem [Ternes, 2001], que actualmente es el método preferido en análisis ambientales [Barceló y Petrovic, 2007], detectores de Triple Cuadrupolo (QqQ), Tiempo de Vuelo (TOF), así como técnicas híbridas como Cuadrupolo con Trampa de iones Lineal (Qq-LIT) y Cuadrupolo con Tiempo de Vuelo (Qq-TOF).

Productos de uso en acuicultura

La acuicultura en el Mediterráneo ha sido una industria en continuo crecimiento durante los últimos 15 años. Si bien este auge ha sido menor en España, hay claros signos de su incorporación a esta actividad industrial a un nivel similar a otros países de esta área como Grecia [Sánchez-Mata *et al.*, 2000].

Sin embargo, la calidad del agua costera y su deterioro es el argumento principal que se esgrime contra la proliferación de piscifactorías, tanto por los demás sectores industriales usuarios de estas zonas como por autoridades o grupos

ambientales. En contraste con este hecho, la información científica existente sobre la interacción de la acuicultura y el ecosistema marino es limitada, así como de su impacto en las específicas características del ecosistema mediterráneo, muy diferentes a las de cuencas de ríos o incluso a las de zonas marítimas de otras latitudes.

Es indudable que las piscifactorías producen deshechos bióticos y abióticos que se vierten en las columnas de agua donde se instalan. Entre ellos cabe destacar:

- **Compuestos químicos mayoritarios.** En especial compuestos de fósforo y nitrógeno que se adicionan como nutrientes de forma continua o productos del metabolismo de los propios peces, que suponen una importante desviación de la fluctuación natural de las columnas de agua. El análisis, control y seguimiento de los contenidos de fosfatos, nitratos y amonio en la columna de agua y sedimentos de la propia piscifactoría y en el entorno es una práctica regular de estas industrias dando su interés en optimizar el suministro de nutrientes.
- **Compuestos químicos minoritarios.** En especial determinados compuestos como plaguicidas y herbicidas, desinfectantes, antibióticos, aditivos alimentarios, etc., que se adicionan de forma voluntaria con fines autorizados. Además otros compuestos minoritarios se pueden adicionar de forma involuntaria al estar presentes (como impurezas) en los diferentes productos o como aditivos en alimentos necesarios en el proceso industrial y que tengan un importante potencial contaminante que es necesario controlar.

Aunque cabe pensar que la dilución natural en el medio marino de lugar a concentraciones finales de estos compuestos muy bajas, hay que considerar, por un lado, los posibles valores elevados que se pueden alcanzar a escala local (ej: bahías) y los efectos inesperados y negativos que, incluso a baja concentración, pueden tener a medio-largo plazo. Por las características

específicas de muchos de estos compuestos (potencial contaminante, ausencia de control, aplicación irregular) el conocimiento de su comportamiento en el medio marino es de gran importancia.

Los compuestos químicos usados en la acuicultura marina en Europa se pueden clasificar en tres grandes grupos: desinfectantes, alguicidas y medicamentos veterinarios (ej: antibióticos, anestésicos, parasiticidas, vacunas) [Costello *et al.*, 2001]. Este último grupo ha recibido especial atención por parte de la UE y su aplicación está regulada en la ordenanza 2377/90/EEC que establece LMRs autorizados en peces. Entre los medicamentos regulados se encuentran sulfamidas, trimetoprim, betalactámicos (como la penicilina) y cefalosporinas, macrolidos, aminoglicósidos y tetraciclinas.

Si bien existen LMRs fijados en peces para algunos de estos compuestos, estando otros en proceso de revisión, no existe normativa específica en lo que se refiere a tolerancias de compuestos orgánicos en los vertidos de industrias acuícolas en el medio ambiente marino.

Al empleo de medicamentos hemos de añadir el de otros compuestos como alguicidas o desinfectantes que también suponen un aporte de compuestos tóxicos al medio ambiente, o el de otros compuestos como aditivos alimentarios (etoxiquina), fungicidas y otros usos (verde malaquita), sustancias inductoras de la maduración del sistema digestivo (espermina), etc. (<http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s06a.htm>).

La mayor parte de los estudios de control realizados por las propias piscifactorías o por agencias medioambientales responsables de la supervisión de la actividad acuícola y su impacto en el medio ambiente, se refieren a la descarga de nutrientes (en especial fósforo y nitrógeno), crecimiento de microalgas, biotoxinas, y otros parámetros característicos de las aguas, pero no así de la presencia de estos contaminantes orgánicos, de ahí que no exista

información suficiente relativa al uso, comportamiento e impacto ambiental de estas sustancias a escala europea.

1.4 Comportamiento de los contaminantes en el medio ambiente acuático: Estudios de degradación fotoquímica.

Una vez que los compuestos orgánicos procedentes de diversas fuentes alcanzan el medio ambiente acuático son susceptibles de sufrir procesos bióticos o abióticos de degradación. Ambos procesos son responsables del destino y eliminación de estos compuestos en el medio. Para algunos compuestos, las transformaciones abióticas pueden tener lugar mediante hidrólisis o fotólisis. Los fármacos, en general, están diseñados para su ingesta vía oral y, como regla general 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 aguas superficiales. Mientras que la fotólisis directa tiene lugar por la absorción directa de la radiación solar [Zepp y Cline, 1977] en la fotólisis indirecta están involucradas especies naturales fotosensibles (nitratos, ácidos húmicos) que bajo el efecto de la radiación solar pueden generar especies altamente oxidantes como los radicales hidroxilo u oxígeno singlete. El conocimiento de estos procesos de degradación y de las variables que los afectan es esencial para el conocimiento del comportamiento de los contaminantes en las aguas naturales. Por otro lado, durante estos procesos se generan productos de degradación que pueden ser más tóxicos y persistentes que los compuestos de partida [Mezcua *et al.*, 2004]. En consecuencia es necesario realizar una evaluación de los mismos para, en caso de ser necesario, determinar qué nuevos compuestos habrá que incluir en los sistemas de vigilancia.

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 sea un área de investigación creciente [Boreen *et al.*, 2003].

Sin embargo, la realización de estos estudios requiere de un adecuado diseño experimental [OECD, 2000. Guidance document for testing of chemicals. Phototransformation of Chemicals in water. Direct and indirect photolysis] y del empleo posterior de técnicas analíticas, sensibles y específicas y que permitan la identificación de los productos de degradación, como la espectrometría de masas [Agüera y Fernández-Alba, 1998; Malato *et al.*, 2003; Agüera *et al.*, 2000].

Es evidente que tanto la introducción de contaminantes orgánicos como la formación de sus productos de degradación puede alterar o empobrecer la biodiversidad y los recursos genéticos de los ecosistemas en las aguas naturales 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. Existe abundante información sobre el impacto ambiental de derivados del petróleo o de las sustancias consideradas “prioritarias” [GESAMP, 1990; Shahidul y Tanaka, 2004], sin embargo, esta información es limitada para contaminantes emergentes como los fármacos o compuestos orgánicos utilizados en actividades acuícolas [Costello *et al.*, 2001]. Para predecir realmente los supuestos efectos tóxicos son necesarios datos sobre cantidades, procesos de degradación, persistencia y distribución de estas sustancias tóxicas o de sus productos de transformación. Ante la escasez de información al respecto, es necesario realizar investigaciones que permitan avanzar en el conocimiento de los peligros mediante estudios de toxicidad que permitan hacer una evaluación adecuada de las repercusiones de los mismos y en especial de los productos de transformación generados, para los que existe un total desconocimiento. Algunos de los resultados presentados en esta memoria son parte de un proyecto más amplio destinado a la evaluación del impacto de la acuicultura en el medio marino.

1.5 Descontaminación de aguas mediante procesos de oxidación avanzada

El objetivo de cualquier tratamiento de contaminantes en agua es siempre el mismo: eliminar ciertos contaminantes, normalmente mezclas complejas de compuestos orgánicos e inorgánicos, presentes en un efluente de tal manera que una vez tratado cumpla las especificaciones de vertido determinadas por el organismo competente. Los procesos y tecnologías de que se dispone en la actualidad para el tratamiento de contaminantes en agua son muy diversos [Sawyer *et al.*, 2003]. Las técnicas de tratamiento de residuos en agua que se usan con más frecuencia en la actualidad se pueden dividir en tres grandes grupos: tratamientos físicos, químicos y biológicos. Como norma general, los diferentes tratamientos existentes se dividen en los siguientes grupos generales:

- **Tratamientos naturales:** Estos sistemas de tratamiento no suelen ser muy utilizados en el caso de aguas residuales con contaminantes difícilmente biodegradables, debiendo tener los vertidos de partida unas condiciones comparables a los urbanos. Sin embargo son muy utilizados debido a su bajo coste y su naturaleza ecológica. Entre ellos están el Filtro Verde y el Lagunaje.
- **Tratamientos primarios:** Se incluyen en este grupo aquellos procesos o conjunto de procesos que tienen como misión la separación por medios físicos de partículas en suspensión que existan en el agua a tratar. Estamos hablando de procesos como: la Decantación, Homogeneización, Cribado o filtrado, Coagulación – Floculación, Precipitación y Neutralización.
- **Tratamientos secundarios:** Fundamentalmente consisten en procesos biológicos empleados para degradar la materia orgánica biodegradable. Pueden agruparse en dos grandes grupos: los procesos Aerobios y Anaerobios.

- **Tratamientos terciarios:** Tradicionalmente se han considerado los tratamientos terciarios como procesos de afino para sustraer los contaminantes que no han podido ser eliminados en las fases de tratamiento anteriores. Además, los tratamientos terciarios a utilizar dependían mucho del uso posterior que iba a hacer del agua ya depurada. Sin embargo en la actualidad esto ya no es así y los tratamientos terciarios se han generalizado y, en el caso de las aguas con contaminantes persistentes y no biodegradables, muchas veces es el único que se realiza ya que se trata, normalmente, de eliminar contaminantes muy específicos. Se suelen incluir procesos como: adsorción, intercambio iónico, ultrafiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis, “Stripping”, desinfección, procesos de oxidación convencionales y procesos de oxidación avanzada.

En aguas urbanas, se suele utilizar únicamente los tratamientos primarios y secundarios, con los que se logra reducir en gran medida la contaminación de los efluentes, pero con los cuales generalmente no se cumple la normativa que se está proponiendo hoy en día (basándose en la WFD), cada vez más estricta como se ha comentado anteriormente. La tendencia es hacia la utilización cada vez mayor de tratamientos terciarios, tanto para cumplir la normativa, como para lograr un reciclado cada vez mayor del agua utilizada, que es el gran objetivo del futuro.

Los procesos de oxidación avanzada (“Advanced Oxidation Processes”, AOPs) posiblemente constituyan en un futuro próximo uno de los recursos tecnológicos más utilizados en el tratamiento de aguas contaminadas con productos orgánicos, que no son tratables mediante técnicas convencionales debido a su elevada estabilidad química y/o baja biodegradabilidad. De hecho, los congresos y conferencias en este campo son cada vez más numerosos:

- Environmental Applications of advanced oxidation processes (EAAOP-1). Chania, Crete, 7-9 Sept. 2006.
- 2nd Int. Conf. on Semiconductor Photochemistry (SP-2). Aberdeen, UK 23-35 July 2007.
- The 12th International Conference on TiO₂ Photocatalysis: Fundamentals & Applications - The 13th International Conference on Advanced Oxidation Technologies for Treatment of Water, Air and Soil, Conference Center-Niagara Falls, New York, USA, September 24-27, 2007.
- 5th European Meeting on Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental Applications, Palermo, Italy. October 4th – 8th 2008.).

En el futuro cercano los AOPs podrían convertirse en la tecnología de tratamiento de agua más utilizada para estos contaminantes [Gogate y Pandit, 2004A, 2004B; Pera-Titus *et al.*, 2004; Malato *et al.*, 2007].

La eficacia de estos procesos se basa en que se generan radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), los oxidantes más fuertes después del fluoruro, los cuales tienen una característica el no ser selectivos, siendo capaces de oxidar todo tipo de estructuras y enlaces químicos. Otra ventaja es que la producción de $\cdot\text{OH}$ por medio de AOPs puede ser muy diversa, adaptándose con cierta sencillez a los requerimientos de un tratamiento específico [Malato *et al.*, 2007]. La desventaja de los AOPs es que suele ser un tratamiento caro frente a los tratamientos convencionales, por el uso de fuentes de radiación y/o de reactivos caros (ver tabla 1.2). Por ello es que debe estudiarse con detalle cuando es preciso aplicar un AOP y no un tratamiento convencional. Existe sin embargo una ventaja de estos tratamientos respecto a muchos de los habituales hoy en día, como es que algunos AOPs precisan un aporte de energía que puede realizarse mediante radiación solar. Debido a esto la investigación cada vez se enfoca más en los que se puedan llevar a cabo por medio de la radiación solar, como son principalmente el proceso de foto-Fenton y la catálisis heterogénea con TiO₂.

Tabla 1.2: Algunos de los AOPs más conocidos.

Fotoquímicos	No Fotoquímicos
Fotólisis directa	Ozonización <ul style="list-style-type: none"> • O_3/OH^- • O_3/H_2O_2
Fotólisis en el ultravioleta de vacío (UVV)	Reacción de Fenton ($Fe^{+2/+3}/H_2O_2$)
UV / H_2O_2	Oxidación electroquímica
UV / O_3	Tratamiento con haces de electrones
Foto-Fenton ($Fe^{+2/+3}/H_2O_2/UV$)	Plasma no térmico
Fotocatálisis Heterogénea (TiO_2/UV)	Ultrasonidos

Las ventajas de los AOPs, frente a los tratamientos tradicionales se pueden resumir en:

- El contaminante se transforma químicamente, a diferencia de los sistemas de separación del agua de los contaminantes.
- Se puede obtener una mineralización completa del contaminante.
- No se generan fangos que requieran un tratamiento posterior.
- Son de mucha utilidad frente a contaminantes tóxicos y/o no-biodegradables.
- Funcionan en el tratamiento de contaminantes hasta muy bajas concentraciones ($\mu g/L$).

1.5.1 Fotocatálisis mediante TiO_2

La fotocatálisis está basada en que el catalizador es sensible a la luz, por tanto es la aceleración de una transformación fotoquímica por la acción de un catalizador. La mayoría de los fotocatalizadores utilizados hasta ahora suelen ser óxidos de metales semiconductores, los que se caracterizan por tener una

banda prohibida que se extiende desde la banda de valencia, rica en electrones, hasta la banda de conducción, con vacantes. Cuando el catalizador recibe la energía de un fotón ($h\nu$) se produce la excitación de un electrón en el catalizador y éste gana la suficiente energía para cambiar de nivel, de la banda de valencia a la banda de conducción (figura 1.1). Al mismo tiempo se forma una vacante, un hueco, para cada electrón que abandona la banda de valencia. Estas dos especies que forman un par electrón-hueco de electrón viajan a la superficie del catalizador, donde se pueden recombinar o participar en reacciones redox con las sustancias adsorbidas en la superficie del catalizador [Malato *et al.*, 2007; Dalrymple, 2007; Herrmann, 1999a, 1999b, 2005].

Si esta interacción se realiza en un ambiente acuoso se producirán radicales $\cdot\text{OH}$. Las propiedades químicas de adsorción del sustrato y las condiciones de la reacción química determinarán en gran medida el mecanismo de reacción que predominará. Otras especies reactivas que se forman incluyen al radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), que resulta de la reacción con oxígeno.

En la fotocatalisis se han utilizado diversos materiales como óxido de zinc (ZnO), sulfuro de zinc (ZnS), óxido férrico (Fe_2O_3), óxido de estaño (SnO_2), sulfuro de cadmio (CdS), entre otros, sin embargo después de dos décadas el más utilizado es el TiO_2 , considerado como referencia cuando se plantea el uso de materiales nuevos susceptibles de ser fotocatalizadores [Dalrymple *et al.*, 2007].

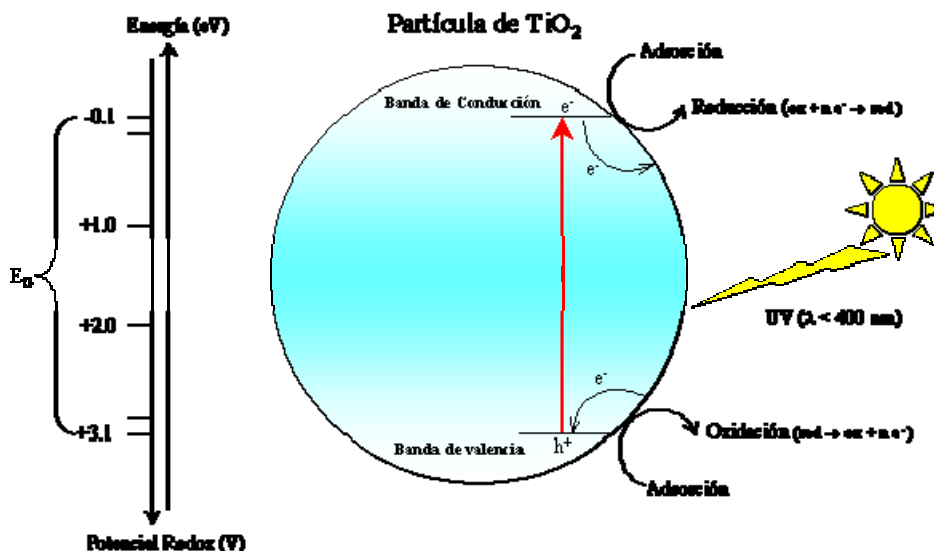


Figura 1.1: Representación de proceso fotocatalítico heterogéneo en una partícula de catalizador TiO_2 .

Las evidencias han demostrado que los radicales $\cdot\text{OH}$ son los principales causantes de las reacciones de oxidación de contaminantes orgánicos mediante la ruptura progresiva de sus enlaces (ver estas reacciones en la sección dedicada a Fenton y foto-Fenton). Se ha demostrado la descomposición total de compuestos orgánicos simples y complejos (halogenados, derivados de alcanos, alquenos, ácidos carboxílicos y sustancias aromáticas, etc.) mediante fotocatalisis heterogénea. En compuestos aromáticos, por ejemplo, se produce la hidroxilación de la parte aromática y sucesivos pasos de oxidación / adición llevan a la apertura del anillo. Los aldehídos y ácidos carboxílicos resultantes son descarboxilados y finalmente producen CO_2 . Hay que tener en cuenta que, al tratarse de un proceso de oxidación-reducción, se puede usar también la vía reductiva. Un ejemplo puede ser la reducción mediante fotocatalisis de metales (como es el caso de Cr^{6+} a Cr^{3+}), de forma simultánea a la oxidación de compuestos orgánicos. Durante la última década, el número de referencias y

patentes publicadas sobre tratamiento de sustancias tóxicas y peligrosas en agua y aire mediante fotocátalisis puede ser contado por miles.

El número de compuestos que se han ensayado mediante fotocátalisis con TiO_2 también puede ser contado por centenares. Además, resulta notable que el número de publicaciones realizadas sobre este tema se haya ido incrementando de forma continua durante los últimos años (ver figura 1.2). Sin embargo, la gran mayoría de las experiencias realizadas hasta la fecha, lo han sido en el ámbito de laboratorio y utilizando lámparas para la generación de los fotones necesarios. Hasta hoy solo se observa en una sustancia orgánica la ausencia de mineralización total. Los pesticidas basados en una estructura triacínica (atracina, simacina, etc.) se transforman únicamente hasta 1,3,5-triacina-2,4,6, trihidroxi (ácido cianurico) [Hincapié *et al.*, 2005], sin producirse la mineralización completa.

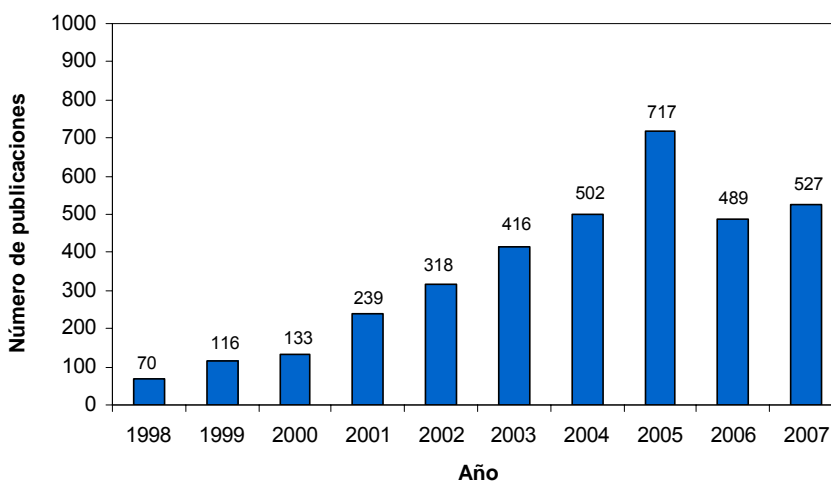
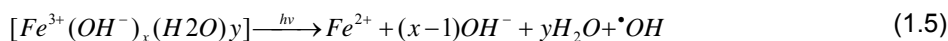


Figura 1.2: Referencias publicadas entre 1998 y 2007 relacionadas con el proceso de fotocátalisis mediante TiO_2 . Fuente: www.scopus.com.

1.5.2 Foto-Fenton

A finales del siglo XIX H. J. H. Fenton [Fenton, 1894] describió una reacción en medio acuoso en la que degradaba ácido tartárico al combinar sales de Fe^{2+} disueltas en agua con H_2O_2 , debido a la producción de radicales hidroxilo. Posteriormente esta reacción tomó el nombre de su descubridor. Sin embargo solo hasta la segunda mitad del siglo XX [Walling, 1975] ha empezado a discutirse la aplicación de la reacción Fenton en el tratamiento de aguas residuales.

La reacción Fenton, reacciones (1.1) y (1.2), es de reactivo limitante, por tanto cuando el H_2O_2 se agota la reacción prácticamente se detiene. La regeneración de hierro, reacción (1.2), es mucho más lenta que la reacción inicial, reacción (1.1). Al utilizar radiación UV-VIS, la reacción Fenton se mejora enormemente, ya que acelera la regeneración de hierro ferroso, a partir de diferentes complejos de hierro, como se muestra en las reacciones (1.3 – 1.6) [Ruppert *et al.*, 1993; Pignatello, 1992], donde L es un ligando orgánico.



Cuando el proceso Fenton se desarrolla en un sistema donde están presentes sustancias orgánicas, éstas reaccionan en muchas maneras con los radicales hidroxilo. Las siguientes reacciones han sido reportadas para diferentes sustratos orgánicos [Haag *et al.*, 1992; Legrini *et al.*, 1993]:

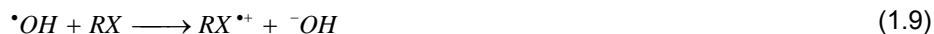
Abstracción de hidrógeno de átomos de carbono alifático:



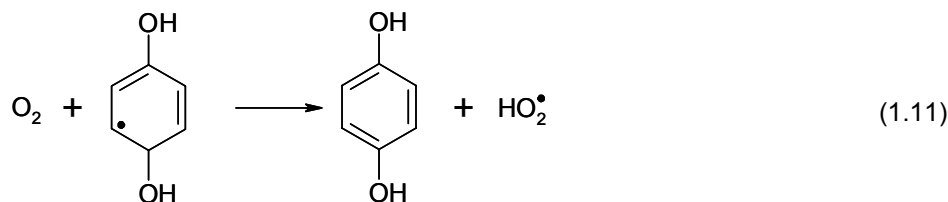
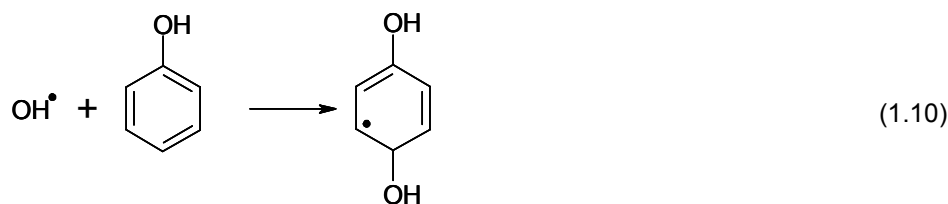
Adición electrofílica en dobles enlaces de anillos aromáticos:



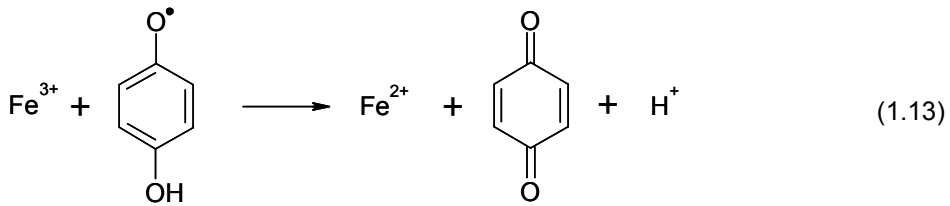
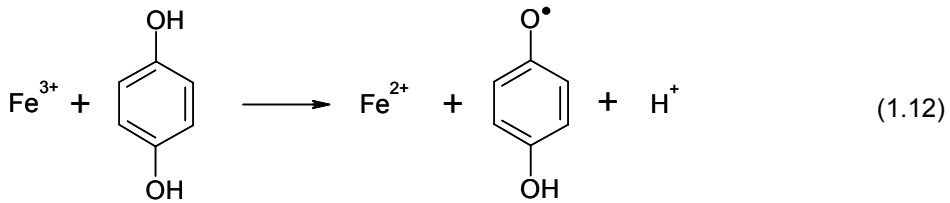
Reacciones de transferencia de electrones:



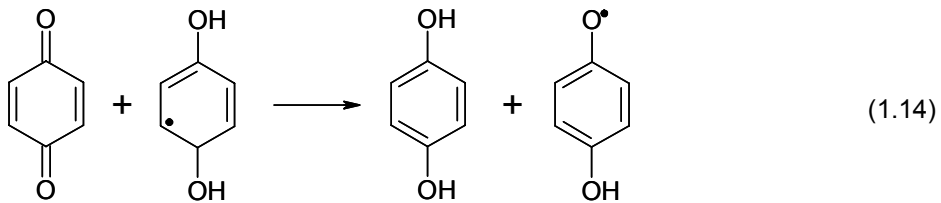
En el caso de contaminantes aromáticos el anillo normalmente es hidroxilado antes de su ruptura durante el proceso de oxidación. Las sustancias que contienen estructuras del tipo quinona e hidroquinona son típicamente productos intermedios de degradación. Este tipo de estructuras se producen por reacciones como (1.10) y (1.11)



Estas especies proporcionan una ruta más rápida para la regeneración del hierro ferroso, por medio de las reacciones (1.12) y (1.13), con lo que aceleran el proceso:



Las estructuras benzoquinónicas resultantes pueden a su vez reducirse (1.14). Por tanto cada molécula puede reducir varios iones Fe^{3+} en un ciclo catalítico. Sin embargo este ciclo catalítico llega a su fin cuando se abre el anillo de las especies quinónicas, lo que conduce a la mineralización de la molécula [Chen y Pignatello, 1997].



Cuando el objetivo es la mineralización total solo con el proceso Fenton, se muestra su limitación en la degradación de intermedios carboxílicos, ya que con este sistema éstos no pueden ser degradados. Se sabe que los ácidos carboxílicos y dicarboxílicos forman complejos estables con el hierro, lo que inhibe la reacción con el peróxido [Kavitha y Palanivelu, 2004]. Esta limitación no existe cuando se utiliza foto-Fenton.

El número de compuestos que se han ensayado mediante foto-Fenton también es numeroso, pero mucho menor que mediante TiO_2 , sobretodo porque su utilización en el tratamiento de aguas contaminadas es mucho más reciente. En todo caso, el número de publicaciones realizadas sobre este tema se haya ido incrementando de forma continua durante los últimos años (figura 1.3).

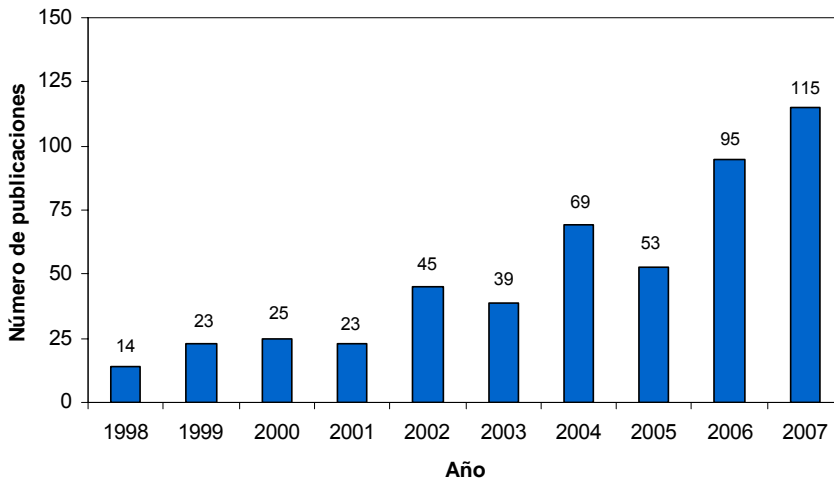


Figura 1.3: Referencias publicadas entre 1998 y 2007 relacionadas con el proceso de foto-Fenton. Fuente: www.scopus.com.

1.6 Reactores fotocatalíticos solares

La fotocatalisis heterogénea y el proceso foto-Fenton son de gran interés ya que se pueden llevar a cabo utilizando radiación solar, lo que representa una mejora al proceso, no solo en términos del coste del tratamiento de agua, sino también en la sostenibilidad del mismo al evitar el uso de energía eléctrica.

Los experimentos de foto-Fenton mostrados en este trabajo fueron realizados en captadores parabólicos compuestos (CPCs) en la Plataforma Solar de Almería (PSA). Los CPCs son captadores estáticos con una superficie formada por dos

espejos parabólicos conectados, con un tubo absorbedor en el foco (figura 1.4), y se ha encontrado que proporcionan la mejor óptica para sistemas de baja concentración [Muschaweck *et al.*, 2000].

Estos colectores no tienen sistema de seguimiento solar y su diseño permite que todos los rayos solares sean reflejados en el foco (absorbedor) y utilizando una baja concentración solar. Debido a este diseño, casi toda la radiación UV (directa y difusa) que llega a la apertura del CPC puede ser captada y estar disponible para el proceso en el reactor. La radiación reflejada por el CPC es también distribuida en la parte trasera del fotoreactor tubular. Todos estos factores contribuyen a que el CPC tenga un desempeño excelente en aplicaciones fotoquímicas y fotocatalíticas [Ajona y Vidal, 2000; Anderozzi, 1999; Herrmann, 1999a y 1999b; Malato *et al.*, 2004; Pera-Titus *et al.*, 2004; Malato *et al.*, 2007].

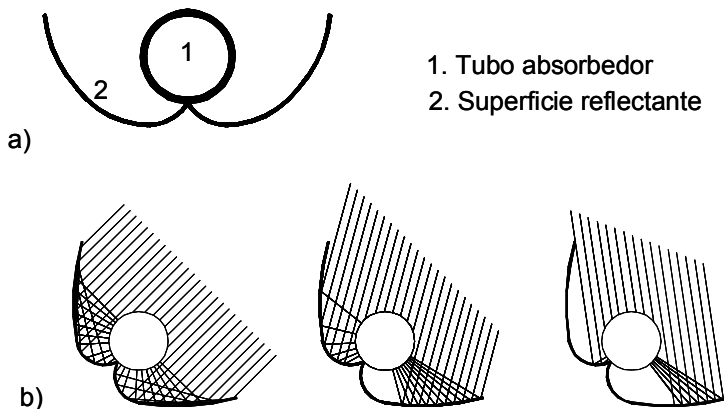


Figura 1.4. Esquema de un Captador Parabólico Compuesto, y como refleja la radiación solar que llega en diferentes ángulos de incidencia.

La mayoría de los componentes de un reactor fotocatalítico solar están hechos de materiales estándares, sin requerimientos especiales, excepto para el reactor y la superficie reflectiva. Los reactores fotocatalíticos deben contener el fluido de

trabajo, incluyendo al catalizador, y deben transmitir la luz UV solar eficientemente, además deben permitir fluir el líquido de trabajo con la mínima presión a través del sistema. Deben también tener buena transferencia de materia desde la corriente de fluido a catalizador. Se debe asegurar una adecuada distribución del flujo dentro del reactor, ya que una distribución no uniforme conlleva unos tiempos de residencia no uniformes dentro del reactor. La elección de materiales transparentes a la luz UV y resistentes a su efecto destructivo es limitada. Las temperaturas dentro del fotorreactor pueden alcanzar fácilmente los 40-50 °C. Además, el material del reactor debe ser inerte y resistente a pH altos y bajos. El cuarzo tiene una excelente transmisión UV, y es resistente a la temperatura y a los reactivos, pero su alto coste lo hace completamente inviable. Los fluoropolímeros son una buena elección ya que tienen una buena transmitancia UV y es químicamente inerte [Malato *et al.*, 2002.]. Una de sus mayores desventajas es que, para alcanzar una resistencia razonable a la presión, el grosor de la pared de un tubo de fluoropolímero debe incrementarse, lo cual hace disminuir su transmitancia UV.

El vidrio es la elección lógica para los fotorreactores. El vidrio borosilicatado de bajo contenido en hierro tiene buenas propiedades transmisivas del espectro solar con un límite inferior a unos 285 nm, y por tanto, parece ser el más adecuado [Malato *et al.*, 2002]. Dos efectos indeseables reducen la eficacia del reactor de vidrio para los propósitos de fotocatalisis solar: (i) la absorción por parte del hierro contenido en el vidrio en el rango UV solar entre 300 y 400 nm; (ii) un decrecimiento adicional de la transmisividad UV durante la operación debido al impacto perjudicial de la radiación solar (solarización UV) [Blanco *et al.*, 2000]. Ambos efectos son causados por cambios de valencia de los cationes de metales de transición contenidos en el vidrio, fundamentalmente el hierro. El efecto de los iones de hierro en el vidrio es especialmente dañino, ya que los iones Fe^{2+} son oxidados a Fe^{3+} por fotones de longitudes de onda menores de 400 nm. Además, Fe^{3+} absorbe en el UV.

Los requisitos para la calidad óptica de superficies reflectivas en aplicaciones solares están normalmente relacionados con la captación de la radiación solar. El aluminio es la mejor opción debido a su bajo coste y su alta reflectividad. La superficie reflectiva ideal para aplicaciones fotocatalíticas solares debe tener alta reflectividad UV, resistencia a la intemperie adecuada para un largo tiempo de vida y un precio razonable. Las superficies actualmente disponibles que mejor cumplen estos requerimientos son de aluminio anodizado electropulido [Ajona y Vidal, 2000]. Los colectores solares (tipo CPC) utilizados en esta Tesis Doctoral son descritos con detalle en la sección 2.2.1 del capítulo Experimental.

1.7 Evaluación analítica de los procesos de degradación y técnicas analíticas aplicadas a la identificación de productos de transformación y degradación.

En todo proceso de degradación fotoquímica de contaminantes orgánicos en agua es necesario conocer en cada momento el grado de eliminación y/o mineralización del compuesto objetivo. Esta información se obtiene a partir de análisis químicos que permitan conocer la cantidad de Carbono Orgánico Total (COT), la concentración del compuesto objetivo y la aparición de iones inorgánicos procedentes de los heteroátomos contenidos en las moléculas orgánicas. Asimismo, una completa caracterización de los procesos de degradación requiere la identificación de los principales productos de transformación generados en el transcurso de los mismos, en especial en el caso de procesos fotolíticos, así como de los ácidos carboxílicos de cadena corta generados como paso previo a la mineralización. A continuación detallaremos el interés de cada una de estas medidas y las técnicas analíticas empleadas en su determinación.

1.7.1 Carbono Orgánico Total (COT)

La medida del COT representa, como su nombre indica, el contenido total de carbono de los compuestos orgánicos presentes en un agua, siendo por tanto indicativo del nivel de contaminación orgánica de ésta. Dentro del COT nos podemos encontrar con diversas fracciones de carbono. El Carbono Orgánico Disuelto (COD), es la medida más habitual y representa el contenido de compuestos orgánicos disueltos en una muestra acuosa (muestra filtrada).

El seguimiento del COD es práctica habitual en los procesos de degradación ya que es una medida del grado de mineralización alcanzado en cada momento del proceso. Cuando el estudio de degradación parte de una disolución de un compuesto puro, el valor medido de COD permite informar acerca de la formación de productos de transformación. Tal es el caso que se muestra en la figura 1.5 para la degradación del plaguicida pirimetanil mediante fotocátalisis con TiO_2 . Puede observarse como una vez que el pirimetanil se ha degradado por completo, tras 250 min de tratamiento, el valor del COD se mantiene aún elevado, indicando la presencia de PTs en la mezcla de reacción. Dado que los PTs pueden ser en muchos casos más tóxicos y peligrosos que el producto de partida, el conocimiento del grado de mineralización alcanzado durante los procesos de degradación es de gran interés.

La medida de COD puede englobar multitud de compuestos que se forman durante el proceso de degradación y que se derivan del compuesto original. La caracterización de estas mezclas de reacción no es una tarea fácil, por lo que el disponer de un parámetro global como el COD es de gran utilidad para la evaluación del proceso, sobre todo cuando se tiene una mezcla de diferentes sustancias que se desean degradar o cuando la degradación se realiza en una matriz compleja como aguas residuales o industriales.

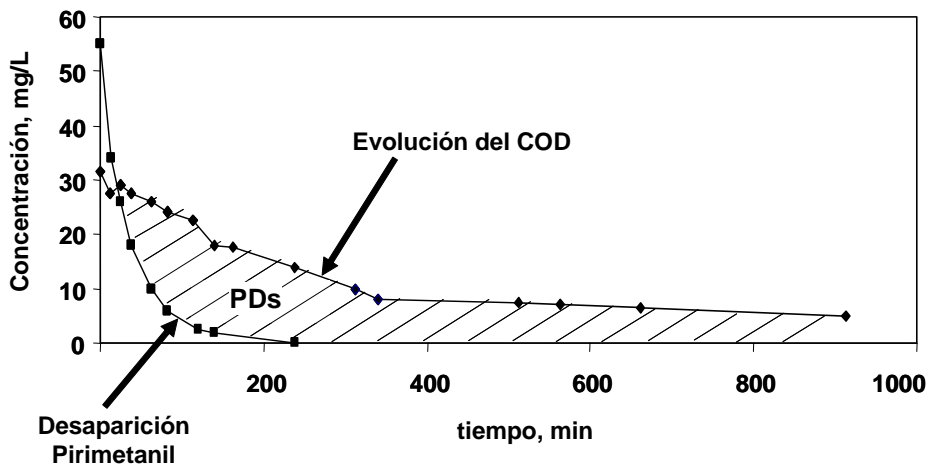


Figura 1.5: Evolución del COD y de la concentración del plaguicida pirimetanil en el transcurso de un experimento de degradación mediante fotocatalisis con TiO_2 . [Agüera *et al.*, 2000]

Como se ha comentado, el acoplamiento de sistemas biológicos con procesos de oxidación avanzada se realiza con objeto de disminuir costes. En este caso, resulta de mucha utilidad el seguimiento del COD ya que representa la cantidad de materia orgánica que los microorganismos tendrán disponible para su alimentación.

En los procesos de oxidación avanzada el COD puede llegar a disminuir hasta valores cercanos a cero [Pérez-Estrada *et al.*, 2005, 2007; Malato *et al.*, 2001, 2003b; Maldonado *et al.*, 2006], indicando que en su mayoría el carbono orgánico se ha oxidado formado CO_2 , con lo cual se puede asegurar una descarga segura del agua tratada en el medio ambiente. La cuantificación de los productos de degradación presentes en los últimos estadios del proceso, principalmente ácidos orgánicos de cadena corta (acético, fórmico, etc.) permitiría, de ser posible, cerrar el balance del carbono en este tipo de procesos.

En estudios de degradación fotolítica, la desaparición del COD es inusual debido a que la energía de los fotones contenidos en el espectro solar no es suficiente para mineralizar los compuestos por si mismos.

1.7.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV) es una técnica ampliamente utilizada para el seguimiento de procesos de degradación de contaminantes orgánicos. Esto se debe a su gran sensibilidad y exactitud en determinaciones cuantitativas y a su especial capacidad para la separación de compuestos polares, no volátiles y termolábiles, lo que la hace, aplicable a un gran número de contaminantes ambientales de interés.

La utilización de HPLC con detector UV-VIS permite un fácil y rápido seguimiento de la cinética de degradación de uno o varios compuestos. Las muestras, generalmente en disolución acuosa, pueden ser inyectadas directamente sin necesidad de complejos procesos de pretratamiento de las mismas que puedan alterar su composición. Tan sólo es recomendable una dilución de la muestra con el disolvente orgánico utilizado en la fase móvil, por lo general metanol o acetonitrilo, y su posterior filtración a través de filtros de 0.22 μm . La adición del disolvente orgánico, además de mejorar las características del análisis, pretende un doble efecto, asegurar la disolución de cualquier partícula precipitada en la solución o adsorbida en el catalizador, en el caso de tratamientos con TiO_2 , y la detención de la reacción fotocatalítica mediante el llamado efecto "quenching", lo cual es especialmente importante en experimentos con foto-Fenton, en los que pueden ocurrir reacciones en la oscuridad después de tomar la muestra del reactor.

Para el estudio de cinéticas de degradación la HPLC-UV es una herramienta fundamental, ya que además de poderle dar seguimiento a sustancias

específicas, como el compuesto objeto de estudio y/o algunos productos de transformación conocidos, la información que proporciona es una base para análisis más específicos. Es de esperar que si se estudia la degradación de una sustancia en particular deba coincidir la desaparición de ésta con la formación de productos de degradación que, aunque no puedan ser identificados, puedan revelarse como productos mayoritarios y por tanto indicadores de las principales rutas de degradación.

Esta técnica analítica es de gran utilidad por su modularidad. De especial interés es la posibilidad de conectarla a un colector de fracciones ya que con él se pueden separar cada uno de los componentes de una muestra y posteriormente realizar diferentes análisis.

Para la identificación de los productos de degradación de alto peso molecular, el empleo de detectores UV no proporciona información estructural suficiente para la identificación. Uno de los detectores que se utilizan en LC para este fin son los espectrómetros de masas. Esta técnica analítica nos da información específica de las moléculas contenidas en una muestra. La espectrometría de masas es una técnica sofisticada, más adelante se habla de ella detalladamente.

1.7.3 Cromatografía Iónica (CI)

La CI es un tipo de cromatografía líquida basado en el intercambio selectivo de los componentes iónicos de la muestra con contraiones presentes en la fase estacionaria. Actualmente, esta técnica se ha convertido en uno de los métodos más importantes para el análisis de trazas de aniones y cationes. Su rápido desarrollo y su capacidad y facilidad operativa han hecho que su gama de aplicaciones se haya ampliado a los aniones de ácidos orgánicos, metales y azúcares y carbohidratos.

En los procesos de degradación los compuestos orgánicos se transforman en CO_2 , H_2O y los ácidos (o sales) minerales correspondientes que provienen de

los heteroátomos contenidos en las moléculas orgánicas. La detección y cuantificación de los correspondientes iones inorgánicos (F^- , Cl^- , Br^- , NO_2^- , NO_3^- , $SO_4^{=}$, PO_3^{3-}) permite realizar un seguimiento del proceso de degradación y aporta información acerca de la naturaleza de los intermedios generados. Igualmente, esta técnica es útil para la determinación de aniones de ácidos orgánicos (Acetato, Glicolato, Formiato, Piruvato, Propianoato, Oxalato, Maleato) que se generan normalmente en las últimas etapas del proceso, y que en ocasiones son responsables del COD residual en procesos de degradación.

Un ejemplo de la utilidad de esta técnica se muestra en la figura.1.6 en la que se representa el seguimiento de la degradación del plaguicida imidacloprid mediante foto-Fenton y fotocatalisis con TiO_2 . Es apreciable (figura 1.6a) como la concentración de iones cloruro aumenta conforme disminuye la concentración de imidacloprid en la disolución. Sin embargo, en ambos tratamientos, la desaparición de imidacloprid no coincide con la máxima liberación de cloruros a la disolución, lo que significa que en este punto no se ha alcanzado la total mineralización y aun permanecen en disolución productos de transformación clorados, poniendo de manifiesto la mayor estabilidad de esta parte de la estructura. Asimismo, en el tratamiento con foto-Fenton (figura 1.6b) se observa como el máximo de concentración detectado para los iones de ácidos orgánicos aparece a tiempos de tratamiento elevados, revelando la formación de ácidos orgánicos como una de las etapas finales del proceso previas a la total mineralización.

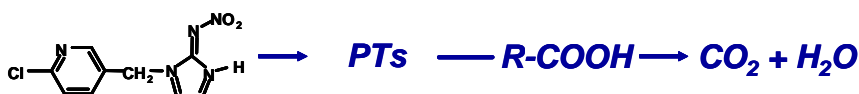
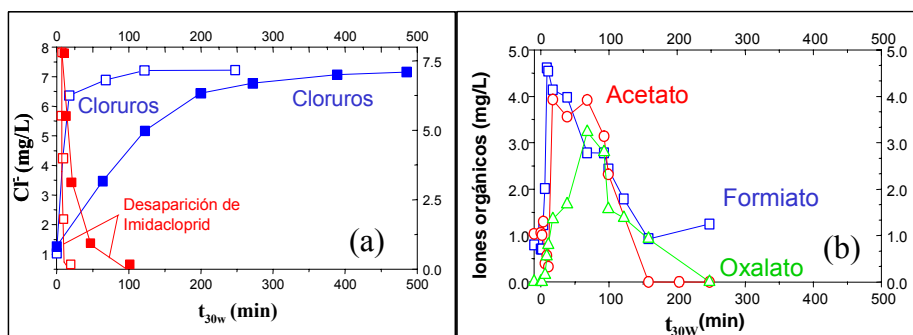


Figura 1.6: Seguimiento de la formación de cloruros y aniones de ácidos orgánicos durante la degradación del plaguicida imidacloprid mediante foto-Fenton (símbolos huecos) y fotocatalisis con TiO_2 (símbolos sólidos) [Malato *et al.*, 2001]

1.7.4 Técnicas analíticas aplicadas a la identificación de productos de transformación

La determinación analítica, cuantitativa y cualitativa, de los productos de transformación (PTs) es una tarea que tiene una gran dificultad, y requiere de la aplicación de técnicas sofisticadas como la espectrometría de masas (MS), generalmente acoplada a equipos de cromatografía de líquidos (LC) o gases (GC), la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN); la espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) [Amalric *et al.*, 1995]. En la evaluación analítica de un proceso de degradación se tienen que superar algunas dificultades como:

- La formación de un gran número de compuestos impredecibles que complican la separación y, en consecuencia, la identificación.
- Las diferentes propiedades físico-químicas de los PTs, que dificulta su determinación con solo un procedimiento analítico o de extracción.

- La ausencia, en muchos casos, de estándares comerciales para confirmar la identidad de los PTs.

Estas dificultades hacen necesaria la utilización de más de una técnica analítica que proporcionen información complementaria, para evaluar lo más completamente posible el proceso. Una etapa importante en este tipo de estudios es la selección del procedimiento para la preparación de las muestras. El análisis de productos de degradación e identificación de los mismos, normalmente se realiza a niveles de mg/L o en muchos casos inferiores, debido a esto es necesario preparar o pre-concentrar la muestra que se va a introducir en los equipos de espectrometría de masas.

Preparación de muestras

La extracción líquido – líquido (LLE) es un proceso común utilizado en el tratamiento de muestras acuosas por su simplicidad y porque no requiere de material de laboratorio especial ni costoso. Sin embargo, con esta técnica de extracción se pueden perder algunos compuestos altamente polares, se consumen grandes volúmenes de disolventes orgánicos, se generan importantes interferencias de matriz, y en ocasiones se pueden formar emulsiones difíciles de romper [Chiron *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1996]. Éstos y otros inconvenientes hacen que la LLE esté cada vez más en desuso. Una alternativa eficaz a la tradicional LLE es la extracción en fase sólida (SPE) que, en los últimos años, se ha convertido en la técnica de elección para el análisis de contaminantes orgánicos en muestras acuosas, especialmente por su eficacia para la extracción de analitos polares y por el menor consumo de disolvente requerido.

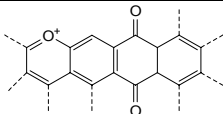
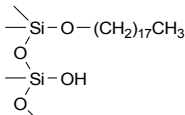
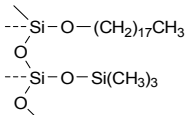
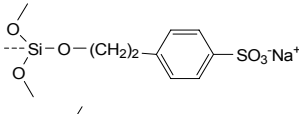
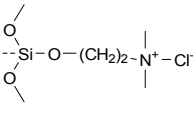
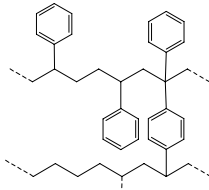
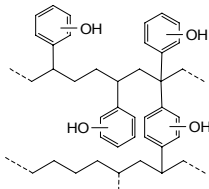
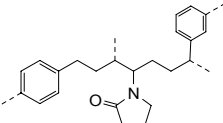
El desarrollo de nuevos adsorbentes utilizados en las minicolumnas de extracción en fase sólida, que permiten separar los PTs de la muestra en un rango de polaridades cada vez más amplio, ha hecho que el uso de la SPE haya ganado preferencia sobre el uso de LLE. Existe en el mercado una amplia gama

de adsorbentes, como las sílicas enlazadas químicamente con cadenas alquílicas (C-18, C-8, CN), polímeros porosos (estireno-divinilbenceno, PRP-1 o PLRP-S), carbón modificado (PGC) o adsorbentes de intercambio iónico, entre otros. Estos materiales poseen diferentes propiedades y su comportamiento, en lo referente a capacidad y volumen de rotura, varía en función de los compuestos a analizar. Esto nos permite seleccionar adsorbentes adecuados para la determinación de analitos dentro de un mayor rango de polaridades y características físico-químicas.

Recientemente, el empleo de adsorbentes de balance hidrofílico – lipofílico, como el Oasis® (Waters Co.) está teniendo una gran aplicación en este tipo de estudios [Marinas *et al.*, 2001]. **Oasis® HLB** es un relleno de fase reversa, humectable en agua, adecuado para la extracción en fase sólida de una amplia gama de compuestos. Su composición consiste en una combinación de dos monómeros: N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílica). Esta combinación proporciona una capacidad de retención superior en fase reversa, con una capacidad especial para optimizar la retención de los analitos polares.

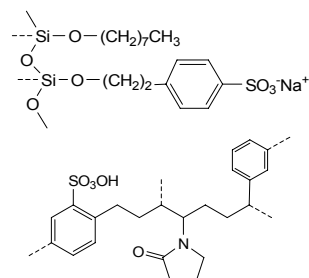
Basados en el relleno usado en los HLB se ha desarrollado una serie de adsorbentes de modo mixto intercambio iónico-fase reversa. Así, los rellenos Oasis® MCX (modo mixto intercambio catiónico-fase reversa) presentan una alta selectividad para compuestos básicos y los Oasis® MAX (modo mixto intercambio aniónico-fase reversa), proporcionan adecuada recuperación para compuestos ácidos. De más reciente desarrollo han sido los rellenos de intercambio débil catiónico y aniónico WCX y WAX, diseñados para mejorar las recuperaciones y la capacidad de procesamiento de ácidos y bases fuertes en laboratorios de metabolismo de drogas / ADME / Toxicología. En la Tabla 1.3, se muestran como ejemplo algunos nombres y estructuras de materiales usualmente utilizados en SPE.

Tabla 1.3: Tipos de adsorbentes más utilizados y sus estructuras.

Tipo de adsorbente	Nombre	Estructura química
Carbón grafitizado	Carbón grafitizado (ej. Carboxpack B [®])	
Sílica enlazada	Fase reversa (ej. RP-C ₁₈)	
	Fase reversa "endcapped" (ej. con trimetilclorosilano)	
	Intercambio aniónico (SAX) (ej. ácidos benceno sulfónicos)	
	Intercambio catiónico (SCX) (ej. trimetil-amonio)	
Copolímeros	Poliestireno-divinilbenzeno (ej. Lchrolut EN [®])	
	Poliestireno-divinilbenzeno hidroxilado (ej. ENV+ [®])	
	Divinilbenzeno-N-vinilpirrolidona (ej. OASIS HLB [®])	

Fases mixtas RP-C8 y SCX

Divinilbenzeno-N-vinilpirrolidona
sulfonado
(ej. OASIS MCX®)



Técnicas de análisis: Espectrometría de Masas (MS)

Aunque, como se ha comentado anteriormente, se han aplicado muchas técnicas para la identificación de productos de transformación de contaminantes en procesos de degradación [Malato *et al.*, 2001, 2003B, 2003C; Detomaso *et al.*, 2005; Martínez Bueno *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2007A, 2007B, 2008], es evidente que el empleo de la espectrometría de masas acoplada a potentes técnicas de separación como la cromatografía de gases y, en especial más recientemente, la cromatografía líquida, se ha impuesto como la técnica de elección para este objetivo. La espectrometría de masas se basa en la producción de iones a partir de moléculas neutras y en el examen de la posterior descomposición de estos iones. Los iones obtenidos para cada sustancia son característicos y nos pueden proporcionar información cualitativa y cuantitativa de la misma a la vez que información estructural.

La espectrometría de masas (MS) es, sin duda alguna, la técnica analítica instrumental más completa que existe hoy en día. Entre las cualidades que justifican esta afirmación, podemos citar:

- Su capacidad de *identificación*. Puede identificar cualitativamente y de forma inequívoca, casi cualquier tipo de sustancia, desde compuestos sencillos hasta moléculas extraordinariamente complejas, como biopolímeros de pesos moleculares elevados.

- Es *cualitativa y cuantitativa*. No sólo es capaz de identificar las sustancias sino también de cuantificar y medir la concentración de las mismas.
- Puede analizar *mezclas complejas*. Es capaz de identificar una sustancia incluso en presencia de otra de composición similar.
- Posee una gran *sensibilidad*. Puede detectar prácticamente cualquier elemento en cantidades de hasta las “ppq” (partes por cuatrillón).
- Es *universal y específica*. Es decir, puede analizar sustancias o mezclas de sustancias sólidas, líquidas o gaseosas, y también es capaz de detectar y separar una sustancia concreta en presencia de una matriz compleja.
- Puede proporcionar *información estructural* de la molécula analizada, energía de enlaces, información cinética, físico-química, cuántica, etc.
- Suministra información *isotópica*. Puede aplicarse para estudios isotópicos de isótopos estables o radiogénicos en campos de creciente interés.
- Es una técnica muy *rápida*. Puede realizar un espectro en décimas de segundo.

Todas estas características convierten a la espectrometría de masas es una técnica instrumental muy evolucionada y automatizada que, si bien durante años fue considerada como una técnica difícil y compleja, hoy en día es de uso muy sencillo y extendido. De hecho, actualmente se utiliza profusamente como técnica de análisis de rutina en procesos industriales, control de calidad en fabricación, etc.

Si a la capacidad de identificación de la MS le unimos la capacidad de separación de la cromatografía, tanto de gases (GC) como de líquidos (LC), parece evidente que la asociación de tales técnicas dé lugar a potentes técnicas combinadas (GC-MS, LC-MS) que permiten la separación e identificación de mezclas complejas. Actualmente existen una gran variedad de sistemas GC-MS y LC-MS fruto de los importantes avances en sistemas de introducción de

muestras, analizadores, detectores o métodos de tratamiento de la información obtenida.

Un espectrómetro de masa consta básicamente de una fuente de ionización que produce iones, un analizador que los clasifica por su masa y un detector que mide la intensidad relativa de las diferentes masas (figura 1.7). El principio de todos los espectrómetros de masas es que el comportamiento de una corriente de iones en fase gaseosa, a través de un campo electromagnético es dependiente de la relación masa-carga (m/z) de los iones, y dicha relación es usada por el analizador para distinguir unos de otros, consiguiéndose su separación.

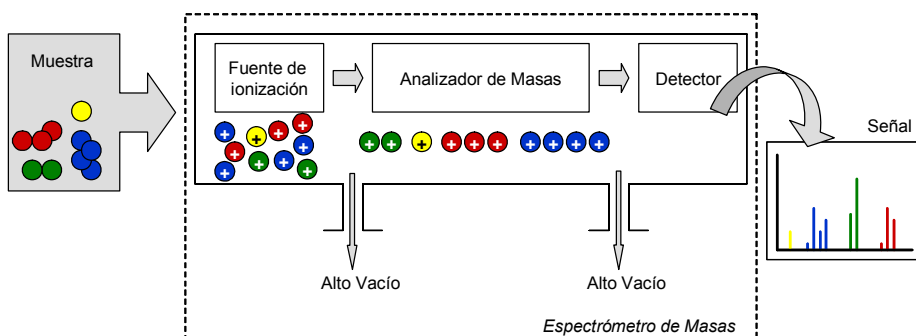


Figura 1.7: Esquema de un Espectrómetro de Masas.

Debido a la necesidad de introducir en el analizador iones de la muestra en fase gaseosa, el tipo fuente de ionización tuvo mucha importancia en el desarrollo de la MS. En los años 50 se desarrolló un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de gases (GC-MS) [Gohlke y McLafferty, 1993]. Esta técnica resultó muy útil para analizar, identificar y cuantificar compuestos orgánicos, sin embargo muchos compuestos quedaban excluidos debido a la necesidad de ser térmicamente volatilizados.

Mayor fue la dificultad del acoplamiento de una técnica de fase líquida de flujo constante como la HPLC y una en fase gas que se realiza con alto vacío, como la MS, constituyéndose la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) con la cual fue posible analizar moléculas termolábiles, no volátiles y de tamaño relativamente grande. Constantes avances en la instrumentación han convertido hoy día a la LC-MS en una potente técnica aplicable a un gran número de nuevas sustancias orgánicas y biológicas, alcanzándose límites de detección de partes por trillón (ppt) [Fenn, 2002].

1.7.5 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

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

- Alta sensibilidad y eficiencia de separación.
- Elevado potencial de identificación, gracias a la abundante información estructural que proporcionan los espectros de masas.
- Posibilidad de utilizar bibliotecas comerciales de espectros.

A continuación se comentarán algunos aspectos de la instrumentación y modos de operación en GC más utilizados en la identificación de PTs.

Sistemas de ionización.

Los instrumentos de GC-MS ofrecen dos técnicas de ionización: impacto electrónico (EI) e ionización química (CI). Ambas técnicas poseen características que las hacen complementarias en su aplicación a la identificación de compuestos desconocidos, como es el caso de los PTs.

a) Ionización por impacto electrónico (EI)

La identificación de los PTs se realiza principalmente en base a los espectros obtenidos en impacto electrónico (EI). La ionización por impacto electrónico ha sido utilizada de forma muy común en el análisis de contaminantes por su simplicidad y reproducibilidad.

La ionización por impacto electrónico se produce por la colisión de las moléculas de la muestra con una cortina de electrones procedentes de un filamento incandescente. Aunque se habla de impacto o choques, lo que realmente tiene lugar es una interacción entre los electrones incidentes y las moléculas de la muestra, sin que llegue a haber contacto real. Si la energía de los electrones es superior al potencial de ionización de nuestras moléculas, éstas se ionizarán por emisión estimulada de un nuevo electrón, generándose así iones moleculares. Si el choque ha sido muy eficaz, la energía comunicada por el electrón es superior a la necesaria para producir la ionización, y el exceso de energía provoca la fragmentación del ión molecular inicialmente formado por rotura de uno o varios enlaces, lo que dará lugar a los iones fragmento. Para un compuesto dado y siempre que se reproduzcan las condiciones de ionización, las proporciones relativas del ion molecular y de los diferentes fragmentos producidos serán fijas, constituyendo el patrón de fragmentación de esa molécula, que queda reflejado en el espectro de masas obtenido y que es como una huella digital de la molécula.

Se pueden obtener espectros idénticos en diferentes tipos de espectrómetros de masas siempre y cuando la energía de los electrones sea la misma. Por convenio se ha adoptado el valor de 70 eV como energía electrónica estándar, para poder comparar directamente los espectros obtenidos en diferentes laboratorios y poder elaborar bases de datos de espectros. El empleo de bases de datos comerciales (Wiley275, NIST) que almacenan espectros de masas de miles de compuestos representa una ventaja a la hora de identificar compuestos desconocidos, gracias a los algoritmos de búsqueda de que disponen los

equipos de GC-MS. Éstos permiten comparar el espectro de masas obtenido de la muestra con los espectros de masas almacenados en la base de datos, encontrando aquellos que mejor coinciden con el mismo con un determinado grado o nivel de concordancia. De esta manera es posible realizar la identificación de compuestos desconocidos de una forma rápida y sencilla y con un alto grado de confianza.

Sin embargo, las bases de datos espectrales no siempre son de utilidad en la identificación de productos de transformación, ya que en muchos casos éstos no están recogidos en las mismas. En estos casos, la abundante fragmentación obtenida en EI proporciona información estructural útil para la elucidación de las estructuras, que una vez propuestas pueden ser confirmadas mediante el análisis de los patrones correspondientes. Un ejemplo de identificación de intermedios basada en la interpretación de los espectros de masas obtenidos por GC-EI-MS se muestra en la figura 1.8 para el caso de la degradación fotocatalítica con TiO_2 del fármaco bezafibrato [Lambropoulou *et al.*, 2008]

Sin embargo, pese a la ventaja que presentan los espectros de EI en cuanto a la abundante información estructural que ofrecen, en algunos casos la energía interna retenida por el catión $[\text{M}]^+$ es tan grande que éste fragmenta completamente y no es posible determinar el ion molecular, lo que supone una seria limitación en la identificación de compuestos desconocidos. Dado que la asignación del ion molecular es esencial para una correcta caracterización de los compuestos, es recomendable el empleo de técnicas de ionización blandas, como la ionización química que aseguren la correcta identificación del mismo.

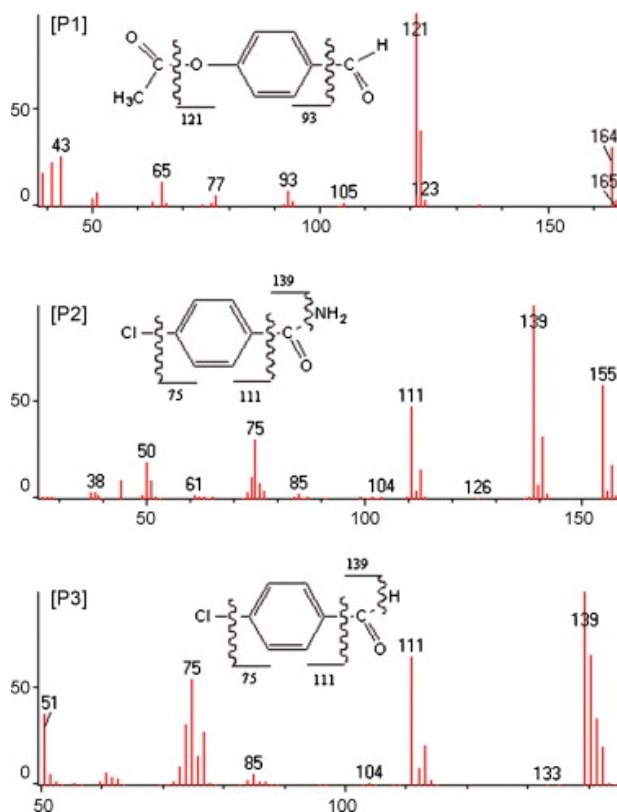


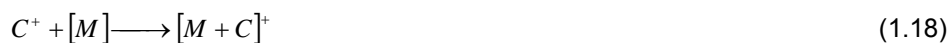
Figura 1.8: Identificación de productos de degradación del bezafibrato basada en la interpretación de los espectros obtenidos mediante GC-EI-MS [Lambropoulou y col., 2008]

b) Ionización química (CI)

La utilización de la técnica de **ionización química positiva** (PCI) es una alternativa muy útil para poder confirmar el peso molecular de compuestos desconocidos [Agüera et al., 2000, 2003, 2005, 2006; Gómez et al., 2007B, 2007C,]. La diferencia más importante entre este modo de ionización y el impacto electrónico es la cantidad de energía transmitida a las moléculas de la muestra durante el proceso de ionización. En PCI las moléculas de la muestra son ionizadas a cationes por otros cationes procedentes de un gas reactivo

(metano, isobutano, amonio, acetonitrilo). El rango de energía para estas reacciones es mucho más estrecho (aproximadamente hasta 20 eV) lo que da lugar a una menor fragmentación.

La técnica requiere que una mezcla gaseosa consistente en un gas reactivo [R] y las moléculas de la muestra [M] estén presentes en la fuente iónica en una relación de 10000:1. Como el gas reactivo está en claro exceso con respecto a la muestra, prácticamente todos los cationes primarios $[C_p]^+$ se producen por ionización electrónica directa del gas reactivo. Las moléculas de la muestra no se ionizan por ionización electrónica. Estos cationes primarios posteriormente reaccionarán con otras moléculas de gas reactivo para producir una serie de cationes secundarios ($[C]_1^+$, $[C]_2^+$, ..., $[C]_n^+$) que son característicos del gas reactivo utilizado y cuya concentración alcanza un estado estacionario. El número de cationes secundarios generados depende del tipo de gas reactivo. Estos iones secundarios interaccionan con las moléculas de la muestra dando lugar a reacciones catión/molécula. Se produce así la ionización de la muestra produciéndose, entre otros, cationes moleculares protonados $[M+H]^+$ abundantes, así como aductos que también dependen del tipo de gas reactivo, su presión y la temperatura de la fuente.



La presencia del ion molecular protonado, típica en espectros de CI permite confirmar el peso molecular de la molécula. Con metano como gas reactivo, la formación de los aductos característicos, $[M+C_2H_5]^+$ y $[M+C_3H_5]^+$ a m/z $M+29$ y $M+41$, respectivamente, también refuerzan la confirmación del compuesto de interés.

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. 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 con diazometano [Nelieu *et al.*, 1996]; BF_3/MeOH [Chiron *et al.*, 1998]; BSTFA [Guillard *et al.*, 1996], etc., 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 PTs, 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 [Nelieu *et al.*, 1996]. Por otro lado, la formación de compuestos indeseados durante el proceso de derivación, como consecuencia de la presencia en las muestras de compuestos adicionales (agentes del formulado, ácidos fúlvicos, etc.), puede complicar la interpretación de los resultados. Como consecuencia, se ha limitado el uso de la derivatización [Buxton *et al.*, 1998; Chiron *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 1996].

Otra alternativa de interés para la determinación de compuestos polares en GC consiste en usar columnas con fases poliméricas del tipo polietilen-glicol, que presentan una mayor polaridad, siempre y cuando las características de las columnas, en cuanto a estabilidad y sangrado a altas temperaturas, lo permitan [Agüera *et al.*, 2000].

Analizadores de masas

a) Analizadores cuadrupolares (Q)

La mayor parte de los estudios aplicados a la identificación de PTs emplean analizadores cuadrupolares. La popularidad de estos espectrómetros de masas surge de su relativamente bajo costo, del hecho de que es un sistema compacto, de la facilidad con la que su electrónica puede ser controlada y la simplicidad de operación.

Los analizadores tipo cuadrupolo pueden ser considerados como un filtro de masas y consisten básicamente en cuatro barras cilíndricas colocadas paralelamente en formación radial (Figura 1.9). Una combinación apropiada de corriente eléctrica y campo eléctrico de radiofrecuencia aplicado a las cuatro barras induce un movimiento oscilatorio en el flujo de iones introducido en el sistema. Las trayectorias oscilatorias de los mismos son dependientes de sus masas y así, los iones con una particular relación m/z se van moviendo consecutivamente por el cuadrupolo hacia el detector.

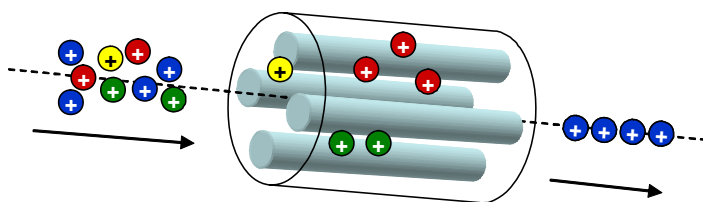


Figura 1.9: Esquema de un cuadrupolo simple.

Los cuadrupolos simples han sido ampliamente utilizados para el análisis de contaminantes medioambientales y PTs mediante GC-MS, principalmente porque ofrecen una alta sensibilidad y robustez, buena información cualitativa y resultados cuantitativos adecuados, teniendo la ventaja adicional de su capacidad de confirmación de estructuras.

Analizador trampa de iones (IT).

Este tipo de analizadores de masas se introdujo a principios de los años 80. Basa su funcionamiento en la separación de iones con diferentes valores de m/z en el tiempo, atrapándolos de forma selectiva en el espacio cerrado que constituye la trampa. El detector IT consta de 3 electrodos: uno de entrada, otro de salida y un electrodo anular central. Juntos forman una cavidad donde tiene lugar la ionización, fragmentación, almacenamiento y análisis de masas (Figura 1.10).

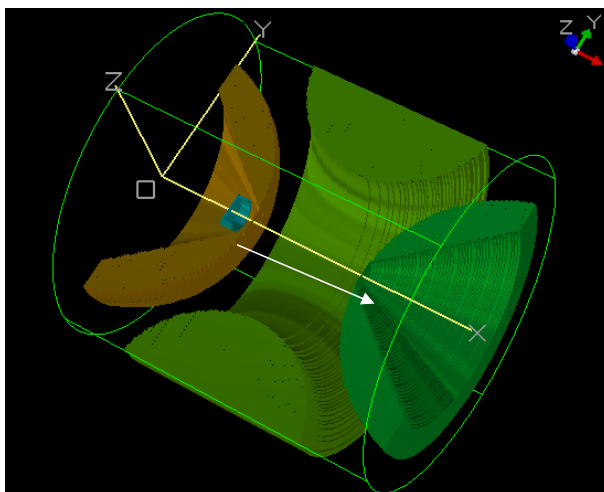


Figura 1.10: Esquema en 3D de una IT, electrodos en los extremos y anillo magnético central. Los iones eyectados siguen la dirección, marcada por la flecha, hacia el detector [www.simion.com/info/Image:Stools_view.png].

Además de su mejorada sensibilidad en “full scan” con respecto a los cuadrupolos simples, los analizadores de trampa de iones permiten la obtención de espectros de masas en tándem (MS/MS) de una forma sencilla.

La técnica de MS/MS consiste en seleccionar en el espectro de la primera fragmentación, sea impacto electrónico o ionización química, un ión selectivo del compuesto a analizar, al que se denomina ión precursor. Una vez seleccionado, éste es aislado en la trampa de iones, expulsándose de la misma, mediante la aplicación de campos eléctricos adecuados, los iones de masa inferior y superior. A continuación, mediante la aplicación de un campo eléctrico sinusoidal, los iones almacenados colisionan con el helio presente en la trampa mediante un proceso conocido como Disociación Inducida por Colisión (CID). Los iones producto así generados se expulsan de la trampa mediante la aplicación de una rampa de radiofrecuencia, registrándose el espectro de la segunda fragmentación (MS²).

Este modo de trabajo proporciona información estructural adicional, permitiendo la asignación de iones fragmento seleccionados, ya que es posible incluso repetir el proceso, aislándose de nuevo un ion producto para obtener espectros de MSⁿ.

Si bien es indiscutible el interés de este modo de trabajo, su aplicación en GC-MS, dada la abundante información estructural proporcionada por los espectros de EI, se ha centrado en mayor medida en la identificación de compuestos objetivo en muestras complejas, dada su mayor selectividad que repercute en una mejora de la sensibilidad. Sin embargo, si que ha encontrado un importante campo de aplicación para la elucidación de estructuras en LC-MS, por la escasa fragmentación proporcionada por esta técnica, como se comentará más adelante [Calza *et al.*, 2003, 2001]

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

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, se ha revelado en los últimos años como una herramienta de gran utilidad en la determinación de

compuestos desconocidos y PTs en agua. Pese a que esta técnica ofrece menor resolución y limitada información estructural, en comparación con la GC-MS, presenta también, sin embargo, importantes ventajas como son:

- Mayor facilidad para analizar compuestos polares, de escasa volatilidad y térmicamente inestables.
- Posibilidad de realizar el análisis directo de las muestras, cuando la sensibilidad requerida lo permite, evitando así las pérdidas derivadas del proceso de extracción.

El reciente desarrollo de interfases de ionización a presión atmosférica (API), como la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la ionización con electrospray (ESI), ha permitido mejorar la sensibilidad de estos sistemas y obtener mayor información estructural que con las interfases tradicionales (*thermospray* y *particle beam*), aumentando así la aplicabilidad de la técnica de LC-MS en este tipo de estudios [Barceló *et al.*, 1997; Chiron *et al.*, 1997]. A modo de ejemplo la Tabla 1.4 incluye algunas referencias relativas a la aplicación de diferentes técnicas de LC-MS a la determinación de PTs de fármacos en procesos de degradación fotoquímica [Petrovic y Barceló, 2007]. A continuación se discutirán las ventajas e inconvenientes de cada una de las estrategias analíticas más comunes.

Analizadores cuadrupolares sencillos (Q):

Una ventaja del uso de técnicas “blandas” de ionización a presión atmosférica es que permiten obtener información relativa al peso molecular de los compuestos. Generalmente, se obtiene el ion molecular protonado $[M+H]^+$ o aductos de amonio $[M+H+NH_3]^+$ o sodio $[M+H+Na]^+$, cuando se trabaja en modo positivo, y el ion molecular desprotonado $[M-H]^-$, si se trabaja en modo negativo.

Tabla 1.4: Revisión de métodos de LC-MS empleados en la identificación de PTs en procesos de transformación fotoquímica de fármacos [Petrovic y Barceló, 2007]

Compuesto	Proceso Oxidativo	Método MS	Referencia
<u>Fármacos anti-inflamatorios y analgésicos:</u>			
Diclofenaco	Fotólisis	LC-TOF	[Agüera <i>et al.</i> , 2005]
Diclofenaco	Fotocatálisis Foto-Fenton	LC-TOF	[Pérez-Estrada <i>et al.</i> , 2005]
Zomepiraco	Fotólisis	LC-MS(Q)	[Wang <i>et al.</i> , 2004]
Naproxeno	Fotólisis	LC-MS(Q)	[Hsu <i>et al.</i> , 2006]
Carprofeno	Fotólisis	LC-MS(Q)	[Sheu <i>et al.</i> , 2003]
<u>β-Bloqueadores e hipertensivos:</u>			
Atenolol	Fotólisis	LC-MS ² (QqQ)	[Liu y Williams, 2007]
Propranolol			
Metoprolol			
Enalapril	Fotólisis	LC-Qq-TOF LC-Qq-LIT	[Pérez <i>et al.</i> , 2006]
<u>Agentes reguladores de lípidos:</u>			
Ácido Clorofíbrico	Fotocatálisis (TiO ₂)	LC-MS ² (QqQ)	[Doll y Frimmel, 2004]
Atorvastatin	Fotólisis	LC-MS ² (QqQ)	[Lam y Mabury, 2005]
<u>Antidepresivos y antiepilépticos:</u>			
Carbamazepina	Fotocatálisis (TiO ₂)	LC-MS ² (QqQ)	[Poiger <i>et al.</i> , 2001]
Carbamazepina	Fotólisis	LC-IT	[Chiron <i>et al.</i> , 2006]

Fluoxetina	Fotólisis	LC-MS ² (QqQ)	[Lam <i>et al.</i> , 2005], [Kwon y Armbrust, 2006]
Citalopram	Fotólisis	LC-MS ² (QqQ)	[Kwon y Armbrust, 2005]
<u>Contraste de rayos X:</u>			
Ipromida	Fotocatálisis (TiO ₂)	LC-MS ² (QqQ)	[Poiger <i>et al.</i> , 2001]
lomeprol			
<u>Antibióticos:</u>			
Sulfamethoxazol			
Clinafloxacin	Fotólisis	LC-IT	[Lovdahl y Priebe, 2000]
Clorotetraciclina	Fotólisis	LC-IT LC-TOF	[Eichhorn y Aga, 2004]
Sulfonamidas	Fotólisis	LC-IT LC-TOF	[Boreen <i>et al.</i> , 2004], [Boreen <i>et al.</i> , 2005]

En contrapartida, hay algunas dificultades que deben ser resueltas cuando se utilizan los sistemas LC-API-MS como son la insuficiente información estructural y la carencia de bibliotecas espectrales que nos permitan identificar intermedios desconocidos, lo que significa un esfuerzo considerable en la obtención de información concluyente en relación a su identificación.

Una forma de obtener espectros con mayor fragmentación, y por tanto una mayor información estructural, empleando analizadores cuadrupolares sencillos es mediante lo que se conoce como “colisión inducida en la fuente”. Ésta se basa en el incremento del llamado voltaje de fragmentación que provoca la aceleración de los iones generados en la fuente incrementando su energía cinética y favoreciendo su colisión efectiva con un gas de colisión, generalmente He, Ar o N₂. Este procedimiento llegar a mejorar esta situación, 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. La figura 1.11 muestra un ejemplo de espectros a diferentes valores de voltaje de fragmentación.

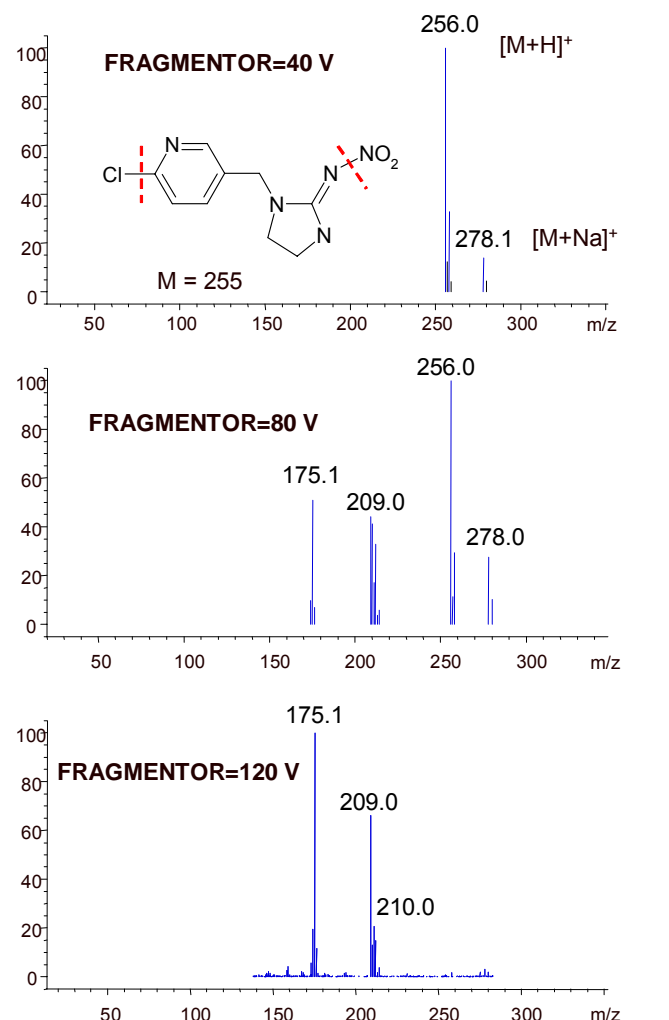


Figura 1.11: Espectros de masas obtenidos para el plaguicida imidacloprid a diferentes valores de voltaje de fragmentación o “fragmentor”.

Los inconvenientes de la CID ya comentados han limitado la aplicabilidad de los cuadrupolos simples a la identificación de PTs (ver Tabla 1.3). En este sentido, el seleccionar una técnica apropiada de LC-API-MS basada en la capacidad de los distintos analizadores que se utilizan, puede solucionar estos inconvenientes.

En general, dos son las estrategias más comúnmente utilizadas que proporcionan una mejora en la información estructural:

- Empleo del análisis de masas en tándem mediante el empleo analizadores de trampa de iones (IT) o sistemas híbridos como el triple cuadrupolo (QqQ) o el cuadrupolo-trampa de iones lineal (Q-LIT).
- Empleo de analizadores de masas de alta resolución como el analizador de tiempo de vuelo (TOF) o el cuadrupolo-tiempo de vuelo (Qq-TOF).

Diversos estudios han evaluado las ventajas e inconvenientes del uso de los diferentes analizadores [Ferrer y Thurman, 2003a; Petrovic y Barceló, 2007; Malato *et al.*, 2003c], en este tipo de aplicaciones.

Triple cuadrupolo (QqQ)

Estos sistemas constan básicamente de tres cuadrupolos colocados en serie, cada uno con una función diferente. El primer cuadrupolo se utiliza para escanear un rango de m/z preseleccionado y aislar un ion en particular. El segundo cuadrupolo, también conocido como celda de colisión, enfoca y transmite los iones mientras se aplica un gas (argón o helio) para provocar la fragmentación por colisión inducida del ion precursor seleccionado. El tercer cuadrupolo sirve para analizar los fragmentos generados en la celda de colisión y eliminar los fragmentos neutros que se han generado, en la figura 1.12 se muestra un esquema sencillo de este analizador.

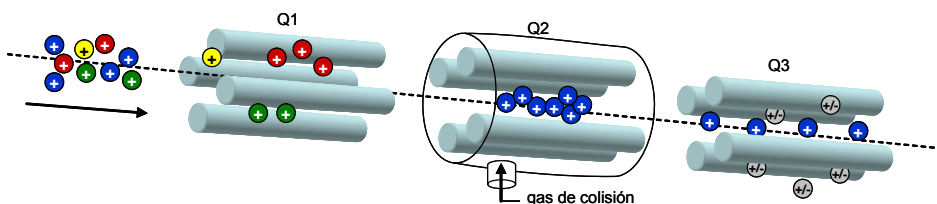


Figura 1.12: Esquema del funcionamiento de un analizador de triple cuadrupolo. Q1: filtro de masas trabajando con una masa objetivo, Q2: celda de colisión, Q3: segundo filtro de masas trabajando en modo SIM.

Los QqQ-MS se han aplicado fundamentalmente al análisis cuantitativo de compuestos objetivo por la elevada selectividad y sensibilidad que proporcionan operando en modo SRM (selected reaction monitoring). Sin embargo, estos instrumentos también proporcionan modos de operación alternativos que pueden ser útiles para identificación de compuestos desconocidos, como la búsqueda de pérdidas neutras (neutral loss scan), búsqueda de ion precursor (precursor-ion scan) o búsqueda de iones producto (product-ion scan).

Un ejemplo es el trabajo de Quintana y colaboradores [Quintana *et al.*, 2005] que utilizan espectros de iones producto registrados a diferentes energías de colisión para identificar los productos de biotransformación de cinco fármacos. La principal limitación sin embargo es la escasa sensibilidad que proporcionan los QqQ cuando operan en modo “scan”. Una mejor alternativa al triple cuadrupolo, por la mayor sensibilidad para registrar espectros de iones producto es la utilización de analizadores de trampa de iones

Trampa de Iones (IT)

Estos analizadores proporcionan, además de una mayor sensibilidad, la posibilidad de obtener espectros de MS^n . En este modo de operación se pueden aislar consecutivamente diferentes iones precursores de una misma molécula en etapas sucesivas obteniéndose patrones de fragmentación diferentes a los proporcionados en MS o MS^2 , que pueden proporcionar información específica de diferentes fracciones de la molécula, o ayudar a determinar la posición de determinados grupos funcionales.

Un ejemplo se muestra en la figura 1.13, correspondiente a la identificación de un derivado hidroxilado del plaguicida diuron, generado durante un experimento de degradación por fotocátalisis [Malato *et al.*, 2003c]. La observación de los fragmentos obtenidos en los análisis de MS^2 y MS^3 permitió confirmar la posición del grupo OH en la molécula.

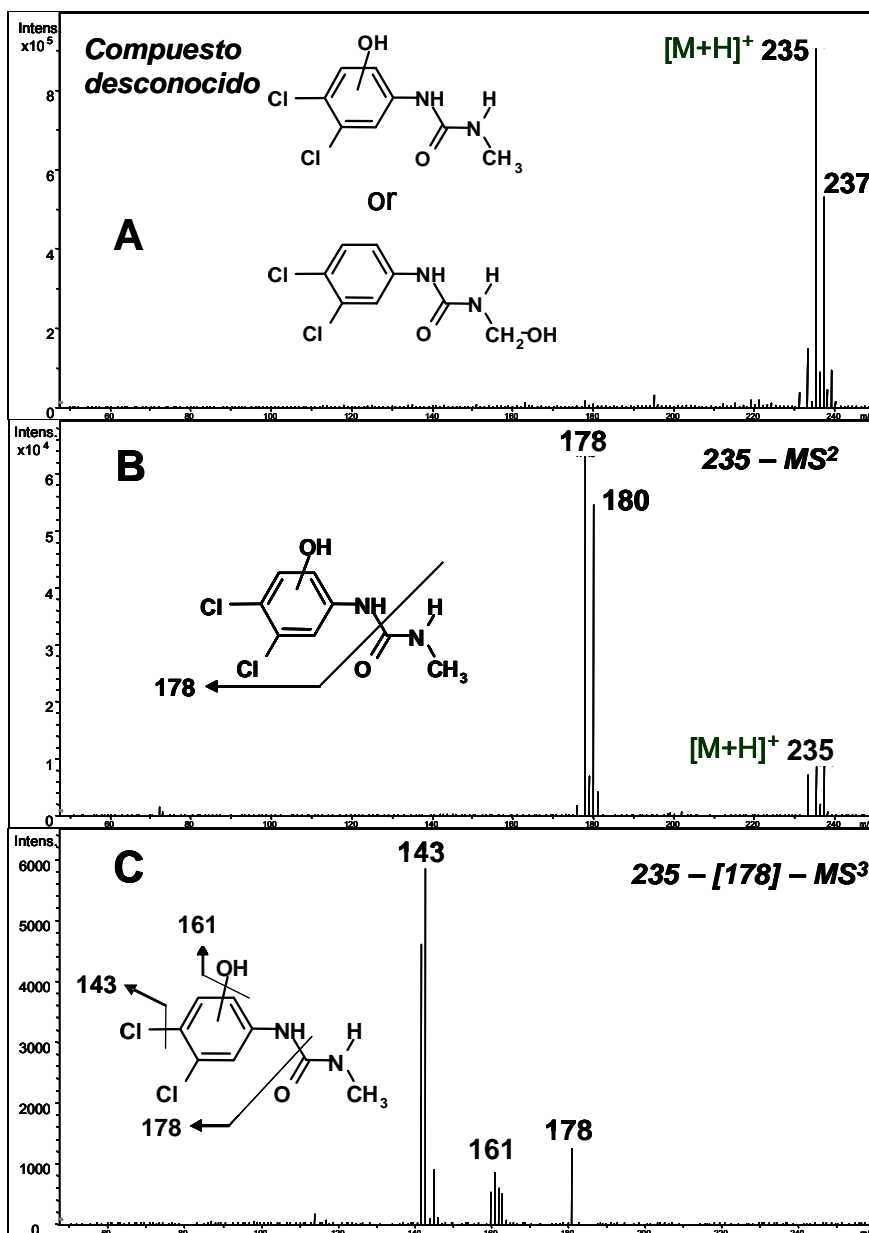


Figura 1.13: Espectros de masas obtenidos con LC-IT-MS durante la identificación de un compuesto desconocido de diuron. A) MS, B) MS² y C) MS³.

Cuadrupolo Lineal (Q-LIT)

Una de las mayores limitaciones de la IT tridimensional es que no es posible realizar búsquedas de iones precursoros con una gran sensibilidad como lo haría un triple cuadrupolo (QqQ), y que el rango dinámico de la IT es limitado ya que cuando muchos iones están presentes en la misma, la presencia de efectos espacio-carga disminuyen el rendimiento de la trampa. Esto se refleja cuando se presenta un problema de buscar un ion que está acompañado por una gran población de iones de fondo.

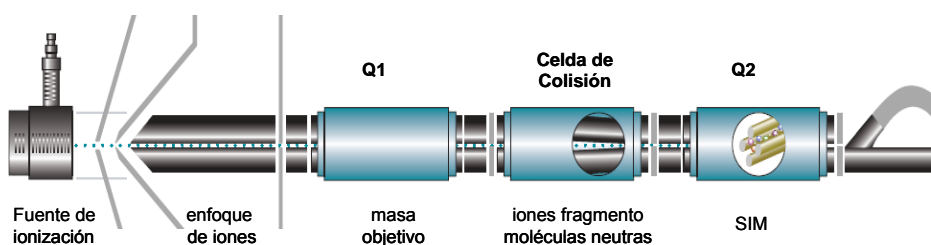


Figura 1.14: Esquema de los componentes de un analizador de masas de triple cuadrupolo con trampa lineal.

Recientemente se ha desarrollado un sistema híbrido cuadrupolo-trampa de iones lineal (Qq-LIT o Q-TRAP) que conjuga la tecnología de los triple cuadrupolo con la trampa lineal de iones. La figura 1.14 muestra un esquema de la configuración de un Qq-LIT. El instrumento está basado en un QqQ en el cual el tercer cuadrupolo (Q3) puede operar como un cuadrupolo normal o en modo LIT. El Qq-LIT se diferencia de la IT tridimensional en la manera en que se confinan los iones a lo largo del eje del cuadrupolo (figura 1.15), utilizando el Qq-LIT una distribución de radiofrecuencia en 2D, en lugar de una de 3D como en la IT. La principal ventaja del Qq-LIT frente a la trampa tridimensional es su mayor capacidad iónica debido a su mayor volumen por lo que se reducen los efectos espacio-carga.

Estos sistemas permiten trabajar en modo triple cuadrupolo (con todos los tipos de *scan* característicos de éste, las altas prestaciones para la cuantificación, gran selectividad, etc.), en modo típicamente trampa de iones, o en modo combinado cuadrupolo con trampa de iones lineal, pudiendo añadir nuevos tipos de *scan*. Además, el uso de la trampa proporciona mayor sensibilidad en modo *scan* que el QqQ, característica ésta que incrementa sensiblemente su capacidad para análisis de metabolitos, en muchos casos presentes a bajas concentraciones. Adicionalmente, a diferencia del QqQ, la trampa lineal permite trabajar registrando espectros de MSⁿ.

A pesar de las ventajas comentadas, aun no existen aplicaciones de esta técnica al análisis de PTs de fármacos en muestras medioambientales. Un ejemplo, sin embargo, que demuestra la potencialidad del Qq-LIT es reportado por Xia y colaboradores [Xia, *et al.*, 2003] para la determinación de 5 metabolitos del fármaco gemfibrozil en fluidos biológicos. Este trabajo describe la aplicación simultánea, en un mismo análisis, de diferentes estrategias de identificación como la búsqueda de pérdidas neutras, iones producto (MS²) y MS³. La combinación de estos modos de trabajo en un único análisis es posible gracias al uso del modo IDA (information-dependent-acquisition) provisto por el software del sistema, el cual permite la obtención de abundante información estructural de forma rápida y sencilla.

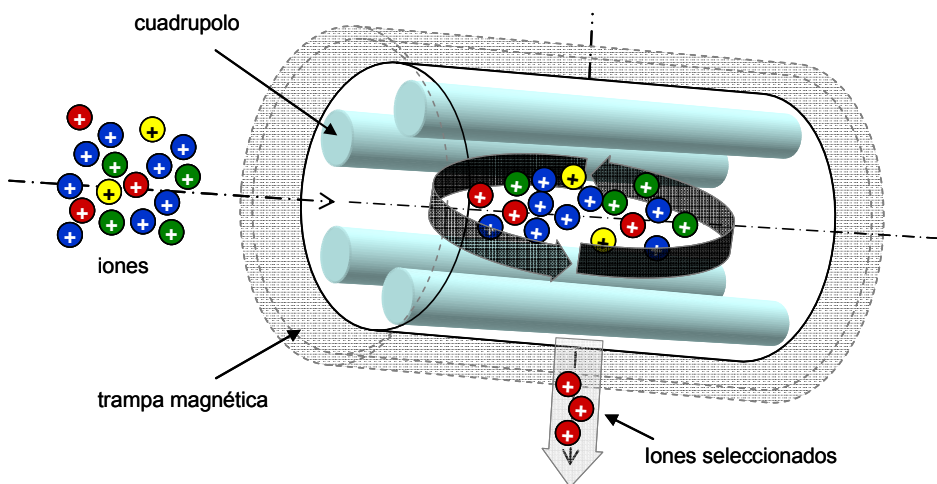


Figura 1.15: Detalle del funcionamiento de una trampa lineal.

Tiempo de Vuelo (TOF)

Los analizadores de tiempo de vuelo pueden considerarse actualmente como una de las herramientas más potentes en la identificación de compuestos desconocidos. Esto es debido a su capacidad de proporcionar medidas de masa exacta, tanto de los iones moleculares (de)protonados como de los posibles iones fragmento presentes en los espectros, lo que supone una importante mejora con respecto a cuadrupolos o trampas de iones que solo proporcionan información de la masa nominal.

En base a las medidas de masa exacta obtenidas, el software del sistema calcula la composición elemental y la fórmula empírica de los correspondientes iones, proporcionando una lista de posibles resultados que mejor se ajustan a la masa medida. La información sobre la composición elemental de los PTs, junto con el conocimiento del compuesto del que proceden, así como de los mecanismos de transformación (fotolíticas, fotocatalíticos, biológicos, etc.) que los originan suponen un importante punto de partida para su correcta identificación. A esto hay que añadir la excelente sensibilidad en full scan que

proporcionan los nuevos instrumentos LC-TOF, que permiten detectar compuestos desconocidos a niveles traza.

El funcionamiento del TOF, se esquematiza en la figura 1.16 Una vez producida la ionización, los iones formados son retenidos en la fuente iónica por medio de la aplicación de un potencial de retardo de igual signo al de la carga de los iones, evitando que puedan salir de la fuente dispersos en el tiempo. Una vez conseguida la ionización, y confinados los iones en el recinto de la fuente, se aplica un voltaje de extracción, que permite que todos los iones salgan de la fuente de modo simultáneo. Seguidamente, éstos pasan por un campo electrostático acelerador con un voltaje determinado, adquiriendo una elevada energía cinética que les impulsa en la dirección del tubo de vuelo, o analizador, hacia el detector. Los iones de mayor m/z volarán a menor velocidad que los de menor m/z . El resultado es que los iones más pequeños alcanzan antes el detector, seguidos en el tiempo y de modo sucesivo por los de mayor tamaño. El tiempo empleado en recorrer la longitud del tubo de vuelo es proporcional a su masa.

Recientes mejoras técnicas implementadas en los nuevos equipos TOF, han permitido mejorar sensiblemente la resolución y sensibilidad de los mismos. Así, el accesorio llamado “reflectrón” (Figura 1.16) proporciona una mejora de la resolución sobre los antiguos detectores TOF, los cuales solo poseían un tubo y los iones viajaban en línea recta desde el impulsor al detector. Esta mejora incrementa la distancia que tienen que recorrer los iones y la energía cinética enfocada a través del reflectrón, consiguiendo un incremento en la resolución y sensibilidad del TOF.

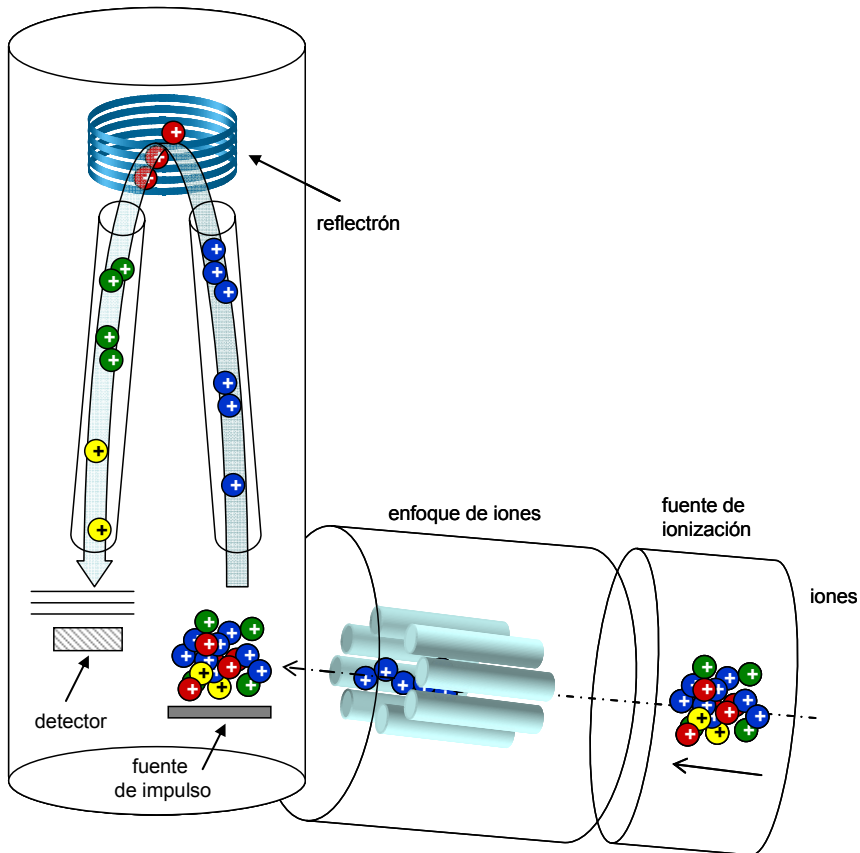


Figura 1.16: Esquema de los componentes en un detector de Tiempo de Vuelo.

Los analizadores de tiempo de vuelo proporcionan determinaciones de masa exacta con errores típicamente inferiores a 2 mDa, lo que permite una gran certidumbre en la asignación de las fórmulas empíricas de los compuestos. En la figura 1.17 se muestra un ejemplo de identificación de dos fármacos de uso común en una muestra de agua residual, donde se aprecian errores entre la masa experimental y la calculada, tanto para los iones moleculares protonados como para los iones fragmento, inferiores a 0.5 mDa.

El número de posibles fórmulas empíricas detectadas por el equipo para un determinado compuesto a identificar pueden reducirse drásticamente si se limita el umbral del error de exactitud de masa ($a < 5$ ppm) y si se consideran las características estructurales de la molécula. La observación del perfil isotópico de la molécula protonada en el espectro de masa exacta nos permite confirmar la presencia o ausencia de heteroátomos (normalmente átomos de halógenos o azufre) y también, utilizando las abundancias relativas, podemos deducir el número de ellos que hay presentes en la molécula investigada [García-Reyes *et al.*, 2005; Thurman *et al.*, 2005].

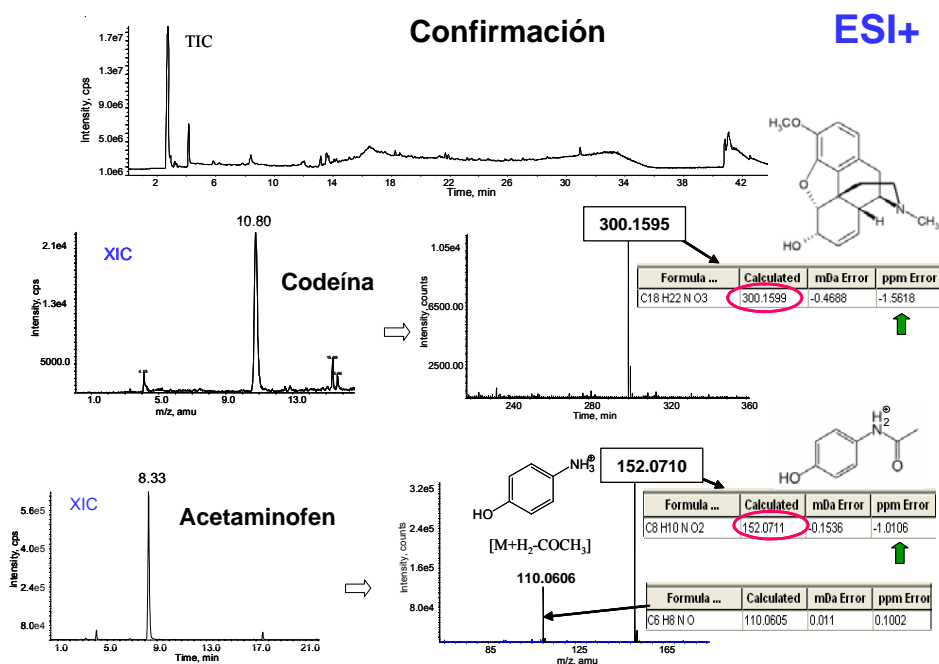


Figura 1.17: Ejemplo de la identificación de dos fármacos (codeína y acetaminofén), donde se obtuvieron errores menores a 1.5 ppm (0.5 mDa).

Diversos estudios han evidenciado la aplicabilidad de TOF-MS en la determinación de rutas metabólicas o elucidación de los productos de fotodegradación de ciertos fármacos y contaminantes orgánicos en agua. No

obstante, y a pesar del potencial de estos instrumentos para la identificación de desconocidos, los trabajos publicados son aun escasos, estando muchos de ellos recogidos en esta memoria. Algunos ejemplos son la aplicación de TOF-MS para la elucidación de los productos de foto-degradación del desinfectante triclosan en aguas residuales [Ferrer *et al.*, 2004]. Mezcua y col. [Mezcua *et al.*, 2006] identificaron con TOF-MS los productos de degradación de fotólisis y fotocátalisis de un disruptor endocrino omnipresente en las aguas medioambientales, el bisfenol A, en matrices de agua residual. También se aplicó TOF-MS para la identificación de los principales PTs del anti-inflamatorio/antipirético dipirona, en procesos de degradación solar en diferentes matrices ambientales [Gómez *et al.*, 2008]. Ibáñez y col. [Ibáñez *et al.*, 2006] describen la aplicación de LC-TOF y LC-QTOF en la identificación de PTs del plaguicida diazinon en agua, poniendo de manifiesto la capacidad de estas técnicas para la identificación de compuestos isobáricos, con la misma masa nominal. Lambropoulou y colaboradores [Lambropoulou *et al.*, 2008] identifican 17 PTs de bezafibrato generados durante la degradación fotocatalítica con TiO₂. Errores inferiores a 2 mDa permitieron la asignación de la fórmula empírica de los intermedios. La selección de un ión diagnóstico de m/z 138.9965, correspondiente a una sección de la molécula común a la mayoría de los intermedios [C₇H₃ClO], permitió la identificación los mismos mediante la obtención del cromatograma de iones seleccionados. La figura 1.18 muestra los espectros de masa exacta de algunos de los intermedios más relevantes identificados.

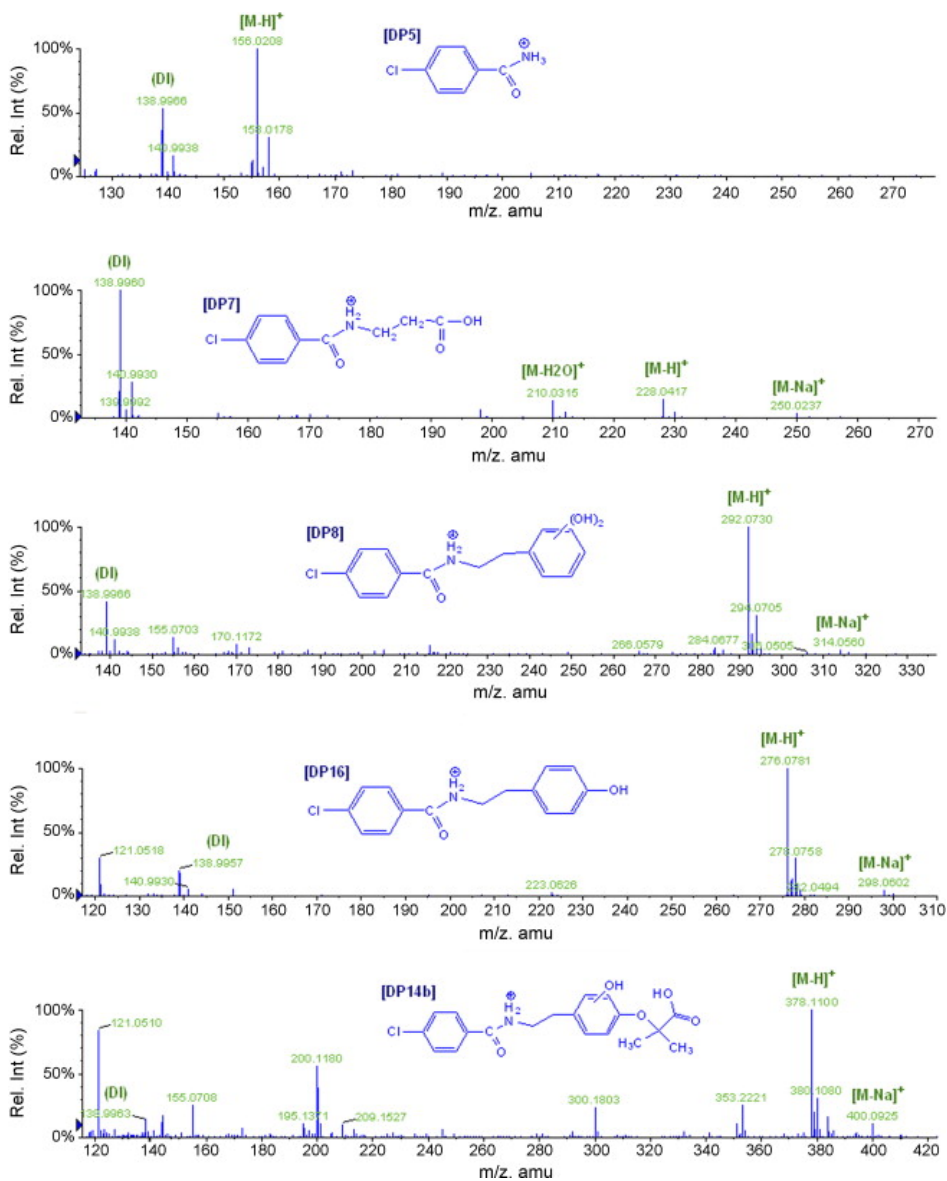


Figura 1.18: Espectros de masa exacta, obtenidos en LC-TOF-MS, para el benzafibrato, y algunos de los intermedios más relevantes identificados [Lambropoulou et al., 2008].

Cuadrupolo con Tiempo de Vuelo (Qq-TOF)

Con el fin de mejorar y ampliar las capacidades de los sistemas LC-TOF, se ha introducido recientemente un sistema híbrido que combina la estabilidad de un analizador cuadrupolar (Q) con la alta eficiencia, sensibilidad, precisión y medida de masa exacta de un analizador de masas TOF (figura 1.19). En este sistema híbrido Qq-TOF, el cuadrupolo puede utilizarse para aislar selectivamente un ion precursor, fragmentarlo y obtener espectros de iones producto de masa exacta, lo que aumenta la capacidad de esta técnica para diferenciar entre isómeros estructurales.

El Qq-TOF aúna así las capacidades del cuadrupolo para seleccionar un ion en particular y la habilidad del TOF para llevar a cabo mediciones simultáneas y precisas de los iones dentro de todo el rango de masas. Esto contrasta con los analizadores de masas convencionales, tales como los cuadrupolos en tándem, los cuales tienen que escanear una sola masa cada vez. El Qq-TOF ofrece una sensibilidad y precisión significativamente mayor, en comparación con los QqQ cuando se ha de adquirir espectros de fragmentación en todo el rango de masas.

El Qq-TOF es un instrumento que puede utilizar de igual manera el cuadrupolo o el TOF independientemente o en conjunto para análisis de masas en tándem.

En el campo medioambiental, solo unos pocos autores han explorado las capacidades de estos sistemas para la identificación de PTs. Eichhorn y col. [Eichhorn *et al.*, 2005] realizan la elucidación estructural de 2 metabolitos del antibiótico trimetoprim producidos por degradación con lodos activados con bacteria nitrificantes. La identificación de los metabolitos fue posible con errores de masa inferiores a los 5 mDa. Otros estudios reportan la identificación de productos de fotodegradación de diversos plaguicidas, como carbofurán [Detomaso *et al.*, 2005], diuron [Malato *et al.*, 2003b] o triazinas [Ibáñez *et al.*, 2004]. El empleo de masa exacta permitía, en el caso del carbofurán eliminar

incertidumbres relativas a pérdidas neutras isobáricas. Así las pérdidas neutras de 28 Da presentadas por algunos PTs pudieron diferenciarse con exactitud y asignarse a pérdidas de CO ó C₂H₄, de 27.9949 y 28.0313 Da, respectivamente.

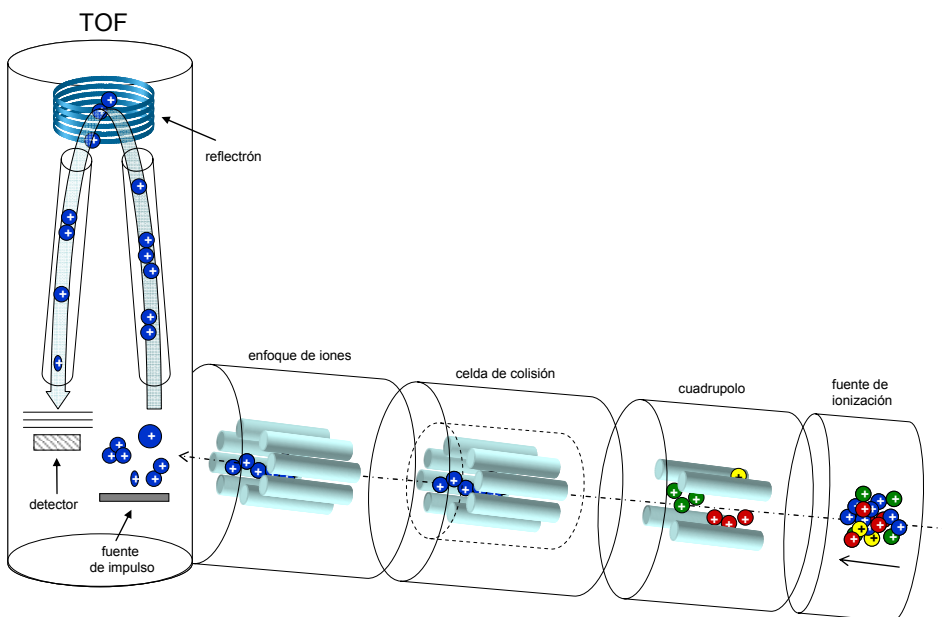


Figura 1.19: Esquema representativo de los componentes de un Q-TOF.

Pese a la potencialidad de las técnicas descritas, la mayoría de los trabajos publicados proponen la combinación de más de una de ellas o con otras técnicas como la RMN para conseguir una evaluación más completa de los procesos de degradación, lo que refleja la complejidad de estos estudios.

CAPITULO

2

Capítulo 2

EXPERIMENTAL

2.1 Compuestos modelo y reactivos

Se utilizó Diclofenaco y Dipirona en su forma de sal sódica, Verde Malaquita en su forma de sal oxálica, todos de Sigma–Aldrich y pureza $\geq 90\%$. El hierro utilizado para el sistema Foto-Fenton fue $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pureza del 75%, H_2SO_4 y NaOH para ajustes de pH, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30% (p/v) de Panreac (Barcelona, España). El TiO_2 fue Degussa P-25. Para los métodos cromatográficos se utilizó metanol y acetonitrilo de alta pureza de Sigma-Aldrich, NaOH 50% de J.T. Baker (Deventer, Holland), agua de alta pureza de un sistema Milli-Q (Bedford, MA, US) $0.052 \mu\text{S/cm}$. En todos los experimentos se utilizó agua desmineralizada obtenida de la planta de destilación en la Plataforma Solar de Almería (PSA) (conductividad $< 10 \mu\text{S/cm}$, $\text{Cl}^- = 0.2 - 0.3 \text{ mg/L}$, $\text{SO}_4^{2-} = 0.2 - 0.3 \text{ mg/L}$, $\text{NO}_3^- = 0.2 - 0.3 \text{ mg/L}$, carbono orgánico $< 5 \text{ mg/L}$). En algunos experimentos se utilizó agua estándar la cual se preparó añadiendo NaHCO_3 (96 mg/L), $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60mg/L), MgSO_4 (60 mg/L) y KCl (4 mg/L) al

agua destilada, como lo estipula el método del manual de métodos estándar [Standard Methods, 1998] para agua con una dureza media.

2.2 Dispositivo experimental

2.2.1 Fotoreactores y procedimiento experimental

Todos los experimentos fotocatalíticos (en fase homogénea y heterogénea) se realizaron utilizando captadores solares cilindro parabólico compuestos (CPC), dispuestos en una planta piloto, como se muestra en la figura 2.1. Localización: Tabernas, España. Latitud: 37° N; Longitud: 2.4° W. La planta piloto se utilizó con un volumen total de 35 litros, el volumen de líquido iluminado es de 22 litros, la superficie irradiada de captadores fue de 3.08 m². La planta piloto se constituye de dos lazos gemelos, compuestos por tres captadores CPCs en paralelo inclinados 37°, lo que maximiza la captación de radiación solar, el agua se recircula mediante una bomba centrífuga que proporciona un caudal de 20 L/min. Con el objetivo de disponer de suficiente volumen para muestreo, poder recircular el agua y poder añadir los reactivos necesarios el sistema cuenta con un tanque de 10 L perfectamente agitado. El sentido del flujo tiene el siguiente orden: tanque de agitación, bomba de recirculación, módulos CPC, retorno al tanque de agitación. Las muestras fueron tomadas a través de una válvula colocada en el tramo entre los módulos CPCs y el tanque de mezcla.

La planta piloto trabaja en sistema de lotes (“batch”), recirculado constantemente el volumen total de trabajo, manteniendo un flujo turbulento en los tubos absorbedores. La temperatura no es controlada en el sistema, por tanto la temperatura dentro de los reactores varía dependiendo de la estación del año, normalmente entre 30 y 40° C. Al comienzo del experimento se cubren los módulos CPCs, se agrega el compuesto a degradar y se mantiene la recirculación hasta que se alcance la concentración deseada, posteriormente se

agrega el catalizador a utilizar, de nuevo se mantiene la recirculación por un período predeterminado de tiempo, con el objeto de verificar alguna reacción en la oscuridad. Finalmente se retira la cubierta del captador y las muestras son tomadas a intervalos de tiempo pre-establecidos. En el caso de los experimentos, este procedimiento se complementa con el ajuste de pH a 2.8, antes de añadir el catalizador (Fe^{2+}) y con la adición de peróxido de hidrógeno antes de retirar la cubierta del captador solar.

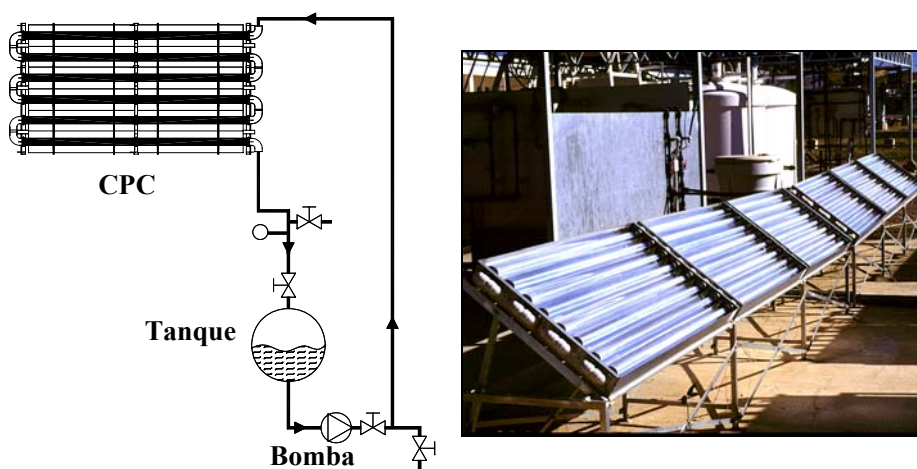


Figura 2.1: Esquema e imagen de los reactores solares fotocatalíticos.

En el caso del proceso de Foto-Fenton (fotocatálisis homogénea), el reactivo limitante es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se mantiene entre 200 – 400 mg/L por medio de adiciones periódicas, en la medida que se vaya consumiendo.

En los procesos fotocatalíticos solares la radiación solar juega un papel muy importante, debido a que interviene directamente en los procesos activando el TiO_2 o permitiendo la regeneración de Fe^{+2} . Sin embargo una característica de la radiación solar es que nunca es constante, además del hecho de que no se puede controlar. Con el fin de comparar diferentes experimentos que se

realizaron bajo diferentes condiciones de radiación solar, se desarrolló una metodología tomando en cuenta el valor medido de la radiación solar en el momento del experimento. Esta metodología introduce de una manera sencilla un tiempo de iluminación estandarizado. Una radiación de $30 \text{ W}\cdot\text{m}^2$ puede ser considerada como un estándar de radiación UV global ($I_{G,UV}^0$) para un día perfectamente soleado y despejado en la Plataforma Solar de Almería (PSA) [Malato *et al.*, 2003]. $I_{G,UV}$ es la radiación media medida en cada intervalo de muestreo, siendo t el tiempo transcurrido desde que se inició el experimento. La radiación solar ultravioleta fue medida a través de un radiómetro de UV global (KIPP&-ZONEN, modelo CUV3), el cual se encuentra montado en una plataforma inclinada 37° , la misma inclinación que los módulos CPCs, el cuál proporciona datos en términos de radiación incidente $\text{W}_{UV}\cdot\text{m}^2$. Esto nos da una idea de la energía que alcanza cualquier superficie en la misma posición con respecto al sol, y por tanto en los CPCs. Las ecuaciones (2.2 y 2.3) permiten normalizar el tiempo de iluminación mediante el cálculo de t_{30W} . En las figuras que describen los experimentos de degradación (capítulos de resultados) se utilizan a veces tiempos negativos. Esta notación pretende aclarar el tiempo transcurrido (en este caso tiempo real y no normalizado) antes de iniciar la iluminación con los captadores tapados, siendo $t_{30W} = 0$ el momento en que se inició con la iluminación. Esta forma de presentación de los datos permite simplificar la comprensión de los mismos, utilizándose fundamentalmente en el caso de foto-Fenton para los periodos transcurridos durante la mezcla de reactivos y, sobretodo, para remarcar el periodo inicial dónde solo se produce la reacción de fenton en la oscuridad al mezclar peróxido de hidrógeno y Fe^{2+} .

$$t_{30W} = t \frac{I_{G,UV}}{I_{G,UV}^0} \quad (2.2)$$

$$t_{30W} = \frac{1}{I_{G,UV}^0} \int_0^t I_{G,UV}(t) dt \quad (2.3)$$

Este concepto de utilizar un tiempo estandarizado con respecto a la radiación solar hace posible la comparación del rendimiento experimental de diferentes captadores solares. Evidentemente otra manera de comparar este tipo instalaciones es desde el punto de vista del coste de tratamiento, sin embargo esto no es sencillo de hacer y en la mayoría de los casos no es muy exacto [Goswami *et al.*, 1997]. En un esfuerzo por lograr un acuerdo la IUPAC recomienda que la comparación de los sistemas de captación solar esté basada en el área de captador necesaria para lograr un cierto objetivo por unidad de tiempo [Bolton *et al.*, 2001].

La energía UV incidente acumulada en la superficie del captador por unidad de volumen la denominaremos Q , y se calcula con la ecuación (2.4) [Malato *et al.*, 2002]. En la Figura 2.2 se muestra un ejemplo de un experimento de degradación, donde se demuestra claramente la utilidad de usar Q , cuando se discuten resultados experimentales.

$$Q = \frac{A}{V_{tot}} \int_0^t I_{G,UV}(t) dt \quad (2.4)$$

La curva de degradación con respecto al tiempo experimental (t , figura 2.2a) tiene un aspecto difícil de interpretar, debido a los tres puntos de inflexión provocados por los cambios en la intensidad de iluminación, pero la curva de degradación con respecto a Q (figura 2.2b) permite evaluar mejor una cinética de reacción de primer orden. Finalmente con la ecuación (2.5) se puede calcular el área del captador por unidad de masa, como lo define la IUPAC [Bolton *et al.*, 2001], donde Δc es la diferencia de concentración del parámetro analítico que se esté midiendo, desde el inicio hasta el final del tratamiento.

$$A_{CM} = \frac{Q}{I_{G,UV}^0 \Delta c} \quad (2.5)$$

Todo lo anterior se puede calcular a partir de los datos de $I_{G,UV}$ recogidos durante los experimentos, sin embargo en esta tesis se ha decidido utilizar el parámetro t_{30W} por ser el más intuitivo por su similitud a los tiempos de reacción utilizados en reactores convencionales. De hecho, las velocidades de reacción se calculan habitualmente como dC/dt .

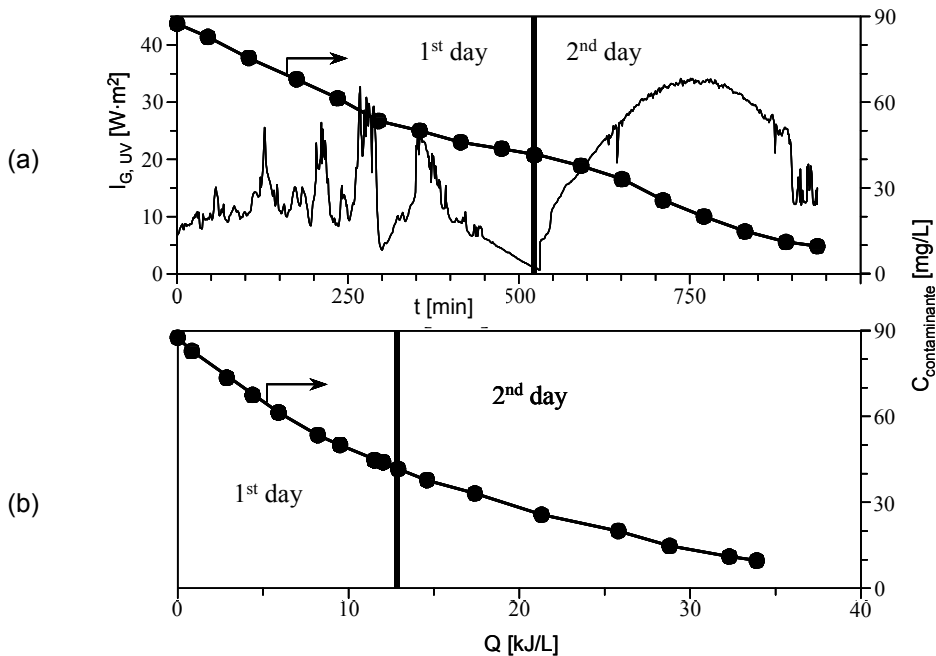


Figura 2.2: Ejemplo de un experimento de degradación solar. (a) concentración contra el tiempo de experimentación, (b) concentración contra Q .

2.2.2 Fotólisis e hidrólisis

Los experimentos de fotólisis se realizaron en botellas de 5 L de vidrio pyrex con una transmisividad a la radiación UV > 80% de 320 a 400 nm, y alrededor del 40% a 300 nm, diámetro interno 15 cm y altura 30 cm. La solución se preparó en las mismas botellas, previamente cubiertas con papel aluminio; una vez

expuestas al sol se mantuvieron en agitación constantemente y la boca de la botella se cubrió, con el objeto de prevenir contaminación externa. En los experimentos de hidrólisis se utilizaron botellas ámbar de 250 mL, y matraces ámbar o forrados de papel aluminio para la preparación de las soluciones. Durante las hidrólisis realizadas, las botellas se mantuvieron en oscuridad.

2.3 Métodos analíticos convencionales

2.3.1 Carbono Orgánico Total (COT)

La medida del Carbono Orgánico Total (COT) se lleva a cabo a través de un analizador que realiza mediciones de Carbono Total (CT) y Carbono Inorgánico Total (CIT) en muestras de agua; la diferencia entre el CT y el CIT es la medida del COT. Este analizador efectúa la medición de CT al pasar una cantidad determinada de muestra que es arrastrada por una corriente de aire por un reactor (con catalizador de platino soportado en perlas de alúmina) a 680 °C, donde todo el carbono de la muestra se transforma en CO₂. Posteriormente la corriente de gas pasa a través de un detector de infrarrojo no dispersivo. Se genera una señal proporcional a la cantidad de carbono contenido en la muestra. El analizador obtiene el CIT al dosificar ácido fosfórico en una cantidad determinada a la muestra y burbujearla con aire de alta pureza. De esta manera al disminuir el pH y purgar con aire se provoca la generación rápida de CO₂ proveniente de la oxidación de carbonatos y bicarbonatos contenidos en la muestra. La corriente de gas es conducida directamente al detector infrarrojo, generándose también una señal proporcional al carbono inorgánico contenido en la muestra.

El dispositivo utilizado para medir el carbono orgánico disuelto (COD) es un equipo Shimadzu TOC 5050A equipado con un automuestreador ASI5000, que se muestra en la Figura 2.3. Este analizador de COT tiene instalados tubos

capilares, que son demasiado pequeños para permitir el ingreso de partículas o material no disuelto, por tanto la medida de carbono que proporciona es la de que se encuentra disuelto, es decir carbono orgánico disuelto (COD).



Figura 2.3: Imagen del analizador de COT. (a) Módulo de COT y (b) Automuestreador.

Todas las muestras fueron filtradas (por eso hablar de COD) utilizando filtros de PTFE con un tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore Millex® GN). Una vez filtradas las muestras, por medio del automuestreador, fueron inyectadas y analizadas automáticamente. Cada medida estuvo basada en dos inyecciones con una variación máxima del 2% entre ellas, de lo contrario se realiza una tercera inyección. Esto lo realiza automáticamente el sistema en atención a los límites de variación que se le programen. Con las muestras provenientes de los experimentos utilizando el proceso foto-Fenton se procedió con especial rapidez (se inyectaban en el sistemas inmediatamente después de ser tomadas) ya que el hierro disuelto y el peróxido de hidrógeno siguen reaccionando una vez que se han retirado de la exposición a la luz, con la consecuente degradación de la muestra. En el caso de la fotocatalisis utilizando TiO_2 una vez que las muestras son retiradas de la radiación solar se detiene toda actividad catalítica, siendo así muestras más estables.

Periódicamente soluciones patrón son inyectadas en el equipo para comprobar el correcto funcionamiento, en la figura 2.4 se muestra la calibración de los rangos de concentraciones utilizadas. Además de esto, en cada experimento realizado se comprobó que la concentración teórica de COD, calculada para cada compuesto modelo utilizado. Una comprobación adicional es que la concentración inicial del COD y la del compuesto de interés, medida por HPLC, deben de ser congruentes.

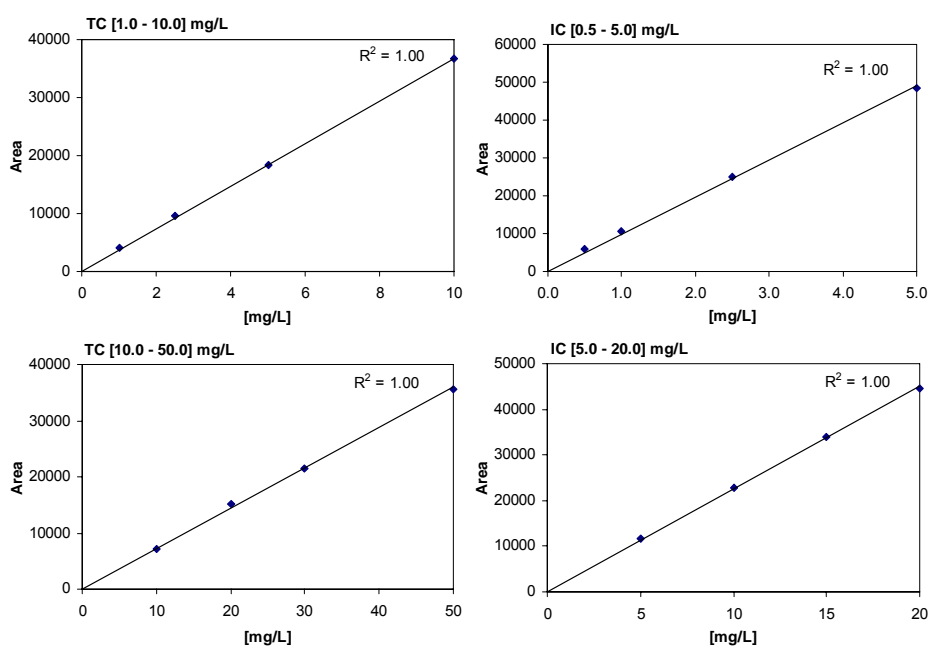


Figura 2.4: Datos de calibración del equipo en los rangos de concentraciones de CT y CIT utilizados en esta Tesis.

2.3.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La concentración de los compuestos de interés en agua, se analizó utilizando un sistema HPLC Agilent Technologies, series 1100 (Figura 2.5), con detector UV-VIS Diode Array Detector (DAD), columna C-18 (LUNA 5 micron, 3 × 150 mm, de

Phenomenex®) y flujo de 0.5 mL/min, y un volumen de inyección de 10 µL. Las muestras se prepararon diluyendo 1:1, la muestra con acetonitrilo o metanol (dependiendo de la fase móvil utilizada) y filtrando posteriormente utilizando filtros Milipore® de 0.22 µm. Los métodos de separación para cada sustancia se muestran en la tabla 2.1. La dilución 1:1 tiene un doble objetivo: (i) detener cualquier reacción que pueda ocurrir en la oscuridad desde que se toma la muestra hasta que se analiza; (ii) desorber cualquier compuesto que pueda haber quedado adsorbido en la superficie del catalizador sólido (TiO₂) o hidróxidos de hierro formados en el proceso de foto-Fenton antes de la filtración para evitar que quede retenido en el filtro.

Tabla 2.1: Composición de la fase móvil utilizada para cada compuesto

Compuesto	Fase Móvil	λ (nm)
Diclofenaco	ACN / NH ₄ COOH 10 mM (50/50) pH= 3	254
Dipirona	MeOH / H ₃ PO ₄ 20 mM (50/50) pH= 2.5	254
Verde Malaquita	ACN / CH ₃ COONH ₄ 50 mM (50/50) pH= 4.4	617*/254**

* para el VM.

** para los productos de transformación.

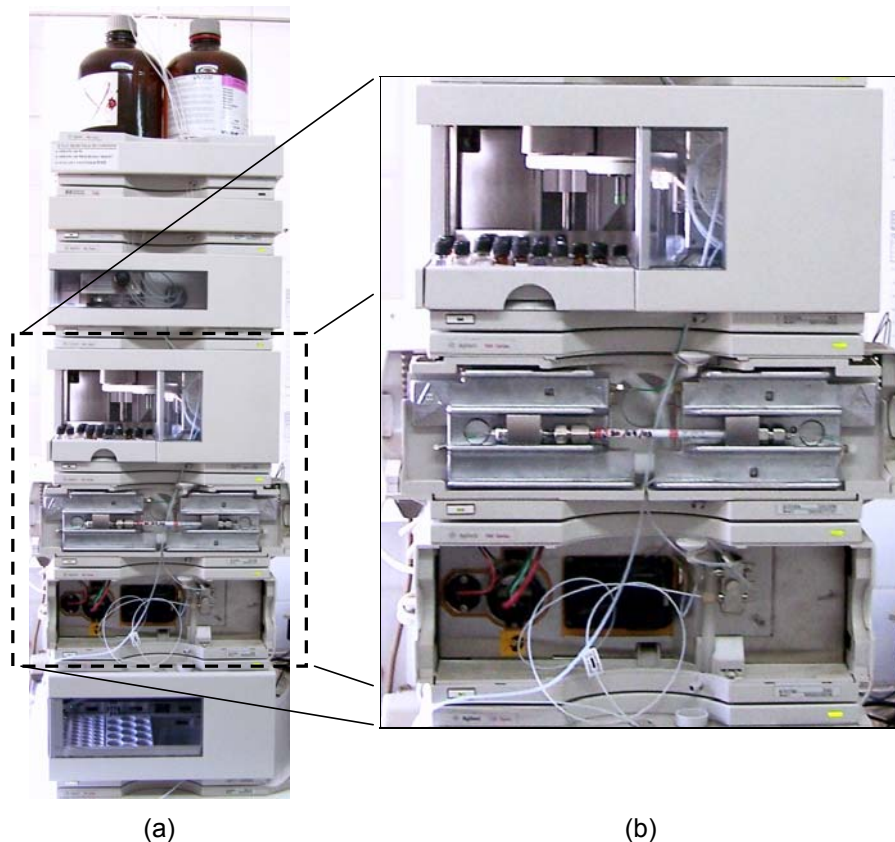


Figura 2.5: Imagen del HPLC Agilent serie 1100 (a). Detalle de los módulos (b): automuestreador, columna, y detector UV-VIS (DAD).

Para asegurar el buen funcionamiento del equipo se inyecta a menudo un patrón. Además, como medida de control adicional, siempre se dispone de la concentración inicial de cada experimento, que debe ser congruente con la cantidad de compuesto que se ha agregado al volumen deseado agua. Finalmente la concentración inicial, medida en HPLC, y el valor de TOC deben de ser congruentes.

2.3.3 Cromatografía Iónica (IC)

La determinación de cationes se llevó a cabo en un cromatógrafo Dionex DX-120, con una columna Dionex IonPac CS12A de 4 x 250 mm y flujo de 1.2 mL min⁻¹, en método isocrático, con el que fue posible determinar la concentración de NH₄⁺. El método isocrático tiene un tiempo de 15 min y como eluyente se utilizó H₂SO₄ a una concentración de 20 mN.

Para los aniones y ácidos carboxílicos se utilizó un cromatógrafo Dionex DX-600, con una columna Dionex IonPac AS11-HC de 4 x 250 mm, y flujo de 1.5 mL/min. El método para aniones fue isocrático de 15 min, con un escalón de concentración como se detalla en la tabla 2.2. Con este método es posible determinar las concentraciones de Cl⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻.

Tabla 2.2: Método para la determinación de aniones.

Tiempo	Agua	NaOH [100 mN]
0 – 7.5 min	80%	20%
7.5 – 15 min	65%	35%

Para los ácidos carboxílicos se utilizó un método de rampa de concentraciones, descrito en la tabla 2.3: Este método nos permite determinar Acetato/Glicolato, Propianoato, Formiato, Piruvato, Maleato, Oxalato.

Tabla 2.3: Método para la determinación de ácidos orgánicos.

Tiempo	Agua	NaOH [5 mN]	NaOH [100 mN]
0 min – 18 min	80%	20%	
18 min – 28 min	85%		15%
28 min – 38 min	70%		30%



Figura 2.6: Sistema de IC Dionex utilizado. DX120 (cationes), DX600 (aniones/ácidos orgánicos) y automuestreador.

Con el fin de asegurar el buen funcionamiento de los cromatógrafos iónicos, antes de cada secuencia de inyecciones, se analiza agua ultra pura (MilliQ) y posteriormente se introducen patrones de 2.5 ó 10 mg/L para cationes, aniones y ácidos carboxílicos. Además el equipo se calibra periódicamente con concentraciones que van desde 0.1 mg/L hasta 50 mg/L, para aniones y cationes, y de 0.1 - 10 mg/L para ácidos carboxílicos. Se dispone de rectas de calibración en rangos de 0.1 – 1 mg/L, 1 – 10 mg/L, y 10 – 50 mg/L. En las figuras 2.7a, 2.7b y 2.7c se muestran los cromatogramas de los patrones mencionados anteriormente.

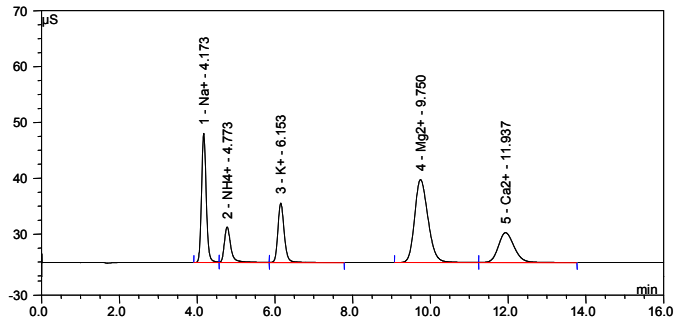


Figura 2.7 (a): Cromatograma del patrón de referencia de cationes.

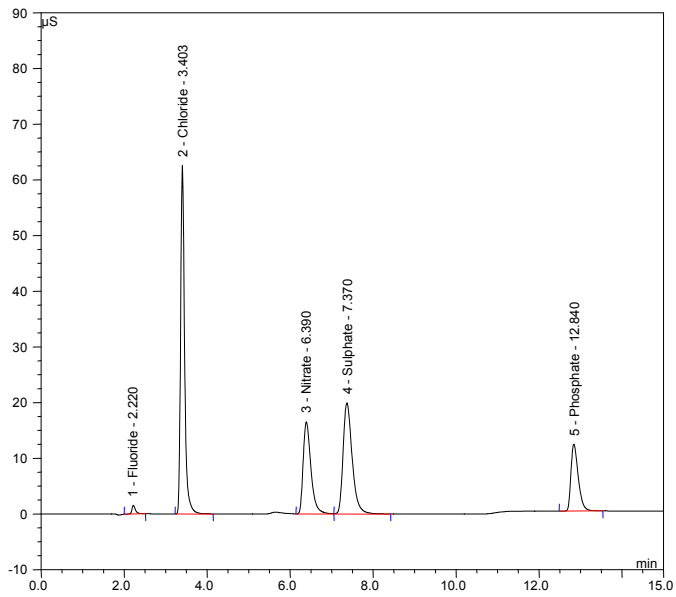


Figura 2.7 (b): Cromatograma del patrón de referencia de aniones.

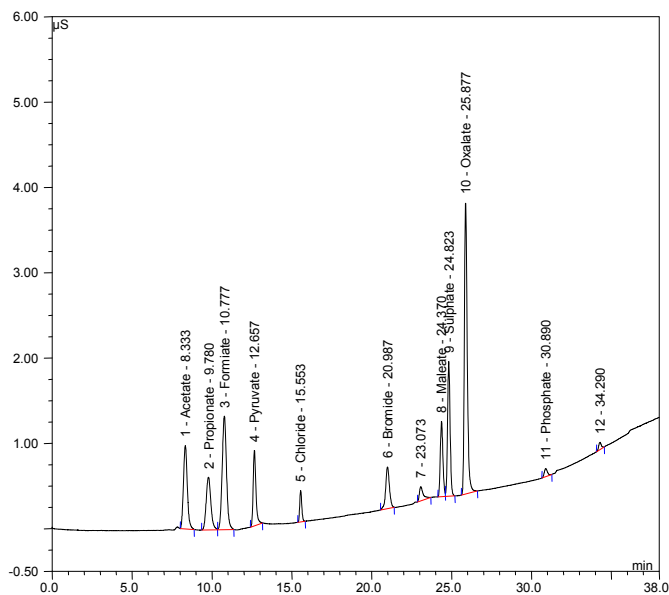


Figura 2.7 (c): Cromatograma del patrón de referencia de ácidos carboxílicos.

Los dos cromatógrafos DX-120 y DX-600 se controlan a través del software Chromelon®, el cual determina el área de la señal generada por la muestra, y la integra automáticamente, teniendo la opción de corregir manualmente dicha integración. Utilizando la recta de calibrado adecuada para una determinada concentración, previamente construida, se obtiene el resultado directamente en mg/L de cada ion o ácido carboxílico.

2.3.4 Determinación de hierro (Fe^{2+} , Fe^{3+} y Fe total)

La determinación de hierro disuelto se realizó formando un complejo quelato con fenantrolina (1,10-fenantrolina), este complejo adquiere un color naranja-rojizo y la absorción de luz se mantiene sin cambios en un rango de pH de 3 – 9, sin embargo se observa una respuesta mejor a valores de pH cercanos a 3, por tanto la medida se realiza utilizando una solución tampón de ácido acético.

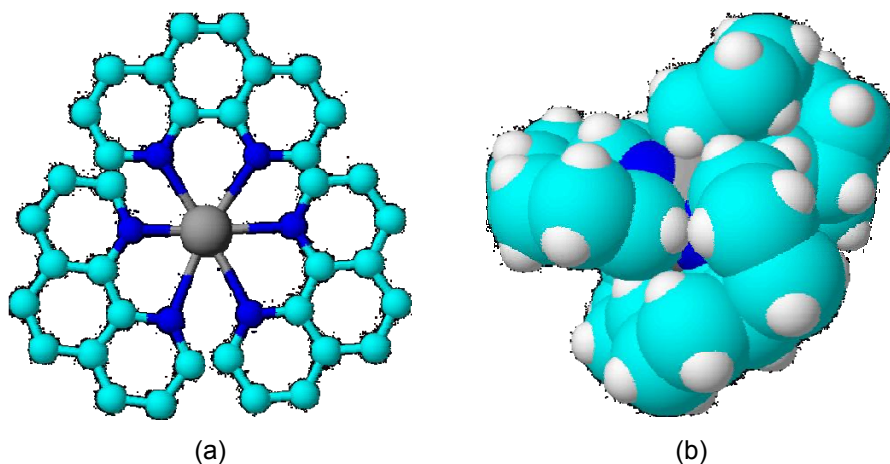


Figura 2.8: Complejo quelato de hierro y fenantrolina. (a) estructura molecular en 2D, (b) Estructura molecular en 3D. Código de colores: (●) Fe, (●) N, (●) C, (○) H.

La determinación de hierro se realizó en dos pasos, primero se determinó la cantidad de hierro ferroso (Fe^{2+}) mezclando 4 mL de la muestra, previamente filtrada utilizando filtros con tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore Millex® GN), con 1 mL de 1-10-fenantrolina, preparada a 0.1% (p/v) en agua, y 1 mL de solución tampón (62.5g de acetato de amonio y 175 mL de ácido acético en 250 mg/L agua). Después de 1 minuto se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm en un espectrómetro (Unicam II Spectrometer), la medida se realizó tomando como referencia un blanco preparado de la misma manera, reemplazando la fenantrolina por agua para eliminar cualquier interferencia de color.

El hierro disuelto total se midió agregándole ácido ascórbico (dos puntas de espátula) a la preparación para la medición de hierro ferroso. El ácido ascórbico reduce el hierro férrico (Fe^{3+}), y cualquier oxidante presente en la solución. La preparación se homogenizó, se dejó sedimentar el ácido ascórbico suspendido, y se realizó la medida de absorbancia como se describió anteriormente. El cálculo para determinar la concentración de hierro férrico (Fe^{3+}) se realiza

restando la concentración de hierro ferroso (Fe^{2+}) a la concentración de hierro total ($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$). La evaluación cuantitativa de la absorbancia se realizó utilizando la ecuación (2.6), la cual se obtuvo para un rango de concentraciones de 0.4 a 7 mg/L, con un r^2 de 1.000. De acuerdo con la ley de Beer para soluciones coloreadas, se diluyó la muestra para valores de absorbancia >1 .

$$C_{Fe} (\text{mg} / \text{L}) = [(7.15) (\text{ABS}) - 0.036] \cdot (\text{factor de dilución}) \quad (2.6)$$

El parámetro de control para verificar el buen estado del equipo es la medida de diferentes soluciones patrón. Además en cada experimento se tomó una medida de referencia antes de agregar el hierro a la solución, posteriormente se midió una muestra después de haber agregado el hierro para comprobar la concentración teórica inicial deseada.

2.3.5 Determinación de H_2O_2 por tritración iodométrica

El método de titración iodométrica puede ser utilizado en la medición de muchos agentes oxidantes. El principio de esta medición se basa en agregar un exceso de yoduro a la muestra en condiciones ácidas, el agente oxidante reacciona con el yoduro para formar una cantidad estequiométricamente equivalente al anión tri-yoduro, como se muestra en la reacción (2.7). La cantidad de anión tri-yoduro formado es determinado por la adición de tiosulfato, el cual reacciona cuantitativamente formando tetratiónato, reacción (2.8). El reactivo indicador forma un complejo azul-gris oscuro con el ion tri-yoduro. Consecuentemente en presencia de almidón, como reactivo indicador, la desaparición completa del ion tri-yoduro puede ser observada, ya que el complejo vira del color azul-gris oscuro a transparente.



Para la determinación del peróxido de hidrógeno se siguió el siguiente procedimiento: se tomaron unos mL de muestra (ver ecuación 2.9) y se mezclaron directamente con 25 mL de yoduro potásico 0.2 M (KI 33.2 g/L), 20 mL ácido sulfúrico 1 M, y 5 – 10 gotas del reactivo indicador (Zinc starch titration solution de MERCK® Ref. 5445). La solución se mantiene en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente la solución se titra con tiosulfato de sodio 0.05 M ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 24.82 g/L). La concentración de peróxido de hidrógeno puede ser calculada con la ecuación (2.9), asumiendo que toda la oxidación del yoduro al ión tri-yoduro se debe a la presencia de peróxido.

$$C_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}{V_{\text{muestra}}} (1700 \text{ mg / L}) \quad (2.9)$$

Donde $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ es el volumen gastado en la titración, y V_{muestra} es el volumen de muestra para el análisis, que suele ser de 5 mL.

2.4 Técnicas analíticas avanzadas

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

Las muestras fueron pre-concentradas mediante SPE, utilizando un regulador de vacío Supelco Visiprep™, antes de su análisis en los equipos de MS. Con este fin, se utilizaron minicolumnas Oasis® HLB (divinilbenzeno/*N*-vinilpirrolidona) de 3 cm³ con 60 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. En los estudios de diclofenaco también se utilizaron minicolumnas Oasis® MAX, (modo mixto fase reversa-intercambio aniónico), de 3 cm³ con 60 mg de adsorbente (Waters, Miliford, USA), con alta selectividad para compuestos ácidos.

En la Figura 2.9 se muestra el equipo utilizado para realizar la SPE.



Figura 2.9: Sistema utilizado para la pre-concentración de muestras con SPE.

Se aplicó el siguiente esquema general de extracción:

- Acondicionamiento: 2 mL de metanol + 2 mL de agua destilada (acidificada a pH 3 con HCl en el caso de diclofenaco)
- Carga: 20 mL de muestra, a un flujo aproximado de 10 mL/min (50 mL en el caso de diclofenaco).
- Elución en cartuchos Oasis HLB®: 2x4 mL de metanol, flujo de 1 mL/min
- Elución en cartuchos Oasis MAX®: 3 mL de metanol, flujo de 1 mL/min

Los eluatos obtenidos fueron concentrados, evaporando el disolvente con una corriente suave de nitrógeno, hasta un volumen final de 1 mL en metanol (4 mL en el caso de verde malaquita). Estos extractos fueron analizados directamente en GC-MS o diluidos convenientemente con agua MiliQ para su análisis en LC-MS. Los extractos fueron conservados en oscuridad y refrigeración para prevenir cualquier degradación posterior.

2.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para el análisis en GC-MS se utilizó un HP 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) HP 5973 (Figura 2.10). Los analitos fueron separados en una columna capilar HP-5MS, compuesta en un 5% por difenilpolisiloxano y en un 95% por dimetilpolisiloxano, 30 m de longitud, 0.25 mm diámetro interno, y 0.25 μm de grosor. El tipo de inyector utilizado fue un split-splitless en modo de pulso de presión bajo las siguientes condiciones: Volumen de inyección 10 μL , temperatura de inyección 250 $^{\circ}\text{C}$, presión del impulso inicial 30 psi (1.5 min), flujo de split 50.0 mL/min y tiempo de split 1.5 min, gas portador Helio a 1 mL/min, programa de temperatura del horno: 1.0 min a 105 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 180 $^{\circ}\text{C}$, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 230 $^{\circ}\text{C}$ (230 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min); temperatura de la línea de transferencia 280 $^{\circ}\text{C}$.

Los espectros de masas que fueron obtenidos por Impacto Electrónico (EI) se obtuvieron con una energía de ionización de 70 eV y se detectaron desde 50 a 400 unidades de masa. La fuente de ionización y el analizador de cuadrupolo fueron ajustados a 230 $^{\circ}\text{C}$ y 106 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Para la Ionización Química Positiva (PCI) se utilizó metano como gas reactivo para el análisis de las muestras y para este caso la fuente de ionización y el analizador de cuadrupolo se ajustaron a 120 $^{\circ}\text{C}$ y 250 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Las condiciones de operación del MSD se optimizaron automáticamente utilizando la aplicación de "autotuning" del software del equipo.



Figura 2.10: GC-MS Agilent 6890, con un MSD 5973 inert.

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

Para el análisis de las muestras mediante LC-MS se utilizó un analizador de tiempo de vuelo (TOF) con interfase de electro spray (ESI) (Figura 2.11), operando en modo de ionización positiva (y negativa en el caso del diclofenaco). 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 cuenta con una columna analítica C8 de fase reversa (Zorbax Eclipse XDB-C8) 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 con 0.1% de ácido

fórmico (canal B). Se programaron diferentes gradientes de fase móvil en cada ensayo:

- Diclofenaco y dipirona: gradiente lineal desde 15% hasta 100% de A en 30 min, 5 minutos a 100% A. Velocidad de flujo: 0.6 mL/min, volumen de inyección: 50 μ L.
- Verde Malaquita: gradiente lineal desde 20% hasta 100% de A en 42 min, 5 minutos a 100% A. Velocidad de flujo: 0.2 mL/min, volumen de inyección: 10 μ L.

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

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



Figura 2.11: TOF-MS Agilent

2.5 Evaluación de la toxicidad

2.5.1 Bioensayo basado en la actividad bioluminiscente de la bacteria *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri es un heterótrofo marino (Figura 2.12), del grupo Gram-negativo, perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, la cual contiene especies que desarrollan una interacción cooperativa y/o patógena con el animal huésped. *V. fischeri* se encuentra en todo el mundo en regiones templadas y subtropicales,

existiendo como una bacteria libre o como un organismo luminoso en simbiosis con algunas especies de jibias y peces [Nealson y Hastings, 1991].

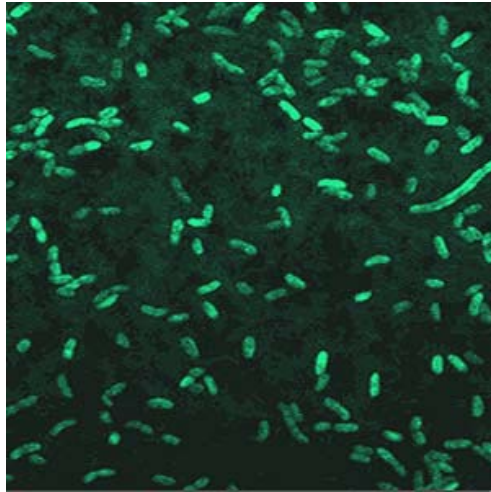


Figura 2.12: Fotografía de bacterias *Vibrio fischeri*.

La toxicidad fue evaluada utilizando el bioensayo basado en la inhibición de la luminiscencia emitida por la bacteria *V. fischeri*. La luz emitida por la bacteria es el resultado de la interacción de la encima luciferaza, reduciendo la flavina, y una larga cadena de aldehído en presencia de oxígeno. La energía metabólica generada por esta ruta es convertida en energía química, la cual es convertida en luz visible, a través de un sistema de transporte de electrones. Esta ruta metabólica está intrínsecamente relacionada con la respiración celular, así que la interrupción del metabolismo regular causa una disminución en la producción de luz [Hernando *et al.*, 2007].

Se utilizó un luminómetro ToxAlert 100 de MERCK® (Darmstadt, Germany) (Figura 2.13). La bacteria (NRRL B-11177) fue adquirida a Macherey-Nagel (Düren, Germany), como reactivo congelado y liofilizado, se mantuvo congelada a -20 °C y se re-hidrató previo al análisis. Las muestras fueron preparadas

ajustando el valor de pH entre 6 – 8, con soluciones diluidas de NaOH y HCl, y la osmolaridad de las muestras a un contenido de sal del 2%, agregando cloruro de sodio de alta pureza (Suprapure, Merck) para un rendimiento óptimo. La bacteria liofilizada fue reactivada por hidratación con una solución estéril de cloruro de sodio.



Figura 2.13: Imagen de un luminómetro ToxAlert 100 de MERCK®

El efecto a corto plazo del compuesto de interés y de las muestras recolectadas durante los experimentos, se evaluaron a 5, 15, 30 minutos de exposición, como se estipula en el método ISO 11348-3 de calidad de agua (determinación del efecto inhibitorio de muestras de agua en la emisión de luz de *Vibrio fischeri*, prueba de bacteria luminiscente. Parte 3: Método utilizando bacteria congelada – liofilizada).

El efecto inhibitorio se obtuvo con la ecuación (2.10), donde, $I_{S,0}$ y $I_{S,x}$ son las intensidades de luminiscencia, en unidades relativas de luz (RLU), de la muestra inicial y después de un tiempo de contacto de x minutos respectivamente. El factor de corrección ϕ , ecuación (2.11), se utiliza para la medida de control, donde $I_{C,0}$ y $I_{C,x}$ son las intensidades de luminiscencia (RLU) del control inicialmente y después de un tiempo de contacto de x minutos, respectivamente.

$$INH\% = \left(1 - \frac{I_{S,x}}{\varphi I_{S,0}} \right) \times 100 \quad (2.10)$$

$$\varphi = \frac{I_{C,x}}{I_{C,0}} \quad (2.11)$$

Los datos de inhibición fueron expresados en términos de la función gamma (Γ), ecuación (2.12), es decir, la relación de la pérdida de luz y la luz remanente. Finalmente la función gamma se relaciona con la inhibición detectada en el metabolismo de la bacteria como lo muestra la ecuación (2.13) [Fernández-Alba, *et al.*, 2001].

$$\Gamma = \left(\frac{\varphi I_{S,0} - I_{S,x}}{I_{S,x}} \right) \quad (2.12)$$

$$\Gamma = \frac{INH\%}{100 - INH\%} \quad (2.13)$$

El EC_{50} o concentración efectiva se determinó como la concentración de una muestra que causa una reducción del 50% en la luminiscencia emitida por la bacteria *V. fischeri*. Las curvas de calibración para la determinación de los valores de EC_{50} fueron preparadas con los estándares disponibles de los productos de degradación identificados con las técnicas de LC-MS y GC-MS, como se muestra en la sección 5.5, del capítulo 5.

Las soluciones de las muestras fueron analizadas para determinar el efecto inhibidor observado en cada muestra. La inhibición se calculó en términos de porcentaje y se comparó con la luminiscencia obtenida con un control libre de toxicidad [Fernández-Alba *et al.*, 2001].

CAPITULO

3

Capítulo 3

DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA DE DICLOFENACO EN AGUA MEDIANTE FOTÓLISIS Y FOTOCATÁLISIS. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE RUTAS DE DEGRADACIÓN

3.1 Fotólisis del diclofenaco

Previos a los estudios de fotólisis se realizaron experimentos para determinar la contribución de la hidrólisis a la fotodegradación del diclofenaco. Los experimentos partieron de la misma concentración inicial y se realizaron a 3 diferentes valores de pH (3, 7, y 9), durante 72 horas. No se detectó hidrólisis a pH 7 y 9, permaneciendo la concentración de diclofenaco constante durante los experimentos. Sin embargo, los resultados a pH 3 demostraron una disminución del 90% de la concentración inicial, que se demostró debida a la precipitación de

diclofenaco. En un medio neutro o alcalino, el diclofenaco es muy soluble (50 g/L), es un producto farmacéutico ácido con un pKa de 4.15 [Packer *et al.*, 2003], pero a pH = 4 se vuelve casi insoluble y a pH < 4 precipita.

Este hecho es de gran importancia para entender algunos resultados obtenidos durante los experimentos de fotólisis y foto-Fenton expuestos a lo largo del capítulo. La causa principal de la disminución de pH observada durante los experimentos puede explicarse por la liberación de iones cloruro, que proporcionan valores de pH < 3 durante la degradación de diclofenaco.

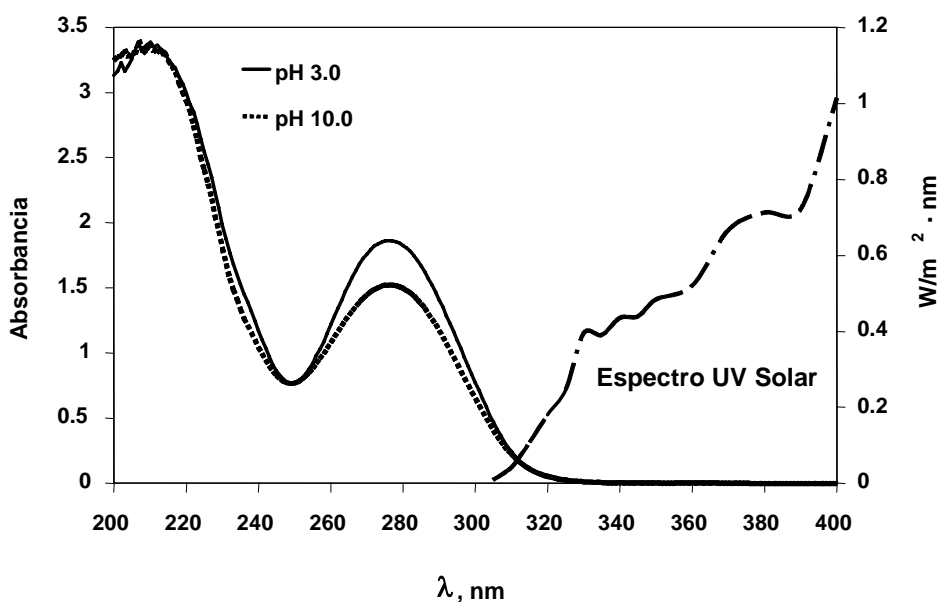


Figura 3.1: Espectro UV de 200 – 400 nm del diclofenaco (a pH 3 y 10) comparado con el espectro UV solar registrado en la Plataforma Solar de Almería.

La comparación del espectro UV del diclofenaco con el espectro solar (a la latitud de 37° N y longitud 2.4° W) permite suponer que se degradará por fotólisis directa al exponerse a la radiación solar natural. El máximo de absorción del diclofenaco es a 273 nm, no obstante se solapa con el espectro de la radiación

solar en la región desde 300 – 330 nm. Por tanto, la absorción de radiación y la consecuente foto-alteración de la molécula del diclofenaco es factible, tal y como se ha reportado anteriormente [Andreozzi *et al.*, 2003; Boreen *et al.*, 2003; Buser *et al.*, 1998; Packer *et al.*, 2003]. Esto se muestra en la figura 3.1.

Los experimentos de fotólisis se realizaron con diclofenaco disuelto en agua desmineralizada y agua estándar, en el capítulo Experimental se detalla la composición del agua estándar), expuesta a la radiación solar para una mejor y más realista evaluación de los procesos de foto-transformación. Los estudios del efecto de la radiación solar en los productos de la foto-transformación de un compuesto son más informativos si se realizan con un solo compuesto, de este modo nos aseguramos que los intermedios formados proceden únicamente de la interacción entre los fotones solares y el compuesto inicial.

La concentración de oxígeno fue la que se alcanzó al mantener el agua en contacto con la atmósfera, es decir entre 6 y 8 mg/L de oxígeno disuelto. Estas condiciones, de saturación de oxígeno a presión atmosférica fueron elegidas porque son las más representativas de las condiciones reales en el medio ambiente. No se consideró pertinente hacer pruebas en ausencia de oxígeno, porque esto no ocurriría bajo condiciones naturales, ya que el agua se encontrará sin oxígeno solamente a grandes profundidades y la luz solar no llegaría hasta ahí.

Los resultados obtenidos en estos dos tipos de agua, desmineralizada y estándar, indican que el diclofenaco experimenta una espontánea y rápida foto-transformación bajo iluminación solar. Sin embargo, se observaron importantes diferencias entre los experimentos, respecto a la evolución del pH. La fotólisis en agua destilada mostró una disminución en el pH debida a la mencionada liberación de cloruros, lo que daba lugar a la disminución del COT y de la concentración de diclofenaco, como consecuencia de la precipitación de éste último..Para evitar la precipitación del diclofenaco, pequeñas cantidades de

sodio hidróxido se añadieron progresivamente, con el objeto de mantener el pH en un rango entre 7 y 8. Esto no fue necesario en el caso de los experimentos realizados con agua estándar, al poseer ésta una capacidad de tampón, la cual mantuvo el valor de pH entre 7.0 y 7.4 durante todo el ensayo. A pesar de estas diferencias, los resultados de la degradación del diclofenaco en agua destilada y agua estándar fueron similares. La figura 3.2 muestra la evolución de la concentración de diclofenaco con el tiempo de reacción utilizando agua estándar.

El experimento de fotólisis se desarrolló exponiendo las disoluciones de diclofenaco desde las 08:30h hasta las 15:30h y se tomaron muestras cada dos días. El eje de abscisas en la Figura 3.2 representa el tiempo de iluminación normalizado ($UV_{\text{promedio}} = 25 \text{ W/m}^2$), como se detalla en el capítulo Experimental. Se observó una rápida disminución, de más del 70%, de la concentración inicial (45.5 mg/L) de diclofenaco, durante las primeras 30 horas de iluminación. Posteriormente, la velocidad de foto-transformación disminuyó notablemente, debido a la acumulación de intermedios de reacción coloreados, que actúan como un “filtro” interno ante la luz. De hecho, la solución adquirió un color marrón oscuro durante los experimentos.

Este efecto ha sido reportado anteriormente para aguas naturales superficiales [Buser *et al.*, 1998; Andreozzi *et al.*, 2003; Packer *et al.*, 2003; Boreen *et al.*, 2003], en las cuales la solución adquiere un color marrón oscuro, presumiblemente debido a la formación de estructuras carbazólicas, como las reportadas por Moore [Moore, 1998], formadas tras la pérdida de cloro.

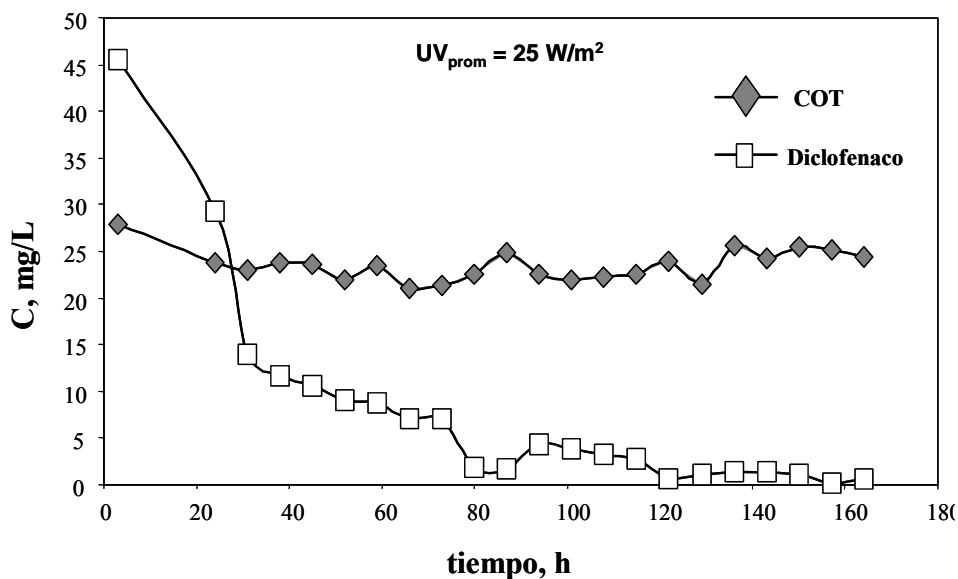


Figura 3.2: Cinética de la desaparición del diclofenaco por fotólisis, y evolución del COT durante el experimento. A) Disolución recién preparada de diclofenaco en agua. B) Disolución al final del experimento.

A pesar de la rápida desaparición del diclofenaco en la disolución, no hubo mineralización en ningún caso, tal como lo muestra el comportamiento del COT, el cual permanece casi constante durante los análisis. Esto demuestra la formación de un gran número de productos de transformación (PTs), los cuales son más resistentes a la foto-degradación que el diclofenaco. La tabla 3.1

muestra los resultados de los experimentos de fotólisis con el diclofenaco disuelto en agua destilada y en agua estándar.

Tabla 3.1: Resultados de los experimentos de fotólisis, expresados en % de desaparición del diclofenaco.

$t_{iluminación}$ (A) (h)	%	$t_{iluminación}$ (B) (h)	%
4	28	7	36
11	47	27	71
18	59	34	75
32	68	62	85
90	87	105	95
160	99	160	100

$C_0 \approx 50$ mg/L, A: agua destilada a pH 7.5; B: agua estándar a pH 7.2

3.1.1 Identificación de productos de transformación

Bajo ciertas condiciones, la foto-transformación del diclofenaco ha sido referenciada por varios autores como un proceso rápido y efectivo [Packer *et al.*, 2003; Poiger *et al.*, 2001]. Sin embargo, hasta ahora no se había realizado un estudio en profundidad de la ruta fotolítica de degradación de este compuesto. La evaluación analítica de este tipo de procesos de degradación presenta en general muchas dificultades:

- La formación de un gran número de compuestos impredecibles que complica su separación y consecuentemente su identificación.
- Las diferentes propiedades físico-químicas de los PTs, lo que dificulta su determinación.
- La ausencia, en la mayoría de los casos, de estándares comerciales para confirmar su identidad.

Estas dificultades hacen necesario el desarrollo de métodos de extracción de amplio espectro y técnicas analíticas avanzadas, basadas en la Espectrometría de Masas (MS), que permitan una evaluación lo más completa posible del proceso. En esta investigación se utilizaron varias estrategias de este tipo como son: GC-EI-MS, GC-PCI-MS y LC-TOF-MS.

Tratamiento de la muestra

Como hemos comentado anteriormente, el tratamiento de la muestra es una importante etapa en este tipo de estudios. La selección del procedimiento de preparación de la muestra se realiza con dos objetivos:

- Obtención de extractos de las muestras analizables por las técnicas analíticas empleadas.
- Preconcentración de las muestras para determinar los PTs presentes a bajas concentraciones o escasamente recuperados con la técnica de extracción seleccionada.

El uso de la extracción en fase sólida con adsorbentes poliméricos representa la mejor y más simple opción en este tipo de aplicaciones. Debido a la naturaleza polar de los productos de transformación y/o degradación generados, muchos escaparían a la tradicional extracción líquido – líquido (LLE). Para la SPE se utilizaron adsorbentes capaces de extraer compuestos en un amplio rango de polaridades, como el Oasis HLB, que consiste en un copolímero macroporoso, sintetizado a partir de dos monómeros, el divinilbenceno, de carácter lipofílico, y la N-vinilpirrolidona, de carácter hidrofílico.. Además, debido a la presencia de grupos funcionales ácidos en la molécula del diclofenaco, se utilizó un adsorbente con grupos funcionales de intercambio aniónico, Oasis® MAX, que consiste en un relleno de retención mixta (intercambio aniónico-fase reversa), el cual proporciona buenos resultados en la recuperación de intermedios ácidos. Una descripción más detallada de los adsorbentes y el proceso de extracción se encuentran descritos en el capítulo Experimental.

La comparación entre ambos tipos de extracciones (Oasis® HLB y Oasis® MAX) fue muy útil para confirmar la presencia de grupos funcionales ácidos en los PTs detectados.

Análisis por GC-MS

Los extractos obtenidos por el método descrito se analizaron inicialmente por GC-EI-MS. El empleo de la ionización por impacto electrónico permite la obtención de espectros en “*full scan*” que proporcionan abundante información estructural a la vez que una fragmentación reproducible (a 70 eV) que permite su comparación con bases de datos de espectros comerciales (Wiley, NIST, etc.). Todos los picos presentes en los cromatogramas fueron investigados y seis de ellos fueron identificados como posibles PTs. La Figura 3.3 muestra como ejemplo el cromatograma correspondiente al análisis de un extracto obtenido tras tres días de exposición solar. Las estructuras de estos compuestos, presentadas en la Figura 3.10, fueron propuestas utilizando los correspondientes espectros de masas. Dos de ellas (compuestos C-5 y C-11) fueron confirmadas utilizando bases de datos de espectros de masas (Wiley 275). En la Figura 3.3 se muestra el espectro de masas obtenido para el compuesto C-5, el cual fue identificado como 3-clorocarbazol con un 83% de certeza.

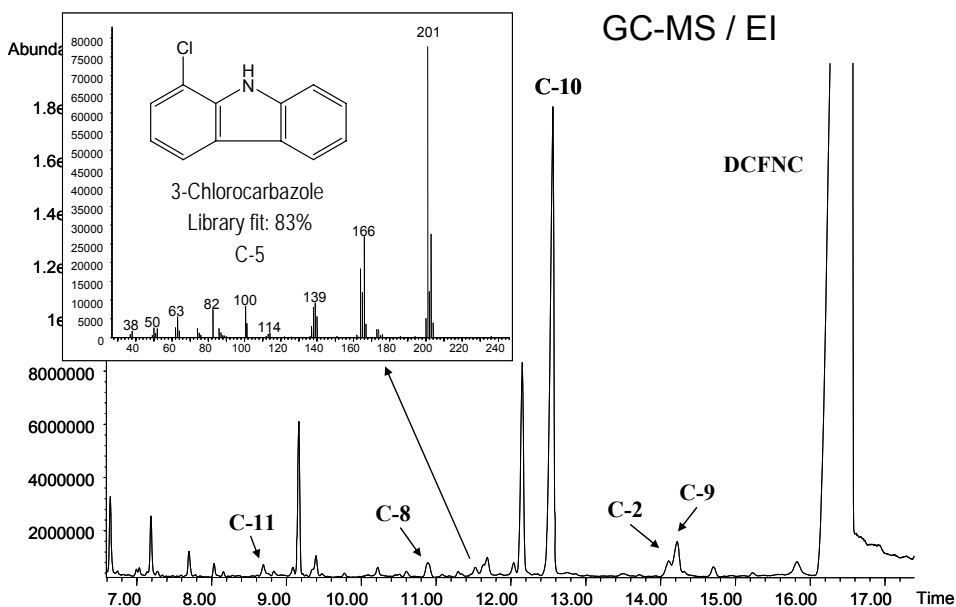


Figura 3.3: Cromatograma obtenido mediante el análisis por GC-EI-MS de una disolución de diclofenaco tras tres días de exposición solar, donde se identifican seis productos de la degradación. El ejemplo del espectro de masas, en full-scan, corresponde al compuesto C-5.

Las bases de datos espectrales disponibles constituyen una herramienta muy valiosa en la identificación de compuestos desconocidos analizados en GC-MS. Sin embargo, su utilidad algunas veces se ve dificultada por la complejidad de las muestras. La presencia de interferencias de matriz o de coeluciones entre los propios productos de transformación generados, incrementan la dificultad para una identificación correcta de los mismos, especialmente cuando éstos no han sido previamente descritos, debido a la complejidad de los espectros obtenidos.

En este caso, la realización de análisis utilizando ionización química positiva (PCI), con metano como gas reactivo, puede ayudar a resolver este problema. La simplicidad de los espectros obtenidos con PCI y la presencia de series de aductos característicos del uso de metano como gas reactivo, $[M+C_2H_5]^+$ y

$[M+C_3H_5]^+$, nos permiten detectar la presencia de más de un ion molecular en el mismo espectro.

Las figuras 3.5 y 3.6 muestran la secuencia seguida en la identificación del compuesto C-8 mediante el uso de ionización química positiva. En los análisis mediante impacto electrónico, el pico correspondiente a este compuesto ($t_r=10.82$ min) fue identificado por la base de datos Wiley275 como el éster metílico del ácido hexadecanoico (Figura 3.4A), con un 93% de concordancia entre espectros. Sin embargo, la observación del espectro de masas de la muestra (Figura 3.4B) permitía detectar la presencia de iones (m/z 181, 214, 251 principalmente) que no correspondían con el espectro identificado por la base de datos. La obtención del espectro de ionización química (Figura 3.5) mostraba más fragmentación de la que es usual obtener por esta técnica de ionización débil. Una observación más detenida del espectro permitió detectar dos series de iones $[M+H]^+$, $[M+29]^+$ y $[M+41]^+$ característicos, mostrados en rojo y azul en la figura, que evidenciaban la presencia de dos compuestos diferentes coeluyendo al mismo tiempo de retención. Esto se confirmó mediante la obtención de los cromatogramas de iones seleccionados correspondientes a los iones de m/z 252 y 271, respectivamente, que evidenciaron la presencia de dos picos a tiempos de retención muy próximos (Figura 3.6).

Una vez confirmada la coelución se pudo volver al cromatograma de impacto electrónico, separar ambos compuestos mediante cromatogramas de iones seleccionados e identificar el compuesto C-8 mediante la interpretación del espectro de masas (Figura 3.7)

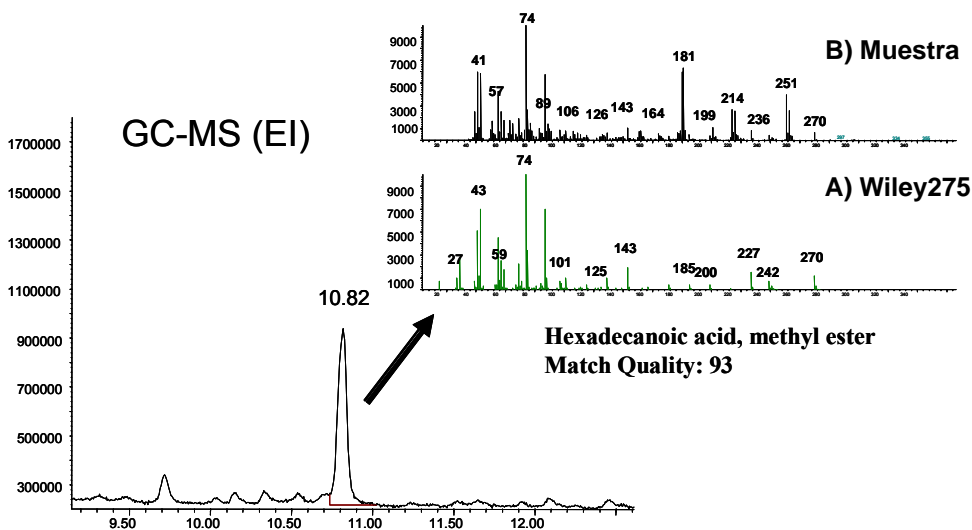


Figura 3.4: Resultado obtenido de la búsqueda en la base de datos Wiley275 del compuesto C-8, de la Figura 3.3. A) Espectro de masas de referencia, B) Espectro de masas de la muestra.

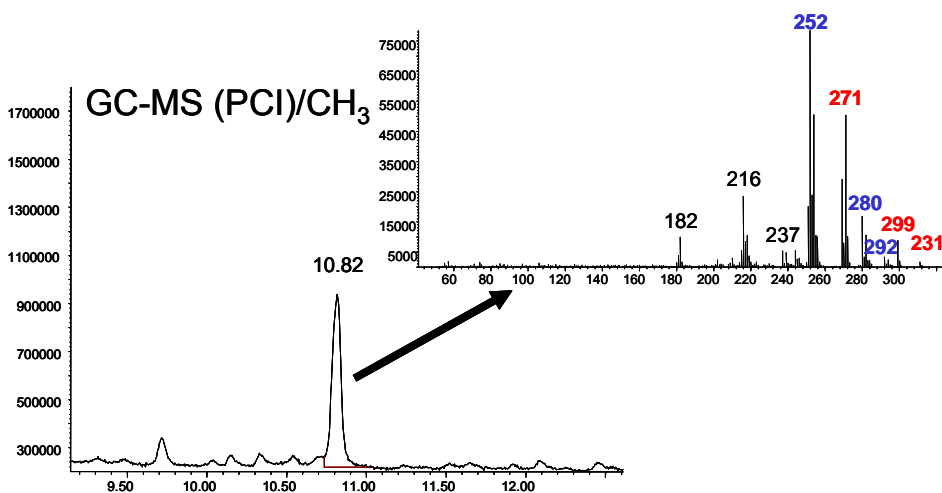


Figura 3.5: Espectro de masas obtenido mediante PCI, utilizando metano como gas reactivo. En el espectro se observa la presencia de dos secuencias de iones características, las cuales se muestran en azul y rojo.

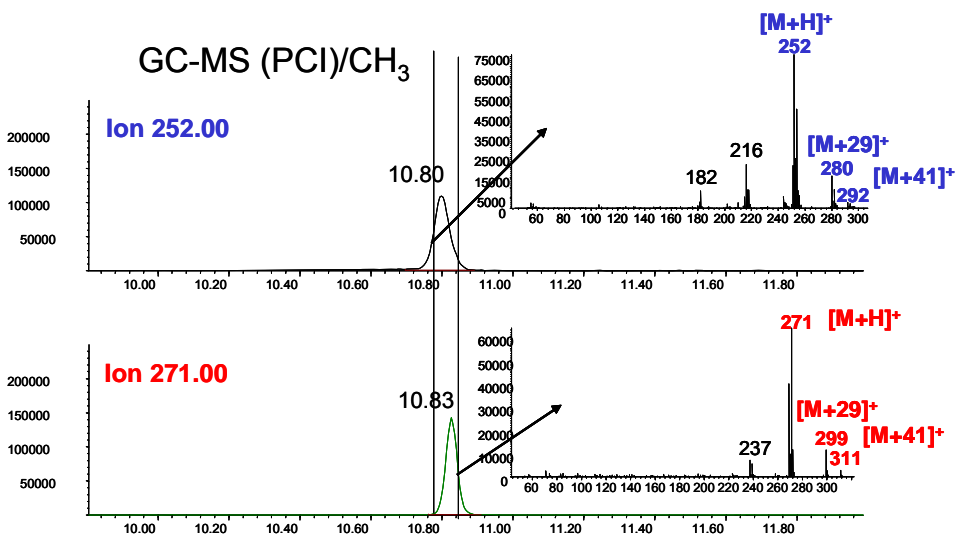


Figura 3.6: Selección de iones, provenientes del cromatograma PCI, con la cual se detecta la co-elución de dos compuestos a un tiempo de retención muy próximo.

Además de esta utilidad, el análisis mediante ionización química positiva proporciona la confirmación exacta del peso molecular de los PTs, esencial en la elucidación estructural de compuestos desconocidos. Así, por ejemplo, los compuestos C-8 a C-11 presentan en impacto electrónico un patrón de fragmentación a baja m/z similar al del diclofenaco, ya que todos ellos comparten la estructura común de la bifenilamina. La confirmación del peso molecular junto con la presencia de patrones de abundancia isotópica y pérdidas características como $[M-Cl]^+$, $[M-CHO]^+$, $[M-CH_3]^+$, permiten la asignación de las estructuras.

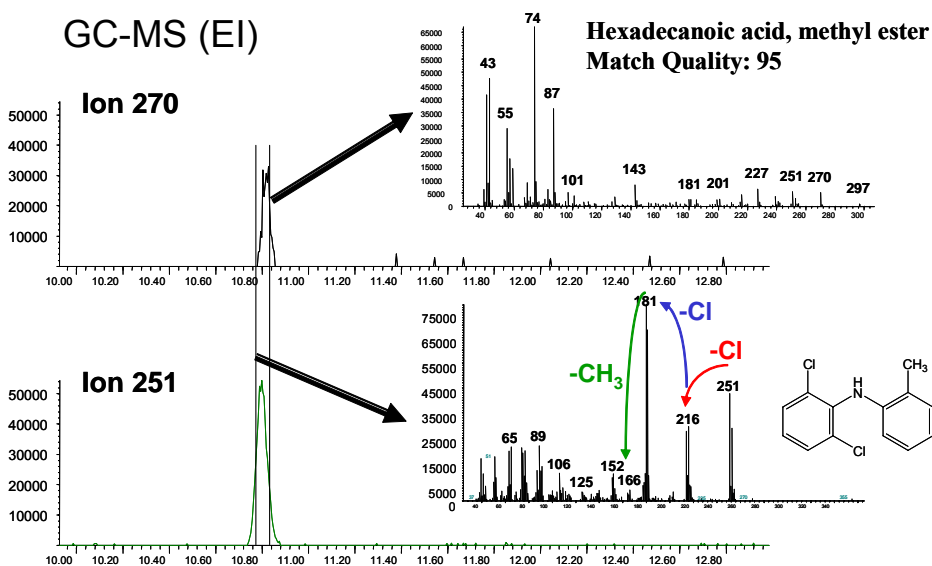


Figura 3.7: Una vez detectada la co-elución de ambos compuestos, se procedió a identificarlos en base a sus correspondientes espectros de masas en EI.

Análisis por LC-TOF-MS

Dado que se prefirió la inyección directa de los extractos de las muestras en GC-MS en lugar de la aplicación de complejos y tediosos procesos de derivación previos al análisis, cabe pensar que productos de transformación altamente polares o no volátiles pudieran haber escapado al análisis. Por este motivo, la aplicación de técnicas de LC-MS fue una alternativa atractiva e inevitable para cubrir la identificación de este tipo de compuestos.

La aplicación de diversas técnicas de LC-MS para la identificación de compuestos desconocidos ha sido ampliamente evaluada y discutida por otros autores [Malato *et al.*, 2003, 2001; Marinas *et al.*, 2001; Ferrer *et al.*, 2003, 2004; Thurman *et al.*, 2005]. Con estos antecedentes, en el presente estudio se eligió trabajar con un sistema LC-MS con analizador de tiempo de vuelo (TOF) por su capacidad para obtener espectros de masa exacta. En base a las medidas de masa exacta obtenidas, el sistema cuenta con un software que calcula la

composición elemental y la fórmula empírica de las moléculas protonadas, proporcionando una lista de resultados que mejor se ajustan a la masa medida experimentalmente. La información disponible acerca de la composición atómica de la molécula original y la observación del patrón de abundancias isotópicas del ion molecular protonado puede utilizarse para delimitar el número de posibles resultados, los cuales, en todos los casos estudiados aquí, se redujeron a una sola opción. A continuación se describe la secuencia seguida en la identificación de posibles productos de transformación en las muestras:

- Para cada pico del cromatograma de iones totales (TIC) se obtuvo el espectro de masa exacta.
- Se calcularon las fórmulas empíricas que mejor coincidían con la masa experimental, dentro de un margen de error previamente establecido, generalmente menor de 2-3 ppm. En esta etapa el conocimiento de la composición elemental de la molécula original y del proceso fotoquímico al que es sometida permite delimitar el número y tipo de átomos presentes en la molécula, restringiendo así el número de resultados.
- En el caso del diclofenaco, el número de átomos de cloro presentes en la fórmula propuesta debía estar en concordancia con el patrón isotópico observado en el espectro.
- Finalmente, la aplicación de este proceso a los posibles iones fragmento presentes en el espectro, si los hubiere, permitió ayudar a confirmar la estructura molecular a través de la identificación de pérdidas características.

Con este procedimiento, siete PTs fueron identificados. La Figura 3.8 muestra el cromatograma de LC-ESI-TOF-MS y el espectro obtenido para el compuesto C-13. En la figura 3.9 se muestran los resultados generados por el software, donde se proponen las posibles fórmulas empíricas y sus errores asociados. También se muestra la masa exacta de cada fragmento, utilizada en la identificación del compuesto C-13.

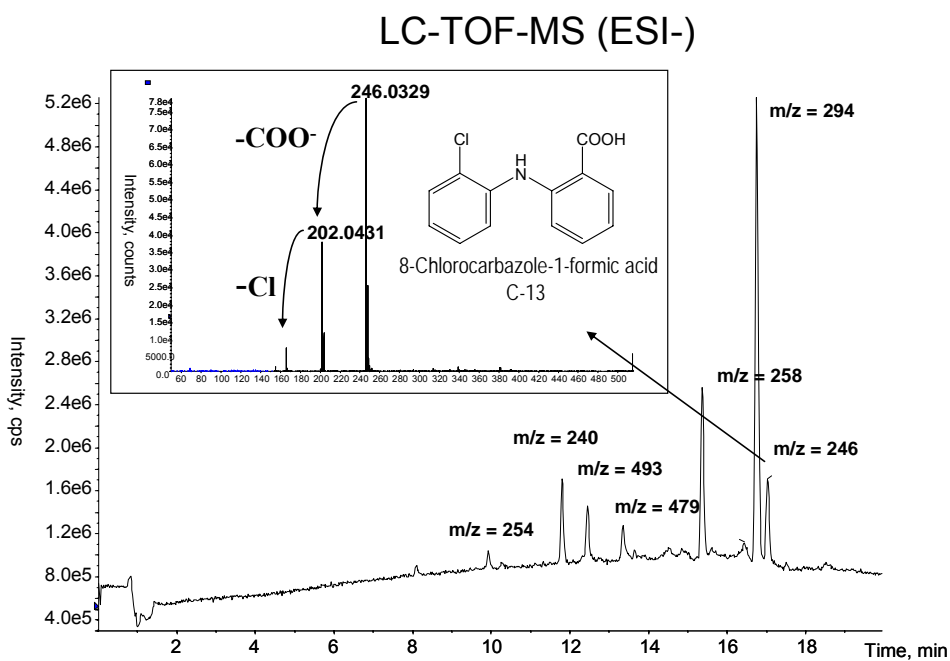


Figura 3.8: Cromatograma LC-TOF-MS obtenido en modo negativo y espectro de masas utilizado para identificar al compuesto C-13 (8-clorocarbazol-1-ácido fórmico).

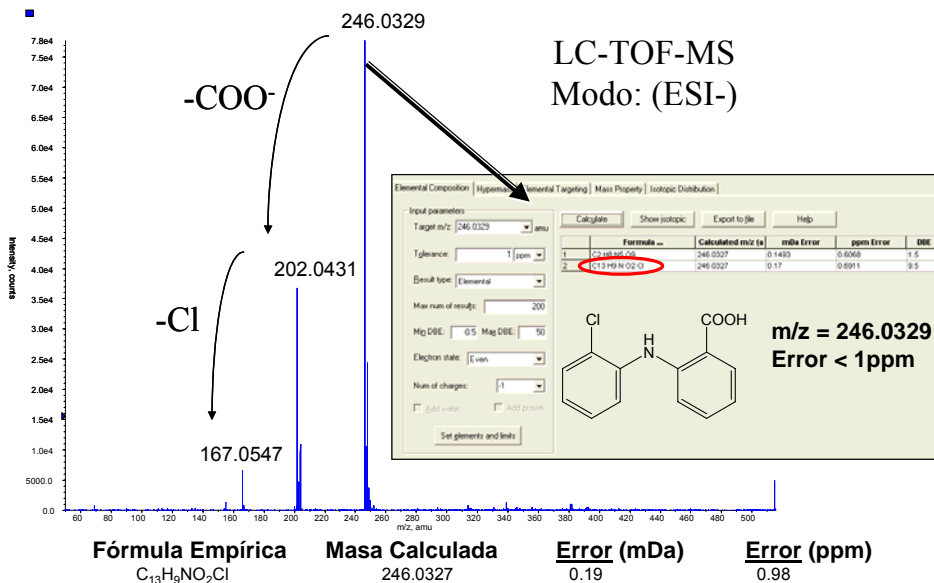


Figura 3.9: Espectro de masas del compuesto C-13, donde se muestran los posibles resultados, formulas empíricas y errores asociados a la masa exacta señalada. Se ha insertado la estructura de la formula empírica de este compuesto.

La Tabla 3.2 muestra información relativa a la fórmula empírica de los iones (des)protonados de los productos de transformación identificados, sus masas experimental y calculada y el error entre ambas masas, que fue menor de 0.3 mDa o 1.0 ppm en todos los casos. Las estructuras propuestas para estos compuestos se muestran en la Figura 3.10.

Tabla 3.2: Datos de masa exacta, error y fórmula empírica obtenidos para los productos de transformación del diclofenaco identificados por TOF-MS.

Compuesto(mo do de ionización)	Formula	Masa calculada (m/z)	Masa experiment al (m/z)	Error (mDa)	Error (ppm)
C-1 (ESI-)	C ₁₄ H ₉ NO ₂ Cl	258.0327	258.0330	0.3	1.0
C-3 (ESI+)	C ₁₃ H ₁₁ NOCl	232.0523	232.0524	< 0.1	0.1
C-4 (ESI +)	C ₁₃ H ₉ NOCl	230.0367	230.0368	< 0.1	0.4
C-6 (ESI-)	C ₁₄ H ₁₀ NO ₃	240.0666	240.0667	< 0.1	0.3
C-7 (ESI-)	C ₁₄ H ₉ NO ₄	254.0458	254.0460	0.2	0.8
C-12 (ESI+)	C ₁₃ H ₁₀ NO ₂ Cl ₂	282.0083	282.0084	< 0.1	0.3
C-13 (ESI-)	C ₁₃ H ₉ NO ₂ Cl	246.0327	246.0329	0.2	0.7

Las medidas de masa exacta de los iones fragmento presentes en los espectros de masas fueron en nuestro caso de particular importancia en la elucidación estructural de los PTs. La presencia de grupos funcionales ácidos en la molécula (-COOH) (compuestos C-1, C-6, C7 y C-13) pudo ser confirmada por la presencia del fragmento $[M-H-COO]^-$ en el espectro ESI(-). Los iones a m/z 258, 240, 254 y 246 todos mostraban una pérdida de 43.9898 uma +/- 0.0002, que correspondía con la masa exacta para la pérdida de CO₂ (la masa calculada para CO₂ es 43.9898 uma). Esto demuestra la pérdida de CO₂ e indica la presencia de grupos carboxilo en la estructura de los productos de degradación. En la figura 3.9 se muestra como ejemplo la identificación del compuesto C-13, ácido fórmico 8-clorocarbazol y la masa exacta de sus fragmentos.

Estos compuestos no estuvieron presentes en los extractos obtenidos por SPE con las columnas Oasis MAX, con el procedimiento de elusión aplicado, debido a su gran retención en los grupos funcionales de intercambio aniónico del adsorbente, lo cual también confirmaba la presencia de tales grupos. Los compuestos C-3 y C-12 fueron caracterizados por la aparición en su espectro ESI(+) de fragmentos correspondientes a la pérdida $[M - H_2O]^+$, típica de

alcoholes, que fue también confirmada mediante medidas de masa exacta. Aunque no es posible determinar con exactitud la posición exacta del grupo –OH en la molécula, una estructura provisional se propone en la figura 3.10.

Además de los productos de transformación mencionados anteriormente, también pudo ser detectada la presencia de dímeros durante la fotólisis del diclofenaco. La formación de dímeros ha sido previamente referenciada en procesos de foto-degradación [Lányi y Dinya, 2003]. Estos compuestos no han sido asignados, pero considerando algunas características de su estructura, tal como la presencia de grupos ácidos o la ausencia de átomos de cloro, puede decirse que se forman a partir de intermedios de diclofenaco de alto peso molecular que coexisten en la mezcla de reacción. Análisis hechos con un detector UV a 400 nm han revelado que algunos de estos dímeros, con pesos moleculares de 494, 481 y 524, son los compuestos coloreados de más abundancia a ésta longitud de onda, siendo en parte responsables de la aparición de color durante el proceso de foto-transformación. Un ejemplo de esto es el ion de masa exacta m/z 479.1248, al cual le corresponde, como el mejor ajuste, la fórmula empírica $C_{28}H_{20}N_2O_6$ (molécula neutra). Esta fórmula correspondía exactamente al doble del compuesto C-6, lo que sugiere la formación de un dímero a partir de este compuesto. El ion de masa exacta m/z 493.1041 también está muy relacionado con el compuesto C-6, diferenciándose solamente en un oxígeno y tres átomos de hidrógeno. De este modo, parece que la pérdida de un átomo de cloro origina la estructura carbazólica la cual va seguida de la sustitución del segundo átomo de cloro por un grupo hidroxilo para formar el compuesto C-6. Esta molécula es activada por la presencia de una estructura fenólica y por tanto es fácilmente dimerizada. Esta ruta de degradación explica la formación de dímeros libres de cloro y puede considerarse la principal causante de que la solución adquiriera un color oscuro.

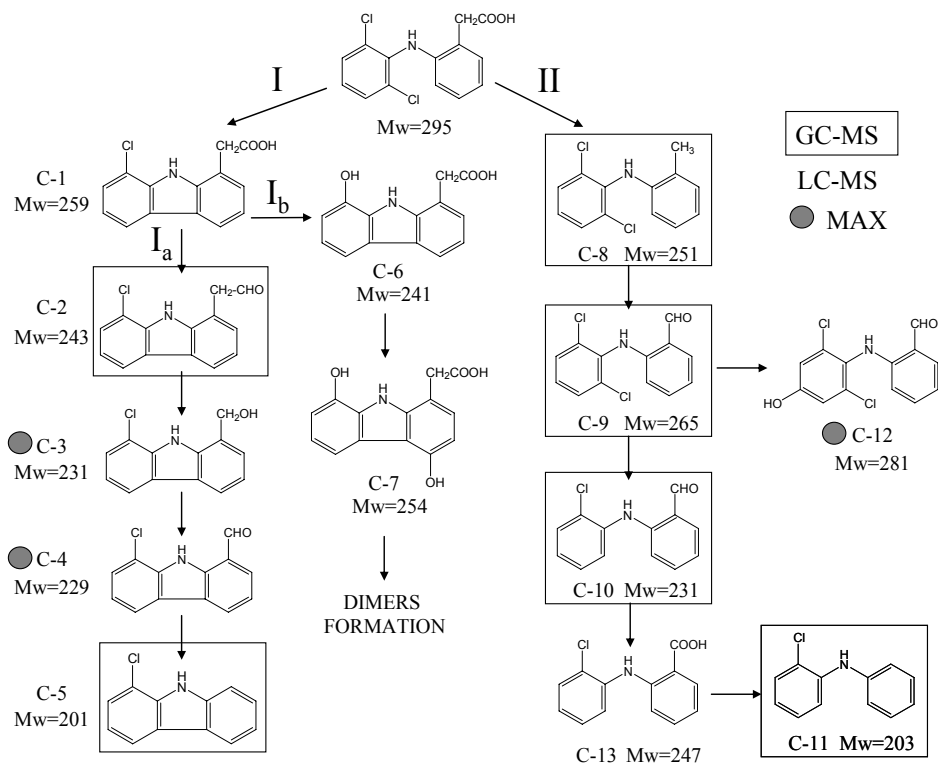


Figura 3.10: Esquema de la ruta propuesta de foto-transformación del diclofenaco, por el efecto de la exposición a la radiación solar.

3.1.2 Ruta de degradación fotolítica

A la luz de los PTs detectados, en la figura 3.10 se propone una posible ruta de degradación. Dado que solo pudo obtenerse en este estudio información cualitativa o semi-cuantitativa, para la mayoría de los productos de fotodegradación identificados no fue posible realizar un estudio cinético, ya que la concentración de estos compuestos es desconocida debido a la falta de estándares analíticos.

El proceso de foto-transformación más significativo que sufre el diclofenaco es la foto-ciclación, para dar lugar al correspondiente carbazol mono-halogenado (C-1), (Ruta I). Este proceso ha sido descrito anteriormente [Moore, 1998; Poiger *et al.*, 2001; Encinas *et al.*, 1998] y es el punto de partida de otros procesos posteriores que afectan principalmente a la cadena alquílica. Se ha encontrado que la deshalogenación del clorocarbazol juega un papel menor en la foto-transformación, ya que el átomo de cloro está presente en la mayoría de los fotoproductos detectados (Ruta Ia) Sin embargo, la sustitución del átomo de cloro por un grupo hidroxilo se observa con la formación del 8-hidroxi-9,9a-dihidro-4-aH-carbazol-1-yl ácido acético (C-6), Ruta Ib. Como se comentó anteriormente, éste producto altamente reactivo es el precursor de la formación de dímeros. La formación de carbazoles es de gran interés debido a su relación con la fototoxicidad causada por el diclofenaco [Moore, 1998].

Además de esta ruta de foto-transformación, también se observó una ruta de degradación alternativa; Ruta II. Esta ruta se inicia con la descarboxilación del diclofenaco (C-8) y la posterior oxidación de la cadena alquílica (C-9 a C-13). La presencia de esta ruta alternativa no ha sido referenciada anteriormente y representa una importante contribución en el proceso de transformación de este compuesto. Los compuestos C-8 a C-10 y C-11 fueron identificados utilizando GC-MS, siendo el C-10 el más abundante. Todos ellos resultaron ser muy estables, permaneciendo hasta el final del experimento. En LC-MS, el

compuesto C-13 también mostró un pico intenso y muy estable. Compuestos de menor peso molecular, procedentes de la rotura de la estructura carbazólica o de la bifenilamina no fueron identificados, sugiriendo la estabilidad de estas estructuras.

3.2 Descomposición del diclofenaco

3.2.1 Aplicación de procesos de oxidación avanzada

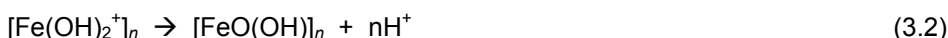
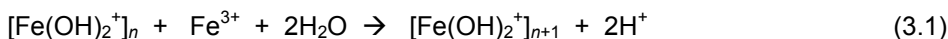
Una vez estudiado el efecto de la degradación natural que sufre el diclofenaco en agua y expuesto a la radiación solar, se realizaron experimentos fotocatalíticos a una concentración inicial constante, e igual a la utilizada anteriormente. Es un hecho que la radiación solar por sí misma puede producir la foto-degradación de ésta sustancia. Sin embargo tal foto-degradación natural es muy lenta, bajo condiciones aeróbicas y buena iluminación, y en este escenario la mineralización del diclofenaco nunca ocurrió. Por tanto tiene sentido planear un método de tratamiento que sí sea capaz de mineralizar este contaminante, como es la oxidación avanzada..

Ya se ha aclarado el efecto de “precipitación” del diclofenaco, evitando su confusión con una posible “descomposición”. Sin embargo, en este punto se debe remarcar que en la revisión bibliográfica no se ha reportado este efecto. Casi todos los POAs utilizados anteriormente para degradar el diclofenaco han sido llevados a cabo en un medio neutro o básico. Mayoritariamente se han aplicado técnicas con ozono, ozono/UV, y H_2O_2/UV . En todos los casos los valores de pH fueron ajustados a 7 ó mayores agregando hidróxido de sodio. El único trabajo donde se realizó la degradación del diclofenaco utilizando el proceso foto-Fenton a un valor de pH de 2.8 [Ravina *et al.*, 2002] no menciona la precipitación de este fármaco, que sin embargo sí se ha producido claramente durante los experimentos comentados en esta Tesis.

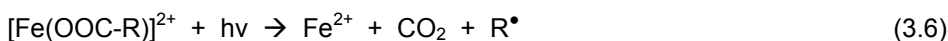
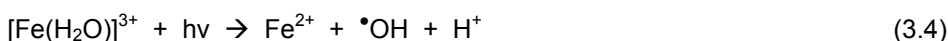
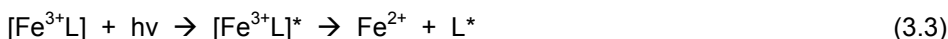
3.2.2 Tratamiento foto-Fenton en agua estándar a pH neutro.

El hecho de la precipitación de hierro a pH neutro es bien conocido, sin embargo la precipitación de hierro y el envejecimiento de ese precipitado es un proceso complejo. En general, la hidrólisis que presenta el hierro inorgánico (Fe^{3+}) se desarrolla en varios pasos, 1) formación de especies de bajo peso molecular, 2) formación de un polímero catiónico rojo, 3) envejecimiento del polímero, con una conversión eventual a fases oxidadas, 4) precipitación de las fases de oxidadas, directamente de los precursores de bajo peso molecular [Flynn, 1984]. Estos precipitados, óxidos e hidróxidos, contienen mucha agua y un carácter fuertemente catiónico, co-precipitan con muchos otros iones e incluso sustancias orgánicas. Al precipitar las especies de bajo peso molecular, forman polímeros constituidos por esferas de 2 – 4 nm de diámetro, los cuales se condensan para formando el susodicho polímero.

El hierro férrico (Fe^{3+}) hidrolizado no está en equilibrio y con la temperatura el proceso de envejecimiento se acelera. Los cambios reportados en el envejecimiento de la solución que contiene el polímero incluyen cambios en la composición química, el pH, incremento de la absorción de luz por turbidez, y la degradación del polímero. Los precipitados de las soluciones hidrolizadas de hierro Fe^{3+} son depositados en un período de días a semanas; la precipitación continúa por meses. Utilizando rayos X se demostró que los precipitados formados consisten en $\alpha\text{-FeO(OH)}$ (geotita) y algunos $\gamma\text{-FeO(OH)}$ (lepidocrocita). Las cantidades y velocidades de formación de estas dos especies indican que la geotita es el producto fundamental del envejecimiento del polímero. El mecanismo sugerido para la formación y envejecimiento del polímero hidrolítico involucra la condensación del monómero $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_{6-n}(\text{OH})_n]^{(3-n)+}$ para formar polímeros en los cuales el hierro Fe^{3+} está enlazado con grupos OH^- (Ec. 3.1) o con iones O^{2-} (Ec. 3.2) [Flynn, 1984].



Debido a que las soluciones son irradiadas en los experimentos, paralelamente al proceso de envejecimiento, se produce la fotoreducción del hierro coloidal y de los precipitados de hierro que pueden liberar hierro ferroso (Fe^{+2}) a la solución el cuál será re-oxidado, por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) produciendo radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) por medio de la reacción de Fenton, o por el oxígeno disuelto en el agua. La foto-reducción provocada por la luz es una reacción de transferencia de carga ligando – metal (ec. 3.3), donde el ligando puede ser agua o una sustancia orgánica, ecuaciones (3.4) – (3.6) [Wells *et al.*, 1991; Pulgarin y Kiwi, 1995; Zepp *et al.*, 1992]. Adicionalmente, los precipitados de hierro Fe^{+3} pueden tener propiedades semiconductoras, por tanto es posible que se produzcan pares electrón-hueco (y la subsiguiente producción de $\bullet\text{OH}$), una vez que incide un fotón sobre el sustrato precipitado y consecuentemente se provocará la oxidación de los contaminantes adsorbidos en la superficie del mencionado sustrato [Pulgarin y Kiwi, 1995; Leland, 1987].



El equilibrio de concentraciones de las especies más importantes de los complejos acuosos del hierro férrico, en presencia únicamente de agua y a diferentes valores de pH, para una concentración de hierro férrico de 20 mg/L, se muestran en la figura 3.11.

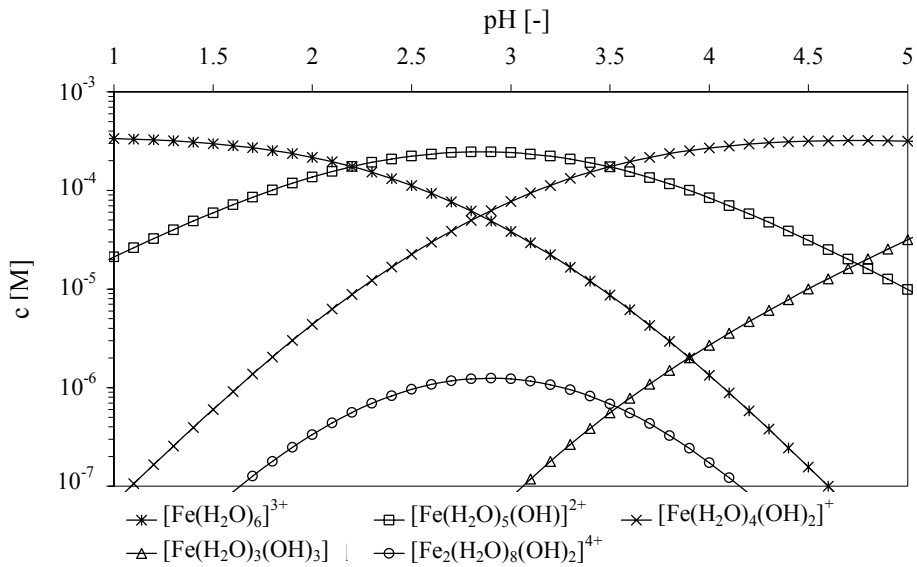


Figura 3.11: Especies de hierro férrico presentes en solución acuosa a diferentes valores de pH. Constantes de equilibrio [Flynn, 1984], gráfica [Gernjak, 2006].

Tomando en cuenta todo lo anterior, el tratamiento foto-Fenton se desarrolló con hierro recién precipitado, a pH 7, para prevenir la insolubilización del diclofenaco. Este proceso, presuntamente poco eficiente, tiene interés en aquellos casos concretos dónde el contaminante objetivo puede insolubilizarse si se trabaja al pH óptimo del proceso de foto-Fenton (alrededor de pH 2.8). Los experimentos se llevaron a cabo con agua estándar para proveer un medio neutro. La adición de hierro tuvo un efecto acidificante debido a la formación de diferentes especies férricas precipitadas, como se ha mencionado anteriormente. Si la concentración de hierro es suficientemente alta, el efecto acidificante puede exceder la capacidad de tampón del agua estándar. Por este motivo la cantidad de carbonato sódico se incrementó utilizando una relación molar de 3:1, comparada a la que se indica en el protocolo de preparación de agua estándar [Standard Methods, 1998]

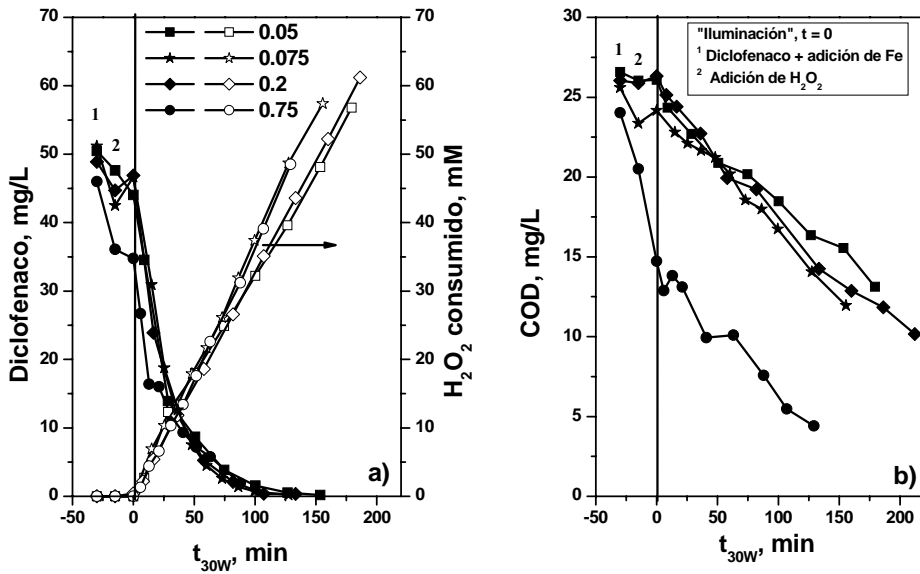


Figura 3.12: Tratamiento Foto-Fenton en agua estándar a pH neutro, a diferentes concentraciones de hierro (0.05, 0.075, 0.2, 0.75) mM. Comparación de (a) concentración de diclofenaco y consumo de peróxido, y (b) Carbono orgánico disuelto (COD).

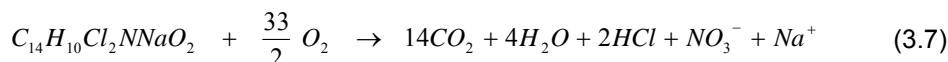
En la figura 3.12 (a) y (b), se muestran los resultados de la descomposición de diclofenaco, el consumo de peróxido y la mineralización del carbono orgánico disuelto (COD). En la figura 3.12 (a) se observa que la descomposición del diclofenaco tiene un comportamiento muy parecido a una reacción de primer orden, mientras que el consumo de peróxido y la mineralización COD tienen una velocidad constante, típico de una cinética de orden cero. Para todas las concentraciones de hierro, la velocidad de descomposición del diclofenaco así como el consumo de peróxido parecen ser iguales. En contraste con la mineralización del COD, que a primera vista, parece depender de la concentración de hierro. Pero, si la rápida disminución inicial, con la concentración más alta de hierro ($\text{Fe} = 0.75 \text{ mM}$) no se considera, se podría suponer también una velocidad constante, sin importar la concentración de hierro utilizada. La explicación podría ser que el precipitado de hierro amorfo

está cargado positivamente [Flynn, 1984], mientras que a pH 7 el diclofenaco está mayormente deprotonado, es decir, cargado negativamente. De este modo la adsorción del diclofenaco en el precipitado de hierro esta favorecida; y cuanto mayor sea la cantidad de hierro precipitado, mayor será este efecto. Por lo tanto debe aclararse que la disminución del COD a elevado concentración de Fe no es debida a mineralización de diclofenaco, sino a que está adsorbido. Este efecto no se aprecia en los resultados de degradación del diclofenaco (medido por HPLC), debido a la manera en que las muestras son preparadas para su análisis. Las muestras son mezcladas con una cantidad equivalente de acetonitrilo, el cual desorbe el diclofenaco del precipitado de hierro, previamente a su filtración e inyección en el HPLC.

La similar velocidad de reacción, a diferentes concentraciones de hierro podría explicarse teniendo en cuenta la geometría del reactor, absorción de luz y adsorción de diclofenaco. Los tubos absorbedores de los CPCs tienen una diámetro interno de 29.7 mm y teniendo en cuenta que la profundidad de penetración de los fotones solares depende de la densidad óptica de la solución, y que el óxido de hierro amorfo absorbe fuertemente la luz, entonces tenemos que toda la radiación activa disponible es absorbida aún en el experimento con menor concentración de hierro (0.05 mM). Esto provoca que la velocidad de reacción sea independiente de la concentración de hierro. Esto también puede explicar el consumo lineal de peróxido. El consumo de éste depende de la cantidad de Fe^{2+} disponible para que transcurra la reacción de Fenton. Y como el Fe^{2+} es producido a partir de la fotoreducción de Fe^{3+} , si toda la radiación disponible es absorbida a la menor concentración de hierro, el aumentar la concentración de Fe no tiene ningún efecto sobre la producción de Fe^{2+} por fotoreducción. Por tanto, el consumo de H_2O_2 será mínimo en esas condiciones y por tanto el mismo que para mayores concentraciones de hierro. Ya que se plantea que la producción de $\cdot\text{OH}$ tiene que ver con el comportamiento como semiconductores de los precipitados de hierro, la degradación del diclofenaco podría también seguir un mecanismo del tipo Langmuir-Hinshelwood en la

superficie del hierro precipitado, provocando que la reacción tenga un comportamiento de primer orden aparente. Esto sería válido tanto para una transferencia de carga de ligando a metal como para una oxidación, por medio pares electrón-hueco fotogenerados [Pulgarin y Kiwi, 1995].

En todos los experimentos la descomposición del diclofenaco tomó entre 100 – 110 minutos, para alcanzar este punto el consumo de peróxido fue de entre 35 – 40 mM. Esto excede bastante la demanda estequiométrica teórica de peróxido para la oxidación de 50 mg/L de diclofenaco (5.3 mM), Ec. 3.7. Si el mecanismo responsable de la oxidación del diclofenaco es una reacción en la superficie del hierro precipitado, se podría proponer un tratamiento alternativo sin la necesidad de agregar peróxido de hidrógeno, ya que el hierro ferroso es oxidado a hierro férrico que precipita en medio neutro [Wells *et al.*, 1991].



3.2.3 Tratamiento foto-Fenton en agua estándar a pH 2.8

El tratamiento foto-Fenton, normalmente se realiza en medio ácido para mantener el hierro en solución. Algunos autores han trabajado en ciertos rangos de pH más bajos, sin embargo la mayoría sigue la recomendación clásica de Pignatello [Pignatello, 1992], que propone un pH de 2.8 como valor óptimo.

En medio ácido el diclofenaco se vuelve prácticamente insoluble. Consecuentemente, las especies oxidantes producidas en el proceso de foto-Fenton ($\cdot OH$) tienen que difundir hacia el contaminante precipitado o reaccionar con la pequeña porción disuelta. En el caso que nos ocupa se producen ambos procesos simultáneamente. La mineralización del COD, la descomposición del diclofenaco y la evolución de los iones cloruro y amonio, utilizando una concentración de hierro de 0.075 mM, se muestran en la figura 3.13, en la cual

se aprecia que el COD y la concentración de diclofenaco disminuyen una vez que el ácido y el hierro se han agregado, pero esto sucede antes de la adición de peróxido de hidrógeno, indicando la precipitación del diclofenaco. El comportamiento a partir de ese momento de diclofenaco (y por tanto del COD) es provocado por un proceso continuo de precipitación de diclofenaco, descomposición de diclofenaco (precipitado y en disolución) y redisolución de diclofenaco precipitado; hasta alcanzar una descomposición y mineralización casi completa.

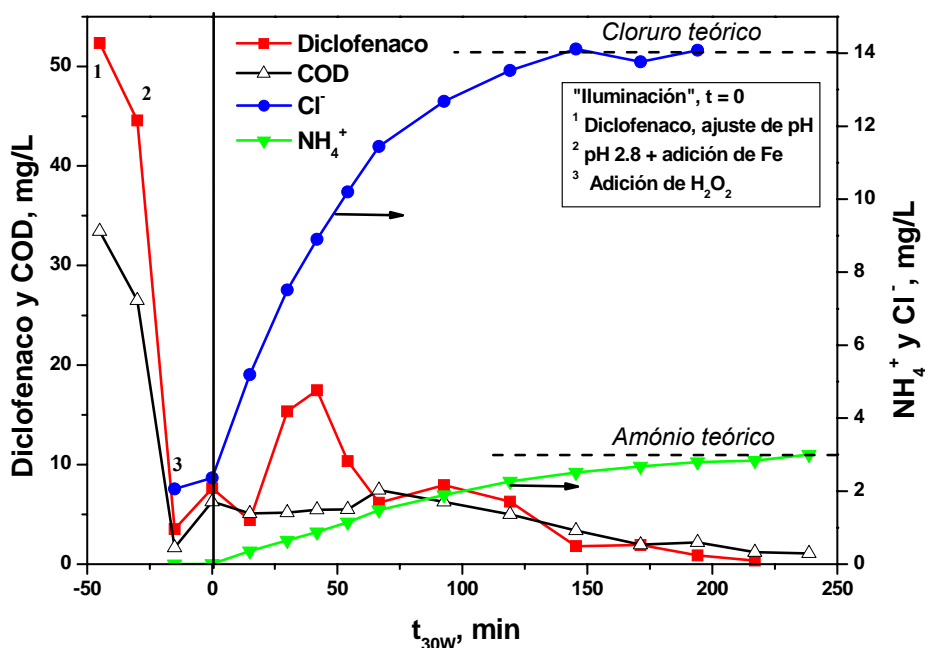


Figura 3.13: Tratamiento Foto-Fenton de diclofenaco en agua estándar a pH 2.8, concentración de hierro 0.075 mM.

De este modo, las mediciones del COD y de la concentración de diclofenaco durante el experimento, no garantizan la correcta evaluación de la descomposición de esta sustancia. Por tanto, la evolución de los iones inorgánicos puede dar una indicación del estado del proceso de oxidación; estos

iones al ser solubles pueden ser medidos a través de cromatografía iónica. La liberación de cloro (en forma de cloruro) del anillo aromático es uno de los primeros pasos en la oxidación de compuestos aromáticos mediante procesos avanzados de oxidación. De ésta manera, la evolución de la cantidad de cloruro liberada puede ser usada para contrastar los resultados del análisis del diclofenaco mediante HPLC de los experimentos desarrollados en medio neutro y a pH 2.8. La mineralización del nitrógeno orgánico en la molécula del diclofenaco, el cuál une sus dos anillos aromáticos, es un poco más lenta que la evolución del cloruro (figura 3.13). Casi nada del nitrógeno orgánico fue mineralizado a nitrato, comparado con la cantidad de amonio (menos del 3%). Por consiguiente solo se consideró la evolución del amonio. Los resultados indican una mineralización completa del nitrógeno orgánico en un estado muy avanzado de la mineralización del diclofenaco. Debido a la estructura molecular es probable que la liberación del nitrógeno sea uno de los últimos pasos antes de que la mineralización sea completa. En este capítulo se abunda al discutir la ruta de degradación del diclofenaco mediante foto-Fenton, unas páginas más adelante.

Aunque la concentración de hierro es muy diferente, habiendo un factor de 25 entre la concentración más baja y la más alta en los experimentos mostrados en la Figura 3.14, las diferencias entre la evolución del cloruro y el amonio, así como también el consumo de peróxido, son pequeñas. Solamente el experimento en el que se utilizó la concentración más alta de hierro es claramente más rápido. En todos los experimentos la evolución del cloruro tomó alrededor de 100 minutos, lo cual es muy similar a la desaparición de diclofenaco medida con el HPLC en los experimentos a pH alrededor de 7, como se muestra en la figura 3.12. En cambio la evolución del amonio tomó más o menos el doble de tiempo, entre 160 y 250 minutos, siendo las diferencias para las cuatro concentraciones de hierro un poco más pronunciadas.

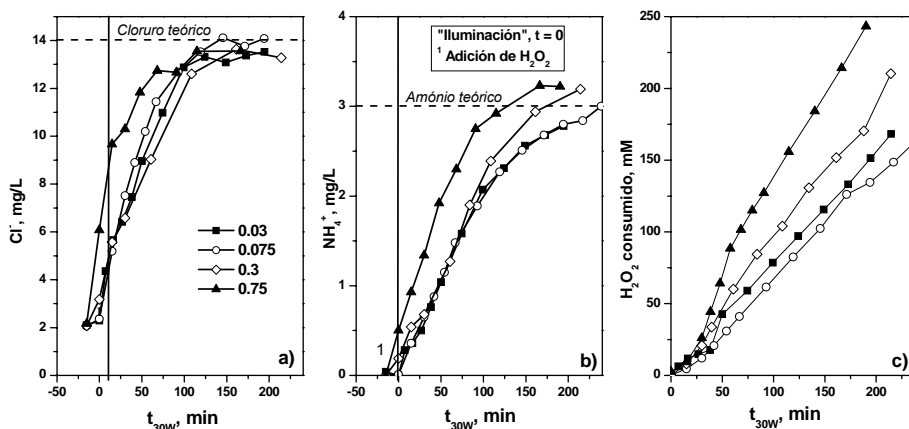


Figura 3.14: Tratamiento Foto-Fenton de diclofenaco en agua estándar a pH 2.8, a diferentes concentraciones de hierro (0.03, 0.075, 0.3 y 0.75 mM). (a) Evolución de cloruro, (b) Evolución de amonio, (c) Consumo de peróxido de hidrógeno. No se detectó consumo de peróxido antes de iniciar la iluminación.

Esto mismo sucede en el caso del peróxido consumido. Sin embargo, como se mencionó antes, con relación a las diferentes concentraciones de hierro, la velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno es muy similar. Experimentos hechos conteniendo solo peróxido de hidrógeno y hierro sin ninguna sustancia orgánica, mostraron un comportamiento similar en cuanto a la descomposición de peróxido. Una explicación puede ser que la generación de radicales hidroxilo es mayor a mayor concentración de hierro, pero debido a la baja concentración de las sustancias que reaccionan con este radical (diclofenaco y sus PD's,) la reconstitución de peróxido de hidrógeno a partir de los radicales producidos está favorecida. Por tanto se sugiere que la concentración de radicales en la solución también es mayor a mayor concentración de hierro, lo cual podría explicar porque los productos intermedios de descomposición solubles son mineralizados y la producción de amonio es más rápida a mayor concentración de hierro. Por otro lado, la oxidación del diclofenaco, como lo indica la aparición de cloruro, parece depender de su solubilización. Esto también se indica por el alto consumo de peróxido hasta completar la decloración (80 – 110 mM, figura 3.14c), el cual es alrededor de 15

– 20 veces la demanda estequiométrica de la mineralización total del diclofenaco. Si el diclofenaco estuviera bien disuelto desde el principio, ese consumo sería claramente menor.

3.2.4 Tratamiento foto-Fenton en agua destilada sin control de pH.

Los tratamientos realizados en medio ácido y neutro mostraron ser desventajosos con respecto a la precipitación del hierro y del diclofenaco. Por consiguiente, el tratamiento foto-Fenton se llevó a cabo con un pH inicial de alrededor de 7, en agua sin capacidad de tampón, así que el pH resultante cambiaría de 7 a 3.7 durante el tratamiento, debido a la formación de intermedios como ácidos carboxílicos y por efecto de la liberación de cloruro al medio. Esto significa que el diclofenaco será más soluble ya que el pH está más cercano a su pKa (4.5) [Packer *et al.*, 2003] y la precipitación del hierro será menor produciendo posiblemente una aceleración de todo el proceso de descomposición.

En los resultados que se muestran en la figura 3.15, la descomposición del diclofenaco, medida con HPLC, casi coincide con la evolución del cloruro, aunque el pequeño incremento en la concentración del cloruro, una vez que el diclofenaco ha desaparecido, indica que algo de diclofenaco ha precipitado debido a la disminución del pH. Es importante remarcar que esta precipitación no pudo ser claramente determinada debido a que la descomposición del diclofenaco fue muy rápida. De nuevo la formación de amonio es más lenta que la evolución de cloruro. El perfil de mineralización del COD también indica que el proceso es determinado por el equilibrio de solubilidad del diclofenaco, que es a su vez influenciado por el pH. El incremento de la concentración del COD después de los primeros minutos es debido a la formación de intermedios solubles, los cuales son mineralizados posteriormente en el transcurso de la reacción. Con el fin de conocer parte de estos productos de oxidación muy solubles, se determinó la concentración de algunos ácidos carboxílicos (acético,

fórmico, maléico y oxálico). Coincidiendo con la máxima concentración de COD después de 30 minutos, la concentración máxima detectada de éstos ácidos fue de 0.1, 1.5, 4.0, 7.0 mg/L, para el ácido maléico, acético, fórmico y oxálico, respectivamente. El ácido acético parece ser el más recalcitrante de ellos, y junto con el ácido oxálico el único que se encontró en concentraciones bajas hasta el final del experimento. No se detectaron ácidos que contuvieran tres carbonos. Los PDs son estudiados con más detalle en la siguiente sección de este capítulo.

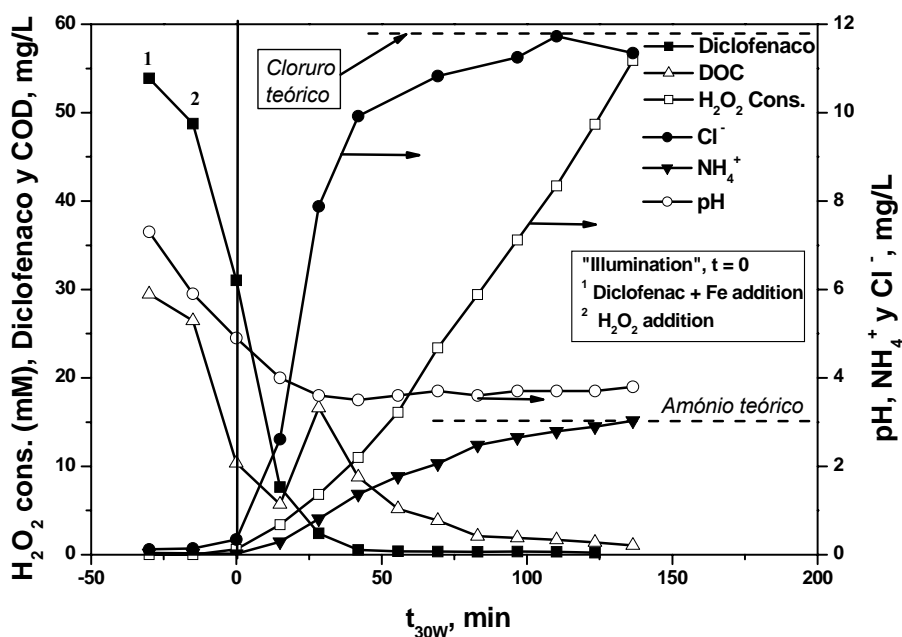


Figura 3.15: Tratamiento Foto-Fenton de diclofenaco en agua destilada, con un pH inicial de 7 y una concentración de hierro de 0.05 mM.

Si para asegurar la descomposición de diclofenaco se utiliza la medida del HPLC, este proceso tiene una duración de alrededor de 50 minutos y el consumo de peróxido de hidrógeno hasta este momento está en torno a 15 mM. Esto es considerablemente más rápido que en los otros casos, y el consumo de

peróxido es mucho menor. Ahora bien, si se utiliza la evolución del cloruro para asegurar el resultado, el tiempo de descomposición aumentará hasta los 100 minutos aproximadamente, como en los otros tratamientos, y el consumo de peróxido se incrementará a 40 mM. De los resultados obtenidos parece adecuado trabajar en un rango de pH de entre 4.5 – 5 que asegura una buena solubilidad de diclofenaco y una lenta precipitación del hierro. Al mismo tiempo la adición de sustancias acomplejantes de hierro puede también mejorar el proceso a este pH, como lo han propuesto diferentes autores [Sun y Pignatello, 1992; Paciolla *et al.*, 2002; Safazadeh-Amiri *et al.*, 1996] para prevenir la precipitación del hierro.

3.2.5 Tratamiento fotocatalítico (TiO₂/UV) en medio neutro.

La fotocatalisis con dióxido de titanio (TiO₂) se utilizó después de haber abordado todas las dificultades, que se han comentado anteriormente, sobre la insolubilidad del diclofenaco a pH muy bajo, ya que la fotocatalisis se puede realizar sin ajuste de pH. El experimento se realizó en agua estándar con 0.2 g/L de TiO₂ en suspensión, ésta concentración se utilizó ya que se encuentra cerca del valor óptimo de acuerdo a experimentos previos [Fernández-Ibáñez *et al.*, 1999] en los mismos fotoreactores. En la figura 3.16 se muestran los resultados de este experimento. La evolución del cloruro coincide de nuevo con la descomposición del diclofenaco medida con HPLC. La descomposición total del diclofenaco tarda alrededor de 200 minutos, lo cual es mucho mas lento que cualquiera de los tratamientos de Foto-Fenton utilizados. Como se puede observar en la figura 3.16, la cinética de descomposición encaja en una cinética de pseudo-primer orden, de acuerdo con el mecanismo generalmente aceptado de Langmuir–Hinshelwood para la fotocatalisis del dióxido de titanio [Herrmann, 1999] cuando la concentración del contaminante es baja. La mineralización del COD inicia después de una período de 100 minutos, lo cual es típico en una oxidación fotocatalítica, ya que las primeras reacciones que toman lugar no

inducen a la mineralización, sino que solamente oxidan parcialmente al compuesto, generándose los PDs que se estudian más adelante.

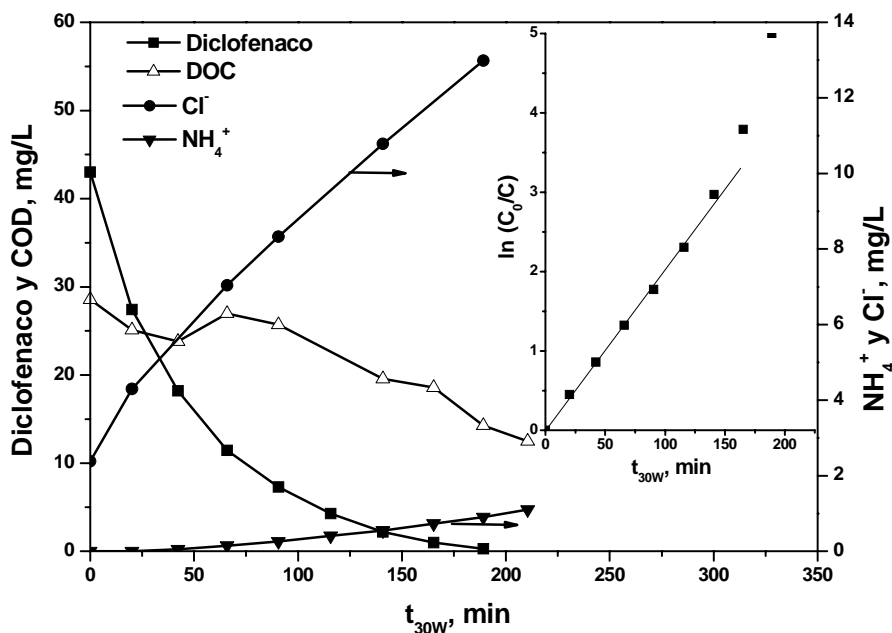


Figura 3.16: Tratamiento fotocatalítico (TiO_2 , 0.2 g L^{-1}) en agua estándar, sin control de pH.

3.3 Determinación de productos de degradación y ruta de degradación de diclofenaco mediante procesos de oxidación avanzada.

A partir de los resultados anteriores, y con el fin de investigar los productos de degradación generados con los dos procesos de oxidación avanzada descritos antes, se realizaron otra serie de ensayos específicos para este fin.

3.3.1 Tratamiento foto-Fenton.

En estos ensayos se utilizó la concentración de hierro de 0.05 mM (la más baja de las utilizadas en la sección 3.2), a fin de reducir la velocidad de reacción, y poder evaluar correctamente los PDs obteniendo una mayor cantidad de muestras. En la Figura 3.x se observa que los PDs principales son generados durante los primeros 20 minutos. Además, se decidió trabajar en agua desmineralizada sin control de pH para evitar la precipitación del diclofenaco o del hierro, en los momentos iniciales de la degradación. Los experimentos mostrados en las siguientes figuras fueron hechos en condiciones similares a las comentadas en sección 3.2.4, pero repetidos varias veces con el objeto de asegurar los resultados y evaluar correctamente los PDs.

Como puede observarse en la Figura 3.17, la concentración de diclofenaco decrece rápidamente durante la reacción Fenton (Fe^{2+}) en la “oscuridad”, reduciendo la cantidad inicial en más del 50%. La reducción del COD también fue evaluada durante este período, reduciéndose significativamente. Después de iluminar el fotoreactor (foto-Fenton), aunque la velocidad del proceso general empezó a disminuir, este condujo a la completa mineralización. Hasta ese momento hay dos efectos presentes:

- La degradación parcial de la molécula principal, con la subsiguiente aparición de algunos PDs, y
- La rápida disminución del pH, la cual desencadena la ya comentada precipitación del diclofenaco.

Después de $t = 0$, la concentración de diclofenaco permaneció baja y la de COD se incrementó debido al mencionado proceso de precipitación – redisolución – degradación del diclofenaco, que ya se comentó en la sección 2 de este capítulo.

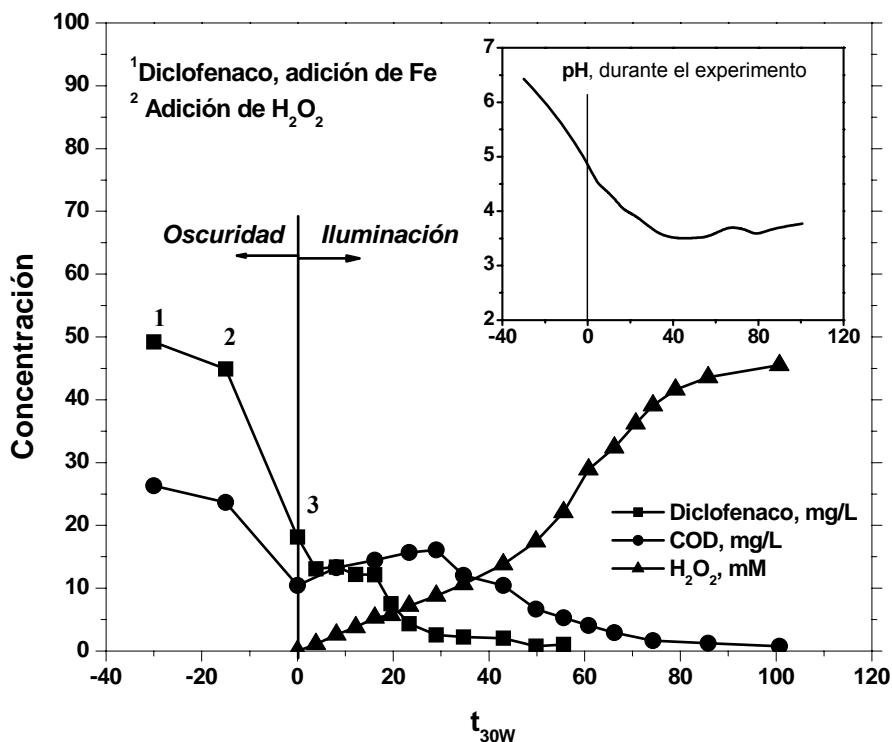


Figura 3.17: Evolución de la concentración de diclofenaco (50 mg/L), COD y del pH con el tiempo de iluminación, durante el tratamiento con foto-Fenton (concentración de Fe²⁺ 0.05 mM).

El COD se incrementa, hasta un máximo de concentración que es mayor que el obtenido a $t = 0$ (16 mg/L a 30 min), pero nunca tan alto como el punto donde se añadió el peróxido (24 mg/L a -15 min, correspondiente aproximadamente a 45 mg/L de diclofenaco). Esto significa que a $t = 0$ algo del diclofenaco inicial ya ha precipitado. A los 43 min, 96% del compuesto principal ya había desaparecido y el COD ya había caído de nuevo hasta el mismo valor que tenía en el momento de exponer la solución a la radiación solar ($t = 0$). La velocidad de consumo de peróxido fue aproximadamente constante hasta los 43 min, incrementándose posteriormente hasta muy cerca del punto donde se logra la mineralización del COD ($t = 70$ min). Se podría concluir que después de $t = 43$ min, todo el

contenido orgánico estaba ya en disolución porque la velocidad de consumo de peróxido de hidrógeno es la más alta de todo el experimento. Al final del tratamiento, a pesar de la precipitación del diclofenaco al inicio, todo el contenido orgánico ha sido mineralizado, como lo evidencia no solo las medidas de COD, sino también la liberación de cloro y amonio de la molécula de diclofenaco. Otras consideraciones respecto a estos experimentos ya se comentaron en la sección 3.2.4. La figura 3.18 muestra la generación de cloruro y amonio.

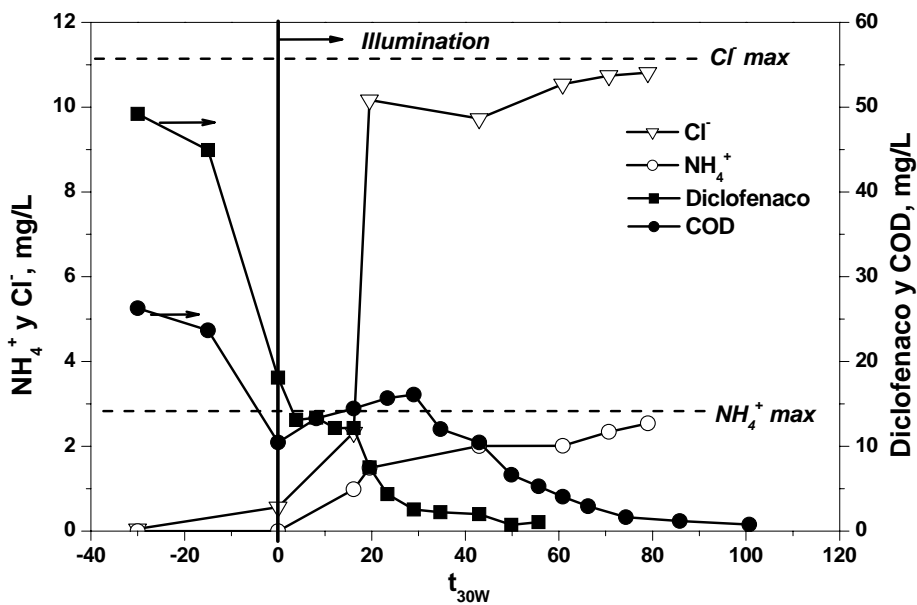


Figura 3.18: Evolución de Cloruro y Amonio durante el proceso foto-Fenton.

Prácticamente todo el cloro (94%) y alrededor del 60% del amonio aparecen alrededor de los 20 minutos después de la iluminación, coincidiendo con la desaparición de la mayoría de los PDs, como se aprecia en la Figura 3.18. Sin embargo debe ser aclarado que solo el 6% de cloruro se libera entre el minuto 20 y el 80, lo cual correspondería a una pequeña parte de diclofenaco re-disuelto y degradado durante este período (entre el minuto 20 y 60), durante el cual los intermedios identificados, mostrados en la Figura 3.20, no fueron detectados. Se

asume que pequeñas cantidades de ellos se formaron y se degradaron muy rápidamente. Únicamente se encontraron ácidos carboxílicos en el agua a partir de 20 minutos de tratamiento. Por otro lado, la evolución del amonio proporcionó otra medida para asegurar la degradación de diclofenaco y de sus intermedios principales, debido a que el nitrógeno en la molécula que mantiene unidos a los dos anillos aromáticos. Después de 40 min, 80% del amonio aparece y el diclofenaco casi desaparece.

3.3.2 Identificación de productos de degradación.

Al igual que en estudios previos, se procedió a la identificación de los principales productos de degradación generados durante el tratamiento por foto-Fenton, con el fin de obtener un mayor conocimiento de los mecanismos de reacción y proponer una posible ruta de mineralización. La oxidación del diclofenaco por foto-Fenton condujo a la formación de un gran número de intermedios, algunos de los cuales fueron identificados mediante GC-MS y LC-TOF-MS.

La identificación por GC-MS se realizó mediante la comparación directa del espectro de masas de los picos del cromatograma, en modo “full-scan”, con bases de datos de espectros de masas o por interpretación de los patrones de fragmentación, tal como se comentó en los estudios de fotólisis. De igual modo, el análisis con ionización química positiva (PCI) fue de gran ayuda, haciendo posible la asignación de los iones moleculares en el espectro de masas.

Los PDs polares y semi-polares fueron analizados por LC-TOF-MS con interfase de electrospray. La identificación de los productos de degradación del diclofenaco se basó en medidas de masa exacta, mediante el procedimiento descrito en el capítulo anterior.

Los análisis por LC-TOF-MS mostraron la pronta aparición de dos picos durante la reacción Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$), antes de la exposición a la luz solar. Estos picos

eluían antes que el diclofenaco a tiempos de retención de 21.4 y 20.9 min. El primero de ellos, designado como D1 en la Figura 3.20, presentaba una masa exacta de 312.0193 uma, la cual dio como mejor ajuste la fórmula $C_{14}H_{11}NO_3Cl_2$ (molécula neutra), con una exactitud de masa de 1.3 ppm. Esta fórmula correspondía a la adición de un átomo de oxígeno, lo cual es consistente con la formación de derivados monohidroxilados. El segundo pico, designado como D2 en la Figura 3.20, mostraba una masa exacta de 310.0031 uma, la cual se ajustaba prácticamente sin error (-0.4 ppm) a la fórmula $C_{14}H_9NO_3Cl_2$ (molécula neutra), que contenía a un átomo de oxígeno más y dos átomos de hidrógeno menos que el diclofenaco. La presencia de ambos compuestos sugería que la degradación inicial de diclofenaco era debida al ataque inicial de radicales $\bullet OH$ en el anillo aromático, produciendo un derivado monohidroxilado, el cual posteriormente era oxidado al correspondiente intermedio iminoquinona.

Aunque la información analítica disponible no posibilita la localización precisa del ataque del radical $\bullet OH$ en la molécula, consideraciones concernientes a la reactividad de las diferentes posiciones activas de la molécula del diclofenaco [Moore, 1998] y la bibliografía disponible, permitieron sugerir que la hidroxilación tenía lugar preferentemente en la posición C-5 como la opción más probable. Es sabido que los radicales $\bullet OH$ son especies fuertemente electrofílicas y no selectivas. En base a su carácter electrofílico y de acuerdo a la teoría de los orbitales frontera, los lugares con más alta densidad electrónica en los orbitales moleculares ocupados de más alta energía (HOMO, Highest Occupied Molecular Orbital) en el estado fundamental, son más susceptibles al ataque de radicales $\bullet OH$ [Pignatello, 1992]. Aunque ambas posiciones C-4 y C-4' presentan un coeficiente HOMO relativamente alto [Vogna *et al.*, 2004], se ve más probable que la posición 4, la cual está en posición para con respecto al sustituyente NH en el anillo aromático mas rico en electrones, sería el más reactivo hacia los oxidantes. Esta hipótesis es consistente con publicaciones anteriores [Sun y Pignatello, 1992; Paciolla *et al.*, 2002].

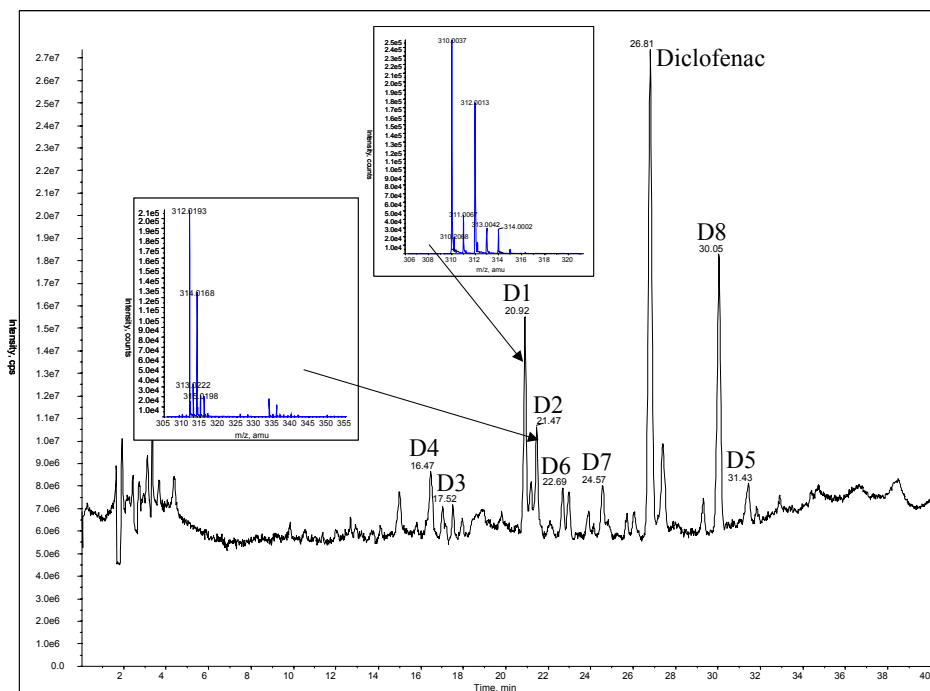


Figura 3.19: Cromatograma obtenido mediante LC-(ESI+)TOF-MS correspondiente al análisis de un extracto de la mezcla de reacción tras 10 min de tratamiento con foto-fenton. En él se muestran los PTs identificados y los espectros de masas, de los compuestos D1 y D2.

Inicialmente, los compuestos D1 y D2 produjeron respuestas similares en el LC-MS. En ese momento la solución en el reactor era incolora. Una vez que la solución fue expuesta a la radiación solar y que la reacción foto-Fenton ($\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV-vis}$) iniciara, D2 se incrementó a más del doble de D1, dando a la solución el color marrón-rojo oscuro característico del grupo iminoquinona.

Después de esto, muchos otros picos fueron detectados (Figura 3.19). Solo los más significativos fueron investigados y en base al conocimiento previo de este tipo de foto-reacciones, se propusieron las estructuras que se muestra en la Figura 3.19. En la Tabla 3.3 se muestran los datos relacionados con las masas exactas experimentales y calculadas de iones protonados, el error entre ellos y

la fórmula empírica propuesta que corresponden a los compuestos identificados. Las masas exactas resultantes para estos compuestos fueron encontradas con un error de menos de 0.7 mDa ó 2.5 ppm en todos los casos.

La gran exactitud en los resultados obtenidos puede ser atribuida a la manera en que el instrumento procesa “todos los datos, todo el tiempo” y la manera de calcular la masa exacta. Este instrumento utiliza una fuente de ionización con doble nebulizador y un sistema automático de calibrado continuo, el cual introduce las masas de referencia interna (121.0509 y 922.0098) a una velocidad de flujo muy baja, combinando esto con el software utilizado que constantemente autocalibra y graba los resultados de las masas de referencia interna conjuntamente con los datos que se van generando de las muestras. Esta estrategia proporciona una exactitud mejorada en comparación con muchos detectores TOF anteriores, los cuales aplican una calibración de masas externa.

Tabla 3.3: Medidas de Masa Exacta obtenidas de los espectro LC-TOF-MS, de los productos de degradación protonados identificados.

Compuesto	Fórmula	Masa Calculada (m/z)	Masa Experimental (m/z)	Error mDa	Error ppm
D1	C ₁₄ H ₁₂ NO ₃ Cl ₂	312.0188	312.0193	0.4	1.3
D2	C ₁₄ H ₁₀ NO ₃ Cl ₂	310.0032	310.0031	-0.1	-0.4
D3	C ₁₄ H ₁₁ NO ₄ Cl	292.0371	292.0373	0.2	0.6
D4	C ₁₄ H ₁₀ NO ₄ Cl ₂	325.9981	325.9983	0.1	0.5
D5	C ₁₃ H ₁₀ NOCl ₂	266.0133	266.0132	-0.2	-0.7
D6	C ₁₃ H ₁₀ NO ₂ Cl ₂	282.0083	282.0084	< 0.1	0.3
D7	C ₁₃ H ₈ NO ₂ Cl ₂	279.9926	279.9926	<0.1	-0.2
D8	C ₁₄ H ₁₀ NO ₂ Cl ₂	294.0083	294.0090	0.7	2.3

Los análisis realizados por GC-MS condujeron a la identificación de otro grupo de compuestos (D9, D10, D11 y D12) los cuales no poseen el grupo

iminoquinona. Las estructuras de estos compuestos, representados gráficamente en la figura 3.20, fueron tentativamente asignadas a partir de los espectros de masas en modo *full-scan*. Los análisis realizados con ionización química positiva (PCI), utilizando metano como gas reactivo, proporcionaron una confirmación precisa del peso molecular de los compuestos lo cual es esencial para la propuesta de las estructuras.

La evolución en el tiempo de algunos de los principales PDs identificados se representa en la Figura 3.21B. Solo aquellos PDs que son más representativos y presentan una respuesta más alta fueron incluidos para simplificar la gráfica, aunque el resto de compuestos exhibieron un comportamiento similar. Se puede observar en la gráfica que los compuestos D1 y D2 aparecieron con una respuesta significativa antes de la exposición a la radiación solar. Otros PDs con alto peso molecular (D3-D5, D9-D13) también aparecen a $t_{30W} = 0$ pero con una respuesta considerablemente menor y alcanzaron su máximo de concentración entre los 4 y 8 minutos de tratamiento. De aquí en adelante cuando sus concentraciones relativas, basadas en el área relativa de los picos en el cromatograma, empiezan a decrecer aparecen los ácidos carboxílicos.

Utilizando cromatografía iónica se consiguió la identificación de cuatro ácidos orgánicos, los cuales fueron: acético, maléico, oxálico y fórmico. Estos ácidos constituyen el último paso en el proceso de mineralización. Su evolución en el tiempo está representada en la Figura 3.21C, donde el efecto de la degradación – mineralización del diclofenaco puede ser observada más claramente. La concentración máxima alcanzada por estos ácidos fue de 0.1, 1.5, 4.0 y 7 mg/L, para maléico, acético, fórmico y oxálico respectivamente. El ácido acético parece ser el más recalcitrante de ellos y junto con el ácido oxálico fue el único que fue encontrado en bajas concentraciones, hasta el final del experimento.

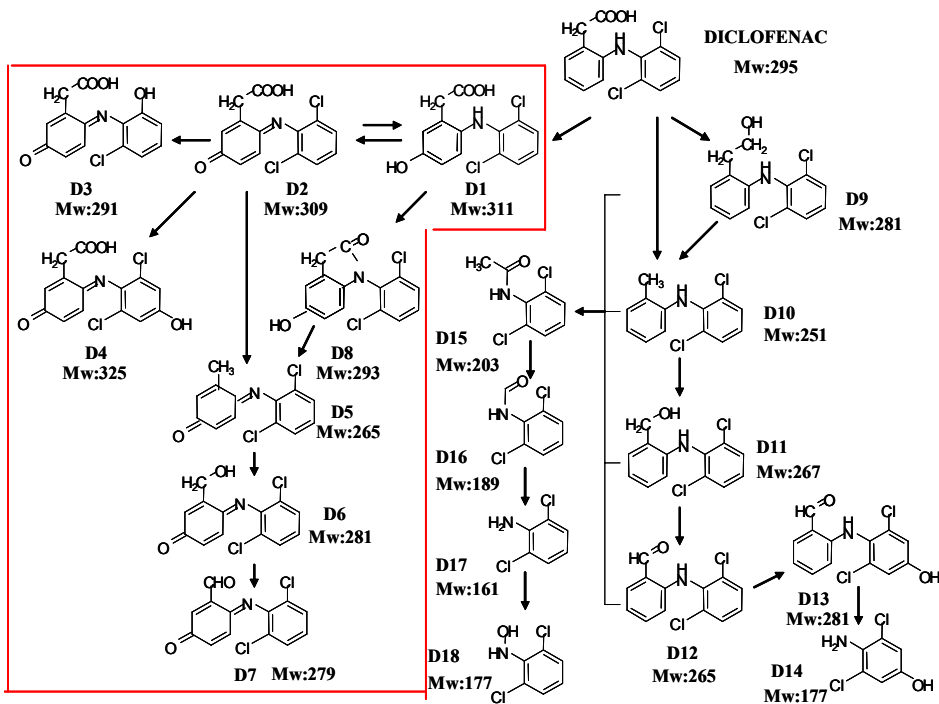


Figura 3.20: Ruta de degradación propuesta para la degradación del diclofenaco por medio del tratamiento foto-fenton.

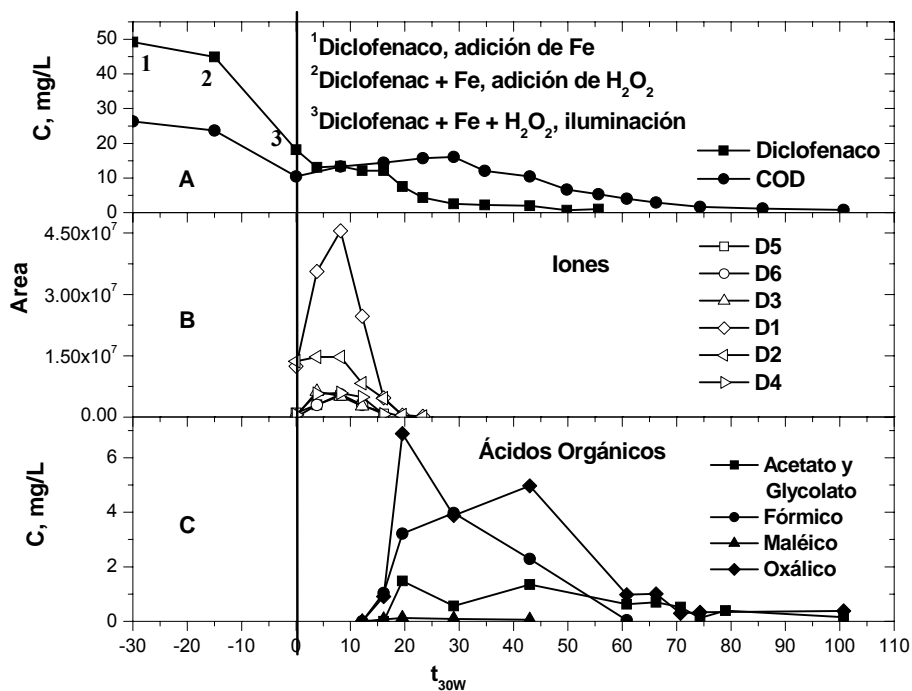


Figura 3.21: Evolución de los principales productos de degradación (B), durante el proceso foto-Fenton. A) Evolución del diclofenaco y el carbono orgánico disuelto, C) Ácidos carboxílicos detectados.

3.3.3 Ruta de degradación.

La mayor parte de los compuestos identificados por LC-TOF-MS, representados dentro del recuadro en la Figura 3.20, presentan la estructura iminoquinona, sugiriendo la formación de D2 como la principal ruta de degradación del diclofenaco utilizando el proceso foto-Fenton. La degradación posterior sucede a través de un proceso de etapas múltiples, las cuales incluyen reacciones de hidroxilación de los derivados iminoquinona (D2) a través del ataque de radicales $\cdot OH$ (D3 y D4); reacciones de descarboxilación en la cadena alifática; etapas de oxidación posterior (D5, D6 y D7); y una posible ciclación de D1 con pérdida de una molécula de H_2O (D8). La hidroxilación de D2 en el anillo dihalogenado

conduce a la formación de los compuestos D3 y D4. D4 resulta del ataque directo de los radicales $\bullet\text{OH}$ en el sitio más reactivo, átomo C-4'. El ataque de los radicales $\bullet\text{OH}$ en los sitios halogenados también conduce a la formación de D3, por reemplazo de un átomo de cloro con un grupo OH [Malato *et al.*, 2003].

Otra etapa de la degradación de los derivados iminoquinónicos fue la descarboxilación del grupo ácido fenilacético para formar D5, y las etapas posteriores de oxidación de la cadena alifática para formar el correspondiente alcohol y aldehído, $-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow -\text{CHO}$.

Conjuntamente con esta ruta de degradación principal, una ruta alternativa también fue identificada, la cual no pasa a través de la formación de derivados iminoquinónicos. Estos compuestos principalmente resultan de la reacción directa de la cadena alifática en la estructura del diclofenaco. Fue posible identificar cinco estructuras (D14-D18), presentes en cantidades muy pequeñas que resultaron de la apertura del anillo sin cloros, después de la oxidación – hidroxilación y/o hidrólisis, seguida por una etapa de descarboxilación posterior. Todos ellos mantenían el grupo 2,6-dicloroanilina, sugiriendo que la posición C-1' no era susceptible al ataque de radicales $\bullet\text{OH}$, como había sido referenciado antes [Vogna *et al.*, 2004].

La ruta de degradación propuesta, aunque con algunas similitudes, difiere de otras previamente reportadas en la literatura. Así, en fotólisis, la transformación del diclofenaco se debe principalmente a la fotociclación inicial del diclofenaco que da lugar a la formación de derivados carbazólicos [Safazadeh-Amiri *et al.*, 1996]. Utilizando ozono/ H_2O_2 /UV [Vogna *et al.*, 2004], se tiene un similar pero no idéntico mecanismo de reacción, el cual en este caso conduce a la formación de intermedios hidroxilados y otros productos provenientes de la ruptura del enlace C-N, sin embargo no se observa la formación de los derivados iminoquinónicos. Evidencia de la formación de D2 durante la oxidación del diclofenaco con HOCl, mieloperoxidasa (MPO), o neutrófilos activados, fue reportada por primera vez

por Miyamoto y colaboradores [Miyamoto *et al.*, 1997], quienes concluyeron que la formación de D2 era probablemente responsable de la hepatotoxicidad asociada al diclofenaco. Othman y colaboradores [Othamn *et al.*, 2000] también hacen referencia a la formación de D2 durante la hidroxilación preparativa del diclofenaco con H₂O₂ o t-BuOOH en presencia de porfirina de hierro. Sin embargo, a pesar de las similitudes, puede concluirse que el diclofenaco sigue diferentes mecanismos de reacción dependiendo del tratamiento de degradación utilizado.

CAPITULO

4

Capítulo 4

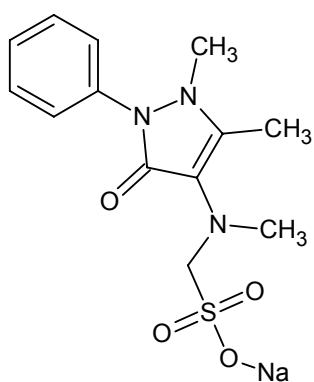
DEGRADACIÓN DE DAPIRONA MEDIANTE FOTOCATÁLISIS CON TiO₂ Y FOTO-FENTON. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA TOXICIDAD

4.1 Introducción

Este capítulo aborda los estudios de degradación mediante Foto-Fenton y fotocatalisis con TiO₂ del fármaco dipirona. La Dipirona es un popular analgésico y antipirético también conocido como Metamizol o Novalgín. Su uso como analgésico ha generado una gran controversia debido a su asociación con trastornos sanguíneos potencialmente mortales como la agranulocitosis. Por ese motivo ha sido prohibido en muchos países como Estados Unidos, Reino Unido o Suecia. Sin embargo, en países como Italia, Alemania o España, su uso está muy extendido tanto en pacientes pediátricos como en adultos, debido a su fuerte efecto analgésico, bajo costo, y por no requerir receta médica [Ergün *et al.*, 2004]. De especial relevancia es el uso en hospitales como tratamiento post operatorio, lo cual se ha puesto de manifiesto en el elevado contenido de su

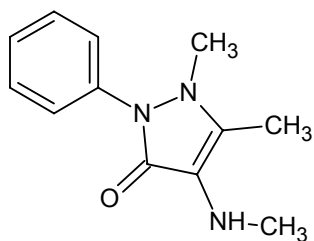
principal metabolito, la metilaminoantipirina (MAA), en las aguas residuales hospitalarias [Ramos *et al.*, 2007].

La Dipirona (figura 4.1a) se encuentra dentro del grupo de medicamentos denominados prodrogas. Este tipo de fármacos son administrados en su forma inactiva o significativamente menos activa, una vez ingeridos son metabolizados *in-vivo* al compuesto activo. Por tanto la Dipirona una vez ingerida, se hidroliza espontáneamente en su principal metabolito (figura 4.1b) 4-metilaminoantipirina (4-MAA), y posteriormente en una gran variedad de compuestos vía reacciones enzimáticas (Figura 4.2).



(a)

Dipirona:
Formula Empírica: C₁₃H₁₆N₃NaO₄S
Peso Molec.: 333.3



(b)

4-MAA:
Formula Empírica: C₁₂H₁₅N₃O
Peso Molec.: 217.2

Figura 4.1: Estructura química de (a) Dipirona como sal sódica, (b) 4-MAA principal metabolito hidrolizado.

Los metabolitos generados naturalmente no son biodegradables, aunque en general todavía se conoce poco sobre su comportamiento y persistencia en el medio ambiente.

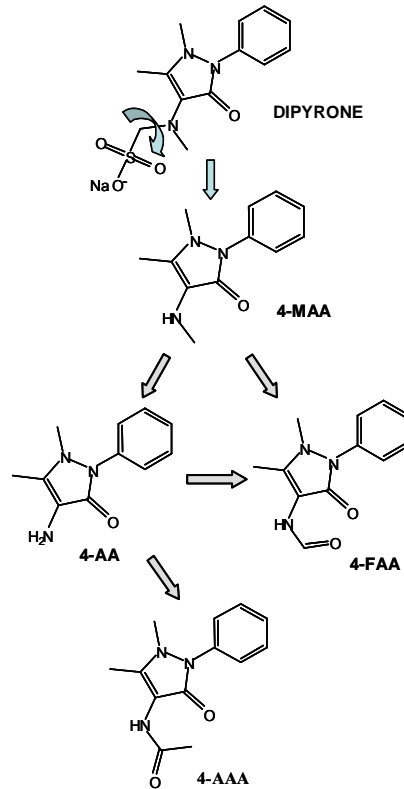


Figura 4.2: Metabolitos de la Dipirona producidos naturalmente en el cuerpo humano [Gómez et al., 2007].

Presencia de los principales metabolitos como MAA, N-acetil-4-aminoantipirina (AAA), N-formil-4-aminoantipirina (FAA) ha sido detectada en aguas superficiales y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en concentraciones significativamente altas (Tabla 4.1). Dada su incompleta eliminación con los tratamientos biológicos convencionales, las EDAR suponen una fuente puntual de contaminación de estos compuestos que contribuyen al continuo aporte de

los mismos a las aguas naturales. Este hecho justifica el interés de investigar la aplicación de tratamientos alternativos que minimicen o reduzcan su entrada al medio ambiente.

Tabla 4.1: Concentraciones medias y más altas de los metabolitos de la dipirona encontradas en aguas residuales y medioambientales

Compuesto	Efluente de EDAR [µg/L] Media-Mayor	Efluente de hospital [µg/L] Media-Mayor	Agua superficial [µg/L] Media-Mayor	Referencias
4-MAA	1.05 – 9.25 0.26 – 0.36	1486 – 4304	0.33 – 0.63	Martínez-Bueno, 2007 Ternes, 2001 Gómez, 2007
4-FAA	3.40 – 10.1 0.85 – 2.00 1.81 – 2.20		0.07 – 1.00 0.27 – 0.51 0.22 – 0.71	Martínez-Bueno, 2007 Zuehlke, 2004 Moldovan, 2006 Wiegel, 2004 Feldmann, 2007
4-AAA	7.30 – 25.00 2.90 – 7.00 4.44 – 4.87		0.12 – 1.00 0.99 – 1.50 0.23 – 0.69	Martínez-Bueno, 2007 Zuehlke, 2004 Moldovan, 2006 Wiegel, 2004 Feldmann, 2007

4.2 Estudios de hidrólisis y fotólisis

Como ya se ha comentado, la dipirona una vez ingerida se hidroliza espontáneamente dando lugar a su principal metabolito, la 4-metilaminoantipirina (MAA) [Ergün *et al.*, 2004]. Similar comportamiento fue observado en los estudios de hidrólisis realizados en disolución acuosa a diferentes valores de pH (natural, 3 y 9), en los que se pudo comprobar como la completa transformación de dipirona en MAA tenía lugar en menos de una hora en todos los casos (Figura 4.3), manteniéndose esta última estable por un largo periodo de tiempo.

Ambos comportamientos explican que solo se encuentren referencias de la presencia de MAA u otros metabolitos generados a partir de éste, tanto en aguas naturales como residuales (Tabla 4.2). En base a esto, estudios posteriores de fotólisis y fotocatalisis fueron realizados con disoluciones acuosas de MAA en lugar de con dipirona.

Así, para los experimentos de fotólisis se preparó una solución de 20 mg/L de dipirona, a pH natural. Una vez que la dipirona se hubo transformado en MAA, la solución fue expuesta a la luz solar una media de 8 horas diarias, con agitación constante, durante un periodo de cuatro semanas.

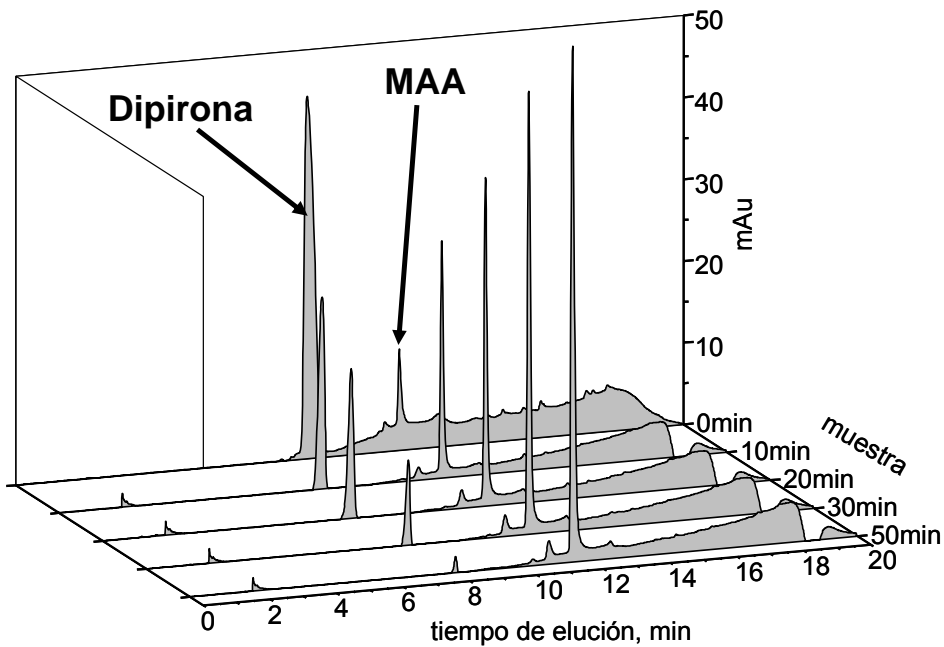


Figura 4.3: Cromatogramas superpuestos de HPLC-DAD ($\lambda = 254 \text{ nm}$) donde se muestran los resultados de la hidrólisis de dipirona (muestras tomadas cada 10 minutos) y su transformación en MAA.

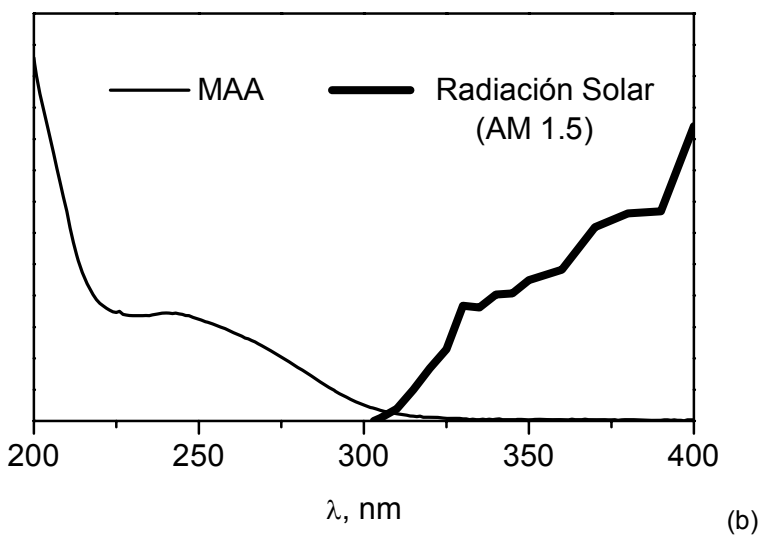
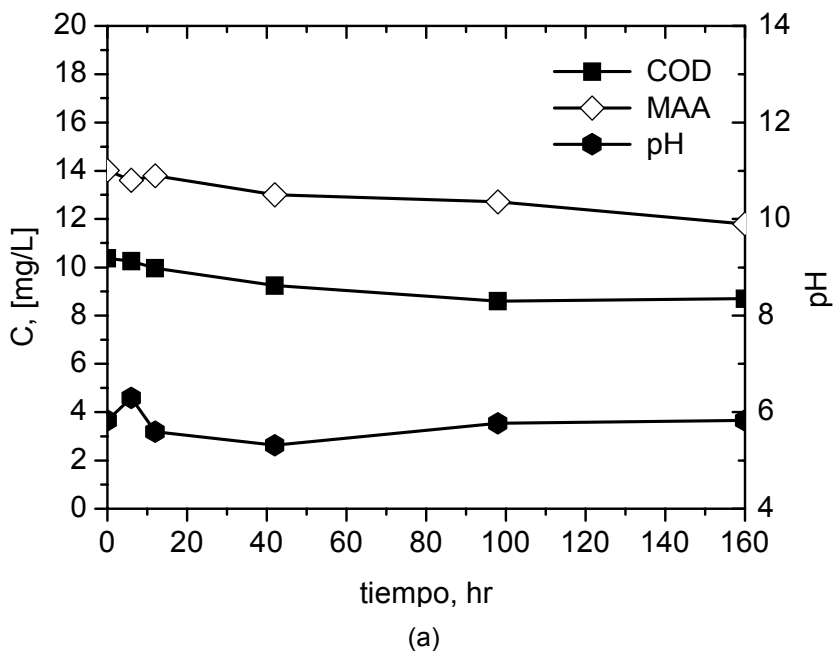


Figura 4.4: (a) Comportamiento del COD y el pH durante la fotólisis del MAA. (b) Espectro solar en la superficie terrestre y espectro de absorción de MAA.

Durante este periodo la concentración de MAA experimentó una ligera reducción de 1 mg/L y el COD 2 mg/L, como puede apreciarse en la Figura 4.4a. Esta estabilidad a la fotólisis directa puede explicarse por el escaso solapamiento entre el espectro de absorción del MAA y el espectro de la radiación solar (Figura 4.4b) que alcanza la superficie de la tierra (ASTM AM 1.5), y puede contribuir a la acumulación de este contaminante en aguas superficiales, dado también el continuo aporte del mismo al medio ambiente a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales u otros focos puntuales.

Este comportamiento justifica la necesidad de aplicar tratamientos alternativos que minimicen o eliminen la presencia de MAA en los efluentes, ya que su permanencia en el medio ambiente se confirma muy prolongada incluso bajo condiciones de insolación idóneas.

4.3 Tratamiento con foto-Fenton

Los experimentos utilizando el proceso foto-Fenton se realizaron a dos diferentes concentraciones de Fe^{2+} , 2 y 20 mg/L. En los experimentos a 20 mg/L (figura 4.5), el MAA desapareció totalmente después de 15 minutos sin iluminación, debido a la reacción Fenton ($\text{Fe}^{2+} / \text{H}_2\text{O}_2$) en la oscuridad. En ese momento, el COD había disminuido alrededor de un 40% respecto a la concentración inicial. Una vez que la solución se expuso a la radiación solar el COD disminuyó rápidamente de 16 a 5 mg/L. Sin embargo, se necesitaron 80 minutos más para alcanzar valores de 1 mg/L, mostrando que las últimas etapas de mineralización fueron lentas.

Después de la desaparición del MAA ($t_{30W} = 0$ min), mediante los cromatogramas de HPLC-DAD no se detectaron intermedios de reacción. Posiblemente en ese momento ya solo quedaban en disolución compuestos que no eran retenidos correctamente en la columna cromatográfica y/o no presentaban absorción en el UV-Vis, escapando así a la detección (más adelante se muestra que la

presencia de ácidos carboxílicos justifica este resultado). Por tanto, se puede deducir que el tratamiento utilizando 20 mg/L de Fe^{2+} fue excesivamente oxidativo para permitir la detección y/o determinación de cualquier intermedio de reacción.

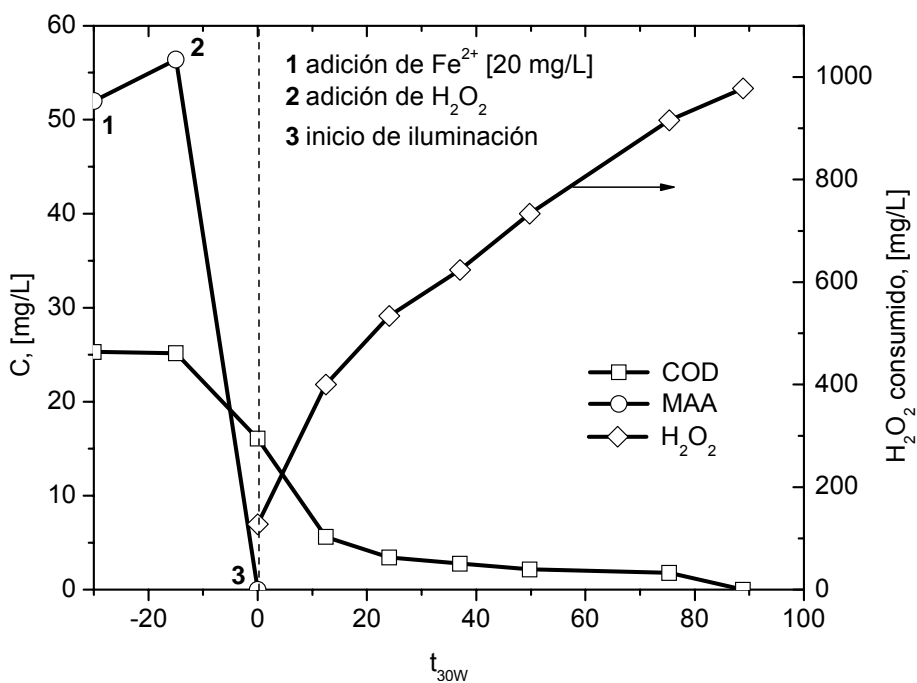
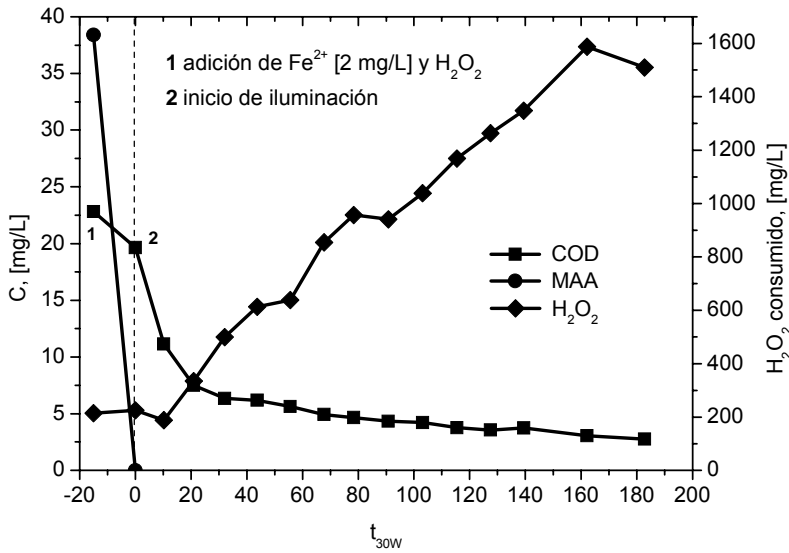
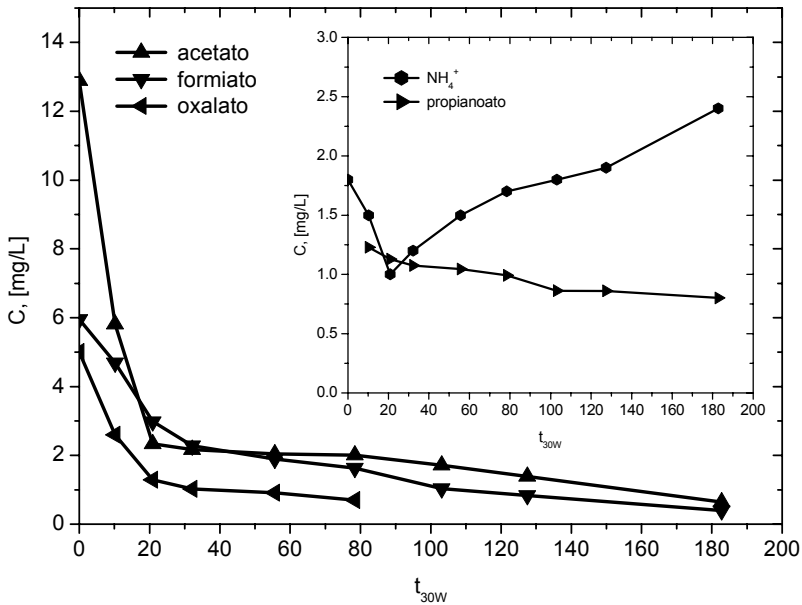


Figura 4.5: Degradación de MAA utilizando 20 mg/L de Fe^{2+} . Se muestra también el consumo de H_2O_2 durante el tratamiento.

Con la experiencia adquirida con la concentración de 20 mg/L, los siguientes experimentos se realizaron utilizando una concentración 10 veces menor, 2 mg/L. A esta baja concentración de Fe^{2+} , el MAA desapareció también después de 15 minutos de reacción en la oscuridad (Figura 4.6a). Sin embargo, la velocidad de degradación del COD fue menor que con 20 mg/L de Fe^{2+} , permitiendo la detección de productos de degradación.



(a)



(b)

Figura 4.6: (a) Cinética de degradación del MAA con el proceso foto-Fenton, utilizando 2 mg/L de Fe^{2+} . (b) Evolución de los principales ácidos carboxílicos y especies inorgánicas detectadas.

A esta concentración de Fe^{2+} (2 mg/L), la mineralización total tomó un tiempo sustancialmente más largo que con 20 mg/L y la mayoría del tiempo se consumió en la mineralización de los compuestos presentes desde un COD de 6 mg/L hasta completar el experimento. Se conoce bien que en la reacción foto-Fenton se producen un gran número de radicales $\cdot\text{OH}$, siendo este radical altamente reactivo y no selectivo, pero especies con bajo contenido de carbono, como el ácido carbámico (NH_2COOH), urea (NH_2CONH_2), formamida (NH_2HCO) o hidracinas pueden resistir este tipo de ataques [Calza *et al.*, 2005] haciendo los últimos pasos, hasta la mineralización completa del carbono orgánico, muy lentos.

Aunque el MAA desapareció por completo antes de iluminar el fotoreactor, el COD solo decreció alrededor del 10% del valor inicial. Una vez que se inició la exposición del reactor a la radiación solar, el COD disminuyó rápidamente en los siguientes 30 min del tratamiento. A partir de ahí el COD experimentó un descenso relativamente lento hasta los 60 min alcanzando una concentración de 5 mg/L a partir de la cual la mineralización es tan lenta que se necesitaron 120 min más de radiación solar para alcanzar un COD final de 2.5 mg/L. La disminución del COD se lleva a cabo principalmente en dos etapas, cayendo rápidamente de 20 a 5 mg/L (75% de mineralización) en los primeros 30 min, y luego muy lentamente de 5 a 2.5 mg/L (12.5% mineralización) en 160 min.

El primer paso de descenso más acusado del COD puede ser explicado por la mineralización del anillo pirazólico y sus sustituyentes alquílicos (responsables del 75% del COD del MAA). La segunda etapa, más lenta, está relacionada con la apertura y mineralización del anillo aromático, más estable. Esto se explica por la formación de ácidos carboxílicos descritos como recalcitrantes para el proceso foto-Fenton [Kavitha y Palanivelu, 2004]. Los ácidos carboxílicos y dicarboxílicos se conoce que forman complejos estables de hierro los cuales inhiben la reacción con el peróxido. Los ácidos carboxílicos más importantes encontrados fueron acetato, formiato y oxalato a unas concentraciones máximas

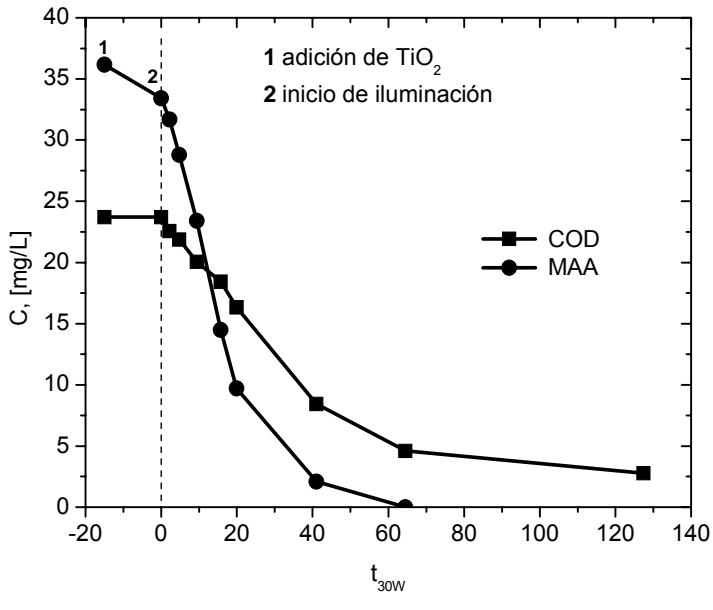
de 13, 6 y 5 mg/L (Figura 4.6b), respectivamente, detectándose también bajas concentraciones de propionato en algunas muestras. Estos compuestos estuvieron presentes en el transcurso de toda la degradación, y a una concentración significativa al final del tratamiento. La concentración relativamente alta de estos ácidos a $t_{30W} = 0$ min, justo después del proceso Fenton (en la oscuridad), muestra qué tan débil es la molécula de MAA frente al ataque de los radicales $\cdot\text{OH}$, y sugiere qué enlaces serán los primeros en ser atacados. La discusión sobre la ruta de degradación contiene más información en este sentido.

4.4 Tratamiento mediante fotocatalisis con TiO_2

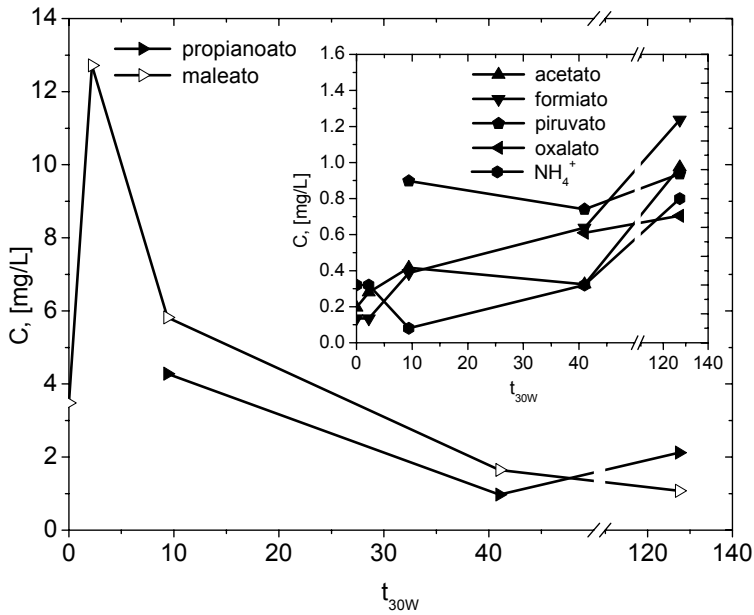
Durante la fotocatalisis, como se muestra en la Figura 4.7a, el MAA se adsorbió ligeramente en el TiO_2 (alrededor del 5%) y fue degradado de forma notablemente más lenta que con el proceso foto-Fenton. La concentración de MAA disminuyó rápidamente del 95% al 30%, durante los primeros 20 min de tratamiento, y desapareció completamente después de 60 min. La desaparición del MAA siguió una cinética aparente de primer orden con $k = 0.069 \text{ min}^{-1}$, algo común en fotocatalisis heterogénea con TiO_2 .

El cálculo de la constante cinética con el proceso foto-Fenton no pudo hacerse dado que la desaparición de MAA ocurría muy rápidamente durante la primera etapa en la oscuridad (reacción Fenton). El COD disminuyó casi al mismo ritmo que el MAA durante la primera etapa, y a una sustancialmente menor velocidad de mineralización al final del tratamiento.

Los ácidos carboxílicos detectados a concentraciones más relevantes fueron maleato y propionato, que alcanzaron concentraciones máximas de 13 y 8 mg/L, respectivamente.



(a)



(b)

Figura 4.7: (a) Cinética de la degradación del MAA por medio de fotocatalisis con TiO_2 (200 mg/L). (b) Evolución de los principales ácidos carboxílicos y especies inorgánicas detectadas.

Ambos se formaron rápidamente y se degradaron más lentamente, presumiblemente en ácidos carboxílicos de menor peso molecular (acetato, formiato, piruvato, oxalato), los cuales siempre aparecieron a muy bajas concentraciones (figura 4.7b) durante el proceso. Esto puede ser debido a que los ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, se forman y se degradan continuamente a partir de los de mayor peso molecular, no dando lugar a que se acumulen a concentraciones significativas en el agua tratada durante la fotocatalisis con TiO₂. Así, los ácidos carboxílicos encontrados a más elevada concentración durante el proceso fotocatalítico fueron diferentes de los determinados durante el proceso foto-Fenton. En realidad, es posible que maleato y propianoato también se formaran a altas concentraciones durante las primeras etapas del foto-Fenton, pero su rápida transformación en ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, podría impedir su detección. Debido a la formación de pequeñas cantidades de amonio, el pH se incrementó levemente durante las primeras etapas del tratamiento de 5.8 a 7.5, disminuyendo después debido a la formación de ácidos carboxílicos hasta un pH de alrededor de 4 e incrementándose de nuevo al final debido a la mineralización de los ácidos orgánicos.

4.5 Identificación de productos de degradación: análisis por GC-MS.

El análisis con GC-MS con ionización por impacto electrónico condujo a la identificación de 5 productos de degradación (D1, D3, D4, D5 y D6) del MAA, los cuales fueron tentativamente asignados por su espectro de masas obtenido en modo *full-scan*. En la Figura 4.8 se muestra el cromatograma de una muestra tomada después de 10 minutos de tratamiento con TiO₂.

Cuatro de los productos de degradación (PDs), D3, D4, D5 y D6, mostraban el mismo patrón de fragmentación con fragmentos a *m/z* 121, 107, 92 y 77 (Tabla 4.3). Todos ellos procedían de la apertura del heterociclo, consecuencia del

ataque de los radicales $\cdot\text{OH}$ al doble enlace del anillo. El fragmento a m/z 121 correspondía al grupo N-fenilformamida, presente en todas las estructuras detectadas. Los compuestos D3 y D5 han sido previamente descritos [Wessel *et al.*, 2006] como productos de biotransformación detectados a nivel traza en muestras de orina humana. El compuesto D5 también ha sido detectado en agua subterránea, presumiblemente proveniente de las industrias farmacéuticas cercanas [Reddersen *et al.*, 2002].

Tabla 4.3: Información sobre los compuestos detectados por GC-MS.

Compuesto	Tiempo de retención	Peso molecular (PM)	Masa de los fragmentos (%)
MAA	18.28	217	217 (50), 123 (11), 98 (9), 83 (48), 56 (100)
D1	17.88	203	203 (70), 119 (39), 83 (55), 56 (100)
D3	18.38	249	249 (6), 207 (20), 191 (63), 164 (41), 121 (100), 107 (15), 92 (16), 77 (17)
D4	12.53	220	220 (26), 192 (15), 121 (100), 107 (10), 92 (25), 77 (27)
D5	8.05	164	164 (62), 121 (81), 107 (57), 92 (100), 77 (20)
D6	9.92	164	164 (65), 150 (22), 121 (100), 107 (23), 92 (25), 77 (24)

El único PD detectado por GC-MS que todavía conservaba el heterocíclico fue la 4-aminoantipirina (D1). Su identidad fue también confirmada con la base de datos Wiley275 con un 70% de fiabilidad. La cinética observada para este compuesto también justifica su identidad ya que aparece tempranamente en el proceso y desaparece mientras los derivados procedentes de la apertura del anillo todavía están presentes.

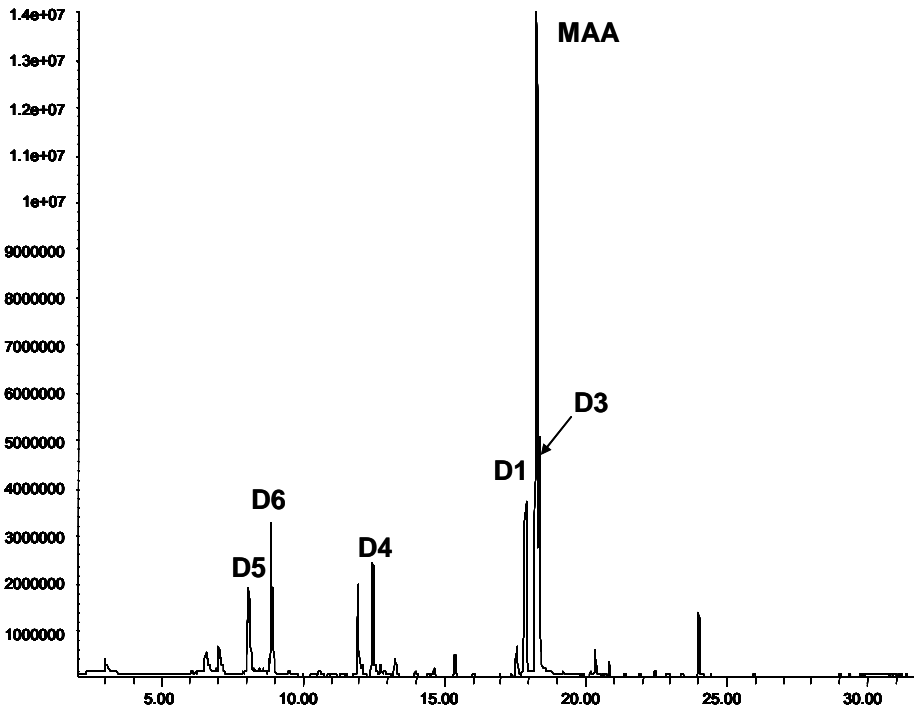


Figura 4.8: Cromatograma típico de GC-MS de un muestra tomada después de 10 min de tratamiento fotocatalítico con TiO_2 .

4.6 Identificación de productos de degradación: análisis por LC-TOF-MS.

Siguiendo la estrategia descrita de forma más detallada en el capítulo 3, los análisis mediante LC-TOF-MS permitieron la identificación de cinco intermedios (D2, D7, D8, D9, D10), adicionales a los detectados con GC-MS. En la Figura 4.9 se muestra un cromatograma obtenido después de 15 minutos de tratamiento en el cual todos los compuestos detectados estaban presentes en su máxima intensidad.

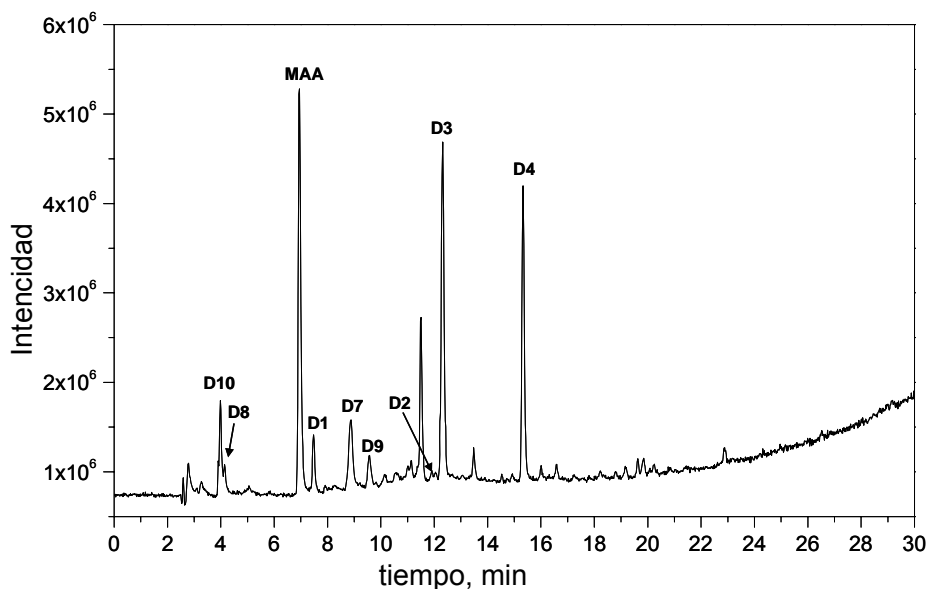


Figura 4.9. Cromatograma obtenido mediante LC-TOF-MS después de 15 min. de tratamiento fotocatalítico (TiO_2/UV), donde todos los productos de degradación identificados están presentes.

Las masas exactas, medidas por el TOF y calculadas por el software, de los iones moleculares protonados se muestran en la Tabla 4.4. También se muestra el error entre ambos y la fórmula empírica propuesta.

En todos los casos se obtuvo una muy buena concordancia entre las medidas de masa exacta experimentales y las formulas propuestas (< 2.8 ppm de error), lo cual confiere una elevada certidumbre en la identificación. La propuesta de estructuras químicas fue posible tomando como base el conocimiento previo de la molécula precursora y del mecanismo del proceso oxidativo aplicado.

Tabla 4.4: Información analítica obtenida mediante LC-TOF-MS, a partir de los espectros de masa exacta de los PDs identificados.

PD	Tiempo de retención	Fórmula del ion [M+H] ⁺	Masa calculada (m/z)	Masa medida (m/z)	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE
D10	4.0	C ₆ H ₈ N	94.0651	94.0652	0.07	0.8	3.5
D8	4.1	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₂	234.1237	234.1236	-0.1	-0.4	6.5
MAA	6.9	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O	218.1287	218.1287	<0.1	-0.4	6.5
D1	7.5	C ₁₁ H ₁₄ N ₃ O	204.1131	204.1130	-0.1	-0.6	5.5
D7	8.9	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₃	195.0764	195.0759	-0.5	-2.6	5.5
D9	9.6	C ₁₂ H ₁₄ N ₃ O ₂	232.1080	232.1078	-0.2	-1.0	7.5
D2	12.0	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O	189.1022	189.1017	-0.5	-2.8	6.5
D3	12.3	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃	250.1186	250.1180	-0.6	-2.4	6.5
D4	15.3	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₃	221.092	221.0918	-0.3	-1.2	6.5

El compuesto con fórmula C₁₂H₁₆N₃O₂ (D8) correspondía a la adición de un átomo de oxígeno en la estructura del MAA (C₁₂H₁₆N₃O). Esto es consistente con la formación de derivados hidroxilados, típica de estos procesos y ya referida previamente, como consecuencia de la adición de radicales •OH al anillo aromático, tal como se propone en la Figura 4.11. La oxidación posterior de D8 produjo el correspondiente derivado iminoquinona (D9). La formación de este tipo de estructuras es común y ya se ha descrito con anterioridad para el diclofenaco. La observación del parámetro DBE (del inglés, *double bond equivalency*), que representa el número de anillos y dobles enlaces presentes en la molécula, es consistente con las estructuras propuestas (Tabla 4.4). Así, la presencia de un doble enlace adicional en la molécula de D9 con respecto a D8 corresponde con un incremento del DBE de 6.5 (5 dobles enlaces y dos anillos) a 7.5 (6 dobles enlaces y dos anillos). Este parámetro representa una gran ayuda a la hora de confirmar las estructuras propuestas.

La formación del compuesto D3, por oxidación del doble enlace del heterociclo y correspondiente apertura del anillo, dio lugar a la aparición de una serie de

derivados, consecuencia de sucesivas pérdidas en las cadenas alifáticas, como D4, D5, D6 y D7.

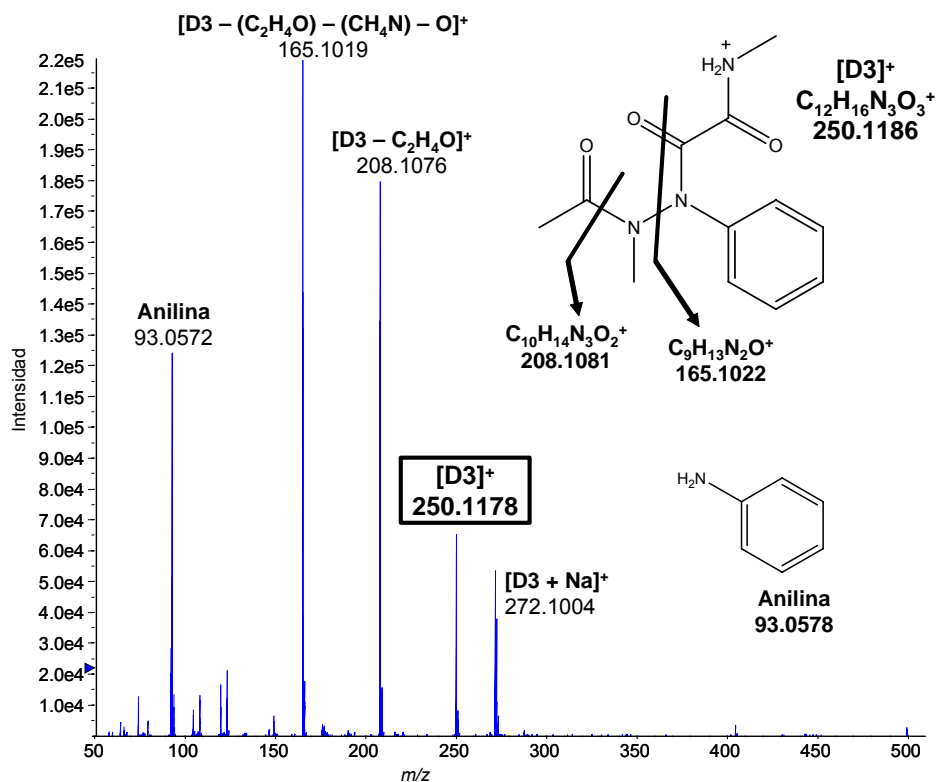


Figura 4.10: Espectro de masa en LC-TOF-MS del compuesto D3, sus fragmentos de ionización con la masa exacta detectada y las estructuras con la masa exacta teórica.

La identificación de D3 fue confirmada por la presencia de fragmentos característicos a m/z 165 y 208, también presentes en el espectro de GC-MS, que correspondían a los iones $[M+H-COCONHCH_2]^+$ y $[M+H-COCH_2]^+$. La fórmula empírica de ambos fragmentos fue confirmada con errores de -1.4 y -1.2 ppm, respectivamente, lo que una vez más subraya la capacidad del TOF-MS para la identificación de compuestos desconocidos. En la Figura 4.10 se muestra el espectro de masas obtenido en el TOF-MS para la identificación del

compuesto D3. Finalmente, también se identificó la presencia de anilina (D10) como etapa final de la oxidación del anillo pirazólico.

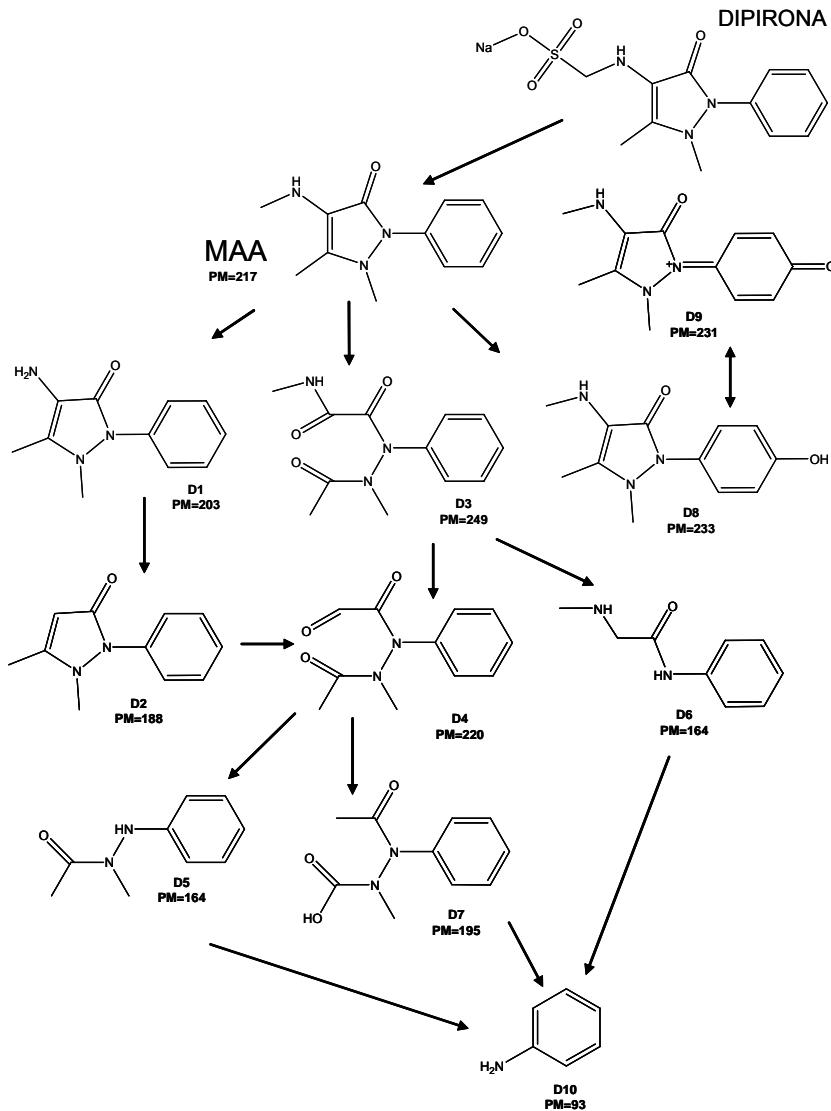


Figura 4.11: Ruta de degradación del MAA, durante el tratamiento fotocatalítico.

Observando las cinéticas de los PDs principales, como se muestra en la Figura 4.12, se puede apreciar que la degradación del MAA tiene lugar principalmente a través de la oxidación y la apertura del anillo heterocíclico, ya que el anillo aromático es más estable y resistente a la degradación. Las muestras del tratamiento con foto-Fenton son similares, excepto por las severas condiciones de oxidación, que hace que la mayoría de los compuestos presentes al inicio del experimento desaparezcan inmediatamente después de la adición de peróxido.

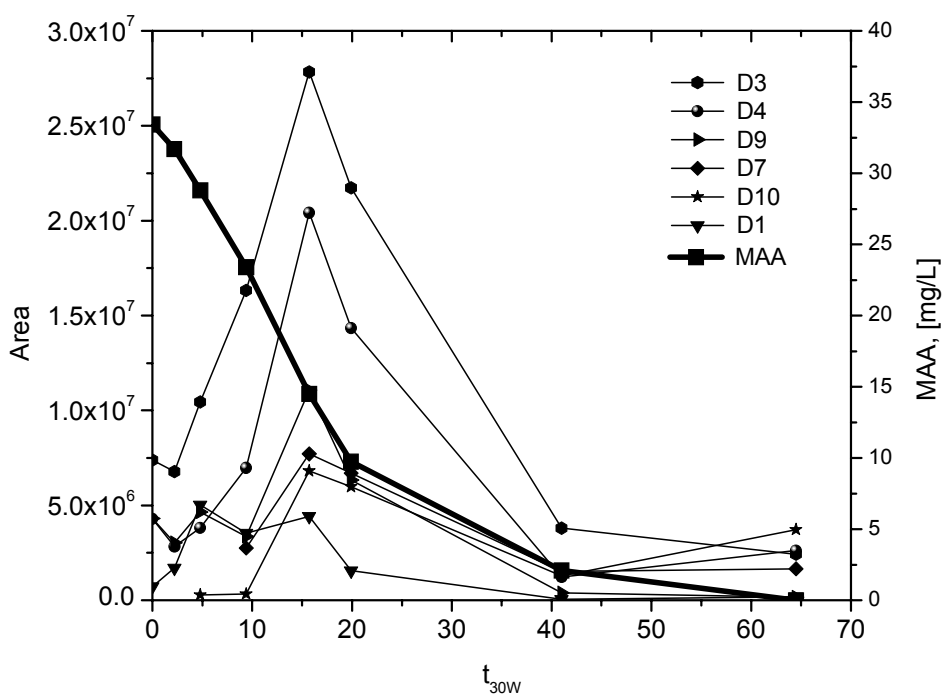


Figura 4.12: Evolución de los PDs mas importantes, formados durante el tratamiento fotocatalítico.

La mayoría de los intermedios detectados mediante LC-TOF-MS, contenían nitrógeno en su estructura (la cinética del ion amonio se muestra en las Figuras 4.6 y 4.7). La información suministrada por cromatografía iónica revela que el ion nitrato está presente a bajas concentraciones durante el tratamiento con TiO₂, y el amonio también es insignificante.

La molécula de MAA contiene una estructura pirazólica, la cual libera nitrógeno, de la parte (–NH–NH–), principalmente en forma de N₂, gas, (70% de la cantidad estequiométrica) y amonio (aproximadamente 7% de la cantidad estequiométrica) [Calza *et al.*, 2005; Waki *et al.*, 2000]. Durante el tratamiento de foto-Fenton el amonio fue liberado lentamente, pero no fueron encontradas cantidades significativas al final del tratamiento. La presencia de anilina puede ser justificada ya que los ataques de los radicales [•]OH tienden a ocurrir preferentemente en el átomo de nitrógeno en lugar del de carbono, debido a la mayor riqueza electrónica. De esta manera, la sección (–NH–C₆H₆) generalmente es oxidada a anilina. Este compuesto está presente como uno de los iones relevantes, por tanto el mecanismo propuesto es congruente con los datos experimentales.

4.7 Evaluación de la toxicidad.

La evaluación de la toxicidad de la disolución a lo largo del proceso de degradación se determinó mediante la aplicación del test de toxicidad BioTox, basado en la inhibición de la luminiscencia emitida por la bacteria *Vibrio fischeri*. El procedimiento aplicado se explica con detalle en la sección experimental. La toxicidad se establece como la concentración de la muestra que causa una reducción del 50% en la luz emitida medida con un luminómetro. La toxicidad de la solución tratada fue determinada, utilizando solamente muestras provenientes del fotorreactor una vez que se inició la iluminación sobre éste. En las Figuras 4.13 y 4.14 se muestra la evolución de la toxicidad durante ambos tratamientos, foto-Fenton y TiO₂, respectivamente.

Todas las muestras evaluadas durante el tratamiento con foto-Fenton estuvieron por debajo del 50% de inhibición, valor considerado como límite por encima del cual la disolución es considerada como tóxica. La escasa toxicidad detectada, la cual alcanzó como máximo el 45% de inhibición al inicio del ensayo, no puede

ser asociada con el MAA ya que éste ya había desaparecido durante el tratamiento en oscuridad (reacción Fenton), como se aprecia en la Figura 4.13. Los resultados demuestran que en el tratamiento mediante foto-Fenton no se forman productos de degradación tóxicos. Sin embargo, no se produce un descenso de toxicidad, como sería lo deseable, manteniéndose el % de inhibición de la actividad bioluminiscente de la bacteria prácticamente constante a lo largo del proceso, incluso cuando el COD desciende considerablemente en el transcurso del mismo.

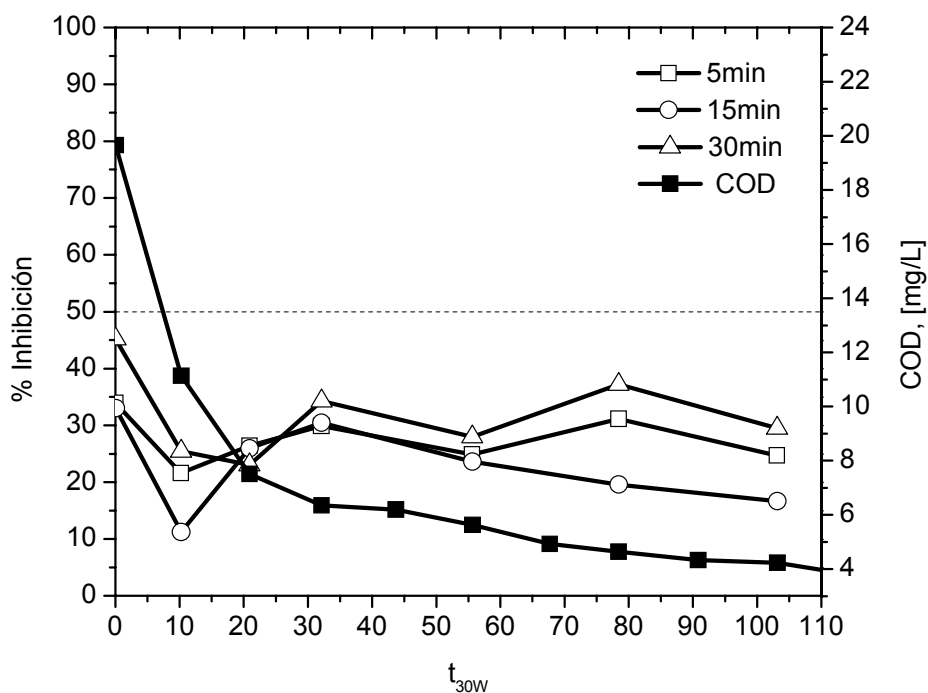


Figura 4.13: Evolución de la toxicidad y del carbono orgánico disuelto (COD) durante el tratamiento con foto-Fenton.

Las muestras analizadas durante el tratamiento fotocatalítico con TiO_2 mostraron un pequeño incremento de la toxicidad durante las primeras etapas del proceso, cuando los principales productos de degradación generados están presentes en

su concentración más alta, Figura 4.14. Este incremento solo se observa durante el tratamiento con TiO_2 debido a que la velocidad de degradación es más lenta y la permanencia de MAA y los PDs más prolongada.

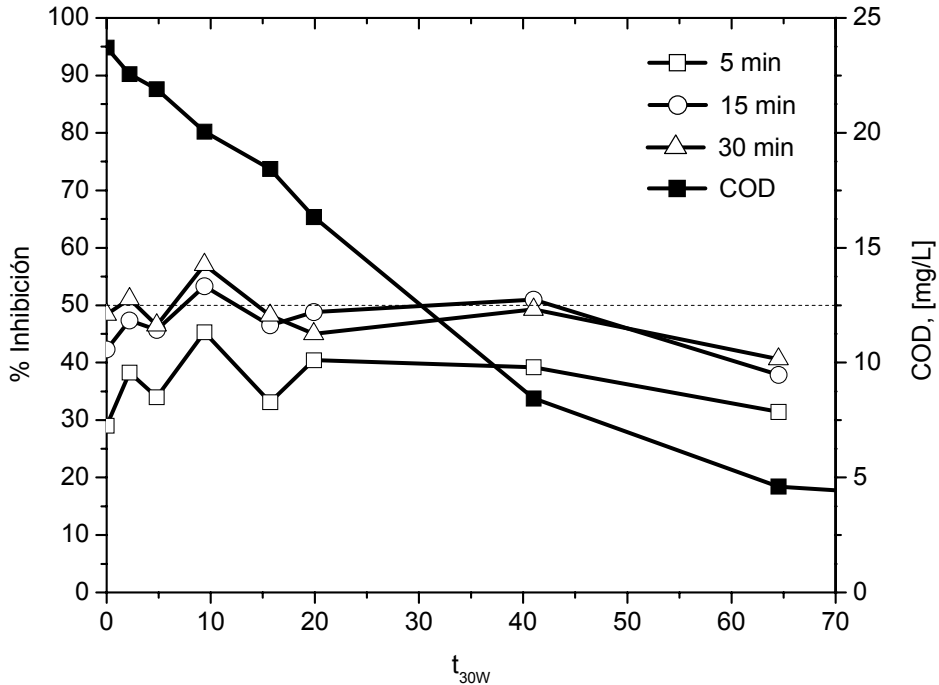


Figura 4.14: Evolución de la toxicidad y del carbono orgánico disuelto (COD) durante el tratamiento fotocatalítico.

También se puede observar que después de 10 minutos de ambos tratamientos, foto-Fenton y TiO_2 , la concentración del COD fue alrededor de 11 mg/L y 20 mg/L, respectivamente. Por tanto, a mayor concentración de COD se detecta una toxicidad algo mayor. Pero cuando ambos tratamientos reducen el COD hasta un valor similar (aunque el TiO_2 más lentamente), el grado de toxicidad también es similar. No es muy arriesgado afirmar que por tanto los DP's formados mediante ambos tratamientos deben ser similares. Es de señalar que durante el tratamiento con TiO_2 la toxicidad permaneció sobre el límite de 50%,

mientras que la concentración del MAA era significativa, $t_{30\text{ w}} < 40$ min, MAA > 2.5 mg/L, como se puede apreciar en las Figuras 4.12 y 4.14. Por tanto, se puede concluir que el MAA puede suponer un riesgo cuando es vertido en el medio ambiente.

CAPITULO

5

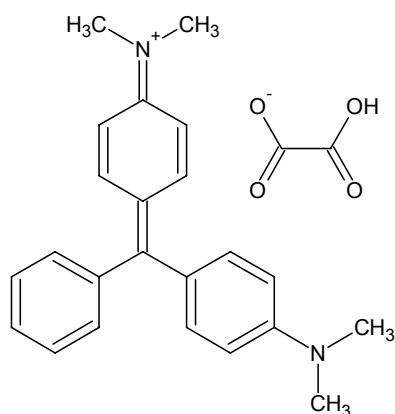
Capítulo 5

DEGRADACIÓN DE VERDE MALAQUITA EN AGUA MEDIANTE IRRADIACIÓN CON LUZ SOLAR NATURAL. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA Y TOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN

5.1 Introducción

Este capítulo describe los estudios de degradación fotolítica del verde malaquita. El Verde Malaquita (VM) es un colorante catiónico perteneciente al grupo de los conocidos como colorantes “azóicos”. Su estructura se muestra en la figura 5.1. Se ha utilizado en un gran número de actividades industriales. En la industria acuícola es utilizado como fungicida y antiséptico, ya que es altamente eficaz contra infecciones provocadas por protozoarios y hongos [Alderman, 1985; Schnik, 1988; Srivastava *et al.*, 2004]. Además del efecto fungicida del VM, éste se utiliza también como colorante en la industria textil sobre algunos tipos de

manufacturados, como son seda, lana, yute, piel, algodón o nylon; en la industria papelera; en la industria alimentaria como aditivo y conservante o en el área médica también como desinfectante y como pigmento para muestras de microscopía [Culp y Beland, 1996].



Verde Malaquita Oxalato:
Formula Empírica: $C_{25}H_{26}N_2O_4$
Masa Exacta: 418.1893
Peso Molec.: 418.4849

Verde Malaquita:
Formula Empírica: $C_{23}H_{25}N_2$
Masa Exacta: 329.2012
Peso Molec.: 329.4575

Figura 5.1: Estructura química de la sal del Verde Malaquita Oxalato.

El VM se prepara condensando una parte de benzaldehído con dos partes de dimetilaniлина, en presencia de ácido sulfúrico concentrado. Su constante de ionización (pK) es 6.9 y es estructuralmente similar a las aminas aromáticas clásicas. El VM es un precursor de otros colorantes durante su producción [Srivastava *et al.*, 2004]. Durante su uso como colorante, se estima que entre el 1% y 15% del colorante se pierde [Mordirshahla *et al.*, 2006] con las aguas de vertido, causando serios problemas en los tratamientos biológicos.

Los colorantes azoicos son el grupo más amplio de colorantes sintéticos y suelen ser resistentes a los procesos de biodegradación. Solamente un grupo pequeño de bacterias anaeróbicas pueden degradar colorantes de este tipo, transformándolos en aminas aromáticas, las cuales suelen ser más tóxicas que el colorante inicial [Hu *et al.*, 2001].

El VM es un fungicida ilegal que se utiliza todavía ampliamente en acuicultura. Su uso se ha convertido en una preocupación, debido al riesgo que posee de llegar al hombre a través de peces o crustáceos sometidos a este tratamiento. Se sospecha que el VM es genotóxico y cancerígeno, y a pesar de que en varios países se ha prohibido su uso, su utilización continúa en muchos lugares del mundo, debido a su bajo costo, amplia disponibilidad y eficacia. El VM y su principal metabolito hidrolizado, Leuco-Malaquita (LM) han sido detectados a una concentración final de 0.1 μM , en muestreos aleatorios realizados en supermercados en Reino Unido [Culp *et al.*, 2002; Mittelstaedt *et al.*, 2004].

Hasta ahora, las industrias acuícolas han estado utilizando el VM extensivamente en los trópicos, a través de métodos de baños o descargas, sin poner ninguna atención al hecho de que este compuesto puede ser absorbido sistemáticamente y producir efectos internos significativos. Desde el punto de vista del medio ambiente, existe una preocupación sobre el destino de ambos compuestos VM y LM. Además una vez utilizado, el eliminar el exceso de VM es un problema importante que se presenta en la industria acuícola, debido a que cantidades residuales de VM permanecen largo tiempo en las aguas de las lagunas de cría, después de haberse aplicado este tipo de tratamiento [Srivastava *et al.*, 2004].

Es tan amplio el uso de VM, que muy a menudo no se puede diferenciar si la exposición del ser humano puede provenir del consumo de peces tratados con ellos y/o de la exposición directa [Stammati *et al.*, 2005]. Al tratarse de un compuesto diferente a los fármacos comentados con anterioridad (diferente estructura, diferente uso, diferente preocupación medioambiental), de clara actividad fotoquímica y de difícil biodegradabilidad se ha decidido incluirlo también en este estudio.

5.2 Cinéticas de degradación

En paralelo a los estudios de degradación fotolítica se realizaron ensayos de hidrólisis, a fin de conocer la contribución de este fenómeno al proceso de degradación global. Para ello se preparó una solución de Verde Malaquita (VM) de la misma concentración que la expuesta a la radiación solar y se mantuvo en oscuridad, tomándose muestras diariamente para determinar posibles variaciones en la concentración del compuesto. Se observó una disminución del 45% de la concentración inicial de VM después de 145 horas, lo que demuestra que una parte importante de la degradación de este compuesto era debida a la hidrólisis.

Los experimentos de fotólisis se iniciaron con una solución de 19 mg/L de VM, en forma de oxalato, la cual produjo un pH de 4.2. La disolución se preparó y expuso a la radiación solar (8 horas de exposición diaria) de la forma descrita en la sección experimental. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.2. En ella puede observarse como en las primeras 30 horas de iluminación se produce una rápida disminución de la concentración de VM hasta un 50% del valor inicial. Después de esta disminución inicial, la concentración del VM permaneció más o menos estable durante un período de 20 horas, y después de 50 horas de exposición a la radiación solar empezó a degradarse de una manera más lenta, hasta su total desaparición después de 210 horas, aproximadamente 26 días de exposición. La concentración de COD medida mostró un comportamiento similar con una disminución lenta hasta alcanzar un valor de 9 mg/L al final del tratamiento, lo que indica una mineralización parcial de VM.

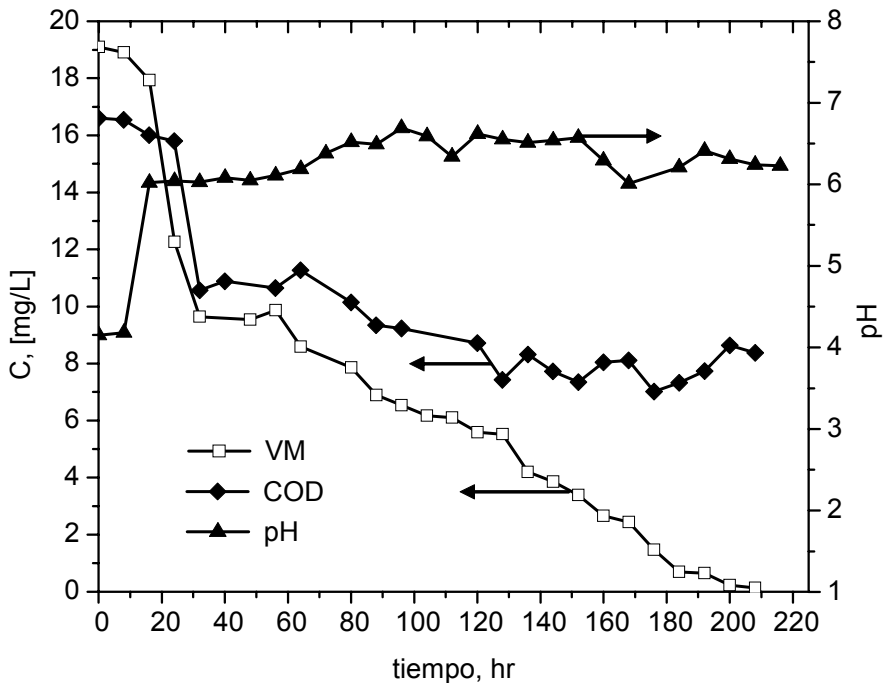


Figura 5.2: Evolución del VM, COD y pH durante el experimento de fotólisis, radiación UV global promedio = $24.2 \text{ W}\cdot\text{m}^2$.

El pH de la disolución (Figura 5.2) mostró un comportamiento similar al observado en los experimentos de hidrólisis. Durante las primeras 10 horas de exposición el pH se mantuvo ligeramente ácido ($\text{pH} \sim 4.2$), incrementándose, después de 20 horas, hasta un valor de 6.2, alrededor del cual se mantuvo hasta el final del experimento. Puede pensarse que la contribución de la hidrólisis a la degradación global del VM fuese mayor durante este primer período a pH ácido.

En general, los resultados muestran una elevada estabilidad del VM a la fotólisis directa, así como la formación de productos de transformación más persistentes. Ambas conclusiones hacen pensar que la presencia de este compuesto en el medio ambiente acuático pueda representar un riesgo potencial.

5.3 Identificación de los productos de transformación

Dada la estabilidad de algunos de los productos de transformación formados durante la fotodegradación de VM, puesta de manifiesto por la parcial disminución del COD observada durante los experimentos, se procedió a la identificación de los mismos, a fin de establecer una posible ruta de degradación y determinar cuales son más persistentes en el medio acuático natural.

En la literatura se reportan varios estudios sobre el VM, la mayoría de los cuales se concentran en su degradación utilizando procesos de oxidación avanzada [Modirshahla y Behnajady, 2006; Xie *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002], degradación de sustancias orgánicas a través del uso del VM y/o colorantes similares, en sistemas combinados $VM^{(+)}/UV/H_2O_2$ y $VM^{(+)}/UV/Fe^{2+/3+}/H_2O_2$, o caracterización y síntesis del VM y algunos de sus metabolitos [Cho *et al.*, 2000]. No se encontraron referencias respecto a la formación de productos de transformación (PTs) del VM, durante la fotólisis, su persistencia e impacto medioambiental.

Los análisis de las muestras tomadas durante los experimentos muestran la formación de una mezcla de compuestos de reacción muy compleja, consecuencia de la fuerte reactividad fotolítica del VM. Un gran número de PTs fueron detectados y posteriormente identificados, tomando como base los análisis con LC-TOF-MS y GC-MS, y la literatura disponible.

La identificación de todos los compuestos presentes en la solución fue complicada, debido especialmente a las diferencias en las concentraciones a las que fueron generados y extraídos por los métodos de SPE utilizados. Los PTs mayoritarios son fácilmente reconocibles en el cromatograma de iones totales (TIC). Sin embargo, aquellos que se generaron en bajas concentraciones o que se recuperaron poco, no son visibles y pueden escapar a la detección. En tal caso, la búsqueda de iones fragmento que pueden corresponder a partes de la molécula comunes a más de un producto de degradación puede ayudar a

detectar compuestos minoritarios en los cromatogramas de iones seleccionados. Esta estrategia es posible en estudios de este tipo en donde los intermedios generados proceden de un mismo compuesto inicial y por tanto pueden mantener partes comunes en su estructura que fragmenten de forma similar en la fuente de ionización.

Las muestras fueron inicialmente analizadas con LC-(ESI+)-TOF-MS, ya que la capacidad de ésta técnica para identificar compuestos desconocidos ha sido ampliamente demostrada a lo largo de esta memoria. En la Figura 5.3 se muestra un ejemplo de un cromatograma de iones totales obtenido durante los experimentos de fotólisis.

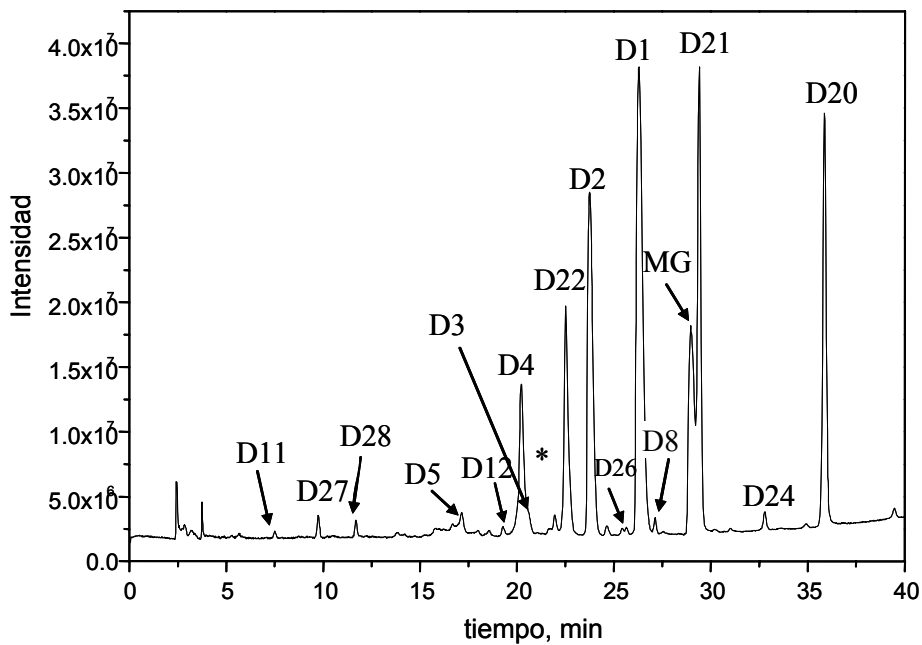


Figura 5.3: Cromatograma de iones totales obtenido mediante LC-(ESI)TOF-MS, donde son visibles 15 de los PTs identificados.

Después de un análisis detallado de todos los picos presentes en los cromatogramas, fueron identificados 28 compuestos como posibles PTs. Se

tomó como base su masa exacta y la información que proporciona el software del sistema, el cual, como se ha comentado en capítulos anteriores, calcula la composición elemental y la fórmula empírica de las moléculas protonadas, proporcionando una lista de compuestos posibles ordenados en función de la mejor concordancia con la masa exacta medida. Los datos de los PTs identificados se muestran en la tabla 5.1. La mayoría de los resultados de masa exacta fueron encontrados con un error menor a 0.3 mDa o 1 ppm, lo que proporciona un alto grado de certeza a la hora de asignar fórmulas empíricas. La lista de las posibles fórmulas propuestas se redujo a no más de 3 ó 4 opciones en la mayoría de los casos, y la selección de la fórmula correcta fue relativamente sencilla, conociéndose la molécula inicial.

La observación del parámetro DBE, ya comentado en capítulos previos y que representa el número de anillos y dobles enlaces presentes en la molécula, fue también de gran ayuda en la asignación de estructuras, proporcionando una confirmación adicional de la estructura molecular propuesta. Utilizando este parámetro, tres grupos principales de compuestos fueron claramente diferenciados:

- Compuestos que todavía poseían la estructura de trifenilmetano, la mayoría derivados demetilados e hidroxilados del VM, con DBE de 12.5, compuestos D1 a D14 (Tabla 5.1)
- Derivados de la benzofenona (BF), compuestos con DBE de 8.5, D20 a D25 (Tabla 5.1), debida a la pérdida de un anillo aromático y a la formación del doble enlace C=O.
- Compuestos con DBE de 11.5, D16 a D19 (Tabla 5.1), derivados de la forma reducida del VM, el Verde Leucomalaquita (VLM).

Tabla 5.1: Tiempos de retención y medidas de masa exacta obtenidas de los espectros del LC-TOF-MS para los productos de transformación identificados.

C	PM	t _R	Formula	M.Ex. (m/z)	M.C. (m/z)	Error (ppm)	DBE	Estructura
VM	329	29.0	C₂₃H₂₅N₂	329.2019	329.2017	0.38	12.5	
D1	315	26.3	C ₂₂ H ₂₃ N ₂	315.1861	315.1855	1.6	12.5	VM-CH ₂
D2	301	23.7	C ₂₁ H ₂₁ N ₂	301.1697	301.1699	-0.2	12.5	VM-2(CH ₂)
D3	301	22.7	C ₂₁ H ₂₁ N ₂	301.1700	301.1699	0.2	12.5	VM-2(CH ₂)
D4	287	20.2	C ₂₀ H ₁₉ N ₂	287.1540	287.1542	0.9	12.5	VM-3(CH ₂)
D5	273	16.7	C ₁₉ H ₁₇ N ₂	273.1385	273.1386	-0.4	12.5	VM-4(CH ₂)
D6	345	24.6	C ₂₃ H ₂₅ N ₂ O	345.1961	345.1961	-0.1	12.5	VM+OH
D7	361	21.6	C ₂₃ H ₂₅ N ₂ O ₂	361.1908	361.1910	-0.7	12.5	VM+2OH
D8	377	27.1	C ₂₃ H ₂₅ N ₂ O ₃	377.1858	377.1859	-0.4	12.5	VM+3OH
D9	331	22.0	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O	331.1804	331.1806	0.3	12.5	VM-CH ₂ +OH
D10	347	32.0	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₂	347.1753	347.1754	-0.3	12.5	VM-CH ₂ +2OH
D11	363	7.5	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₃	363.1705	363.1703	0.5	12.5	VM-CH ₂ +3OH
D12	317	19.3	C ₂₁ H ₂₁ N ₂ O	317.1646	317.1648	-0.7	12.5	VM-2(CH ₂)+OH
D13	320	34.9	C ₂₀ H ₁₈ NO ₃	320.1280	320.1281	-0.3	12.5	VM-N-3(CH ₂)+3OH
D14	306	27.5	C ₁₉ H ₁₆ NO ₃	306.1122	306.1124	-0.8	12.5	VM-N-4(CH ₂)+3OH
D15	329	17.9	C ₂₂ H ₂₁ N ₂ O	329.1648	329.1644	-1.3	13.5	VM-CH ₂ -2H+O
D16	330	26.0	C ₂₃ H ₂₇ N ₂	331.2171	331.2168	0.6	11.5	VLM
D17	316	20.0	C ₂₂ H ₂₅ N ₂	317.2015	317.2012	0.8	11.5	VLM-CH ₂
D18	362	8.4	C ₂₃ H ₂₇ N ₂ O ₂	363.2070	363.2067	0.8	11.5	VLM+2OH
D19	321	15.7	C ₂₀ H ₂₀ NO ₃	322.1435	322.1437	-0.8	11.5	VLM-3(CH ₂)+3OH
D20	225	35.8	C ₁₅ H ₁₆ NO	226.1223	226.1226	-1.5	8.5	BPD
D21	211	29.4	C ₁₄ H ₁₄ NO	212.1068	212.1069	-0.9	8.5	BPD-CH ₂
D22	197	22.5	C ₁₃ H ₁₂ NO	198.0919	198.0918	0.05	8.5	BPD-2(CH ₂)
D23	241	39.4	C ₁₅ H ₁₆ NO ₂	242.1174	242.1175	-0.6	8.5	BPD+OH
D24	227	32.8	C ₁₄ H ₁₄ NO ₂	228.1018	228.1019	-0.4	8.5	BPD-CH ₂ +OH
D25	213	25.6	C ₁₃ H ₁₂ NO ₂	214.0863	214.0862	0.2	8.5	BPD-2(CH ₂)+OH
D26	239	25.4	C ₁₅ H ₁₄ NO ₂	240.1017	240.1019	-0.8	9.5	BPD-2H+O
D27	259	9.7	C ₁₅ H ₁₈ NO ₃	260.1284	260.1281	1.0	7.5	DPMD+2OH
D28	259	11.6	C ₁₅ H ₁₈ NO ₃	260.1283	260.1281	0.7	7.5	DPMD+2OH

C.: Compuesto.

PM: Peso Molecular.

t_R: Tiempo de Retención.

M.Ex.: Masa Experimental.

M.C.: Masa Calculada.

DBE: Equivalencia de Dobles Enlaces.

BPD: Derivado de la benzofenona

DPMD: Derivado del difenilmetanol.

VLM: Verde leucomalaquita.

El DBE también fue útil para distinguir la formación de derivados hidroxilados o aldehídos, ya que en el primer caso la adición de un átomo de oxígeno a la molécula no altera el DBE, mientras que en la segunda el DBE se incrementa en uno, por la formación del enlace C=O. Este es el caso de los compuestos D9/D15 y D56/D26.

La infrecuente, pero interesante formación de iones doblemente protonados $[M+2H]^{2+}$ se observó para el VLM (D16) y PTs relacionados (compuestos D17 a D19). Este fenómeno está directamente relacionado con la disposición del nitrógeno en la estructura molecular. La figura 5.4 muestra el espectro de masa exacta del VLM, en el cual se observa la presencia simultánea de los iones $[M+H]^+$ y $[M+2H]^{2+}$.

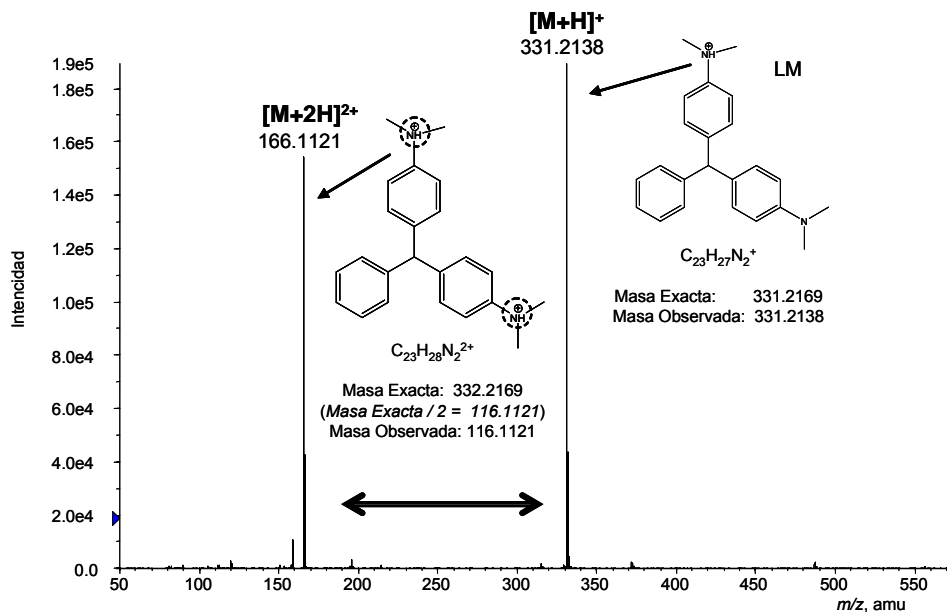


Figura 5.4: Espectro de masa exacta del Verde leucomalaquita (VLM), en el cual se observa la presencia simultánea de los iones $[M+H]^+$ y $[M+2H]^{2+}$.

Las estructuras asignadas a algunos de los compuestos incluidos en la tabla 5.1 fueron confirmadas mediante análisis por GC-MS. Los espectros de impacto electrónico en modo *full-scan* proporcionaron suficiente información estructural para su identificación inequívoca. Dos de ellos, D20 y D22, fueron identificados también con bases de datos comerciales (Wiley275 y NIST2) como (4-(dimetilamino) fenil)(fenil)metanona y el (4-aminofenil)(fenil)metanona con una similitud mayor del 95%. Las estructuras de otros cuatro compuestos fueron confirmadas mediante la asignación de los fragmentos de masa, como se muestra en la tabla 5.2. La pérdida de 77 uma, correspondiente a un grupo fenilo, así como también la masa del fragmento a m/z 77, fue observada en todos ellos. También fue característica la pérdida de los iones $[M-C_6H_5CO]^+$, $[M-N(CH_3)_2]^+$ y $[M-C_6H_5N(CH_3)_2]^+$.

Tabla 5.2: Tiempos de retención e información estructural de los productos de transformación del VM identificados por GC-MS.

C	t_R	PM	Fragmentos principales (m/z)
D20	28.77	225	225 $[M]^+$, 148 $[M-C_6H_5]^+$, 181 $[M-N(CH_3)_2]^+$, 105 $[C_6H_5CO]^+$, 77 $[C_6H_5]^+$
D21	27.77	211	211 $[M]^+$, 134 $[M-C_6H_5]^+$, 105 $[C_6H_5CO]^+$, 77 $[C_6H_5]^+$
D22	24.92	197	197 $[M]^+$, 120 $[M-C_6H_5]^+$, 105 $[C_6H_5CO]^+$, 92 $[M-C_6H_5-CO]^+$, 77 $[C_6H_5]^+$
D23	31.91	241	241 $[M]^+$, 224 $[M-OH]^+$, 148 $[M-C_6H_4OH]^+$, 121 $[C_6H_5NC_2H_6]^+$, 105 $[C_6H_5CO]^+$, 77 $[C_6H_5]^+$
D16 (VLM)	41.62	330	330 $[M]^+$, 286 $[M-N(CH_3)_2]^+$, 253 $[M-C_6H_5]^+$, 209 $[M-C_6H_5N(CH_3)_2]^+$
D17	41.56	316	316 $[M]^+$, 272 $[M-N(CH_3)_2]^+$, 239 $[M-C_6H_5]^+$, 194 $[M-C_6H_5N(CH_3)_2]^+$
D26	30.83	239	239 $[M]^+$, 224 $[M-CH_3]^+$, 210 $[M-COH]^+$, 162 $[M-C_6H_5]^+$, 105 $[C_6H_5CO]^+$, 77 $[C_6H_5]^+$

C: Compuesto

t_R : Tiempo de Retención

PM: Peso Molecular

5.4 Ruta de transformación

La N-desmetilación de la molécula de VM y la formación de derivados de la benzofenona (BPD), debido a la división de la estructura conjugada, ha sido descrita como el mecanismo principal de fotodegradación del VM en muchos procesos diferentes de fotooxidación (Figura 5.5). Chen y colaboradores [Chen *et al.*, 2007], en su estudio de la fotodegradación del VM, inducida con luz UV utilizando nanopartículas de TiO₂, proponen que, bajo condiciones de pH básico, la ruta preferencial es la N-desmetilación, la cual gradualmente tiene lugar hasta la total desaparición de los cuatro grupos metilo. Sin embargo, bajo condiciones de pH ácido, la división de la estructura cromófora conjugada es el mecanismo usual.

La ruta de degradación del VM provocada por la reacción foto-Fenton, asistida por luz visible [Xie *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004], es similar. En éste caso hay más mineralización, debido a la producción continuada de los radicales hidroxilo e hidroperoxilo durante el proceso de foto-Fenton. Por consiguiente, han sido reportados intermedios de bajo peso molecular, como la N,N-dimetilanilina, 4-dimetilaminofenol, ácido 4-hidroxibenzóico, entre otros, que son generados en etapas de oxidación más avanzadas.

Hasta ahora, sin embargo, existen pocas referencias sobre la formación de los derivados hidroxilados del VM. Un estudio referido a la fotooxidación del VM con UV/H₂O₂ en medio acuoso a 254 nm [Milano *et al.*, 1995], reporta la formación de derivados monohidroxilados como consecuencia del ataque de radicales [•]OH en el anillo aromático antes o después de la división de la molécula.

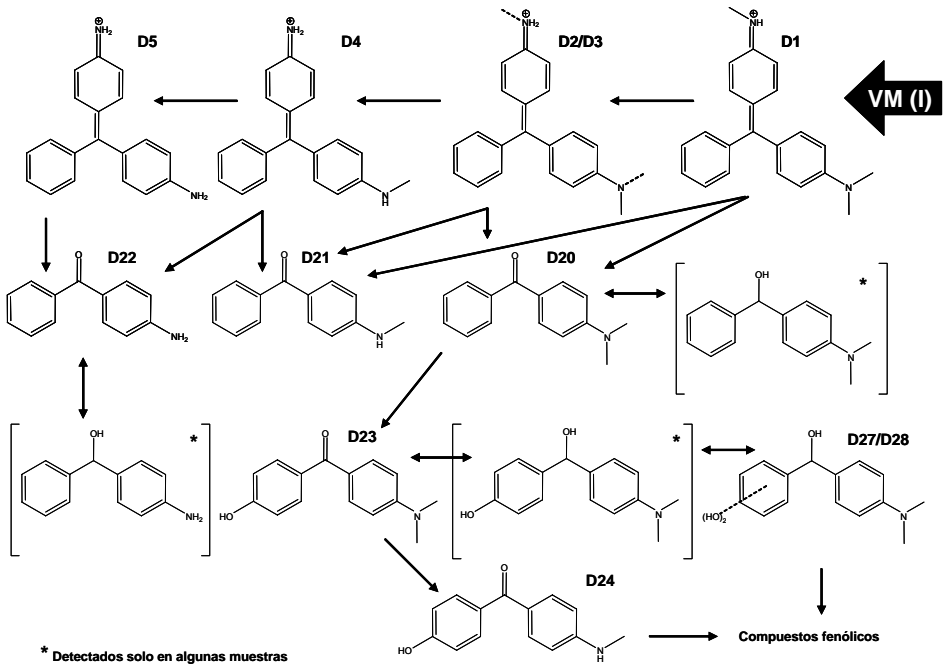


Figura 5.5a: Ruta de transformación (I) y PTs propuestos. Los compuestos marcados con * se detectaron solo ocasionalmente.

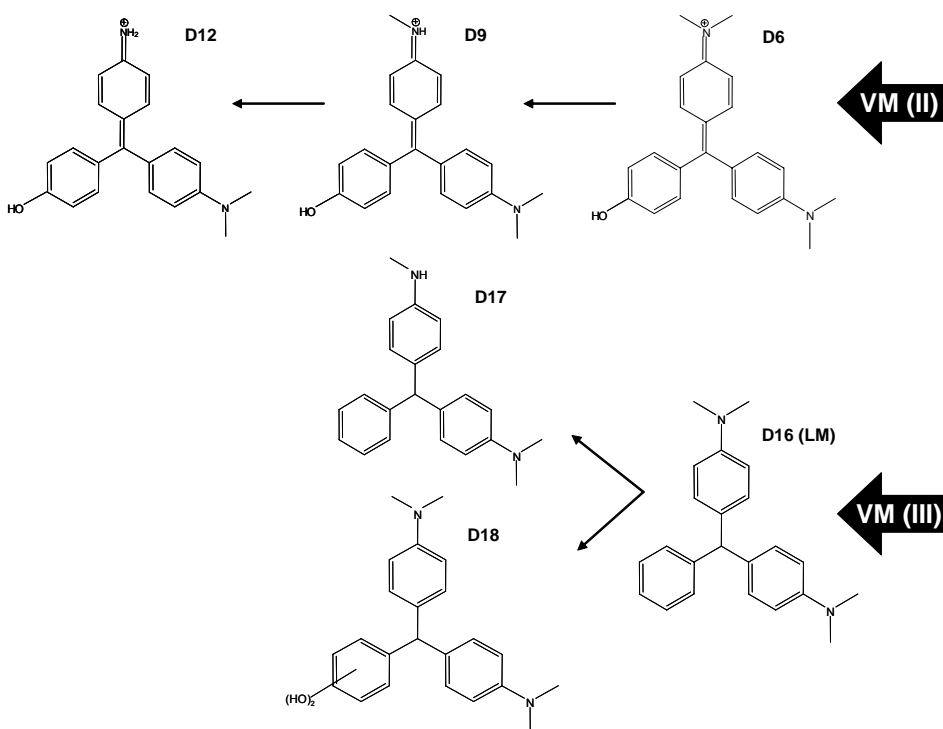
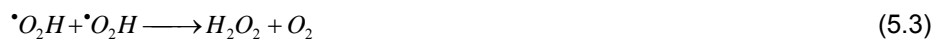


Figura 5.5b: Rutas de transformación (II) y (III) y PTs propuestos.

Estos tres mecanismos, los cuales incluyen el ataque de radicales hidroxilo en el grupo N,N-dimetilamina, en el átomo de carbono central y en el anillo bencénico, fueron observados en este trabajo durante la exposición del VM a la radiación solar natural. La producción fotoinducida de los radicales hidroxilo durante la exposición del VM en una solución acuosa saturada de oxígeno, ha sido previamente reportada [Brezová *et al.*, 2004] por la secuencia de reacciones (5.1) – (5.5).





Los radicales hidroxilo producidos de esta manera pueden inducir la oxidación del VM, y de esta manera catalizar su propia degradación, la cual es acelerada por el ataque de los radicales $\bullet OH$ en sitios de alta riqueza electrónica. En nuestros experimentos, los compuestos D1, D6 y D20, los cuales son típicos de las tres principales reacciones oxidativas mencionadas anteriormente (Figura 5.5, VM(I) y VM(II)), están presentes desde el inicio de la fotólisis. La evolución en el tiempo de las áreas de los picos cromatográficos (Figura 5.6), indican que la N-desmetilación y la división del VM son las rutas predominantes.

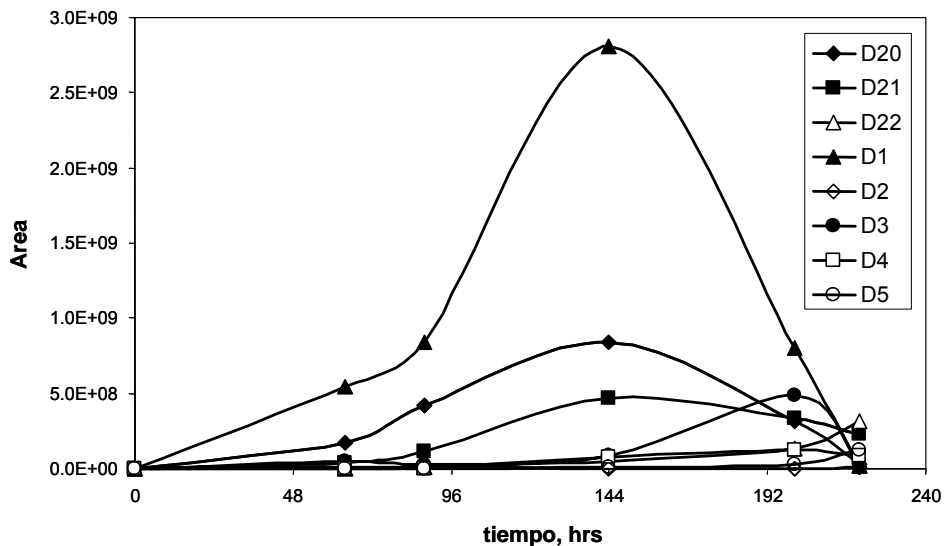


Figura 5.6: Cinética de los PTs de la ruta de transformación (I) propuesta.

Durante el experimento se detectó la formación de derivados mono-, di-, y hasta tri-hidroxilados, antes y/o después de la desmetilación, aunque en menor medida. Considerando que el VM cataliza su propia degradación y que esta reacción auto-catalizada está limitada por el propio reactivo, se puede entender

por qué, en las primeras etapas de degradación fotolítica, se observan la formación de productos de transformación tan pequeños, cuando la concentración del VM todavía es significativa y los radicales $\cdot\text{OH}$ son más abundantes, y por qué también PTs de alto peso molecular aparecen al final del experimento. Por lo anterior, también se puede explicar la rápida disminución de la concentración del VM durante las primeras 30 horas de exposición solar.

Los principales PTs y las rutas identificadas se muestran en las figuras 5.5 a y b. La secuencia de degradación y rutas principales fueron inferidas de las secuencias cromatográficas y cinéticas obtenidas. Como se aprecia en la figura 5.5b, la transformación reductiva del VM a VLM y su posterior desmetilación e hidroxilación también fueron observadas.

5.5 Evaluación de la toxicidad

La alta toxicidad del VM es bien conocida. Ensayos de toxicidad utilizando *Vibrio fischeri*, han demostrado la toxicidad aguda con un $\text{EC}_{50, 30 \text{ min}}$ de 0.031 mg/L [Hernando *et al.*, 2007], lo cual ha hecho que esta sustancia sea clasificada como “tóxica para organismos acuáticos” por la legislación europea [EC, 1993,1996]. Sin embargo, se conoce poco sobre la toxicidad de sus productos de fotodegradación, los cuales pueden ser generados al ser vertido el VM al medio ambiente.

Con el objetivo de evaluar los efectos tóxicos de los PTs persistentes, generados por el VM, se midió la toxicidad de la disolución, después de que el VM había desaparecido por completo. Los análisis de toxicidad fueron realizados utilizando el ensayo bioluminiscente con la bacteria *V. fischeri*, como se describió en el capítulo experimental (sección 2.5.1). Se observó una inhibición del 63% después de 5, 15, 30 minutos de exposición, demostrando la toxicidad de la solución.

Con el fin de poder asignar los PTs responsables de esta toxicidad, se obtuvo un estándar comercial del compuesto D20 (4-(dimetilamino)benzofenona), compuesto mayoritario detectado después de 220 horas de exposición, y se realizó una curva calibración del tipo dosis – efecto (sigmoidal) para calcular el EC_{50} de este compuesto.

Previo al diseño de la curva de calibración y a la evaluación del nivel de toxicidad, se probaron concentraciones desde 5 hasta 0.005 mg/L. Como se aprecia en la figura 5.7 Todos los puntos de la curva de calibración fueron ajustados a una curva estadística del tipo dosis – efecto (sigmoidal).

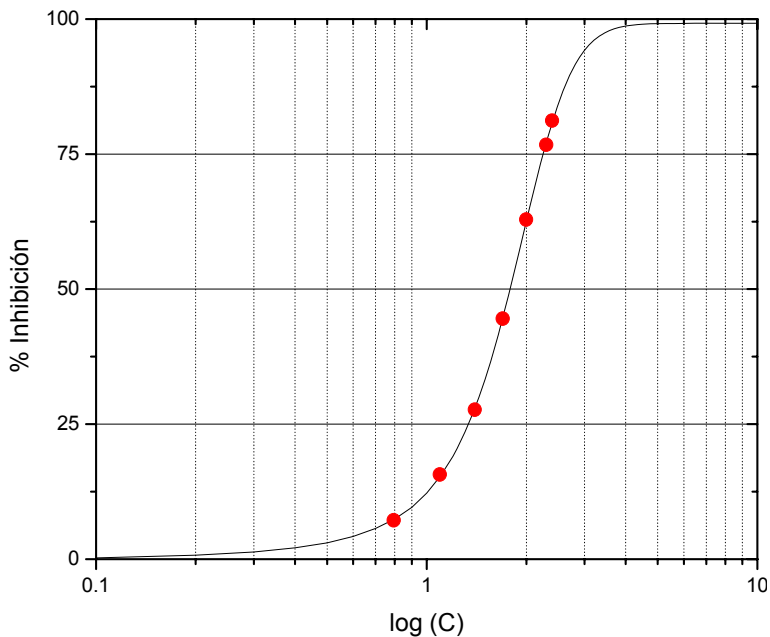


Figura 5.7: Curva de calibración para el $EC_{50, 30 \text{ min}}$ del compuesto D20. Ajustada a una curva sigmoide de Dosis – Efecto ($r^2 = 0.99986$).

El EC_{50} resultante, de 0.061 mg/L, es más alto que el del VM. Sin embargo, la 4-(dimetilamino)benzofenona, continua siendo “muy tóxica”, de acuerdo a la actual regulación de la CE.

La figura 5.8 muestra la evolución de la concentración del D20 durante el experimento de fotólisis. Al final del experimento, después de 220 horas de exposición a la radiación natural, la concentración del D20 todavía estaba por encima del valor de EC_{50} calculado, lo que significa que la toxicidad de éste compuesto, así como del resto de la disolución, permanecía elevada durante todo el experimento. De esta manera, la alta toxicidad de la solución remanente podría ser causada principalmente por el D20, el cual estuvo presente en la solución a una concentración bastante alta después de que desapareciera el VM. Más aún, la formación de este compuesto es favorecida en un medio saturado de oxígeno [Barlet e Indig, 1999]. Los compuestos fenólicos pueden ser otra fuente de toxicidad, la cual merece ser analizada separadamente del resto.

Estudios más detallados, analizando las diferentes fracciones de la disolución podría permitir evaluar la toxicidad generada por otros PTs aunque este análisis queda fuera de los objetivos de esta tesis.

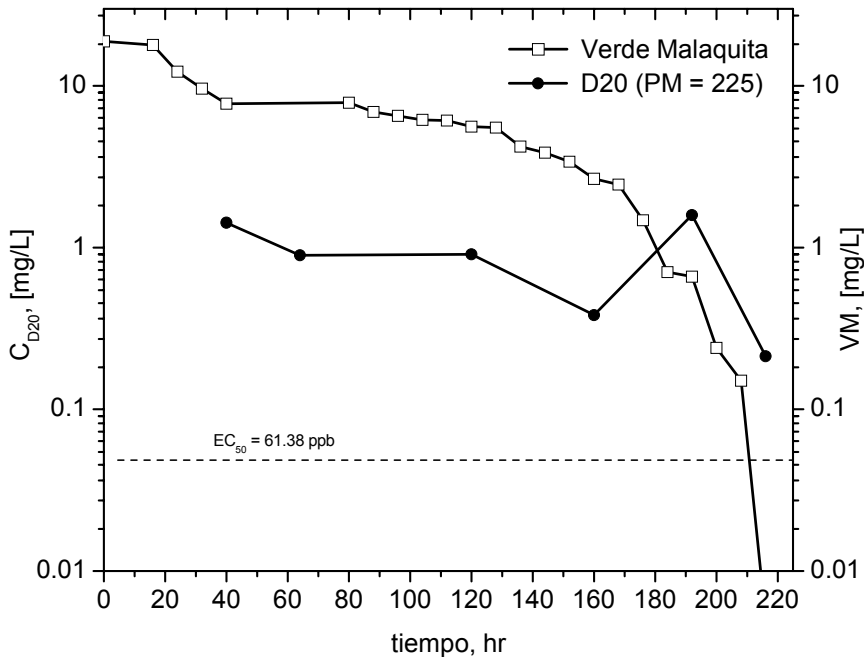


Figura 5.8: Cinética del compuesto D20 y el VM, durante la fotodegradación.

CAPITULO

6

Capítulo 6

CONCLUSIONES

De los objetivos planteados al inicio de este trabajo de investigación y después de llevada a cabo todo lo descrito en los capítulos anteriores, se desprenden las siguientes conclusiones generales y específicas para cada compuesto estudiado.

Conclusiones generales

La aplicación de tratamientos de oxidación avanzada, como la fotocatalisis con TiO₂ o el foto-Fenton, representa una alternativa viable para la degradación de contaminantes emergentes como los fármacos (diclofenaco, dipirona) en aguas. Se observa que la utilización del tratamiento foto-Fenton en comparación con la fotocatalisis con TiO₂ es más eficaz en términos de tiempo de tratamiento y velocidad de degradación de contaminantes disueltos en agua. Además se comprobó no solo la desaparición, sino la mineralización de las sustancias

estudiadas con ambos tratamientos. Los ensayos se realizaron con radiación solar y a escala de planta piloto.

El estudio de la transformación fotolítica de contaminantes en agua mediante irradiación solar es esencial para el conocimiento del comportamiento de los contaminantes en el medio ambiente y de su impacto en el mismo. Los experimentos realizados con diclofenaco y verde malaquita han puesto de manifiesto la formación de gran número de intermedios de fotodegradación más persistentes que el compuesto precursor.

La evaluación analítica de los procesos de transformación fotoquímica, tanto fotólisis como fotocatalisis, representa una tarea compleja que requiere de la aplicación de técnicas instrumentales capaces de proporcionar la información cualitativa necesaria para la identificación del elevado número de productos de transformación generados. La identificación de estos intermedios es importante para un mejor entendimiento de los mecanismos que rigen estos procesos a la vez que permiten la identificación de compuestos mayoritarios y/o relevantes desde el punto de vista de su persistencia o toxicidad, y posibilita el establecimiento de rutas de transformación.

La utilización combinada de GC-MS y LC-TOF-MS junto con diferentes métodos de SPE ha demostrado ser una estrategia eficaz en la detección e identificación de productos de transformación. Las medidas de masa exacta y la información relativa a la fórmula empírica proporcionada por la LC-TOF-MS, tanto de la molécula protonada como de los fragmentos obtenidos mediante colisión inducida en la fuente, han confirmado a esta técnica como una herramienta decisiva en la identificación de productos de transformación. Aunque la información obtenida no siempre es suficiente para la asignación precisa de la estructura molecular, el conocimiento previo de la molécula original y de los mecanismos que rigen los procesos de degradación, facilitan esta tarea. Además la elevada sensibilidad de la técnica, que permite detectar intermedios

generados a bajas concentraciones, y la posibilidad de inyectar las muestras acuosas sin tratamiento previo, la convierten en una alternativa sencilla, rápida y eficaz para esta aplicación.

Las estrategias de identificación desarrolladas son aplicables a los procesos de oxidación avanzada, en general, y no solo a la fotocatalisis mediante TiO₂ y foto-Fenton. Es más, estos procedimientos pueden ser de interés para la Química Analítica ambiental, sobre todo focalizada en compuestos orgánicos presentes en agua.

La aplicación de bioensayos de toxicidad, como el basado en la inhibición de la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*, es útil para un seguimiento toxicológico del tratamiento fotocatalítico de contaminantes orgánicos, así como para la identificación de productos de transformación tóxicos en procesos de fotólisis. Este último aspecto es de gran interés ya que puede contribuir a la mejora de los programas de seguimiento de contaminantes en aguas naturales.

Se remarca la necesidad de una completa evaluación del comportamiento de los POAs, no solamente midiendo la degradación y mineralización del contaminante en cuestión, sino también determinando los principales intermedios de degradación y su toxicidad.

Degradación fotolítica y fotocatalítica de diclofenaco

El diclofenaco sufre una rápida y espontánea degradación por fotólisis directa por efecto de la radiación solar. A pesar de ello, la fotólisis del diclofenaco no conduce a su mineralización, sino a la formación de una gran cantidad de productos de transformación más persistentes a la degradación fotolítica que el propio diclofenaco. Esto demuestra que la presencia del diclofenaco en aguas superficiales supondrá la generación de productos de transformación más persistentes sobre los que no existe información acerca del efecto que pueden causar sobre el medio ambiente.

La aplicación combinada de técnicas de GC-MS y LC-ESI-TOFMS, así como de diferentes modos de trabajo (EI y PCI), ha permitido la identificación de 13 productos de transformación generados durante la fotólisis de diclofenaco. Se ha demostrado que ambas técnicas son complementarias y necesarias para una evaluación más completa de la mezcla de reacción.

El empleo de la ionización química en GC-MS ha sido útil en la asignación de la masa molecular de los compuestos y en la identificación de coeluciones, aspecto este de gran interés dado que la optimización de la separación no es posible en mezclas de composición compleja y desconocida.

La identificación de los productos de transformación demostró que la fotólisis del diclofenaco tiene lugar mediante dos rutas principales. Una originada por la fotociclación de la molécula de diclofenaco para dar lugar a la formación de derivados con estructura carbazólica. La segunda ruta se origina a partir de la descarboxilación inicial del diclofenaco y posterior oxidación de la cadena alquílica, manteniéndose la estructura bifenílica hasta la dechloración de la molécula.

El equilibrio de solubilidad del diclofenaco y el hierro, dependiente del pH, mostró ser determinante en la aplicación del proceso foto-Fenton. A pH 7, compuestos de hierro, recién precipitados a partir de hierro en disolución, son capaces de degradar fotocatalíticamente al diclofenaco siguiendo una cinética de pseudo-primer orden. En este caso diferentes concentraciones de hierro (a partir de 0.05 mM) dan resultados similares, demostrando que una pequeña concentración de hierro es suficiente para absorber todos los fotones disponibles en el interior del fotorreactor utilizado.

Los resultados del tratamiento foto-Fenton a pH 2.8 indicaron que la descomposición del diclofenaco toma lugar en la fase homogénea, y la cinética es gobernada por la continua redisolución del diclofenaco, previamente

precipitado. Como consecuencia, las diferentes concentraciones de hierro no mostraron influencia relevante en la velocidad de descomposición del contaminante.

El tratamiento foto-Fenton iniciado a un pH alrededor de 7, en agua sin capacidad de tampón, causó una disminución del pH hasta un valor de 3.7. De esta forma la precipitación del diclofenaco y el hierro pueden ser en parte atenuados consiguiéndose un tratamiento exitoso. La descomposición del diclofenaco mediante dióxido de titanio (fotocatálisis) en el mismo reactor siguió una cinética de pseudo-primer orden y durante la misma no ocurrió precipitación, siendo sin embargo más lenta que cualquiera de los diferentes procedimientos empleados para su tratamiento mediante foto-Fenton.

Por tanto, aunque a primera vista los procesos de foto-Fenton y la descomposición del diclofenaco parecen ser incompatibles, debido a la insolubilidad del compuesto a pH muy bajo, la velocidad de reacción es significativamente alta en el proceso foto-Fenton en todas las condiciones de reacción empleadas. A pesar de insolubilizarse, el diclofenaco se va degradando, redisolviéndose y finalmente mineralizándose.

La ruta de degradación del diclofenaco en el proceso foto-Fenton se caracteriza por la hidroxilación inicial de la molécula en posición C-4 y subsiguiente formación de la especie iminoquinona, la cual no había sido reportada anteriormente, y que constituye la especie principal que conduce a la mineralización total de este compuesto y de los productos de degradación formados. Esta ruta difiere de la obtenida mediante otros procesos de degradación (fotólisis, ozonización, UV/H₂O₂) indicando que el diclofenac sigue diferentes rutas de degradación, dependiendo del tratamiento aplicado.

Degradación fotolítica y fotocatalítica de dipirona

Se comprobó la rápida transformación, en solución acuosa, de la dipirona en su metabolito activo, 4-metilaminoantipirina (4-MAA), el cual se mantuvo estable por un largo período de tiempo (15 días). Por medio de los tratamientos de oxidación avanzada se consiguió una eliminación de este compuesto en un tiempo muy reducido. Utilizando el tratamiento fotocatalítico con TiO₂, el 4-MAA fue degradado en 70 minutos y con el tratamiento foto-Fenton se necesitaron 15 minutos.

Se alcanzó una mineralización del 90% después de 265 minutos con TiO₂ y 50 minutos con foto-Fenton. Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos fotocatalíticos mediante foto-Fenton y TiO₂, son adecuados para mineralizar la dipirona o dicho más propiamente su producto de hidrólisis (4-MAA). Sin embargo el tratamiento foto-Fenton es especialmente efectivo, logrando la mineralización del compuesto en 50 minutos, a una concentración de Fe²⁺ de 20 mg/L.

La evaluación de los productos de degradación generados durante el proceso dio como resultado la identificación de 12 compuestos. Se propone una ruta de degradación, basada en la formación inicial de derivados hidroxilados, seguidos por las pérdidas de los grupos metilo- y amino-, y la posterior apertura del anillo pirazólico, siendo éstas las reacciones principales que se observan durante el proceso de degradación. Una vez que los productos de degradación de alto peso molecular desaparecen, y antes de la mineralización total, los ácidos carboxílicos detectados prevalecen como los intermediarios más importantes.

La toxicidad de la solución fue seguida durante ambos procesos fotocatalíticos y se demostró que la toxicidad se mantiene en niveles más bajos utilizando el proceso foto-Fenton. A su vez se demostró que el 4-MAA, el PT de mayor

preocupación ambiental, es degradado por ambos tratamientos fotocatalíticos solares permitiendo hacer una descarga segura de este efluente.

El tratamiento foto-Fenton a muy bajas concentraciones de hierro ($\text{Fe}^{2+} = 2 \text{ mg/L}$) es un método mucho más rápido para tratar este tipo de compuestos, que cuentan con un anillo pirazólico, que la fotocatálisis utilizando TiO_2 . El foto-Fenton con luz solar provee una manera de depurar los efluentes de las plantas depuradoras sin tener que eliminar el hierro utilizado en el tratamiento posteriormente.

Degradación fotolítica de verde malaquita

Los resultados muestran que durante la degradación fotolítica, el Verde Malaquita genera una gran cantidad de PTs, algunos de los cuales son más persistentes y tóxicos que el compuesto inicial. Fueron identificados 28 posibles productos de transformación y se encontraron varias rutas de degradación, algunas de ellas similares a las reportadas para procesos oxidativos mucho más fuertes, como el foto-Fenton, probando que tiene lugar la formación de radicales hidroxilo durante el tratamiento fotolítico. También se observó la formación de derivados hidroxilados, y doble protonados, escasamente referenciados en la literatura.

La información obtenida de los productos de transformación identificados demuestran que el Verde Malaquita experimenta principalmente tres reacciones de transformación: N-demetilación, hidroxilación y desprendimiento de la estructura conjugada formando así derivados con estructura benzofenónica. Estos procesos involucran ataques de radicales hidroxilo en el anillo fenólico, en los grupos N-N-dimetilamina y en el átomo de carbono central.

Se demostró la toxicidad aguda de uno de los principales productos de transformación generados durante la fotólisis del VM, 4-

(dimethylamino)benzophenone, por medio del test de bioluminiscencia con la bacteria *V. fischeri* y un estándar analítico.

Las pruebas de toxicidad aguda, con *Vibrio fischeri*, mostraron que la solución permanece tóxica después de que el Verde Malaquita ha desaparecido por completo. Esta toxicidad puede ser adjudicada, o cuando menos en parte, a la formación del 4-(dimetilamino)benzofenona, del cual se obtuvo un EC50,30 min de 0.061 mg/L, que se considera “muy tóxico para organismos acuáticos” según la normativa Europea actual.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Agüera A., Almansa E., Tejedor A., Fernández-Alba A., Malato S., Maldonado I. (2000) Photocatalytic pilot scale degradation study of pyrimethanil and its main degradation products in water by means of solid-phase extraction followed by gas and liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Environmental Science and Technology*, **34**, 1563.
- Agüera A., Almansa E., Tejedor A., Fernandez-Alba A.R., Malato S., Maldonado M.I. (2000) *Environmental Science and Technology*, **34**, 1563.
- Agüera A., Fernandez-Alba A.R. (1998) *Analisis*, **26**, 123.
- Agüera A., Pérez-Estrada L.A., Ferrer I., Thurman E.M., Malato S., Fernandez-Alba A.R. (2005) 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**, 908.
- Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., Piedra, L., Mézcua, M., Gómez, M.J. (2003) Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction

- followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **480**, 193.
- Agüera, A., Mezcua, M., Mocholí, F., Vargas-Berenguel, A., Fernández-Alba, A.R. (2006) Application of gas chromatography-hybrid chemical ionization mass spectrometry to the analysis of diclofenac in wastewater samples, *Journal of Chromatography A*, **1133**, 287.
- Ajona J.A., Vidal A. (2000) The use of CPC collectors for detoxification of contaminated water: Design, construction and preliminary results. *Solar Energy*, **68**, 109.
- Alderman, D.J. (1985) Malachite green: a review. *Journal of Fish Diseases*, **8**, 289.
- Altenburger, R., Walter, H., Grote, M. (2004) What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environmental Science and Technology*, **38**, 6353.
- Amalric A., Guillard C., Pichat P. (1995) The GC-MS identification of some aliphatic intermediates from the TiO₂ photocatalytic degradation dimethoxybenzenes in water. *Research Chemical Intermediates*, **21**, 33.
- Andreozzi R., Caprio V., Insola A. and Martota R. (1999) Advanced oxidation proceses (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, **53**, 51.
- Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, **50**, 1319.
- Barceló D., Hennion M.C., Trace L. (1997) Determination of pesticides and their degradation products in water. Elseviere, 1997. ISBN-10: 0-444-81842-1.
- Barceló, D. (2003) Emerging contaminants in water analyses. TrAC - Trends in *Analytical Chemistry*, **22**, 10.
- Barceló, D., Petrovic, M. (2007) Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **26**, 2.

- Bartlett J.A., Indig, G.L. (1999) Spectroscopic and photochemical properties of Malachite Green noncovalently bound to bovine serum albumin. *Dyes and Pigments*, **43**, 219–226.
- Bhatkhande D.S., Pangarkar V.G., Beenackers AACM. (2002) Photocatalytic degradation for environmental applications: a review. *J. Chem. Technol Biotechnol.*, **77**, 102.
- Black, K.D. (Ed.) (2001) Environmental impacts of Aquaculture. Sheffield Academic Press, Sheffield, England, UK. 228 pp.
- Blanco J., Malato S. (2003) “Solar Detoxification”, UNESCO Publishing, France. ISBN 92-3-103916-4.
- 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. (2000) Compound parabolic concentrator technology development to commercial solar detoxification applications. *Solar Energy*, **67**, 317.
- Blesa M., Matijevic E., (1989) *Adv. Colloid Interface Sci.* 29, 173.
- Bolton J.R., Bircher K.G., Tumas W., Tolman C.A (2001) Figures-of-merit for the technical development and application of advanced oxidation technologies for both, electric- and solar driven system. *Pure and Applied Chemistry*, **73**, 627.
- Boreen A.L., Arnold W.A., McNeill K. (2004) Photochemical fate of sulfa drugs in then aquatic environment: Sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups. *Environmental Science and Technology*, **38**, 3933.
- Boreen A.L., Arnold W.A., McNeill K. (2005) Triplet-sensitized photodegradation of sulfa drugs containing six-membered heterocyclic groups: Identification of an SO₂ extrusion photoproduct. *Environmental Science and Technology*, **39**, 3630.
- Boreen A.L., Arnold W.A., McNeill K., (2003) Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Aquatic Science*, **65**, 320.

- Brezová, V., Pigošová, J., Havlínová, B., Dvoranová, D., Ďurovič, M. (2004) EPR study of photochemical transformations of triarylmethane dyes. *Dyes and Pigments*, **61**, 177.
- Buser H.-R., Poiger T., Müller M. (1998) Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3449.
- Buser H.-R., Müller M. (1998) Occurrence of the pharmaceutical drug clofibrac acid and the herbicide Mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea. *Environmental Science and Technology*, **32**, 188.
- Buser H.-R., Poiger T., Müller M. (1998) Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenaco in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science and Technology*, **32**, 3449.
- Buser H.-R., Poiger T., Müller M. (1999). Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewaters. *Environmental Science and Technology*, **33**, 2529.
- Buxton G.V., Greenstock C.L., Helman W.P., Ross A.B. (1998) Critical-review of rate constants for reactions of hydrated electron, hydrogen atoms and hydrogen radicals ($\bullet\text{OH}/\text{O}^{\bullet-}$) in aqueous-solution. *Journal of Physic Chemistry Data*, **17**, 513.
- Calza P., Baudino S., Aigotti R., Baiocchi C., Pelizzetti E. (2003) Ion trap tandem mass spectrometric identification of thiabendazole phototransformation products on titanium dioxide. *Journal of Chromatography A*, **984**, 59.
- Calza P., Pelizzetti E., Brussino M., Baiocchi C. (2001) Ion trap tandem mass spectrometry study of dexamethasone transformation products on light activated TiO₂ surface. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **12**, 1286.
- Calza P., Pelizzetti E., Minero C. (2005) The fate of organic nitrogen in photocatalysis: an overview. *J. Appl. Electrochem.*, **35**, 665.
- Chen C.C., Lu C.S., Chung Y.C., Jan J.L. (2007) UV light induced photodegradation of malachite green on TiO₂ nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, **141**, 520.

- Chen F., Ma W., He J., Zhao J. (2002) Fenton degradation of malachite green catalyzed by aromatic additives. *Journal of Physical Chemistry A*, **106**, 9485.
- Chen R. and Pignatello J.J. (1997). Role of quinone intermediates as electron shuttles in Fenton and photoassisted Fenton oxidations of aromatic compounds. *Environmental Science and Technology*, **31**, 2399.
- Chen, F., He, J., Zhao, J., Yu, J.C. (2002) Photo-Fenton degradation of malachite green catalyzed by aromatic compounds under visible light irradiation. *New Journal of Chemistry*, **26**, 336.
- Cheng, M., Ma, W., Li, J., Huang, Y., Zhao, J., Wen, Y.X., Xu, Y. (2004) Visible-light-assisted degradation of dye pollutants over Fe(III)-loaded resin in the presence of H₂O₂ at neutral pH values. *Environmental Science and Technology*, **38**, 1569.
- Chiron S., Fernández-Alba A., Rodríguez A., García-Calvo E. (2000) Pesticide chemical oxidation: State of the art. *Water Research*, **34**, 366.
- Chiron S., Minero C., Vione D. (2006) Photodegradation processes of the antiepileptic drug carbamazepine, relevant to estuarine waters. *Environmental Science and Technology*, **40**, 5977.
- Chiron S., Rodríguez A., Fernández-Alba A.R. (1997) Pesticide chemical oxidation processes: an analytical approach. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **16**, 518.
- Chiron S., Rodríguez A., Fernández-Alba A.R. (1998) Application of Gas and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry to Evaluate Pirimiphos Methyl Degradation Products in Industrial Water under Ozone Treatment. *Journal of Chromatography A*, **823**, 97.
- Cho, B.P., Blankenship, L.R., Moody, J.D., Doerge, D.R., Beland, F.A., Culp, S.J. (2000) Synthesis and characterization of 4'-amino and 4'-nitro derivatives of 4-N,N-dimethylaminotriphenylmethane as precursors for a proximate malachite green metabolite. *Tetrahedron*, **56**, 7379.

- Costello, M.J., Grant, A., Davies, I.M., Cecchini, S., Papoutsoglou, S., Quigley, D., Saroglia, M. (2001) The control of chemicals used in aquaculture in Europe. *Journal of Applied Ichthyology*, **17**, 173.
- Dalrymple, O.K., Yeh, D.H., Trotz, M.A. (2007) Removing pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds from wastewater by photocatalysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **82**, 121.
- Deng A., Himmelsbach M., Zhu Q-Z, Frey S., Sengl M., Buchberger W., Niessner R., Knopp D. (2003) Residue analysis of the pharmaceutical diclofenaco in different water types using ELISA and GC-MS. *Environmental Science and Technology*, **37**, 3422.
- Detomaso A, Mascolo G, Lopez A. (2005) Characterization of carbofuran photodegradation by-products by liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**, 2193
- Doll T.E., Frimmel F.H. (2004) 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**, 955.
- Domènech X., Jardim W.F., Litter M. (2001) Procesos Avanzados de Oxidación para la Eliminación de Contaminantes, Capítulo 1, en Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogenea. Blesa M. A., Editor. ©2001. ISBN: 987-43-3809-1.
- EC (1993) Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993 laying down the principles for assessment of risks to man and the environment of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC.
- EC (1996) Technical guidance documents in support of Directive 93/67/EEC on risk assessment of new notified substances and Regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment of existing substances (Parts I, II, III and IV). EC catalogue numbers CR-48-96-001, 002, 003, 004-EN-C. Office for Official Publications of the European Community, 2 rue Mercier, L-2965 Luxembourg.

- Eichhorn P., Aga D.S. (2004) 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**, 6002.
- Encinas S., Boscá F., Miranda M.A. (1998) Photochemistry of 2,6-dichlorodiphenylamine and 1-chlorocarbazole, the photoactive chromophores of diclofenac, meclofenamic acid and their major photoproducts. *J. Photochem. Photobiol.*, **68**, 640.
- Farré M., Ferrer I., Ginebreda A., Figueras M., Olivella L., Tirapu L., Vilanova M., Barcelo D. (2001) Determination of drugs in surface waters and wastewater samples by liquid chromatography – mass spectrometry: methods and preliminary results including toxic studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A*, **938**, 187.
- Feldmann, D.F., Zuehlke, S., Heberer, T., 2007. Occurrence, fate and assessment of polar metamizole (dipyrone) residues in hospital and municipal wastewater. *Chemosphere*, **in press**, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.032.
- Fenton H.J.H. (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Chem. Soc.*, **65**, 899.
- Fernandez-Alba, A.R., Hernando, M.D., Díaz, G., Chisti, Y. (2001) Toxicity of pesticides in wastewater: A comparative assessment of rapid bioassays. *Analytica Chimica Acta*, **426**, 289.
- Fernández-Alba, R., Guil, L.H., López, G.D., Chisti, Y. (2001) Toxicity of pesticides in wastewater: A comparative assessment of rapid bioassays. *Analytica Chimica Acta*, **426**, 289
- Fernández-Ibáñez P., Malato S., De Las Nieves F.J. (1999) *Catalysis Today*, **54**, 1954.
- Ferrer I. and Thurman E.M. (Editors) (2003a) Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, MS/MS and Time-of-Flight MS: Analysis of Emerging Contaminants, American Chemical Society Symposium Series 850, Oxford University Press, Washington DC. ISBN: 0841238251

- Ferrer I., Thurman M. (2003b) Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 750.
- Ferrer I., Mezcua M., Gómez M.J., Thurman E.M., Agüera A., Fernández-Alba A.R. (2004) Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric analyses for the elucidation of the photodegradation products of triclosan in wastewater samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 443.
- Ferrer, I., Mezcua, M., Gómez, M.J., Thurman, E.M., Agüera, A., Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R. (2004) Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric analyses for the elucidation of the photodegradation products of triclosan in wastewater samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**, 443
- Ferrer, I., Thurman, E. M. (2003) Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 750.
- Flynn C.M. Jr., (1984) *Chem. Rev.*, **84**, 31.
- Food and Agriculture Organization of the UN (2002) The State of World Fisheries and Aquaculture. <http://www.fao.docrep/005/y7300e/y7300e00.htm> (accesado en 2004).
- Fukui, K.; Yonezawa, T.; Nagata, C.; Shingu, H. (1954) Molecular orbital theory of orientation in aromatic, heteroaromatic, and other conjugated molecules. *J. Chem. Phys.*, **22**, 1433.
- García-Reyes J.F., Ferrer I., Thurman E.M., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A.R. (2005) Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**, 2780.
- García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R., (2007). Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation- degradation" relationships. *Anal. Chem.* **79**, 307–321.

- GEO-3: Perspectivas del Medio Ambiente Mundial 2002,. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. © 2002, ISBN: 84-8476-062-6. <http://www.grida.no/geo/geo3/>
- Gernjak Wolfgang, Malato Rodriguez Sixto, Manuel Ignacio Maldonado Rubio, Maria Fuerhacker. (2006) Solar photo-Fenton treatment of EU priority substances – Processes parameters and control strategies. Editorial CIEMAT, Madrid. ISBN 84-7834-521-3.
- GESAMP 1990, Joint Group of Expert on the Scientific Aspect of Marine Environment UNEP. Regional Seas Report and Studies No 115.
- Gogate P.R., Pandit A.B (2004a) A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, **8**, 501.
- Gogate P.R., Pandit A.B (2004b) A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Advances in Environmental Research*, **8**, 553.
- Gómez M.J., Sirtori C., Mezcuca M., Fernández-Alba A.R., Agüera A. (2008) Photodegradation study of three dipyrone metabolites in various water systems: Identification and toxicity of their photodegradation products. *Water Research*, **In Press**: doi:10.1016/j.watres.2008.01.022.
- Gómez, M.J., Malato, O., Ferrer, I., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. (2007A) Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. *Journal of Environmental Monitoring*, **9**, 719.
- Gómez, M.J., Martínez-Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera A. (2007B) Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, **66**, 993.
- Gómez, M.J., Agüera, A., Mezcuca, M., Hurtado, J., Mocholí, F., Fernández-Alba, A.R. (2007C) Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography-tandem mass spectrometry in wastewater, *Talanta*, **73**, 314.

- Goswami D.Y., Blake D.M. (1996) Cleaning Up with Sunshine. *Mechanical Engineering*, **8**, 56.
- Goswami D.Y., Sharma S.K., Mathur G.D., Jotshi C.K. (1997) Techno-Economic Analysis of Solar Detoxification Systems. *Journal of Solar Energy Engineering, ASME*, **119**, 108.
- Goswami D.Y., Vijayaraghavan S., Lu S., Tamm G. (2003) New and emerging developments in solar energy. *Solar Energy*, **76**, 33.
- Guillard C., Pichat P., Huber G., Hoang-Van G. (1996) The GC-MS analysis of organic intermediates from the TiO₂ photocatalytic treatment of water contaminated by Lindane. *Journal of Advanced Oxidation Technology*, **1**, 53.
- Haag W.R. y Yao C.D. (1992) Rate Constant for Reaction of Hydroxyl Radicals with Several Drinking Water Contaminants. *Environmental Science and Technology*, **26**, 1005.
- Heberer T. (2002) Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, **131**, 5.
- Hernando M.D., Mezcuca M., Fernández-Alba A.R., Barcelo D. (2006) Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, **69**, 334.
- Hernando, M.D., De Vettori, S., Martínez Bueno, M.J., Fernández-Alba, A.R. (2007) Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*, **68**, 724.
- Hernando, M.D., Martínez Bueno, M.J., Fernandez-Alba, A.R. (2005) Seawater quality control of micro-contaminants in fish farm cage systems. Application of passive sampling devices. *Boletín - Instituto Español de Oceanografía*, **21**, 37.
- Herrera-Silveira, J.A., Comin, F.A., Aranda-Cirerol, N., Troccoli, L., Capurro, L. (2004) Coastal water quality assessment in the Yucatan Peninsula: management implications. *Ocean and Coastal Management*, **47**, 625.

- Herrmann J.M. (1999a) Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catalysis Today*, **53**, 115.
- Herrmann J.M. (1999b) Water treatment by heterogeneous photocatalysis. *Catal. Sci. Serv.*, **1** (Environ. Catal.), 171.
- Herrmann J.M. (2005) Heterogeneous photocatalysis: state of the art and present applications. *Topics in Catalysis*, **34**, 1.
- Hincapié M., Maldonado M.I., Oller I., Gernjak W., Sánchez J.A., Ballesteros M.M., Malato S. (2005) Solar photocatalytic degradation and detoxification of EU priority substances. *Catálisis Today*, **101**, 203.
- Hsu Y.H., Liou Y.B., Chen C.Y., Wu A.B. (2006) Assay of naproxen by high-performance liquid chromatography and identification of its photoproducts by LC-ESI MS. *Biomedical Chromatography*, **20**, 787.
- Ibáñez M., Sancho J.V., Pozo O.J., Hernández F. (2004) Use of Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry in Environmental Analysis: Elucidation of Transformation Products of Triazine Herbicides in Water after UV Exposure. *Analytical Chemistry*, **76**, 1328.
- Ibáñez M., Sancho J.V., Pozo O.J., Hernandez F. (2006) Use of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of transformation products and metabolites of pesticides. Diazinon as a case study. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **384**, 448
- Islam, Md.S., Tanaka, M. (2004) Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 624.
- Joss A., Keller E., Alder A.C., Göbel A., McArdell C.S., Ternes T., Siegrist H. (2005) Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*, **39**, 3139.
- Kavitha V. and Palanivelu K.. (2004) The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton processes for the degradation of phenol. *Chemosphere*, **55**, 1235.
- Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other

- organic wastewater contaminants in US streams, 1999 – 2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, **36**, 1202.
- Kosjek T., Heath E., Petrovic M., Barcelo D. (2007) Mass spectrometry in identification of pharmaceutical biotransformation products in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **26**, 1076.
- Kwon J.W., Armbrust K.L. (2005) Degradation of citalopram by simulated sunlight. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 1618.
- Kwon J.W., Armbrust K.L. (2006) Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25** 2561.
- Lam M.W., Mabury S.A. (2005) Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Science*, **67**, 177.
- Lam M.W., Young C.J., Mabury S.A. (2005) Aqueous photochemical reaction kinetics and transformations of fluoxetine. *Environmental Science and Technology*, **39**, 513.
- Lambropoulou D.A., Hernando M.D., Konstantinou I.K., Thurman E.M., Ferrer I., Albanis T.A. and Fernández-Alba A.R. (2008) Identification of photocatalytic degradation products of bezafibrate in TiO₂ aqueous suspensions by liquid and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1183**, 38.
- Lányi K., Dinya Z. (2003) Photodegradation study of some triazine-type herbicides. *J. Microchem.*, **75**, 1.
- Legrini O., Oliveros E. y Braun A.M. (1993) Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews*, **93**, 671.
- Leland J.K. (1987) *J. Phys. Chem.*, **91**, 5076.
- Lindqvist N., Tuhkanen T., Kronberg L. (2005) Occurrence of acid pharmaceuticals in raw water and treated sewages and in receiving waters. *Water Research*, **39**, 2219.
- Liu Q.T., Williams H.E. (2007) Kinetics and degradation products for direct photolysis of β -blockers in water. *Environmental Science and Technology*, **41**, 803.

- Lovdahl M.J., Priebe S.R. (2000) Characterization of ciprofloxacin photodegradation products by LC-MS/MS and NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23**, 521.
- Malato S., Blanco J., Vidal A., Alarcón D., Maldonado M.I., Cáceres J., Gernjak W. (2003a) Applied studies in solar photocatalytic detoxification: an overview. *Solar Energy*, **75**, 329.
- Malato S., Cáceres J., Fernández-Alba A.R., Piedra L., Hernando M.D., Agüera A., Vidal J. (2003b) Photocatalytic treatment of diuron by solar photocatalysis: evaluation of main intermediates and toxicity. *Environmental Science and Technology*, **37**, 2416.
- Malato S., Albanis T., Piedra L., Agüera A., Hernando M.D., Fernández-Alba A.R. (2003c) "LC-MS and LC-MS/MS strategies for the evaluation of pesticide intermediates formed by degradative processes. Photo-Fenton degradation of Diuron" En: LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY, MS/MS AND TIME-OF-FLIGHT MS. ANALYSIS OF EMERGING CONTAMINANTS (ISBN: 0-8412-3825-1) American Chemical Society, ACS Symposium Series 850, 66 – 95
- Malato S., Albanis T., Piedra L., Agüera A., Hernando M.D., Fernández-Alba A.R. "LC-MS and LC-MS/MS strategies for the evaluation of pesticide intermediates formed by degradative processes. Photo-Fenton degradation of Diuron". En Liquid chromatography-mass spectrometry, MS/MS and Time-Of-Flight MS. Analysis of emerging contaminants. ACS Symposium Series 850, 2003, pg. 66-95.
- Malato S., Blanco J., Alarcón D.C., Maldonado M.I., Fernández-Ibáñez P., Gernjak W. (2007) Photocatalytic decontamination and disinfection of water with solar collectors. *Catalysis Today*, **122**, 137.
- Malato S., Blanco J., M. I. Maldonado Rubio, P. Fernández Ibáñez, D. Alarcón Padilla, M. Collares Pereira, J. Farinha Mendes and J. Correia de Oliveira (2004) Engineering of solar photocatalytic collectors. *Solar Energy*, **77**, 513.
- Malato S., Blanco J., Vidal A., Richter C., (2002) Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: overview. *Applied Catalysis B: Environmental*, **37**, 1.

- Malato S., Cáceres J., Agüera A., Mezcua M., Hernando M.D., Vial J., Fernández-Alba A.R. (2001) Degradation of imidacloprid in water by photo-fenton and TiO₂ photocatalysis at a solar pilot plant: a comparative study. *Environmental Science and Technology*, **35**, 4359.
- Malato S., Cáceres J., Agüera A., Mezcua M., Hernando M.D., Vial J., Fernández-Alba A.R. (2001) Degradation of Imidacloprid in water by photo-fenton and TiO₂ photocatalysis at a solar pilot plant: a comparative study. *Environmental Science and Technology*, **35**, 4359.
- Maldonado Rubio M.I., Gernjak W., Oller Alberola I., Blanco Gálvez J., Fernández-Ibáñez P., Malato Rodríguez S. (2006) Photo-Fenton degradation of alachlor, atrazine, chlorfenvinphos, diuron, isoproturon and pentachlorophenol at solar pilot plant. *International Journal of Environment and Pollution*, **27**, 135.
- Marinas A., Guillard C., Marinas J.M., Fernández-Alba A.R., Agüera A., Herrmann J.M. (2001) Photocatalytic degradation of pesticide-acaricide Formetanate in aqueous suspension of TiO₂. *Applied Catalysis, B: Environmental*, **34**, 241.
- Martínez Bueno, M.J., Agüera, A., Gómez, M.J., Hernando, M.D., García-Reyes, J.F., Fernández-Alba, A.R. (2007) 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**, 9372.
- Mendiguchía, C., Moreno, C., Mánule-Vez, M.P., García-Vargas, M. (2006) Preliminary investigation on the enrichment of heavy metals in marine sediments originated from intensive aquaculture effluents. *Aquaculture*, **254**, 317.
- Metcalfe, C.D., Miao, X.-S., Koenig, B.G., Struger, J. (2003) Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 2881.

-
- Mezcua M., Gómez M.J., Ferrer I., Agüera A., Hernando M.D., Fernández-Alba A.R. (2004) *Anal. Chim. Acta*, **524**, 241.
- Mezcua, M., Ferrer, I., Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R. (2006) Photolysis and photocatalysis of bisphenol A: Identification of degradation products by liquid chromatography with electrospray ionization/time-of-flight/mass spectrometry (LC/ESI/ToF/MS). *Food Additives and Contaminants*, **23**, 1242.
- Milano, J.C., Loste-Verdot, P., Vernet, J.L. (1995) Photooxidation of malachite green in aqueous medium in the presence of hydrogen peroxide: kinetics and mechanism. *Environmental Technology*, **16**, 329.
- Miyamoto G., Zahid, N., Uetrecht, J. P. (1997) Oxidation of diclofenac to reactive intermediates by neutrophils, myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 414.
- Modirshahla, N., Behnajady, M.A. (2006) Photooxidative degradation of malachite green (MG) by UV/H₂O₂: influence of operational parameters and kinetic modeling. *Dyes and Pigments*, **70**, 54.
- Moldovan Z. (2006) Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, **64**, 1808.
- Moore D.E. (1998) Mechanisms of photosensitization by phototoxic drugs. *Mutation Research*, 422, 165.
- Moore D.E., Robert-Thomson S., Dong Z., Duke C.C. (1990) Photochemical studies on the anti-inflammatory drug diclofenaco. *Photochemistry and Photobiology*, **52**, 685.
- Muschaweck J., Spirkl W., Timinger A., Benz N., Dörfler M., Gut M., Kose E. (2000) Optimized reflectors for non-tracking solar collectors with tubular absorbers. *Solar Energy*, **68**, 151.
- Nealson K.H., Hastings J.W. (1991) The luminous bacteria. In: Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. (eds) *The prokaryotes*, 2nd Edition. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp 625–639.

- Nelieu S., Kerhoas L., Einhorn J. (1996) Atrazine degradation by ozonation in the presence of methanol as scavenger. *Intermediate Journal of Analytical Chemistry*, **65**, 297.
- Othman, S., Mansuy-Mouries, V., Bensoussan, C., Battioni, P., Mansuy, D. (2000) Hydroxylation of diclofenac: an illustration of the complementary roles of biomimetic metalloporphyrin catalysts and yeasts expressing human cytochromes P450 in drug metabolism studies. *C. R. Acad. Sci., Ser. IIc, Chim.*, **3**, 751.
- Paciolla M.D., Kolla S., Jansen S.A., (2002) *Adv. Environ. Res.*, **7**, 169.
- Packer J.L., Werner J.J., Latch D.E., McNeill K., Arnold W.A. (2003) Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen. *Aquatic Science*, **65**, 342.
- Parra S., Malato S., Pulgarin C. (2002) New integrated photocatalytic-biological flow system using supported TiO₂ and fixed bacteria for the mineralization of isoproturon. *Applied Catalysis B: Environmental*, **36**, 131.
- Pera-Titus M., García-Molina V., Baños M.A., Giménez J., Esplugas S. (2004) Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Applied Catalysis B: Environmental*, **47**, 219.
- Perez S., Barcelo D. (2006) 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, p. 39.
- Pérez-Estrada L.A., Malato S., Agüera A., Fernández-Alba A.R. (2007) Degradation of dipyrone and its main intermediates by solar AOPs. Identification of intermediate products and toxicity assessment. *Catalysis Today*, **129**, 207
- Perez-Estrada L.A., Malato S., Agüera A., Fernandez-Alba A.R. (2006) Photocatalytic treatment of Dipyrone using solar energy. Identification of intermediate products. 1st Environmental Applications of Advanced

- Oxidation Processes, E-Proceedings. Eds: Matazavinos D., Poullos I. September 7th – 9th, Chania, Greece.
- Pérez-Estrada L.A., Malato S., Gernjak W., Agüera A., Thurman E.M., Ferrer I., Fernandez-Alba A.R. (2005) Photo-fenton degradation of diclofenac: Identification of main intermediates and degradation pathway. *Environmental Science and Technology*, **39**, 8300.
- Petrovic M., Barceló D. (2006) Application of liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QqTOF-MS) in the environmental analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, **41**, 1259.
- Petrovic M., Barceló D. (2007) LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **26**, 486.
- Pignatello J.J. (1992) Dark and photoassisted iron(3+)-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology*, **26**, 944.
- Poiger T., Buser H.-R., Muller M.D. (2001) Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 256.
- Primavera, J.H. (2006) Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. *Ocean and Coastal Management*, **49**, 532.
- Pulgarín C., Kiwi J. (1995) *Langmuir*, **11**, 519.
- Quinn B., Gagné F., Blaise C. (2008) An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuate*. *Science of the Total Environment*, **389**, 306.
- Quintana J.B., Weiss S., Reemtsma T. (2005) Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*, **39**, 2654.
- Ramos M.J., Malato O., Ferrer I., Agüera A., Fernández-Alba A.R. (2007) Solid-phase extraction followed by liquid chromatography–time-of-flight–mass

- spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. *J. Environ. Monit.*, **9**, 718.
- Ravina M., Campanella L., Kiwi J. (2002) Accelerated mineralization of the drug diclofenac via fenton reactions in a concentric photoreactor. *Water Research*, **36**, 3553.
- Reddersen K., Heberer T., Dünbier U. (2002) Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water. *Chemosphere*, **49**, 539.
- Reemtsma T., Weiss S., Mueller J., Petrovic M., Gonzalez S., Barcelo D., Ventura F., Knepper T. P. (2006) Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: A European Perspective. *Environmental Science and Technology*, **40**, 5451.
- Richardson S., Thurston A., Collette T. (1996) Identification of TiO₂/UV disinfection byproducts in drinking water. *Environmental Science and Technology*, **30**, 3327.
- Richardson S.D. (2003) Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 666.
- Ruppert G., Bauer R. y Heisler G., (1993) The photo-Fenton reaction — an effective photochemical wastewater treatment process. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **73**, 75.
- Safazadeh-Amiri A., Bolton J.R., Carter S.R., (1996) *Solar Energy*, **56**, 439.
- Sagawe, G.; Lehnard, A.; Lübbber, M.; Bahnemann, D. (2001) The insulated solar Fenton hybrid process: Fundamental investigations. *Helv. Chim. Acta*, **86**, 3742.
- Sánchez-Mata A., Mora J. (2000) *Journal of Applied Ichthyology.*, **16**. 209.
- Sarria V., Kenfack O., Guillod O., Pulgarin C. J. (2003) An innovative coupled solar-biological system at field pilot scale for the treatment of biorecalcitrant pollutants. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, **159**, 89.

- Sather, P.J., Ikonomou, M.G., Haya, K. (2006) Occurrence of persistent organic pollutants in sediments collected near fish farm sites. *Aquaculture*, **254**, 234.
- Sawyer C.N., McCarty P.L., Parkin G.F. Chemistry for Environmental Engineering and Science Fifth Edition. Editorial McGraw Hill, 2003. ISBN: 0-07-248066-1.
- Shahidul Md., Tanaka M., 2004. Impact of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 624.
- Shao, Z.J. (2001) Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **50**, 229.
- Sheu M.T., Ho H.O., Wand P.Y., Wu A.B. (2003) *The Journal of Chromatographic Science*, **41**, 200.
- Srivastava, S., Sinha, R., Roy, D. (2004) Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*, **66**, 319.
- Stammati, A., Nebbia, C., Angelis, I., Giuliano Albo, A., Carletti, M., Rebecchi, C., Zampaglioni, F., Dacasto, M. (2005) Effects of malachite green (MG) and its major metabolite, leucomalachite green (LMG), in two human cell lines. *Toxicology in Vitro*, **19**, 853.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Organisation, United Book Press Inc., Baltimore, MD, USA, 1998.
- Stanley Foundation (1971). Sixth Conference on the United Nations of the Next Decade. Conference held 20th – 29th June 1971, Sianai, Romania.
- Strong, M. (1999). Hunger, Poverty, Population and Environment. The Hunger Project Millennium Lecture, 7 April 1999. Madras, India, The Hunger Project. <http://www.thp.org/reports/strong499.htm>.
- Sun Y., Pignatello J.J., (1993) *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 308.
- Tacon, A.G.J., Forster, I.P. (2003) Aquafeeds and the environment: policy implications. *Aquaculture*, **226**, 181.

- Ternes T. (2001) Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **20**, 419.
- Ternes T. A., Meisenheimer M., Mcdowell D., Sacher F., Brauch H-J., Haist-Gulde B., Preuss G., Wilme U., Zulei-Seibert N. (2002). Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental Science and Technology*, **36**, 3855.
- The AOT Handbook (1996) Calgon Carbon Oxidation Technologies, Ontario, Canada.
- Thurman E.M., Ferrer I., Fernández-Alba A.R. (2005) Matching unknown empirical formulas to chemical structure using LC/MS TOF accurate mass and database searching: Example of unknown pesticides on tomato skins. *Journal of Chromatography A*, **1067**, 127.
- Vogna D., Marotta R., Napolitano A., Anderozzi R., d'Ischia M., (2004) Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenaco with UV/H₂O₂ and ozone. *Water Research*, **38**, 414.
- Waki K., Zhao J., Horikoshi S., Watanabe N., Hidaka H. (2000) Photooxidation mechanism of nitrogen-containing compounds at TiO₂/H₂O interfaces: an experimental and theoretical examination of hydrazine derivatives. *Chemosphere*, **41**, 337.
- Walling C. (1975) Fenton's reagent revisited. *Accounts of Chemical Research*, **8**, 125.
- Wang C.C., Chen F.A., Chen C.J., Chao S.H., Wu A.B. (2004) Biomed. Chromatogr. 18 820.
- Weigel S., Kallenborn R., Hühnerfuss H. (2004A) Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1023**, 183.

- Wiegel S., Aulinger A., Brockmeyer R., Harms H., Löffler J., Reincke H., Schmidt R., Stachel B., Von Tümpling W., Wanke A. (2004B) Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*, **57**, 107.
- Wells M.L., Mayer L.M., Donard O.F.X., Sierra M.M., Ackelson G. (1991) *Nature*, **353**, 248.
- Wessel J.C., Matyja M., Neugebauer M., Kiefer H., Daldrup T., Tarbah F.A., Weber H. (2006) *Eur. J. Pharm. Sci.*, **28**, 15.
- Xia Y.-Q., Miller J.D., Bakhtiar R., Franklin R.B., Liu D.Q. (2003) Use of a quadrupole linear ion trap mass spectrometer in metabolite identification and bioanalysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**, 1137.
- Xie, Y., Wu, K., Chen, F., He, J., Zhao, J. (2001) Investigation of the intermediates formed during the degradation of malachite green in the presence of Fe³⁺ and H₂O₂ under visible irradiation. *Res. Chem. Intermed.*, **27**, 237.
- Zepp R.G., Cline D.M. (1977) Rates of direct photolysis in aquatic environment. *Environmental Science and Technology*, **11**, 359.
- Zuehlke, S., Duennbier, U. and Heberer, T. (2007) Investigation of the behaviour and metabolism of pharmaceutical residues during purification of contaminated ground water used for drinking water supply. *Chemosphere*, **69**, 1673.
- Zwiener C., Gremm T.J., Frimmel F.H.. (2001) Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment and their Significance for Drinking Water Production, in: K. Kümmerer (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects, and Risks*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2001, pp. 81.

GLOSARIO

GLOSARIO

ABS	Absorción
AOPs	Advanced Oxidation Processes (Procesos de Oxidación Avanzada).
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica.
API	Ionización a Presión Atmosférica.
BPD	Derivados de Benzofenona.
CEPAL	Comisión Económica para América Latina y el Caribe.
CI	Cromatografía Iónica.
CID	Disociación por colisión inducida.
CIT	Carbono Inorgánico Total.
COD	Carbono Orgánico Disuelto.
COT	Carbono Orgánico Total.
CPCs	Captador Parabólico Compuesto.
CT	Carbono Total.
DBE	Equivalencia de dobles enlaces.
DPMD	Derivados del Difenilmetanol.
EC ₅₀	Concentración Efectiva que causa el 50% de mortalidad en determinado organismo.

EC ₅₀ , 30min	EC ₅₀ a los 30 minutos de exposición a determinada sustancia.
EDAR	Estación de Depuración de Aguas Residuales.
EI	Impacto electrónico, ionización por (<i>en GC-EI-MS</i>).
EPA	Environmental Protection Agency, de USA.
ESI	Ionización con Electrospray.
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
GEF	Fondo para el Medio Ambiente Mundial.
HOMO	Orbitales moleculares ocupados de más alta energía.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
IT	Trampa de Iones.
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
LC-MS	Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas.
LMRs	Límites Máximos de Residuos.
LLE	Extracción Líquido – Líquido.
<i>m/z</i>	Relación masa / carga del ion.
MAA	Metilaminoantipirina.
MS	Espectrometría de Masas.
MSD	Detector de Espectrometría de Masas.
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem.
MS ⁿ	Espectrometría de masas en tándem, de orden n.
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico.
PCI	Ionización Química Positiva (<i>en GC-PCI-MS</i>).
PDs	Productos de Degradación, hace referencia a un proceso de degradación (como los POAs).
POAs	Procesos de Oxidación Avanzada.
POPs	Contaminantes Orgánicos Persistentes.
PPCPs	Productos farmacéuticos y de higiene personal (Pharmaceuticals and Personal Care Products).
ppq	Partes por cuatrillón.
ppt	Partes por trillón.

PTs	Productos de Transformación, hace referencia a la degradación natural o fotolítica.
Q	Cuadrupolo simple.
Qq-LIT	Cuadrupolo – Trampa de Iones Lineal.
QqQ	Triple cuadrupolo.
Qq-TOF	Cuadrupolo – Tiempo de Vuelo.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
SPE	Extracción en Fase Sólida.
t_{30w}	Tiempo de iluminación normalizado (min).
TOF	Tiempo de Vuelo.
uma	Unidades de masa atómica.
VLM	Verde Leucomalaquita.
VM	Verde Malaquita.
WFD	Water Framework Directive.

ANEXO

ANEXO

**PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS
INTERNACIONALES**

Los resultados de la presente investigación han dado lugar a cinco artículos en diferentes revistas científicas interacionales, como se detalla a continuación:

Pérez-Estrada, L.A., Agüera, A., Hernando, M.D., Malato, S., Fernández-Alba, A.R. (2008) **Photodegradation of malachite green under natural sunlight irradiation: Kinetic and toxicity of the transformation products.** *Chemosphere*, **70**, 2068-2075. Índice de impacto (2006): 2.442.

Pérez-Estrada, L.A., Malato, S., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. (2007) **Degradation of dipyrone and its main intermediates by solar AOPs. Identification of intermediate products and toxicity assessment.** *Catalysis Today*, **129**, 207-214. Índice de impacto 2006: 2.148.

Pérez-Estrada, L.A., Malato, S., Gernjak, W., Agüera, A., Thurman, E.M., Ferrer, I., Fernández-Alba, A.R. (2005) **Photo-fenton degradation of diclofenac: Identification of main intermediates and degradation pathway.** *Environmental Science and Technology*, **39**, 8300-8306. Índice de impacto (2005): 4.054.

Agüera, A., Perez Estrada, L.A., Ferrer, I., Thurman, E.M., Malato, S., Fernandez-Alba, A.R. (2005) **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**, 908-915. Índice de impacto (2005): 3.574.

Pérez-Estrada, L.A., Maldonado, M.I., Gernjak, W., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., Ballesteros, M.M., Malato, S. (2005) **Decomposition of diclofenac by solar driven photocatalysis at pilot plant scale.** *Catalysis Today*, **101**, 219-226. Índice de impacto (2005): 2.365.