
SEGUIMENT DE FÀRMACS I CAFEÏNA AL LLARG DEL PROCÉS DE TRACTAMENT D'AIGÜES RESIDUALS

MÀSTER EN CIÈNCIA I TECNOLOGIA DE L'AIGUA

Programa Oficial de Postgrau
Ciències Experimentals i Sostenibilitat



Núria Galceran Almirón
21 de setembre del 2007
Girona



Universitat de Girona

ÍNDEX.

AGRAÏMENTS.....	7
PRESENTACIÓ.....	9
1. INTRODUCCIÓ.....	11
1.1. Els fàrmacs com a contaminants en les aigües.....	13
1.2. Els compostos.....	23
1.2.1. Cafeïna.....	25
1.2.2. Àcid clofíbric.....	29
1.2.3. Carbamazepina.....	30
1.2.4. Diclofenac.....	32
1.2.5. Ibuprofè.....	34
1.2.6. Naproxè.....	36
1.3. Determinació de fàrmacs en aigües.....	39
1.3.1. Tractament de la mostra.....	40
1.3.2. Extracció en fase sòlida (SPE).....	42
1.3.2.1. Extracció en fase sòlida <i>off-line</i> i <i>on-line</i>	43
1.3.2.2. Formats disponibles comercialment.....	45
1.3.2.3. Fonaments de l'extracció en fase sòlida.....	46
1.3.2.4. Mecanismes de separació en extracció en fase sòlida.....	49
1.3.2.5. Tipus de sorbents per extracció en fase sòlida.....	51

4.2. Mètodes.....	98
4.2.1. Presa de mostra.....	99
4.2.2. Tractament de les mostres.....	103
4.2.2.1. Filtració.....	103
4.2.2.2. Extracció en fase sòlida (SPE).....	103
4.2.3. Mètode cromatogràfic.....	105
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	109
5.1. Mètode cromatogràfic.....	111
5.2. Tractament de la mostra: SPE.....	115
5.2.1. Elecció del cartutx: Oasis HLB.....	115
5.2.2. Mètode d'extracció en fase sòlida (SPE).....	118
5.3. Seguiment dels fàrmacs al llarg de les EDARs.....	121
5.3.1. Percentatge d'eliminació total.....	126
5.3.2. Percentatge d'eliminació a cada etapa.....	128
5.3.3. Mecanismes d'eliminació dels fàrmacs.....	134
5.3.4. Perspectives de futur.....	137
6. CONCLUSIONS.....	141
7. REFERÈNCIES.....	145

AGRAÏMENTS.

M'agradaria donar les gràcies a totes les persones que, d'una manera o altra, heu fet possible la realització d'aquest projecte gràcies al vostre suport i col·laboració.

En primer lloc, vull manifestar la meva gratitud a la meva tutora, la Dra. Manuela Hidalgo, per haver-me ofert l'oportunitat de realitzar aquest projecte al seu departament, així com per la seva dedicació, ajuda, suport i confiança que m'ha mostrat durant aquests temps.

Expresso també el meu agraïment al Consorci de la Costa Brava, als responsables i al personal de manteniment de les diferents estacions depuradores que han facilitat la presa de mostra i han mostrat interès per aquest estudi.

Els meus agraïments a tots els companys i amics de llicenciatura i sobretot del màster pels ànims i l'interès mostrat durant la realització d'aquest projecte. Gràcies Agustí, Carme, Conxa, Conxi, Ivan, Laia, Lolita, Meritxell, Roser i Quico. Tots els moments que hem passat junts, els vostres consells i l'amistat que ens uneix ha estat una motivació més en el meu treball diari.

Finalment, voldria agrair a tota la meva família i amics pels seus suggeriments, per la comprensió, la paciència i pels ànims mostrats en els moments difícils, i molt especialment a en Sergi, gràcies per tot.

A tots vosaltres, moltes gràcies!

PRESENTACIÓ.

El treball que aquí es presenta com a projecte del Màster en Ciència i Tecnologia de l'aigua sota el títol "SEGUIMENT DE FÀRMACS I CAFEÏNA AL LLARG DEL PROCÉS DE TRACTAMENT D'AIGÜES RESIDUALS", es centra en el seguiment de sis fàrmacs al llarg del procés de depuració de les EDARs d'Empuriabrava, Castell-Platja d'Aro i Blanes.

Els fàrmacs objecte d'estudi són tres antiinflamatoris i analgèsics (diclofenac, ibuprofè i naproxè), un antiepilèptic (carbamazepina), un regulador de lípids (àcid clofíbric) i un estimulant nerviós (cafeïna).

La determinació dels fàrmacs es realitza gràcies al tractament de les mostres mitjançant extracció en fase sòlida (SPE) i la posterior injecció a un sistema de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Amb el present projecte es vol determinar quina és la capacitat d'eliminació dels fàrmacs a les tres EDARs de la Costa Brava.

1. INTRODUCCIÓ.

1.1. ELS FÀRMACS COM A CONTAMINANTS EN LES AIGÜES.

L'elevat grau de desenvolupament de la nostra societat fomentat en el consum insostenible dels recursos, la necessitat d'un constant avenç tecnològic i les grans concentracions urbanes i industrials, ha provocat la introducció de substàncies xenobiòtiques d'origen antropogènic al medi ambient, augmentant el risc d'alteració de l'equilibri natural establert dins l'ecosistema.

Durant les tres últimes dècades els abocaments de caràcter industrial en els rius han estat la primordial preocupació dels experts. L'impacte de la contaminació s'ha centrat gairebé exclusivament en els contaminants convencionals i s'han establert normatives que obliguen a les indústries a controlar i tractar els seus abocaments. Amb les ànsies de progrés, la societat ha hagut d'afrontar varis problemes ambientals com la contaminació per metalls pesats, l'eutrofització de les aigües degut a l'ús excessiu de detergents i adobs, i la contaminació per substàncies orgàniques tòxiques. No fa massa temps el ràpid desenvolupament de la indústria dels pesticides per tal d'intensificar l'agricultura, va provocar la introducció d'aquests compostos a l'ecosistema aquàtic amb efectes tòxics per tot tipus d'organismes, bioacumulació dins la xarxa tròfica i suposant un alt risc per a la salut humana. Els científics han centrat els seus esforços en l'estudi de compostos químics la presència dels quals al medi ha estat regulada per les legislacions corresponents. Com a conseqüència, diferents grups de contaminants, sobretot els orgànics apolars tòxics persistents i bioacumulables, com els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs), els policlorobifenils (PCBs) i les dioxines, s'han estudiat extensament i el coneixement que es té sobre la seva presència, destinació i persistència al medi ambient és molt ampli [1, 2].

En els darrers anys, però, el desenvolupament de noves metodologies d'anàlisi molt sensibles han desviat l'atenció de la comunitat científica cap a nous contaminants que provenen de l'impacte directe dels abocaments que reben els rius des dels nuclis de

població. Aquests nous contaminants ambientals es coneixen com a “*contaminants emergents*”, i en la seva majoria no estan considerats per cap legislació i es desconeixen els possibles efectes sanitaris i ambientals.

Referent a legislació, els contaminants ambientals es classifiquen en tres grups segons del seu estat regulador [3]:

- **Contaminants *convencionals* *prioritaris*:**

S'inclouen els contaminants com el plom, benzè, DDT, PCBs, etc., reconeguts des de fa temps com a perillosos per a la salut humana a causa de la seva toxicitat aguda, els efectes cancerígens i mutàgens que poden provocar i la seva persistència en el medi ambient.

- **Contaminants *nous*:**

En aquesta categoria es troben principalment els compostos disruptors endocrins, els quals s'han incorporat a les llistes reguladores recentment i els seus efectes adversos i el comportament ambiental es troba en fase d'avaluació.

- **Contaminants *emergents* o *no regulats*:**

S'hi troben els fàrmacs (antibiòtics d'ús humà i veterinari, analgèsics i antiinflamatoris no esteroídics, antiepilèptics, reguladors de lípids en sang, antidepressius, antisèptics, antineoplàsics, β -bloquejants, agents de diagnòstic, esteroides i hormones) i els productes de cura personal (antisèptics, fragàncies i essències, protectors solars, surfactants, additius i desinfectants). Els fàrmacs i els productes de cura personal s'agrupen sota el nom de PPCPs (*Pharmaceuticals and Personal Care Products*). Aquests contaminants no han rebut prou atenció i encara es disposa de poques dades, per tant, es fa difícil avaluar el risc que suposa la seva presència en el medi.

El creixent interès per aquests contaminants emergents es deu a que són compostos l'abocament dels quals suposa un problema sanitari i ambiental que encara no està

suficientment investigat, ni regulat legalment. Generalment es tracta de compostos relativament polars i solubles en aigua, pel que són capaços de penetrar a cada una de les etapes del cicle de l'aigua, plantejant un seriós perill per a les xarxes de subministrament. No són un grup de contaminants particularment persistents, ja que són susceptibles a patir processos de transformació, tot i que per exigències del seu propi disseny són compostos relativament poc biodegradables, no obstant, no necessiten una gran estabilitat química per desenvolupar els seus efectes negatius, ja que són objecte d'un abocament constant i per aquest motiu es poden considerar com a persistents.

Tot i no conèixer exactament el nombre de fàrmacs utilitzats, l'interès social i científic per l'impacte negatiu d'aquests productes sobre medi ambient es pot valorar a través de la multitud de bibliografia que es publica constantment sobre aquesta temàtica, per les conferències i congressos que es duen a terme i pels estudis de gran magnitud sobre l'evolució dels fàrmacs dins l'ambient aquàtic en àrees geogràfiques concretes.

L'origen dels fàrmacs en el medi és molt divers i pot provenir tan del consum humà com de l'ús veterinari. Les **Figures 1.1 i 1.2** representen els dos casos esmentats:

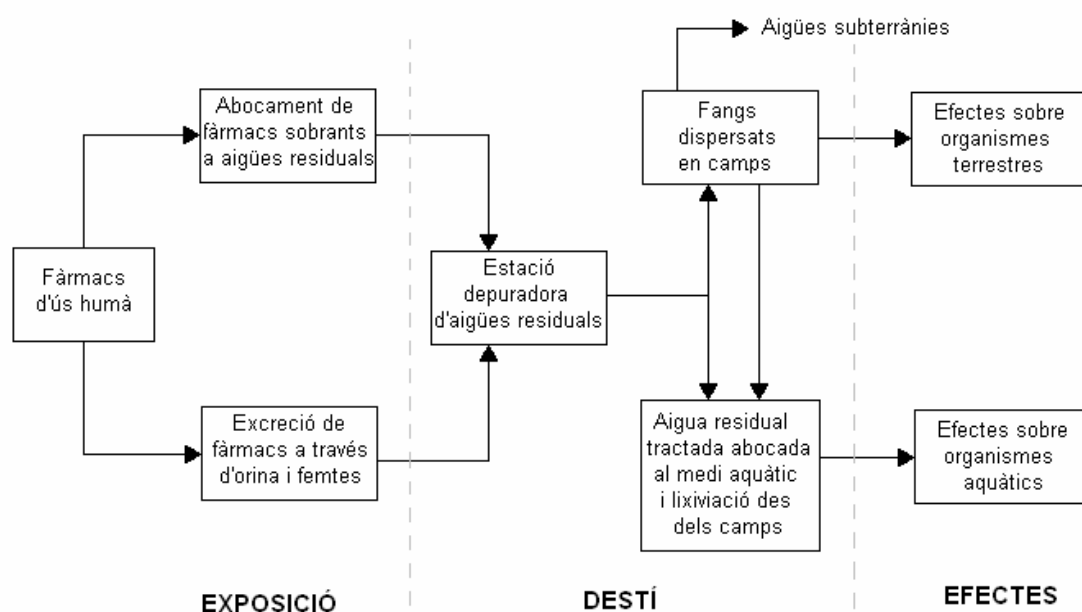


Figura 1.1. Exposició, destí i efectes dels fàrmacs de consum humà en el medi ambient [4].

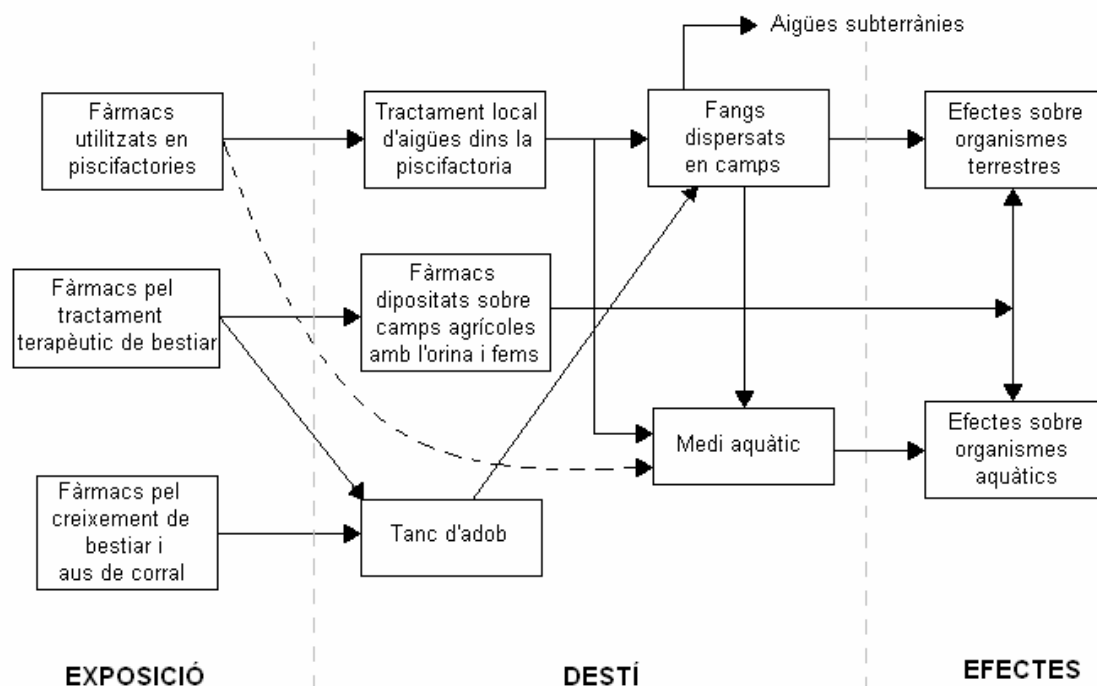


Figura 1.2. Exposició, destí i efectes dels fàrmacs de consum veterinari en el medi ambient [4].

L'excreció animal és una font d'origen molt important. Molts fàrmacs d'ús veterinari finalitzen en adobs i poden arribar a les aigües subterrànies perquè donades les seves característiques hidròfiles, no queden retinguts en el sòl. Aquesta mateixa situació es pot presentar quan els llots generats a les depuradores, que poden contenir fàrmacs no biodegradables, s'utilitzen com a fertilitzants. Les piscifactories són també un origen important degut a que els fàrmacs s'alliberen directament en el medi aquàtic.

Les diferents vies d'introducció al medi es poden resumir en els següents punts [5]:

- Excreció humana i animal dels fàrmacs.
- Fàrmacs caducats o no utilitzats abocats directament a les aigües residuals.
- Aigües residuals d'indústries farmacèutiques.
- Instal·lacions sèptiques i EDARs.
- Aquicultura (piscifactories).
- Fàrmacs utilitzats en el control de plagues.
- Residus hospitalaris.
- Residus sòlids.

El control d'aquests contaminants resulta particularment difícil a causa de la gran diversitat del seu origen que va des dels residus domèstics, hospitalaris i industrials fins als abocaments procedents de l'activitat agrícola i ramadera. La presència en el medi de substàncies amb activitat biològica depèn de les seves velocitats d'emissió i de degradació, que es pot produir tant al sòl com en el medi aquós mitjançant reaccions fotoquímiques o per l'acció de microorganismes capaços de metabolitzar-los.

L'ús dels compostos farmacèutics és molt ampli i dispers tant pel que fa a la distribució geogràfica com a les activitats en què s'apliquen. Es fa difícil fer una estimació quantitativa de l'ús d'aquests compostos ja que comercialment es troben fàrmacs d'àmbit humà i veterinari tant de prescripció mèdica com de venda lliure, i els informes de producció i consum generalment són confidencials. L'any 1993 es van produir 559 000 tones de fàrmacs a Alemanya. Al 1997, la despesa per càpita en fàrmacs als Estats Units va ser de 319 dòlars, per darrera de Bèlgica, Japó i França, que estaven entre 321 i 351 dòlars [6]. Entre els països europeus existeix un debat constant sobre l'augment de la despesa farmacèutica i la necessitat d'harmonitzar i regular el mercat de fàrmacs dins la Unió Europea. Espanya és un dels països amb un dels percentatges més grans de despesa econòmica sobre el total del cost sanitari públic (19% l'any 1996). Entre el 1986 i el 1996, la cost per càpita del consum total farmacèutic va augmentar de 52.7 a 99.7 € per habitant [7].

Els medicaments són compostos dissenyats precisament per la seva activitat biològica i farmacològica, que es prenen amb certa freqüència i que s'acaben alliberant al medi en grans quantitats mitjançant l'excreció dels fàrmacs no metabolitzats a través de l'orina i de la femta, pel que arriben a les aigües residuals i és aquí on comencen els problemes ja que s'introdueixen en el medi aquàtic. Cal destacar que una part molt important de la presència d'aquestes substàncies al medi és deguda als residus de processos de producció [8] i a una falta d'educació sanitària. Una quarta part de la població europea llença els fàrmacs no utilitzats o caducats directament al clavegueram, contribuint a que els abocaments d'aquests contaminants emergents siguin en l'actualitat un gran problema de contaminació ambiental [9]. Només cal que alguns dels fàrmacs tinguin

efectes adversos sobre la salut humana i sobre les espècies aquàtiques per que sigui necessari evitar aquesta eliminació incontrolada.

S'esperaria que els fàrmacs presents a les aigües residuals s'eliminessin a les estacions depuradores d'aigües residuals (EDARs), però en l'actualitat s'està posant de manifest que els tractaments convencionals que s'apliquen no són capaços d'eliminar completament aquest tipus de contaminants i tampoc els seus productes de transformació, provocant que els efluent de les EDARs es considerin com a una de les principals fonts d'introducció d'aquest tipus de contaminants emergents al medi aquàtic, junt amb les aigües residuals urbanes no tractades. D'aquesta manera els fàrmacs passen directament de les depuradores als rius, afectant l'ecosistema i col·laborant a que els nivells en el medi s'incrementin cada vegada més [9].

Alguns dels fàrmacs més representatius trobats en efluent de depuradores són antibiòtics, antiinflamatoris, reguladors de lípids i antiepilèptics. Els compostos que es venen sense recepta com els analgèsics i els antiinflamatoris, són els que es troben a les aigües amb una concentració més elevada, igual que l'àcid clofíbric, un regulador del colesterol [10]. En anys recents, s'ha escrit molt sobre la detecció de la presència de fàrmacs en efluent d'EDARs, en alguns casos per exemple, els nivell de concentració han arribat fins a 1.5 µg/L pel naproxè i 85 µg/L per l'ibuprofè, suposant percentatges d'eliminació inferiors al 20% [2].

S'han elaborat varis estudis per determinar l'eficiència d'eliminació de compostos farmacèutics en EDARs americanes i europees. En tots els casos, les concentracions detectades tant a l'entrada com a la sortida de les EDARs són de l'ordre de ppb. Com a exemple americà, Paul M. Thomas i Gregory D. Foster [11] van realitzar un seguiment a través dels processos de tractament d'una estació depuradora d'aigües residuals per concretar el percentatge i els mecanismes d'eliminació dels contaminants que tenen lloc a cada un d'ells. Al llarg del procés de tractament d'aigües es va fer el seguiment de cinc fàrmacs (ibuprofè, diclofenac, naproxè, ketoprofè i àcid mefenàmic) i es van

utilitzar com a traçadors un estimulants nerviós (cafeïna) i un agent antimicrobiològic que es troba en els sabons (triclosan).

A Europa es pot destacar un estudi de científics suïssos [12] que van determinar el comportament i el destí de sis fàrmacs (carbamazepina, àcid clofíbric, diclofenac, ibuprofè, ketoprofè i naproxè) en les aigües superficials corresponents als efluent de tres EDARs, a dos rius i al llac suís Greifensee, els quals reben directament els efluent de aquestes EDARs.

Ja dins d'Espanya, l'equip de J.L. Santos [2] van proposar una metodologia analítica per determinar simultàniament cinc antiinflamatoris (acetaminofen, diclofenac, ibuprofè, ketoprofè i naproxè), un antiepilèptic (carbamazepina), i un estimulants nerviós (cafeïna) per una anàlisi rutinària d'aquests fàrmacs en les aigües residuals d'entrada i de sortida de quatre EDARs de Sevilla.

Durant els últims anys, s'han identificat nombrosos compostos farmacèutics i els seus metabòlits tant en aigües residuals com en rius i altres corrents superficials, fins i tot s'han pogut detectar quantitats petites, però significatives, de compostos farmacèutics en aigües potables tractades [1, 13]. Avui dia els fàrmacs s'han convertit en substàncies cada vegada més presents en les aigües dels grans rius. Es calcula com a terme mitjà, que a l'aigua residual es troben més de 20 fàrmacs de diferent composició segons el país.

Com a exemple de la detecció de fàrmacs en aigües de Catalunya, es pot citar el cas de l'Ebre [10], en que un estudi del CSIC (Consell Superior d'Investigacions Científiques) va donar l'alerta l'any 2005 quan van rastrejar residus farmacèutics al llarg de 18 punts del riu Ebre i en tots es van detectar restes de fàrmacs. En les aigües del riu es va trobar una llarga llista de compostos farmacèutics com antiinflamatoris i analgèsics (ibuprofè, ketoprofè, naproxè, indometacina, diclofenac i àcid mefenàmic), reguladors de lípids (àcid clofíbric, gembibrozil i bezafibrate), antibiòtics (azitromicina, eritromicina, sulfametoxazol, trimetoprim, ofloxacina), reguladors del colesterol (mevastatina,

pravastatina), beta-bloquejadors (atenolol, sotalol, metoprolol, propanolol), fàrmacs d'ús psiquiàtric (carbamazepina, fluoxetina, paroxetina); antihistamínics (famotidina, ranitidina, loratadina) i agents pel tractament d'úlceres (lansoprazol). Barceló i el seu equip van analitzar les aigües d'entrada i de sortida de les EDARs de les ciutats més properes al riu. En totes elles van aparèixer restes dels antiinflamatoris naproxè i ibuprofè. Altres principis actius com el ketoprofè, el diclofenac, el gemfibrozil i el bezafibrate van ser detectats en el 86% de les mostres, seguits d'un 71% de l'àcid mefenàmic.

Pel que fa a aquest tipus de contaminants, la situació a Espanya és comparable a la d'altres països europeus. Tot i que és el setè país del món pel que fa a consum de fàrmacs i l'envelliment progressiu de la població no ajuda a reduir-ne els residus, les concentracions detectades i el percentatge d'eliminació dels compostos coincideixen amb els determinats en varies EDARs europees [9].

Les concentracions d'aquests residus de moment no suposen un risc per a la salut humana. Per exemple, l'antiinflamatori ibuprofè es sol dispensar en dragees de 400 mg, i segons el citat treball de l'Ebre elaborat pel CSIC, la màxima concentració d'ibuprofè trobada a l'efluent d'una depuradora és de 3 µg/L, l'equivalent a 0,003 mg per litre, molt per sota del contingut habitual d'un comprimit, però el que preocupa als experts és que a cada litre d'aigua no només hi pot haver ibuprofè sinó que s'hi afegeixen molts altres fàrmacs que poden interaccionar entre ells [14].

Els fàrmacs han estat dissenyats per ser altament actius i específics dins del cos dels humans, per la qual cosa una vegada s'han introduït al medi poden interactuar amb els sistemes biològics de multitud d'organismes. No existeixen dades concretes sobre el risc d'exposició perllongada a compostos solubles en aigua amb activitat farmacològica, encara que és raonable suposar que en un futur puguin afectar particularment a certs grups vulnerables, com nens o persones amb deficiències enzimàtiques.

Fins dates molt recents els fàrmacs només s'estudiaven en termes de salut humana, sense donar cap tipus d'importància ambiental a la seva entrada al medi ambient i al potencial impacte que poden provocar sobre aquest degut al ràpid progrés de la indústria farmacèutica. Es troba disponible una àmplia informació sobre estudis dels efectes dels fàrmacs en humans i en altres mamífers durant les fases de desenvolupament i posterior registre, però hi ha una gran falta d'informació ecotoxicològica i de la rellevància que presenten aquests fàrmacs en el medi ambient. La pròpia activitat biològica d'aquests compostos suggereix la possibilitat d'efectes importants fins i tot a dosis molt reduïdes, però mantingudes durant un llarg temps que poden provocar un efecte acumulatiu dins l'ecosistema.

Encara que la concentració dels medicaments de moment sigui innòcua pels éssers humans, com ja s'ha comentat, és susceptible de provocar danys renals i hepàtics en certs organismes sobretot els més joves, com és el cas del diclofenac [9]. S'ha demostrat que l'ús veterinari del diclofenac en alguns països com la Índia ha provocat una important disminució de les poblacions de voltors, esdevenint un important desastre ecològic ja que es tracta d'una espècie en perill d'extinció. Els voltors desenvolupaven malalties renals, un conegut efecte secundari del diclofenac, degut a la ingesta d'un gran nombre de cadàvers d'animals els quals se'ls havia tractat amb aquest compost. El govern de la Índia després de moltes disputes, va anunciar la retirada de l'ús veterinari del diclofenac substituint-lo per meloxicam, un fàrmac antiinflamatori que no provoca aquests efectes als voltors [15]. La pèrdua de desenes de milions de voltors durant la última dècada ha tingut conseqüències ecològiques importants al continent indi que plantegen una amenaça potencial per la salut humana. En molts indrets, les poblacions de gossos salvatges, corbs i altres animals carronyers s'han beneficiat de la desaparició dels voltors de *Gyps* convertint-se ara en consumidors dels cadàvers d'animals salvatges i domèstics. L'increment de la població dels gossos salvatges s'associa al risc creixent de casos de ràbia en humans. El declivi de la població de voltors també ha provocat un impacte social en algunes comunitat que oferien els cossos humans a aquests animals per fer els "enterraments del cel" i ara han hagut de buscar vies alternatives [16].

Una de les prioritats actuals és descobrir com afecta als organismes aquàtics i de forma indirecta, a la salut humana. Una de les principals preocupacions és l'exposició constant dels microorganismes de l'ecosistema als antibiòtics que pot generar patògens resistents a aquests fàrmacs, posant en perill el tractament a futures infeccions. No menys importants són els efectes, encara difícils de preveure, que tenen els residus de les píndoles anticonceptives i de les teràpies hormonals, les quals segueixen actives al arribar al medi aquàtic i poden alterar el sistema endocrí dels organismes. La seva perillositat es deu a la inherent capacitat disruptora endocrina produïda per l'emissió d'hormones, les quals provoquen nombrosos desordres reproductius sobre els éssers vius exposats a les aigües contaminades per aquests productes. Diversos estudis han fet evident l'existència de peixos amb signes d'intersexualitat amb coexistència de l'òrgan masculí i femení simultàniament impeding la seva reproducció [14]. En aquest cas, el fenomen no es pot atribuir només als fàrmacs, sinó que és l'efecte combinat de contaminants d'origen divers. A les hormones femenines sintètiques se'ls unien les hormones naturals, com la progesterona o l'estradiol que en les aigües residuals de grans ciutats arriben a nivells molt elevats, i els contaminants d'origen industrial com el nonilfenol, que imiten les hormones femenines. També és conegut que determinats compostos farmacèutics afecten al sistema endocrí encara que originalment no hagin estat dissenyats amb aquesta finalitat, incloent-se dins del grup de disruptors endocrins que engloba totes les substàncies capaces d'interferir en el sistema hormonal. Varis autors sostenen també una relació d'aquests tipus de contaminants amb l'augment de la incidència de certs tumors [8].

Segons altres estudis, el fàrmac antiepilèptic carbamazepina, suposa un risc pels crustacis, i el β -bloquejador propranolol produeix efectes negatius en el creixement del peix Medaka, una espècie asiàtica d'aigua dolça [9, 10]. Aquests tan sols són alguns de la multitud de casos existents. Per la gran majoria de substàncies no esmentades no es pot dir que no siguin perjudicials, sinó que encara no s'han definit clarament les conseqüències que comporta la seva presència en el medi.

Tot i que de moment aquests fàrmacs que hi ha en l'aigua no suposen un risc immediat per a les persones, als experts els preocupa el seu efecte a mitjà i llarg termini. Per tots aquest motius, seria convenient realitzar estudis d'avaluació de risc ambiental combinant la perillositat amb la possibilitat d'exposició i basant-se en les concentracions que es poden predir i en dades de laboratori. Els nivells de concentració mesurats són indispensables per obtenir dades reals, així com detalls de l'evolució dels fàrmacs en diferents compartiments mediambientals.

1.2. ELS COMPOSTOS.

S'estudien sis fàrmacs de caràcter polar àmpliament consumits entre els quals hi ha antiinflamatoris, analgèsics, antiepilèptics i un estimulant nerviós. Els fàrmacs en qüestió són:

- Antiinflamatoris i analgèsics: *diclofenac*, *ibuprofè* i *naproxè*.
- Regulador de lípids: *àcid clofibrí*.
- Antiepilèptic: *carbamazepina*.
- Estimulant nerviós: *cafeïna*.

S'han escollit aquests compostos per la disponibilitat d'una metodologia analítica per la seva determinació i, com ja s'ha comentat anteriorment, per la seva detecció en efluent de diferents depuradores, d'acord amb el seu gran volum de producció i el seu ús generalitzat. Com exemple, el consum a Alemanya és d'aproximadament unes 100 tones anuals tant per l'ibuprofè com la carbamazepina i de 16 tones anuals per l'àcid clofibrí [13]. La cafeïna en aquest estudi s'utilitza també com a traçador de les aigües residuals, ja que a part de ser un fàrmac és una de les substàncies més consumides en el món, que es pot trobar en menjar, refrescos i condiments entre altres productes.

L'estructura química dels compostos defineix gran part de les seves propietats entre les quals destaquen el comportament al medi, la possibilitat de degradació dins de l'organisme i al medi natural i també aspectes com la possibilitat d'adsorció al sòl o al fang de depuradora.

Bàsicament, els mecanismes d'eliminació dels fàrmacs dins dels processos de depuració de les EDARs són l'adsorció als fangs i la degradació mitjançant processos físics o microbiològics. Aquests mecanismes es poden intuir a través de l'anàlisi de propietats químiques dels compostos com el pK_a , el $\log K_{ow}$ i la solubilitat, comentades breument a continuació:

- El pK_a indica en quin estat es trobarà l'espècie a un pH donat. Amb valors de pH inferiors al pK_a , l'espècie estarà en forma protonada, en canvi, amb valors superiors l'espècie estarà en forma iònica, desprotonada.
- El *coeficient de partició octanol/aigua* (K_{ow}) mesura la concentració d'equilibri d'un compost orgànic entre una fase orgànica i una fase aquosa. S'ha convertit en un paràmetre clau en estudis ambientals sobre contaminants químics orgànics. Té relació amb la solubilitat de l'aigua, els coeficients d'adsorció en el sòl, i amb factors de bioconcentració de la vida aquàtica. Està inversament relacionat amb la solubilitat d'un compost a l'aigua i estableix el potencial de partició dins d'un sòl orgànic. Mesura la hidrofobicitat i indica si el compost pot migrar a la fase orgànica immiscible. Un K_{ow} elevat indica que és més probable que el compost s'adsorbeixi a un sòl orgànic a que es dissolgui a l'aigua. Els compostos amb un k_{ow} inferior a 10 són relativament hidrofílics i tendeixen a tenir una alta solubilitat en aigua, baixos coeficients d'adsorció sòl/sediment i baixos factors de bioconcentració a ambients aquàtics. Contràriament, compostos amb valors de K_{ow} superiors a 10^4 són molt hidrofòbics i tendeixen a acumular-se a les superfícies orgàniques com el sòl húmic i en espècies aquàtiques.

- La *solubilitat* mesura la capacitat d'una determinada substància per dissoldre's en un líquid. El caràcter polar o apolar de la substància influeix molt, ja que a causa d'això, la substància serà més o menys soluble. La solubilitat d'una substància depèn de la naturalesa del dissolvent i del solut, així com de la temperatura i la pressió del sistema.

Tot seguit es detallen les característiques, propietats, el mecanisme d'acció i altres dades d'interès de cada un dels compostos analitzats.

1.2.1. CAFEÏNA.

Nom científic: 1,3,7-trimetilxantina

Fórmula molecular: $C_8H_{10}N_4O_2$

pH: 5.5 - 6.5 a 10 g/L a 20°C

Pes molecular: 194.19 g mol⁻¹

Solubilitat: Solubilitat en aigua: 21.7 g/L

No és soluble en casi cap dissolvent orgànic, encara que té un alt grau de solubilitat en cloroform.

Punt de fusió: 232 °C

Punt de sublimació: 178 °C

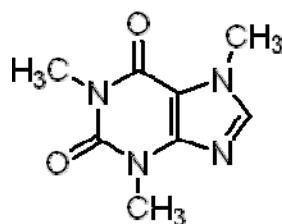
pKa: 10.4 (40 °C)

Log Kow: -0.07 [11]

Funció: Estimulant cardiovascular i del sistema nerviós central.

Nº registre CAS: 58-08-2

Estructura química:



La cafeïna és una xantina d'origen natural utilitzada com estimulants directe i moderat del sistema nerviós central, del sistema respiratori i del sistema cardiovascular. Va ser descoberta l'any 1819 per Rugeix i descrita el 1821 per Pelletier i Robiquet. En estat pur és una pols blanca molt amarga. Altres derivats xantínics inclouen la teofilina, que comparteix algunes de les seves propietats i s'utilitza àmpliament en el tractament de malalties pulmonars tot i que és molt més potent que la cafeïna, i la teobromina, un dels compostos del cacau i de la xocolata.

En general, la cafeïna es troba a les llavors, a les fulles, i als fruits de més de 60 plantes en les quals actua com a pesticida natural, paralitzant i matant certes classes d'insectes quan es volen alimentar d'aquestes. La cafeïna és el principal alcaloide de la *Coffea*, planta típica del cafè, i del *cacahuatl* o cacau, planta a partir dels grans de la qual s'elabora la xocolata. Pel que fa al te sol haver una confusió perquè l'any 1827 al ser aïllat el seu principi actiu va rebre el nom de teïna. Anys més tard una anàlisi molecular va permetre descobrir que la teïna era en realitat cafeïna. Aquest alcaloide també es troba present a l'herba mate i a la nou de kola, usada per a preparar les begudes de cola.

La cafeïna és un estimulants del sistema nerviós central que actua després de 5 minuts de la seva ingestió. Es distribueix ràpidament a tots els teixits corporals i creua fàcilment la barrera hematoencefàlica i placentària. Un 36% aproximadament s'uneix a les proteïnes del plasma. Es metabolitza parcialment en el fetge mitjançant reaccions de desmetilació. Els metabòlits principals són la 1-metilxantina i la 7-metilxantina.

Els símptomes del consum de cafeïna són insomni, nerviosisme, excitació, problemes gastrointestinals, augment del flux sanguini renal i diüresi moderada. En algunes persones els símptomes apareixen consumint quantitats petites de 250 mg per dia. Més enllà d'un gram al dia pot produir contraccions musculars involuntàries, arítmia cardíaca i agitacions psicomotrius. Les intoxicacions amb cafeïna són poc freqüents. Grans dosis especialment quan són consumides per persones no habituades o

sensibles, poden produir símptomes semblants als del pànic i ansietat generalitzada amb mals de cap, taquicàrdia, convulsions i eventualment deliris.

Clínicament la cafeïna es pot administrar per via oral o intravenosa. Com a usos terapèutics es ven sota diverses marques comercials com Cafeaspirina® i Saridón® amb píndoles estimulants de fins a 200 mg. L'ús terapèutic de la cafeïna no requereix recepta mèdica per a la seva compra.

Per la seva capacitat per estimular la respiració, es recomana el seu consum com antídota per a la depressió respiratòria en sobredosi d'heroïna i altres psicoactius opiàcids. També es comercialitza en productes utilitzats per a tractar el mareig o la obesitat.

Mentre que les respostes clíniques a la cafeïna són ben conegudes, els mecanismes cel·lulars són bastant incerts. Es creu que a altes concentracions la cafeïna interfereix la captació i l'emmagatzematge de calci pel reticle sarcoplàsmic del múscul estriat. Aquesta acció explicaria els efectes de la cafeïna sobre el múscul cardíac i esquelètic. Actualment es coneix que les xantines actuen com antagonistes dels receptors d'adenosina provocant l'alliberament de neurotransmisors, el que explicaria els efectes estimulants.

Un alt percentatge de la cafeïna passa sense alterar-se a través del cos humà i s'elimina a través de l'orina varies hores després del seu consum. Com a conseqüència, grans quantitats d'aquesta substància arriben a les plantes de tractament d'aigües residuals. La cafeïna es pot considerar com una de les substàncies psicoactives més àmpliament consumides en el món, per aquest motiu, la seva presència a les aigües és un evident indicador d'influències antropogèniques.

La mitjana de consum global segons James [17] és de 70 mg per persona i dia encara que varia àmpliament segons el país, per exemple, a Austràlia l'any 1995 es van

consumir entre 190 i 410 mg de cafeïna per persona i dia. A Amèrica del Nord el 90% dels adults consumeixen cafeïna a diari [18].

La cafeïna és consumeix a través d'aliments, refrescos, condiments, tabac i medicaments. Les begudes que contenen cafeïna, com el cafè, te, refrescs de cola i begudes energètiques tenen una gran popularitat. Per tenir una idea de les quantitat de cafeïna que es pren diàriament la **Taula 1.1** dona a conèixer la quantitat que conté cada un dels productes més consumits:

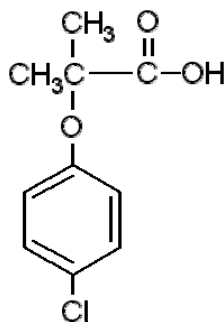
<i>Producte</i>	<i>Contingut de cafeïna (mg)</i>
Tassa de cafè:	60-120
Tassa de cafè exprés:	100
Tassa de cafè descafeïnat:	2-4
Tassa de te:	10-90
Tassa de xocolata:	50-70
Barra de xocolata de 200 gr:	20-60
Begudes de cola:	30-50 (per cada 250 mL)
Píndoles d'ús terapèutic:	30-65

Taula 1.1. Contingut de cafeïna en els productes més consumits [1, 20].

L'ésser humà no requereix del consum de cafeïna dins la seva dieta, no obstant, el seu consum moderat no està associat amb cap risc per a la salut. Tres tasses de cafè de 235 ml (250 mg de cafeïna) per dia, es consideren una quantitat moderada de cafeïna i 10 tasses de 235 ml es consideren un consum excessiu. El consum continuat de cafeïna pot provocar dependència física. En la literatura mèdica es consigna que dosis majors als 350 mg diaris de cafeïna consumits durant un mes poden provocar l'aparició d'una síndrome d'abstinència, pel que en usos terapèutics els metges recomanen reduir gradualment el consum. La síndrome es manifesta per irritació, cansament, depressió i somnolència. No és greu i desapareix en pocs dies.

1.2.2. ÀCID CLOFÍBRIC.

Nom científic:	Àcid 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropionic
Fórmula molecular:	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃
Pes molecular:	214.65 g mol ⁻¹
Solubilitat:	Solubilitat en aigua (20°C) : 582.5 mg L ⁻¹
Punt de fusió:	120-122 °C
pKa:	2.84 [13], 3.18 [21]
Log Kow:	2.57 [12], 2.84 [13]
Constant Henry:	2.19·10 ⁻¹⁸ atm m ³ mol ⁻¹ [12]
Funció:	Metabòlit actiu de fàrmacs reguladors de lípids en sang.
Nº de registre CAS:	882-09-7
Estructura química:	



L'àcid clofíbric és un metabòlit actiu dels fàrmacs clofibrat, etofibrat i etofyllineclofibrat, àmpliament utilitzats com a reguladors de lípids en sang amb altes dosis terapèutiques (1-2 grams per persona i dia). Els tres compostos s'utilitzen per reduir la concentració plasmàtica de colesterol i triglicèrids.

En l'àmbit de l'agricultura, s'utilitza com a antiauxina, un fitoregulador que inhibeix i retarda del creixement o floració d'algunes plantes.

Entre el 95 i el 99% d'una dosi oral de clofibrat s'excreta a través de l'orina com àcid clofíbric lliure i conjugat. L'àcid clofíbric s'uneix en un 95-97% a les proteïnes. La vida mitjana de l'àcid clofíbric es d'entre 18 i 22 hores, però pot variar fins a 7 hores en la mateixa persona en moments diferents.

1.2.3. CARBAMAZEPINA.

Nom científic: 5H-dibenzè [b, f] azepina-5-carboxamida

Fórmula molecular: $C_{15}H_{12}N_2O$

Pes molecular: $236.27 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilitat: Baixa solubilitat en aigua 0.23 mg mL^{-1}

Punt de fusió: $191\text{-}192 \text{ }^{\circ}\text{C}$

pKa: 7.00

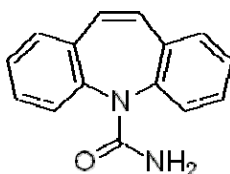
Log Kow: 2.45 [12, 13]

Constant Henry: $1.08 \cdot 10^{-10} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ [12]

Funció: Antiepilèptic, antineuràlgic i antipsicòtic.

Nº registre CAS: 298-46-4

Estructura química:



La carbamazepina pertany al grup de fàrmacs anomenats anticonvulsius, estructuralment semblant als antidepressius tricíclics que redueixen l'excitació anormal en el cervell. Va ser descoberta l'any 1953 pel químic Walter Schindler, que va sintetitzar el fàrmac l'any 1960. Les característiques antiepilèptiques del fàrmac es van descobrir posteriorment.

S'utilitza sola o en combinació amb altres medicaments per tractar crisis convulsives en pacients amb epilèpsia. També és efectiva en el tractament del dolor dels nervis facials que provoca la neuràlgia del trigemin. Les càpsules d'alliberament lent de carbamazepina s'usen per tractar els pacients amb trastorn bipolar que pateixen episodis de mania amb excitació anormal o estat d'ànim irritable i episodis mixts amb símptomes de mania i depressió que ocorren al mateix temps. També es pren pel tractament de l'esquizofrènia i els desordres psiquiàtrics com la mania depressiva i la conducta agressiva que es produeix de vegades en la demència senil.

La carbamazepina és un fàrmac lipofílic que travessa la barrera hematoencefàlica i es troba present en quantitats significatives en el líquid cefaloraquidi, bilis, fluids duodenals i saliva. Pot travessar la barrera placentària i acumular-se en el fetus. S'uneix a proteïnes plasmàtiques en un 70-80%. La concentració del compost inalterat en líquid cefaloraquidi i saliva reflecteix la porció no unida a proteïnes en el plasma (20-30%). La vida mitja d'eliminació de la carbamazepina inalterada és de 36 hores després d'una dosi oral i de 16-24 hores després de dosis repetides. Amb l'administració d'una dosi oral única de 400 mg de carbamazepina el 72% és excretat en l'orina i el 28% en la femta. En l'orina aproximadament 2% de la dosi es recupera sense canvi i al voltant del 1% es transforma en el metabòlit farmacològicament actiu 10,11-epòxid. Altres vies importants de biotransformació per a la carbamazepina impliquen diversos compostos monohidroxilats com la N-glucurònid de carbamazepina.

La carbamazepina evita el cúmul excessiu, ràpid i repetitiu dels impulsos elèctrics que sobreestimulen el cervell i alteren el seu funcionament. Estabilitza l'activitat nerviosa elèctrica del cervell prevenint atacs i mantenint l'activitat cerebral normal.

Els efectes secundaris més freqüents particularment en la fase inicial de tractament són marejos, somnolència, malestar estomacal, vòmits, debilitació de la coordinació motora i pèrdua de cèl·lules de sang i de plaquetes. Altres efectes sobre el sistema nerviós central inclouen visió borrosa, confusió, cefalees, fatiga i al·lucinacions visuals. Les més greus i freqüents es refereixen al sistema hematològic, al fetge, la pell i al sistema cardiovascular. S'ha de tenir en compte que una retirada brusca del medicament pot desembocar en un augment de les crisis epilèptiques fins i tot un estat epilèptic potencialment fatal. No hi ha cap evidència que la carbamazepina produeixi addicció ni dependència física o psicològica.

L'ús terapèutic en humans es realitza mitjançant l'administració per via oral. Amb una dosi oral de 400 mg les concentracions plasmàtiques màximes s'assoleixen entre les 4 i 5 hores posteriors. En l'estat d'equilibri, que s'arriba després de varis dies, les fluctuacions dels nivells plasmàtics són mínimes.

Farmacèuticament es troba en comprimits de 200 i 400 mg i emulsions de 100 mg per cada 5 mL. El nom comercial de la carbamazepina és el Tegretol®, tot i que també existeixen formes genèriques. Com a terme mig depenent de la malaltia es consumeix d'entre 200-400 mg/dia per pacient. Degut a una major eliminació de la carbamazepina els nens poden necessitar dosis més elevades que els adults.

1.2.4. DICLOFENAC

Nom científic: Sal sòdica àcid 2-[(2,6-diclorofenil)amino]benzoacètic

Fórmula molecular: $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$

Pes molecular: $318.13 \text{ g mol}^{-1}$

Punt de fusió: $275\text{-}277^\circ\text{C}$

pKa: 4.15 [12]

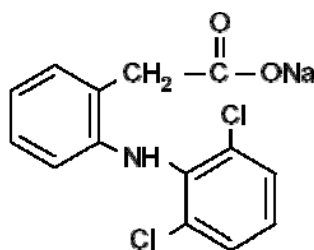
Log Kow: 4.51 [12]

Constant Henry: $4.73 \cdot 10^{-12} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ [12]

Funció: Analgèsic, antiinflamatori.

Nº registre CAS: 15307-79-6

Estructura química:



El diclofenac és un antiinflamatori no esteroídic (AINE) utilitzat per reduir inflamacions i com analgèsic, reduint des de dolors provocats per ferides lleus fins a dolors intensos com els de l'artritis. Es troba al mercat com àcid lliure, sal sòdica i sal potàssica. A la majoria dels països es subministra en forma de potassi, tot i que al Regne Unit, Mèxic, Estats Units i Espanya es troba com a sal de sodi.

Els antiinflamatoris no esteroïdals (AINE) són substàncies químiques amb efecte antiinflamatori, analgèsic i antipirètic amb efectes semblants als dels corticoides, però sense les conseqüències secundàries.

El diclofenac s'utilitza per a tractar els dolors múscul-esquelètics, especialment artritis, atacs de gota i alleugeriment del dolor causat per càlculs renals i vesiculars. Una indicació addicional és el tractament de les migranyes agudes. També s'utilitza regularment per tractar el dolor lleu i moderat posterior a la cirurgia o després d'un procés traumàtic, particularment quan hi ha inflamació. El fàrmac és efectiu contra el dolor menstrual. Existeixen també presentacions amb llicència per vendre sense recepta per a emprar-se contra dolors lleus i febre associada amb infeccions comuns.

L'ús de diclofenac a llarg termini, igual que els altres AINEs, predisposen l'aparició d'úlceres pèptiques, pel que molts pacients reben tractament de diclofenac en combinació amb misoprostol, un anàleg sintètic de les prostaglandines que protegeix la mucosa gàstrica en un sol producte.

Els efectes adversos d'aquest medicament són freqüents encara que en general són de caràcter lleu i reversible. Els més freqüents són nàusees i vòmits, indigestió, acidesa, diarrea o restrenyiment, dolor abdominal, mal de cap i marejos. EL diclofenac també pot produir símptomes d'alteració hepàtica com pèrdua d'apetit, picor o icterícia (coloració groga de pell i mucoses) degut a l'augment d'enzims hepàtics. Pot aparèixer una hepatitis sense tenir cap senyal precursor.

El temps d'acció d'una dosi és generalment de 6 a 8 hores. El mecanisme d'acció primari responsable de l'acció antiinflamatòria i analgèsica del diclofenac és la prevenció de la síntesi de prostaglandines a l'organisme, provocada per la inhibició de l'enzim ciclooxigenasa (COX). Les prostaglandines es produeixen com a resposta d'una lesió o de certes malalties i provoquen inflamació i dolor. La inhibició del COX disminueix la producció de prostaglandines a l'epiteli de l'estómac, fent-lo molt més vulnerable a la corrosió per àcids gàstrics, el principal efecte secundari del diclofenac.

El diclofenac està disponible en comprimits, càpsules i supositoris amb concentracions d'entre 50 i 100 mg. Tant en casos lleus d'adults com en tractaments perllongats es recomana administrar entre 75 i 100 mg al dia. La dosi màxima diària inicial en el tractament és d'entre 100 i 150 mg.

Els noms comercials del diclofenac són Di Retard®, Diclofenaco Aldo Union®, Diclofenaco Clariana Pic®, Diclofenaco Lepori®, Diclofenaco Pliva Retard®, Diclofenaco Ratiopharma®, Diclofenaco Rubio®, Dolo Nervobion®, Dolo Voltaren®, Dolotren®, Luase® i Voltaren®. També existeixen formes genèriques comercialitzades de diclofenac.

1.2.5. IBUPROFÈ.

Nom científic: Àcid 2-(4-isobutilfenil)propanoic

Fórmula molecular: $C_{13}H_{18}O_2$

Pes molecular: 206.29 g mol⁻¹

Punt de fusió: 275-277 °C

PKa: 4.31 [13], 4.91 [12]

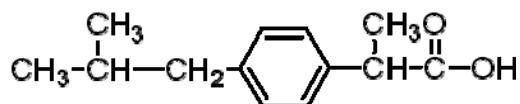
Log Kow: Entre 3.97 i 4.91 segons bibliografia [12, 13]

Constant Henry: 1.5·10⁻¹⁷ atm m³ mol⁻¹ [12]

Funció: Antiinflamatori, analgèsic.

Nº registre CAS: 15687-27-1

Estructura química:



L'ibuprofè és un antiinflamatori no esteroídic (AINE) derivat de l'àcid propiònic que posseeix propietats analgèsiques, antiinflamatòries i antipirètiques.

S'utilitza pel tractament de processos dolorosos d'intensitat lleu i moderada com el dolor dental, el dolor postoperatori, el tractament simptomàtic de la cefalea, l'alleugeriment dels símptomes de la dismenorrea primària i el tractament de lesions de teixits tous com els esquinços. Les indicacions clíniques també inclouen l'ús pel tractament de quadres inflamatoris com els que es presenten en artritis i l'artrosi, la febre i l'alleugeriment del dolor agut i/o crònic associat a una reacció inflamatòria.

L'ibuprofè s'absorbeix ràpidament en el tracte gastrointestinal, presentant-se pics de concentracions plasmàtiques 1-2 hores després de l'administració. La seva vida mitja d'eliminació és d'unes 2 hores aproximadament. S'uneix fortament a les proteïnes plasmàtiques i es metabolitza en el fetge donant lloc a 2 metabòlits inactius que juntament amb l'ibuprofè, s'excreten per via renal com a tals o com a metabòlits conjugats. L'excreció renal és ràpida i completa.

En general és ben tolerat, però ocasionalment es presenten alguns efectes secundaris com mal de cap, mareig, mal de panxa, vòmits, restrenyiment i diarrea. Pot produir gastropatia per AINE, és a dir, úlcera d'estómac i duodè, però es considera que produeix menys mal a l'estómac que altres AINE com l'àcid acetilsalílic, l'aspirina. Les dades epidemiològiques indiquen que dels set antiinflamatoris no esteroïdals més utilitzats, l'ibuprofè posseeix el menor risc de toxicitat digestiva elevada. També s'han detectat reaccions al·lèrgiques, problemes cardiovasculars com l'aparició d'edemes i alguns problemes renals i alteracions hepàtiques.

L'efecte terapèutic, com antiinflamatori no esteroïdal que és, deriva de la seva activitat inhibidora perifèrica de la síntesi de prostaglandines subsegüent a la inhibició de la ciclooxigenasa. Inhibeix la migració leucocitària a les àrees inflamades impedit l'alliberament de citoquines i altres molècules pels leucòcits que actuen sobre els receptors nociceptius. Com altres AINEs, l'ibuprofè no altera el llindar del dolor ni modifica els nivells de prostaglandines cerebrals, concloent-se que els seus efectes són perifèrics.

La posologia s'ha d'ajustar a la intensitat del quadre a tractar, emprant la mínima dosi que produeixi remissió dels símptomes. En adults la dosi per l'ús com antiinflamatori és de 1200-1800 mg/dia administrats en diverses dosis. La dosi total diària no hauria d'excedir de 2400 mg. L'ús com analgèsic, antipirètic i antidismenorreic requereix una dosi de 400-600 mg cada 4-6 hores depenent de la intensitat del quadre i de la resposta al tractament.

L'ibuprofè es troba disponible com a Algiasdin®, Dasly®, Espidifen®, Neobrufen® i Saetil® amb quantitats d'entre 400 i 600 mg.

1.2.6. NAPROXÈ.

Nom científic: Àcid acètic (s)-(+)-6-metoxi-alfa-metil-2-naftalè

Fórmula molecular: $\text{CH}_3\text{OC}_{10}\text{H}_6\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{H}$

Pes molecular: 230,26 g mol⁻¹

Solubilitat: Liposoluble, pràcticament insoluble en aigua amb un pH inferior a 4 i totalment soluble en aigua amb pH superior a 6.

Punt de fusió: 153°C

PKa: 4.15 [12]

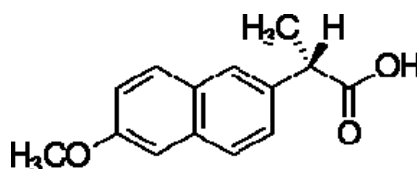
Log Kow: 3.18-3.24 [12]

Constant Henry: $3.39 \cdot 10^{-10}$ atm m³ mol⁻¹ [12]

Funció: Antiinflamatori, analgèsic.

Nº registre CAS: 22204-53-1

Estructura química:



El naproxè és un fàrmac antiinflamatori de la família dels AINE amb un grup àcid arilacètic i amb propietats analgèsiques i antipirètiques. S'utilitza àmpliament per la població en el tractament de dolor suau a moderat, la febre, la inflamació i la rigidesa

provocades per afeccions com la osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriàtica, espondilitis anquilosant, lesions, rampes menstruals, tendinitis i en el tractament de la dismenorrea primària.

Com altres AINE, els efectes secundaris del naproxè són les molèsties gastrointestinals. La seva presa junt amb les menjars pot ajudar a mitigar aquests efectes. També pot inhibir la excreció del sodi i el liti.

El naproxè es va posar a la venda com a medicament amb recepta l'any 1976 sota el nom comercial de Naprosyn®. La sal sòdica es va posar a la venda com Anaprox® l'any 1980. La FDA (*Food and Drug Administration*) nord-americana va aprovar l'any 1994 la venda sense recepta del naproxè sota la marca comercial Aleve®. En molts països, incloent Canadà, continua sent un fàrmac que s'expèn únicament amb recepta mèdica. A Espanya i alguns països iberoamericans es pot obtenir sense prescripció mèdica.

Al desembre de 2004 la FDA va fer públic un comunicat de premsa segons el qual, seguint les recomanacions dels Instituts Nacionals de la Salut nord-americana (NIH), aturava una investigació de cinc anys de durada anomenada "Estudi sobre la prevenció del Alzheimer emprant antiinflamatoris". En aquest estudi s'havien provat l'Astut® i el Celebrex® com a tractament preventiu contra l'Alzheimer, però els primers resultats van indicar que el risc de patir un accident cardiovascular o cerebrovascular augmentaven en un 50%. A causa d'aquest fet la FDA va aconsellar als usuaris que prenen el naproxè sense recepta mèdica que seguissin atentament les instruccions del prospecte, que evitessin ingerir una dosi superior a la recomanada de 200 mg cada dotze hores, i que no prenguessin naproxè durant més de deu dies consecutius a menys que un metge indiqués el contrari.

El fàrmac naproxè es pot administrar com àcid o en forma de sal sòdica. En ambdós casos l'absorció gastrointestinal és completa, encara que la sal sòdica s'absorbeix més ràpidament. Les concentracions màximes de naproxè i de naproxè sòdic s'assoleixen a

les 2-4 hores i a les 1-2 hores respectivament. El fàrmac s'uneix a les proteïnes del plasma en un 99% i per tant té una vida mitjana més llarga en sang que altres analgèsics, arribant fins a 12 hores per dosi. Pot creuar la barrera placentària i excretar-se en la llet materna. Aproximadament el 30% del fàrmac administrat és metabolitzat a 6-desmetil-naproxè, que no té activitat antiinflamatòria. L'eliminació és urinària, eliminant-se el 10% fàrmac sense alterar, el 5-6% en forma de 6-desmetilnaproxè i la resta conjugat o en forma de glucurònids. Només una petita quantitat és eliminada en la femta.

Els efectes antiinflamatoris del naproxè són el resultat de la inhibició perifèrica de la síntesi de prostaglandines com a conseqüència de la inhibició de la ciclooxigenasa. El naproxè inhibeix la migració leucocitària a les àrees inflamades, impedit l'alliberament pels leucòcits de citoquines i altres molècules que actuen sobre els receptors nociceptius. El naproxè no altera el llindar del dolor ni modifica els nivells de prostaglandines cerebrals, els seus efectes són perifèrics. L'antipiresis és conseqüència de la vasodilatació perifèrica a causa d'una acció central sobre el centre regulador de la temperatura de l'hipotàlem. Els efectes inhibidors de la síntesi de prostaglandines tenen el seu costat negatiu en la citoprotecció de la mucosa gàstrica i la funció renal (disminueix el flux renal), així com sobre l'agregació plaquetària.

El naproxè es comercialitza en dosis de 200 i 500 mg sota els noms de Momen®, Naprosyn®, respectivament, i el naproxè sòdic com Aleve® de 275 mg i Antalgin® de 550 mg i es recomana prendre no més de dues dosis diàries.

1.3. DETERMINACIÓ DE FÀRMACS EN AIGÜES.

En els últims anys s'han desenvolupat diferents tècniques i mètodes cada vegada més selectius i amb límits de detecció més baixos per controlar el nivell de contaminació de les aigües.

Les tècniques cromatogràfiques, principalment la *cromatografia de gasos* (GC) i la *cromatografia de líquids d'alta resolució* (HPLC), actualment són unes de les tècniques analítiques més utilitzades per a la separació i quantificació de contaminants orgànics en mostres ambientals. La cromatografia de gasos s'utilitza per a determinar compostos volàtils i tèrmicament estables, en canvi els compostos termolàbils i els polars es determinen habitualment amb cromatografia de líquids per tal d'evitar la derivatització dels anàlits que es requereix. La *cromatografia de fluids supercrítics* (SFC) es pot utilitzar com a tècnica complementària a les tècniques cromatogràfiques en els casos en que aquestes tenen limitacions com en la determinació de compostos termolàbils d'elevat pes molecular i difícilment detectables mitjançant un detector habitual d'HPLC. L'electroforesi capil·lar també s'ha utilitzat en la determinació de contaminants, tot i que el nombre d'aplicacions en el camp ambiental és inferior al de les tècniques cromatogràfiques degut principalment als elevats límits de detecció que presenta.

Generalment les mostres ambientals no es poden analitzar directament amb les tècniques esmentades a causa de que les concentracions dels anàlits acostumen a ser inferiors als límits de detecció de les tècniques. Aquest fet implica una etapa prèvia de tractament de la mostra per preconcentrar els anàlits i eliminar possibles interferències de la matriu. La preparació de la mostra és la part del mètode analític que consumeix més temps i acostuma a ser la més difícil. S'estima que entre el 60 i el 80% del temps i del cost dedicat a tot un mètode analític, es concentra tan sols en el tractament de la mostra.

1.3.1. TRACTAMENT DE LA MOSTRA.

Les tècniques més utilitzades per preconcentrar els compostos orgànics de mostres aquoses són l'extracció líquid-líquid (LLE), l'extracció en fase sòlida (SPE) i més recentment la microextracció en fase sòlida (SPME). Aquestes dos últimes es fonamenten en l'equilibri líquid-sòlid. [22-24]. La mostra també es pot preconcentrar amb membranes líquides suportades (SLM) amb l'avantatge que suposa poder extreure selectivament determinades classes de compostos mentre que altres queden intactes, fet interessant en l'anàlisi de mostres ambientals complexes.

La tècnica de tractament de mostra més utilitzada fins ara ha estat *l'extracció líquid-líquid*, on la mostra (fase aquosa) es posa en contacte amb un dissolvent orgànic immiscible. La seva utilització general es deu a la gran simplicitat, la instrumentació senzilla i l'extensa implementació que ha tingut en mètodes oficials d'anàlisi. No obstant, aquesta tècnica presenta alguns inconvenients com són l'ús de grans volums de solvents orgànics, la formació d'emulsions, el risc de contaminació i de pèrdues d'anàlits volàtils durant les diferents etapes del procés, el temps d'extracció considerable i sovint, la necessitat de dur a terme diverses etapes de concentració dels extractes per arribar al rendiment de preconcentració desitjat [24-26].

La tendència a reduir les quantitats de solvents orgànics que normalment són tòxics, inflamables i cars, ha contribuït a que l'extracció líquid-líquid es substitueixi cada vegada més per l'extracció en fase sòlida.

L'extracció en fase sòlida va ser introduïda com la alternativa a l'extracció líquid-líquid a la dècada dels setanta. Es fonamenta en la retenció selectiva que presenta la fase estacionària sobre els anàlits, de la qual s'elueixen posteriorment mitjançant un solvent. Actualment és la tècnica d'extracció més habitual dins d'una gran diversitat d'àmbits com l'alimentari, l'ambiental i el biològic, ja que permet tractar un ampli ventall de compostos i matrius. La SPE és la tècnica de preparació de mostres més àmpliament utilitzada en l'anàlisi de compostos farmacèutics i metabòlits en sang, sèrum i orina.

Tot i que és una tècnica molt estudiada manté un interès creixent tal i com reflecteixen les constants publicacions sobre el seu desenvolupament.

Els seus avantatges respecte a la tradicional LLE són la menor manipulació de la mostra, la reducció del volum de solvent orgànic utilitzat, la obtenció de factors de concentració més grans i la fàcil automatització que permet realitzar múltiples extraccions simultàniament millorant la precisió, l'exactitud i la seguretat al laboratori i simplificant substancialment el desenvolupament de mètodes d'anàlisi [25, 27-29]. L'existència d'una gran varietat de sorbents comporta l'oportunitat d'extreure anàlits de diferent polaritat convertint-lo en un mètode molt selectiu.

A causa dels baixos nivells de concentració esperats d'aquests contaminants a les mostres ambientals, en la majoria dels casos d'anàlisi s'acostuma a realitzar una preconcentració mitjançant extracció en fase sòlida d'un volum entre 250 mL i 1 L de mostra. Durant aquesta etapa del procediment es poden produir errors com les pèrdues d'anàlit si es supera el volum de ruptura o per la coextracció d'interferents presents en la mostra d'aigua.

Una altra tècnica de tractament de mostra és la *microextracció en fase sòlida* (SPME) la qual es va desenvolupar als inicis dels anys noranta i també s'ha aplicat per extreure diferents contaminants de mostres aquoses [30-33]. En la SPME el material adsorbent es diposita sobre una base de sílice fosa generant una microfibra, la qual s'exposa a la mostra i els anàlits hi queden atrapats una vegada s'ha assolit l'equilibri. Posteriorment, els anàlits es desorbeixen tèrmicament o amb un solvent orgànic. Les petites dimensions d'aquesta microfibra fan que es pugui adaptar l'èmbol d'una xeringa i per tant, es pugui aplicar fàcilment a tècniques cromatogràfiques. Alguns dels avantatges que presenta aquesta tècnica respecte a la SPE són la rapidesa, la senzillesa, el baix cost i el reduït o nul volum de solvents orgànics que requereix. No obstant, la poca quantitat de sorbent que recobreix la microfibra limita la capacitat de la tècnica i, conseqüentment, la sensibilitat de la mateixa. La tècnica SPME s'ha emprat bàsicament unida a la cromatografia de gasos, però també es pot aplicar amb altres tècniques

analítiques com la cromatografia líquida i l'electroforesi capil·lar, encara que aquest últim acoblament sigui el més complex.

1.3.2. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPE).

La tècnica d'extracció en fase sòlida (SPE, de l'anglès *Solid Phase Extraction*) és un mètode de tractament de mostres que s'aplica principalment per aconseguir tres objectius [25, 34, 35]:

1. Preconcentrar l'anàlit en els casos en que es trobi a nivells de concentració tan baixos que no permeti ser detectat per la tècnica de mesura.
2. Purificar la mostra per eliminar les substàncies interferents de la matriu.
3. Preparar la mostra per obtenir una solució adient que es pugui introduir a l'instrument de mesura que s'utilitzarà posteriorment.

El mecanisme en què es fonamenta la SPE es basa en la diferència d'afinitat que té l'anàlit per la fase estacionària i la fase mòbil en què es troba dissolt. La fase sòlida és un material adsorbent empaquetat en una columna i la fase líquida la formen la matriu de la mostra i els dissolvents que s'utilitzen com eluents. Els compostos de la matriu líquida són retinguts a la fase sòlida o eluïts segons el grau d'afinitat que tingui amb el sorbent, aconseguint així la separació selectiva de l'anàlit respecte la mostra.

La retenció es produeix com a conseqüència de la formació d'interaccions reversibles entre l'anàlit i la superfície del sorbent que poden ser de tipus hidrofòbic (forces de Van der Waals), polars (ponts d'hidrogen i forces dipol-dipol) o del tipus iònic. Abans de seleccionar el sorbent és necessari tenir en compte les propietats físico-químiques tant dels anàlits com de la matriu de la mostra considerant els grups funcionals, les energies de les interaccions, les interaccions secundàries anàlits-sorbent, les interaccions matriu-sorbent i les interaccions anàlits-matriu [36].

La metodologia de tractament de mostres mitjançant SPE és una de les més senzilles, eficients i econòmiques de tots els mètodes de preparació de mostres, a més, proporciona elevats factors de preconcentració i recuperacions dels anàlits. La gran varietat de materials adsorbents i de dissolvents que es poden utilitzar permet desenvolupar mètodes molt selectius, ja tinguin com a objectiu eliminar les impureses de la mostra o enriquir els anàlits per fer la determinació de traces.

1.3.2.1. Extracció en fase sòlida *off-line* i *on-line*.

L'automatització dels sistemes de SPE han progressat per satisfer requeriments com l'increment del nombre de mostres a extreure, la disminució de costos i del risc i la millora de la precisió.

Es distingeixen dues modalitats d'extracció en fase sòlida:

- L'acoblament fora de línia ("*off-line*").
- L'acoblament en línia amb el sistema cromatogràfic ("*on-line*").

En les dues metodologies l'extracció es duu a terme de forma similar, excepte en el pas de desorció, en el que en l'acoblament *on-line* els anàlits retinguts són eluïts directament des de la precolumna cap a la columna analítica del sistema cromatogràfic.

L'extracció *off-line* ha tingut una aplicació més extensa gràcies a la seva simplicitat, tot i que en els darrers anys la tendència és optar cada vegada més per l'ús de l'acoblament *on-line* degut a les nombroses avantatges que presenta com el major potencial d'automatització i la no manipulació de la mostra entre l'extracció i l'anàlisi, evitant el risc de pèrdua o de contaminació i obtenint millors límits de detecció i reproductibilitat [24, 37]. A més, com que tot l'extracte és analitzat pel cromatògraf es redueix considerablement el volum de mostra a preconcentrar i el volum de solvents orgànics utilitzats. La SPE s'ha acoblat *on-line* a diferents tècniques cromatogràfiques com són la

cromatografia de gasos, la cromatografia de líquids d'alta resolució, la cromatografia de fluids supercrítics i més recentment a l'electroforesi capil·lar.

A part de les nombroses avantatges que presenta l'acoblament *on-line*, també cal considerar alguns dels seus inconvenients. En el mètode *off-line* es pot augmentar la capacitat del sistema incrementant la quantitat de sorbent empaquetat al cartutx, en canvi, en l'acoblament *on-line* aquesta pràctica queda limitada degut a que en augmentar la quantitat de sorbent i eluir posteriorment els anàlits directament cap a la columna cromatogràfica, es produeix un eixamplament dels pics. La precolumna ha de ser el màxim de petita possible per tal d'evitar aquest eixamplament. El sorbent acostuma a ser entre 20 i 100 mg. Aquestes petites dimensions poden provocar una baixa retenció dels anàlits que es podria solucionar seleccionant un sorbent amb una major capacitat de retenció [38, 39].

Una altra limitació del sistema *on-line* és que la mostra només es pot injectar una vegada, ja que tots els anàlits són eluïts directament al sistema cromatogràfic. En canvi, en el sistema *off-line* el mateix extracte es pot analitzar més d'una vegada i mitjançant diverses tècniques ja que en cada anàlisi només s'injecta una petita part. Principalment per aquest motiu, i perquè en el mètode *on-line* no es poden utilitzar volums de mostra molt grans, en aquest estudi la preconcentració mitjançant extracció en fase sòlida es realitza *off-line*.

En els darrers anys s'han introduït dispositius automàtics que permeten l'automatització de l'extracció en fase sòlida tant en mode *off-line* com en l'acoblament *on-line* al sistema analític. Aquests dispositius presenten nombrosos avantatges com són rapidesa, producció de resultats més precisos i possibilitat de total automatització d'entre altres avantatges.

1.3.2.2. Formats disponibles comercialment.

Des de l'aparició de les primeres fases sòlides s'ha anat modificant la presentació del producte en funció de les diverses necessitats d'aplicació i automatització. Els formats de sorbent més habituals per la SPE són el cartutx, el disc i la xeringa (**Figura 1.3**).

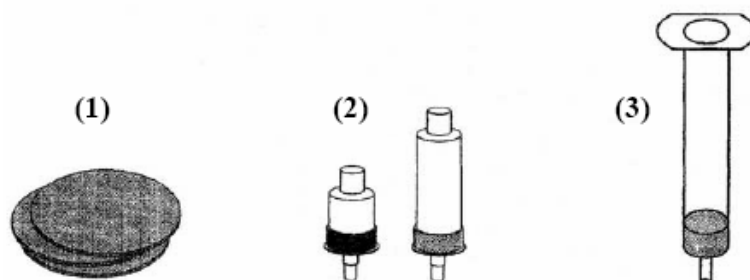


Figura 1.3. Configuracions habituals de SPE: (1) discs, (2) cartutxos, (3) columnes empaquetades.

El *cartutx* consisteix en un cilindre de polipropilè o vidre a l'interior del qual conté diferents tipus i quantitats de sorbent entre dos fritats porosos d'acer inoxidable o polietilè que tenen funció de barrera protectora. El volum dels cartutxos oscil·la entre 1 i 10 mL i la quantitat de sorbent empaquetat normalment és entre 60 mg i 1g. El seu disseny varia segons la casa comercial. Pel que fa a les *xeringues*, la quantitat de fase adsorbent oscil·la entre els 50 mg i 1 g amb dipòsits de mostra d'entre 1 i 25 mL. Tant el cartutx com la xeringa es comercialitzen de forma que s'utilitzen directament sense cap pretractament excepte el propi que requereix aquest tipus d'extracció. Els components també es poden trobar per separat per tal d'elaborar la configuració més adequada per a cada aplicació a desenvolupar [38, 40, 41].

L'altre format comercial disponible és el *disc*. Aquest està disponible en tres dissenys diferents. El més habitual és el consistent en una xarxa de microfibras de politetrafluoroetilè flexible sobre la qual hi ha impregnades les petites partícules del sorbent. Consta d'unes dimensions d'entre 4 i 90 mm de diàmetre i 0.5 mm de gruix. Quan les dimensions són més petites, dins de la miniaturització de SPE (M-SPE), es parla de microdiscs, els quals permeten treballar amb volums molt petits [42]. Els altres dissenys són els discs de matriu de fibra de vidre i recentment, J.T. Baker ha introduït

un nou tipus de discs laminars coneguts com a Speedisks, que consisteixen en un llit prim de micropartícules suportades sobre una estructura laminar en un disc [38, 41].

La utilització de discs comporta alguns avantatges respecte els cartutxos que es poden justificar degut a la major àrea superficial amb la que es pot treballar amb grans volums de mostra, el llit més estret, l'homogeneïtat en l'estructura i l'estabilitat. Aquests avantatges permeten processar volums de mostra a una velocitat superior que amb els cartutxos, obtenir extractes amb menys substàncies interferents i evitant l'aparició de canals en l'estructura de l'adsorbent que poden reduir la capacitat per retenir els anàlits [38, 41, 43, 44].

Els inconvenients dels discs són els grans volums de dissolvent que necessiten a part de que els volums de ruptura poden ser inferiors als dels cartutxos, principalment per l'extracció dels anàlits més polars. Per aquest motiu, els discs només s'utilitzen quan existeix una forta interacció entre l'anàlit i el sorbent.

Tot i la varietat de formats existent comercialment per portar a terme l'extracció en fase sòlida, els més emprats segueixen sent els cartutxos degut al gran nombre de sorbents disponibles en comparació al nombre limitat dels sorbent pel format de disc, i pel menor consum de dissolvents en la seva utilització [44].

1.3.2.3. Fonaments de l'extracció en fase sòlida.

El mecanisme de funcionament de l'extracció en fase sòlida es basa en 4 etapes bàsiques tal com s'esquematitza a la **Figura 1.4**. Aquestes són el condicionament del cartutx, la càrrega de la mostra, el rentat selectiu i per últim, l'elució dels anàlits, les quals es comenten tot seguit.

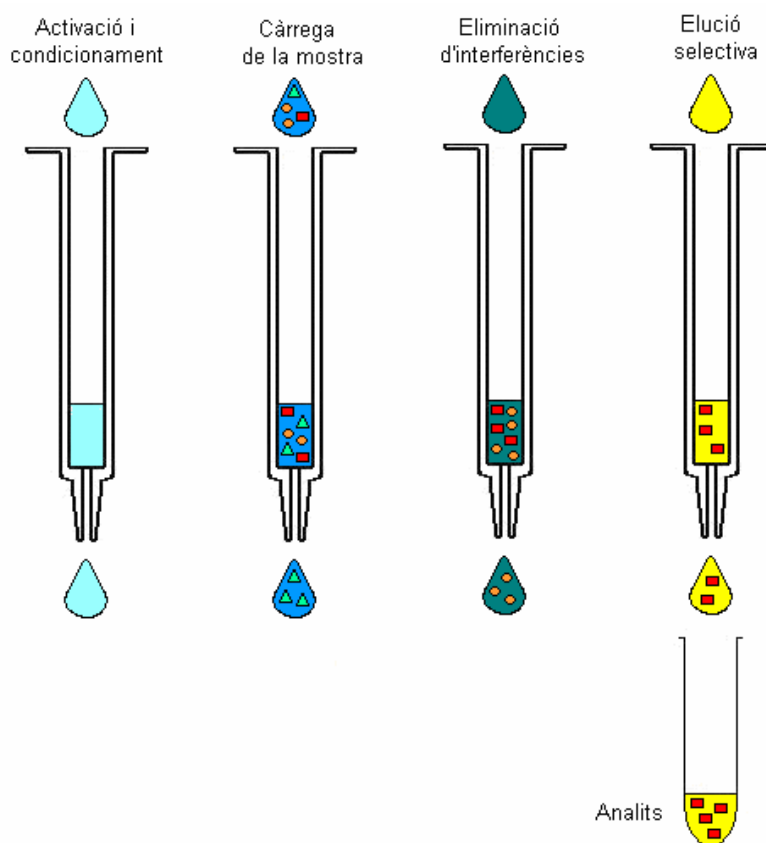


Figura 1.4. Etapes bàsiques del procés d'extracció en fase sòlida [elaboració pròpia].

a) Activació i condicionament del cartutx:

Per tal d'assegurar una reproductibilitat en la interacció entre l'anàlit i la fase sòlida, s'han de solvatar els grups funcionals i eliminar l'aire dels porus mitjançant el pas d'un o varis dissolvents abans de carregar la mostra al cartutx. Cal evitar que la fase sòlida s'assequi durant aquesta etapa ja que sinó el mecanisme d'adsorció no seria efectiu i repercutiria negativament en les recuperacions dels anàlits.

El primer pas del procés de SPE és l'activació del cartutx en la que s'utilitza un solvent orgànic per humitejar la fase sòlida. Amb fases hidrofòbiques com el C18 s'utilitza un solvent polar com el metanol. Amb fases estacionàries polars com la de sílice s'utilitza un solvent no polar com el clorur de metilè.

Una vegada s'ha activat el cartutx, es condiciona amb el mateix solvent de la matriu de la mostra. Amb matrius aquoses el solvent serà l'aigua. El condicionament permet

“alinejar” la fase estacionària lluny de la superfície de sílice, permetent la interacció entre l’anàlit i el sorbent. Qualsevol dissolvent orgànic residual s’elimina en aquesta etapa, així s’assegura que els components d’interès siguin retinguts a la part superior del cartutx.

b) Càrrega de la mostra:

Es tracta de fer passar la mostra pel cartutx de manera que els anàlits quedin retinguts al sorbent i que la resta de la mostra, la matriu, s’elueixi. Es pot realitzar per gravetat, amb un sistema d’aspiració al buit o per mitjà d’una bomba. El flux d’introducció de la mostra ha de ser constant i dependrà de les dimensions i de la configuració del sorbent. Cal un flux adient per facilitar la interacció entre els grups funcionals del sorbent sense que impliqui una gran despesa de temps.

c) Rentat:

Les restes de la matriu que puguin interferir en l’anàlisi i que hagin quedat adsorbides al cartutx es poden eliminar utilitzant un o varis dissolvents que no elueixin els anàlits. Per exemple, al retenir compostos hidrofòbics en C18 les interferències es poden eliminar amb un rentat aigua:metanol 50:50 ja que els compostos no s’elueixen de l’adsorbent de SPE fins que no s’utilitza un percentatge major de dissolvent orgànic.

d) Elució selectiva:

Finalment s’elueixen els anàlits amb una determinada quantitat d’un o varis dissolvents per tal d’aconseguir una elució selectiva. A l’hora d’escollir el dissolvent cal tenir en compte quin serà el mètode d’anàlisi que s’utilitzarà posteriorment i també, cal tenir present que el solvent ha de permetre obtenir recuperacions quantitatives amb el mínim de volum possible, el qual dependrà també de la quantitat de fase sòlida, del format del dispositiu de SPE i de la polaritat de l’anàlit. Amb un sorbent hidrofòbic com el C18 el solvent d’elució és usualment un solvent orgànic molt polar com acetonitril, metanol o una barreja d’aquests eluents amb aigua.

1.3.2.4. Mecanismes de separació en extracció en fase sòlida.

Segons el mecanisme implicat en el procés d'adsorció es distingeixen tres tipus diferents d'extracció en fase sòlida, equivalents als mecanismes de separació que tenen lloc en cromatografia líquida. Es parla de SPE de fase normal, de fase inversa i de bescanvi iònic.

A la **Taula 1.2** es detallen quines són les consideracions que s'han de tenir en compte per escollir el mètode d'extracció que millor s'adapti a les condicions del tipus de mostra, a la solubilitat i la polaritat de l'analit i al mode de separació.

<i>Tipus de Mostra</i>	<i>Solubilitat de l'analit</i>	<i>Polaritat de l'analit</i>	<i>Mode de separació</i>	<i>Mètode d'extracció</i>
Aquosa	En aigua	Iònic	Àcid o bàsic	INTERCANVI IÒNIC
		Neutre	Polar Poc polar Apolar	
	En solvent orgànic	Neutre	Apolar	FASE INVERSA
Orgànica	En solvent orgànic	Iònic	Àcid o bàsic	INTERCANVI IÒNIC
		Neutre	Polar Poc polar	FASE NORMAL

Taula 1.2. Mètodes d'extracció per SPE.

Per cada un dels tres mecanismes els sorbents utilitzats han de tenir unes propietats i característiques pròpies ja que en cada un les condicions són diferents:

- **Intercanvi iònic:**

Aquest mecanisme permet la separació de compostos ionitzables mitjançant el bescanvi iònic d'un analit ionitzat en un adsorbent de càrrega oposada [45]. El mecanisme bàsic és una interacció iònica d'alta energia que permet extreure anàlits polars de dissolvents polars com per exemple l'aigua.

La condició per fer possible l'intercanvi iònic és que l'anàlit també es trobi en forma iònica i competeixi amb altres ions presents a la mostra. La selectivitat del procés depèn de l'afinitat de l'anàlit pel lloc actiu i del tamany dels ions que també competeixen pel mateix lloc.

Els sorbents reben el nom de bescanviadors aniònics si tenen una càrrega permanent positiva, i catiònics si la càrrega en qüestió és negativa.

- **Fase normal:**

La SPE en fase normal es basa en l'aïllament de compostos polars d'una matriu apolar. Per analogia amb la cromatografia líquida de fase normal, la fase sòlida és un sorbent polar. Els grups funcionals dels anàlits s'adsorbeixen als punts polars del material adsorbent mentre que els compostos no polars s'elueixen. Els mecanismes d'adsorció són interaccions polars dèbils o moderadament fortes com els ponts d'hidrogen i les interaccions dipol-dipol.

Els materials adsorbents que s'utilitzen en aquest tipus de SPE són fases no lligades de sílica, alumina, silicat de magnesi i també fases lligades de sílica del tipus aminopropil o cianopropil. L'aigua no es pot utilitzar com a dissolvent en extracció en fase normal ja que al ser polar s'adsorbiria als punts actius de l'adsorbent i reduiria la interacció entre l'anàlit i aquest.

Generalment la SPE en fase normal s'utilitza per fer *clean-up* d'extractes orgànics de mostres d'aigua, aliments o d'altres material. També s'utilitza per extreure anàlits de matrius orgàniques com els olis.

- **Fase inversa:**

El mecanisme de SPE en fase inversa consisteix en la separació dels compostos presents en una fase mòbil polar utilitzant una fase sòlida apolar. És la modalitat de SPE més utilitzada pel tractament de mostres aquoses degut a la polaritat de la dissolució

aquosa on es troben els anàlits. El mecanisme d'adsorció es basa en les interaccions que tenen lloc entre els enllaços C-H dels grups funcionals de l'adsorbent i dels anàlits, és a dir, són interaccions de caràcter apolar i de baixa energia que es produeixen per forces de Van der Waals o les forces de dispersió o de partició.

Els principals sorbents per SPE de fase inversa són els de base de sílice, el carbó grafititzat i el de polímers orgànics.

1.3.2.5. Tipus de sorbents per extracció en fase sòlida.

Comercialment hi ha una gran varietat de sorbents que s'adapten a les necessitats actuals de l'extracció en fase sòlida. Sigui quin sigui l'adsorbent escollit, aquest ha de presentar una elevada estabilitat química, resistència mecànica i una àrea superficial determinada.

Destaquen els sorbents de bescanvi iònic, els de sílica modificada, els de carbó i els sorbents constituïts per polímers orgànics. Tots ells es comenten a continuació:

- **Sorbents de bescanvi iònic:**

Els bescanviadors iònics són els sorbents adequats per l'extracció de compostos orgànics iònics o fàcilment ionitzables. Consten d'un suport de sílice o polimèric sobre el qual s'enllacen diferents grups funcionals.

Els bescanviadors catiónics poden ser dèbils si tenen el grup funcional carboxil, o forts quan incorporen l'àcid sulfònic ($-\text{SO}_3^-$) al final d'una cadena orgànica lligada a una matriu de sílica o a un anell benzènic en el cas d'una matriu polimèrica. Els bescanviadors aniònics de caràcter feble inclouen les amines primàries i secundàries, i si són de caràcter fort, el punt de bescanvi aniònic fort acostuma a ser un àtom de nitrogen quaternari carregat positivament amb un ió clorur com a contraió.

Els adsorbents són de bescanvi iònic feble si la càrrega del bescanviador no és fixa, sinó que pot ser eliminada per variacions de pH. Si el pH de la mostra s'ajusta al pKa de l'anàlit, molècules orgàniques d'àcid o base feble poden ser extretes mitjançant un mecanisme de bescanvi iònic. El valor de pKa d'una molècula orgànica és un factor crític en la utilització de bescanviadors iònics.

- **Sorbents de sílice modificada:**

Els sorbents constituïts per una base de sílice modificada amb grups funcionals de diferent naturalesa són els habituals per l'SPE de fase inversa. Els grups funcionals que s'hi enllacen habitualment són els grups etil (C2), butil (C4), octil (C8), octadecil (C18), fenil, ciclohexil i cianopropil. La llargada de la cadena influeix en la interacció de les partícules més hidrofòbiques i per aquesta raó la sílice modificada amb C18 (**Figura 1.5**) és la que presenta una millor interacció amb els compostos més apolar i els de polaritat moderada.

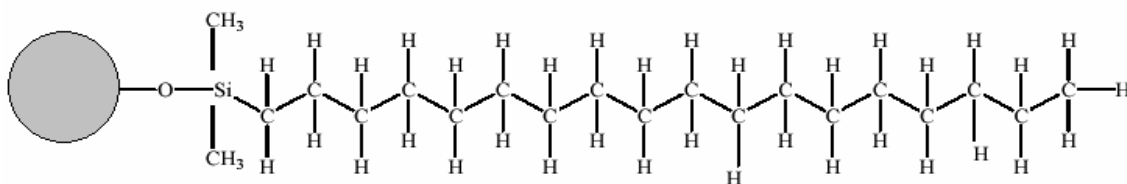


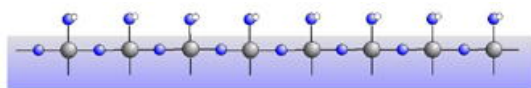
Figura 1.5. Estructura química del sorbent de sílice enllaçada amb C18 [45].

Altres sorbents de base de sílice menys freqüents són els enllaçats amb grups polars com el cianopropil (CN), diol (OH) o aminopropil (NH₂) que s'utilitzen per l'SPE de fase normal.

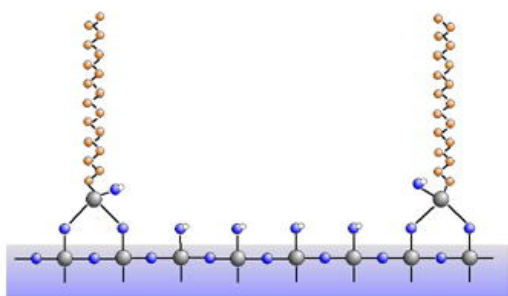
Els sorbents de base de sílice modificada presenten alguns inconvenients com la poca afinitat pels compostos més polars i les limitacions del volum de tractament. Per incrementar el volum de trencament s'ha d'augmentar la quantitat de sorbent utilitzat o addicionar sals a la solució aquosa (efecte salí) fet que afavoreix la interacció dels anàlits amb la fase sòlida [46].

Un paràmetre crític per aquests adsorbents és el pH. La manca d'estabilitat tant en medi àcid com en medi bàsic limita l'ús d'aquests sorbents entre un valor de pH d'entre 2 i 8. Quan es volen extreure compostos àcids mitjançant SPE amb un sorbent que opera en fase inversa és essencial ajustar el pH de la mostra per assegurar que les substàncies es trobin en forma neutra [40, 47].

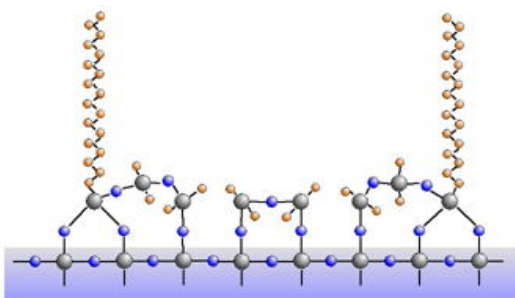
Una altra característica que també cal tenir present és que la superfície de les partícules de sílica és heterogènia amb una gran varietat de grups silanol (Si-OH). La presència d'aquests grups silanol lliures a la superfície de la fase adsorbent poden provocar interaccions secundàries amb els anàlits i induir a la formació de ponts d'hidrogen, generant adsorcions irreversibles que dificulten el procés d'elució [48]. Per evitar-ho i fer més hidrofòbica la base de sílica, es duu a terme el procés d'*endcapping* (**Figura 1.6**), en el que es fa reaccionar la sílica derivatitzada amb trimetilclorsilà de manera que els grups Si-OH esdevenen $\text{Si-(CH}_3)_3$. Amb aquesta acció es bloquegen totalment tots els centres actius que puguin haver quedat a la superfície de la sílica després del lligat de les cadenes de C18. En alguns casos la presència dels grups silanol lliures és intencionada, llavors es parla d'adsorbents per a SPE en mode mixt.



Superfície del gel de sílica.



Procés de lligat dels grups funcionals octadecils a la superfície de gel de sílica. El residu silanol del gel es desactiva parcialment, ja que el procés de lligat dels grups C18 no és complet.



Es porta a terme el procés d'*endcapping* fent reaccionar el gel de sílica amb trimetilclorsilà. El grup silanol residual queda desactivat completament.

Figura 1.6. Procés d'*endcapping* en sorbents amb base de sílice [49].

- **Sorbents de carbó:**

Per extreure compostos orgànics en aigües, un dels primers materials que es va utilitzar va ser el carbó activat. La seva estructura està representada a la **Figura 1.7**. Posteriorment s'han desenvolupat diferents tipus de sorbents de carbó: el carbó negre grafitzat (GCB) i el carbó porós grafitzat (PGC).

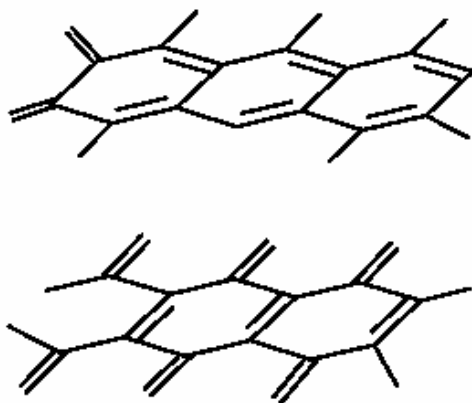


Figura 1.7. Estructura química del sorbent de carbó activat [45].

El GCB és no porós i amb una àrea superficial específica de 100 m²/g aproximadament. Es caracteritza per tenir una elevada capacitat d'adsorció, resistència tèrmica i química, i estabilitat en un ampli interval de pH tot i que l'estabilitat mecànica no és molt gran [50]. En canvi, l'estructura de grafit immobilitzat sobre una estructura de sílice li atorga al PGC una major estabilitat. L'elevada capacitat d'adsorció pot ser un desavantatge en alguns casos ja que els anàlits poden quedar retinguts de forma irreversible. Per altra banda, l'elució dels anàlits acostuma a ser lenta i incompleta, com a inconvenient cal afegir que l'activitat catalítica de la superfície del carbó pot ser problemàtica.

- **Sorbents de matriu polimèrica:**

Finalment, un dels tipus d'adsorbents més extensament utilitzats són els de matriu polimèrica. Els més convencionals i els que han experimentat un major desenvolupament són els adsorbents de base de poliestirè entrecreuat amb divinilbenzè (PS-DVB) (**Figura 1.8**) que s'obtenen mitjançant polimerització en suspensió i presenten àrees superficials no superiors als 500 m² /g.

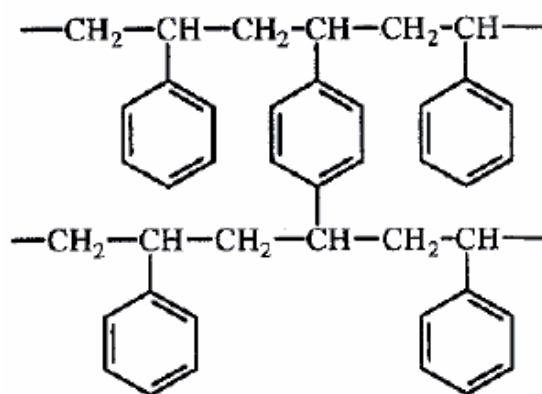


Figura 1.8. Estructura química del sorbent de poliestirè-divinilbenzè [45].

Les interaccions que es produeixen en els sorbents de matriu polimèrica amb més responsabilitat sobre la retenció dels anàlits són les interaccions π - π que es donen entre els dobles enllaços dels anells aromàtics del compost i del polímer. La unió anàlit-adsorbent és més forta i es dona major retenció que en les fases de sílica modificada. A la vegada, els sorbents polimèrics es poden dopar amb grups hidrofílics i així s'aconsegueix una millor interacció amb matrius aquoses i també una millor extracció d'anàlits polars i major selectivitat. En alguns de casos no són productes comercials i cal sintetitzar-los a partir de les funcionalització de resines comercials no modificades [51].

Els polímers orgànics porosos solucionen algunes de les limitacions de les sílices modificades i dels carbons activats per diversos motius: treballen en tot l'interval de pH, l'àrea superficial és més gran, presenten una major retenció pels anàlits més polars i els volums de solvent utilitzats per eluir els anàlits retinguts són menors. Poden tenir mides de partícula, grau d'entrecreuament i àrea superficial diferents segons el proveïdor. Les avantatges que presenten aquests sorbents respecte les fases de sílica es deuen a l'alt percentatge de carboni, la hidrofobicitat de la seva superfície i a la seva estabilitat un ampli interval de pH, i respecte els sorbents de carbó perquè la seva interacció amb els anàlits és reversible.

1.3.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC).

La cromatografia de líquids va ser descoberta l'any 1903 per M.S. Tswett quan va utilitzar una columna de guix per separar els pigments de fulles verdes. En els seus principis es va practicar en columnes de vidre d'1 a 5 cm de diàmetre i de 50 a 500 cm de longitud. Per assegurar cabals raonables el diàmetre de partícula de la fases estacionàries era generalment de 150 a 200 μm . Tot i així, els cabals eren de tan sols unes poques dècimes de mil·lilitre per minut, fent que el temps necessari per realitzar una separació s'allargués sovint a varies hores.

En els primers anys del desenvolupament de la cromatografia ja es va constatar que s'aconseguirien importants augments d'eficàcia de la columna disminuint el tamany de partícula dels empaquetats. No va ser fins a finals de la dècada dels 60 quan es va desenvolupar una tecnologia capaç de reproduir i utilitzar empaquetats de diàmetre de partícula de 10 μm . Aquesta tecnologia va necessitar instruments sofisticats molt diferents a les columnes senzilles de vidre de la cromatografia de líquids clàssica. A aquests nous procediments se'ls designa amb l'acrònim HPLC, per distingir-los dels mètodes clàssics que encara es segueixen utilitzant amb finalitats preparatives.

Inicialment el criteri principal de la cromatografia líquida moderna era la pressió, d'aquí el seu nom d'HPLC (de l'anglès *High Pressure Liquid Chromatography*). No obstant, aquest no és el terme més adient ja que dona per suposat que la millora en el funcionament és degut a l'alta pressió i això no és cert. De fet, l'alt rendiment és el resultat de molts factors: la distribució de les partícules amb mida de porus uniforme, l'alta pressió de l'empaquetat de la columna, el control del flux de la fase mòbil, la precisió dels injectors amb els volums exactes de mostra, la gran sensibilitat dels detectors, i per suposat, els bons sistemes de bombeig i l'alta resolució analítica. Naturalment, la pressió és necessària per oferir un cabal donat a la fase mòbil. Reconeixent tot això, el terme més adient per a referir-se a aquesta tècnica és "*Cromatografia Líquida d'Alta Resolució*", que permet seguir utilitzant el mateix acrònim HPLC [52].

El sistema HPLC ofereix un alt grau de flexibilitat que altres sistemes cromatogràfics no ofereixen i té la capacitat de separar fàcilment una gran varietat de barreges químiques.

Els processos cromatogràfics es poden definir com a tècniques de separació que impliquen una transferència de masses entre una fase estacionària i una fase mòbil. El sistema HPLC utilitza com a fase mòbil un conjunt de solvents adients per a cada cas i com a fase estacionària el material que empaqueta la columna.

Per separar els components d'una solució es força el pas d'una petita quantitat de mostra per la columna cromatogràfica sota condicions d'alta pressió, on els diferents anàlits es separen individualment de la solució inicial, segons les interaccions físiques o químiques que tenen lloc amb la fase estacionària a mesura que avancen per la columna. El grau de retenció dels compostos de la mostra depèn de la naturalesa del compost, de la composició de la fase estacionària i de la fase mòbil. El temps que un compost tarda a ser eluït de la columna s'anomena *temps de retenció* i es considera una propietat identificativa d'un compost en una fase mòbil i estacionària determinades. La utilització de pressió en aquest tipus de cromatografia incrementa la velocitat lineal dels compostos dins de la columna i redueix així la seva difusió dins la mateixa millorant la resolució de la cromatografia.

1.3.3.1. Instrumentació en HPLC.

El procés cromatogràfic comença amb la injecció dels soluts dins la columna. Els compostos es separen a mesura que són bombejats junt amb la fase mòbil, fins que elueixen de la columna i gràcies al detector a l'ordinador es mostren els pics que acaben formant el cromatograma. Per analitzar les dades dels cromatogrames s'utilitzen diferents opcions d'integració (habitualment es treballa amb l'àrea de pic) que ofereix el software de l'ordinador.

Els equips de cromatografia líquida necessiten un mínim d'instrumentació per a poder operar. Hi ha equips més elaborats que altres, però en general tots requereixen una sèrie de components bàsics pel seu funcionament.

A grans trets, tal com mostra la **Figura 1.9**, un equip de HPLC està format per un dipòsit per la fase mòbil amb sistemes de tractament de dissolvents, un sistema de bombeig constituït per una bomba d'alta pressió, el sistema d'injecció de la mostra, la columna, el detector, un dipòsit pels residus i un ordinador connectat al sistema de magatzem i tractament de les dades.

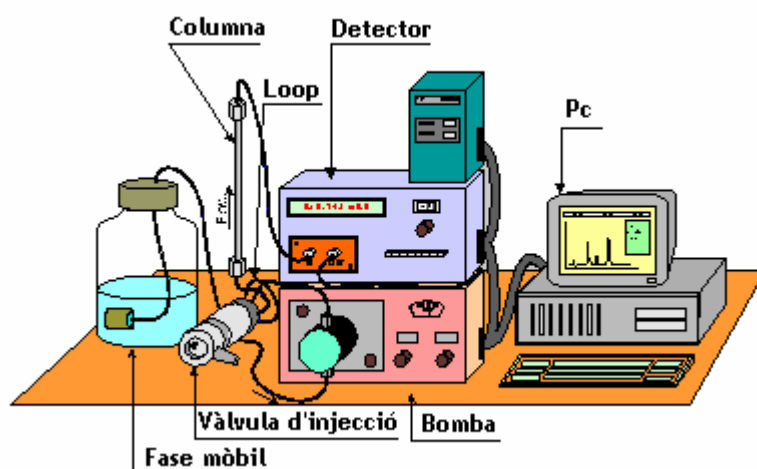


Figura 1.9. Esquema funcional d'un sistema d'HPLC [53].

A continuació es descriuen els diferents elements de l'equip d'HPLC a l'hora que es comenta el seu funcionament a trets generals [52-54]:

- **Dipòsit per la fase mòbil i sistemes de tractament de dissolvents:**

El sistema d'HPLC comença amb el dipòsit de la fase mòbil el qual conté els dissolvents que s'utilitzen per desplaçar la mostra a través del sistema. Normalment es tracta d'ampolles de vidre. Sovint porten incorporats un filtre i un desgasificador per poder eliminar les partícules en suspensió i els gasos dissolts que puguin contenir, ja que els gasos dispersen les bandes com a resultat de la formació de bombolles, i tant les partícules com les bombolles interfereixen en el funcionament del detector.

▪ Sistemes de bombeig:

La bomba es considera un dels components més important del sistema de HPLC. Com que la fase estacionària està formada per partícules amb mida micromètrica de porus, cal una bomba d'alta pressió per fer passar la fase mòbil a través de la columna. El sistema de bombeig proporciona un flux continu i constant de l'eluent a través de l'injector, de la columna i del detector des del recipient dels dissolvents.

Els requeriments estàndards per una bomba de HPLC són els citats a continuació:

- Rang de flux d'entre 0.01 i 5 mL/minut.
- Rang de pressió d'entre 1 i 5000 psi.
- Pulsacions de pressió menor al 1% per fase normal i inversa i menor al 0.2 % per exclusió per tamany.
- Resistència al contacte amb solvents agressius i pH extrems.

Existeixen dos tipus bàsics de bombes pels sistemes cromatogràfics: les bombes de pressió constant i les de flux constant. Les bombes de *pressió constant* disposen de certes avantatges com la simplicitat i la llibertat de pulsacions, donant com a resultat línies bases dels cromatogrames llises. Són econòmiques i tant el funcionament com el manteniment no són dificultosos. El seu inconvenient és que requereix d'un control precís i constant del flux, sobretot si es realitzen anàlisis qualitatives o quantitatives, ja que canvis de temperatura poden alterar la viscositat del solvent provocant un canvi en el cabal del sistema. Les bombes de *flux constant* són les més utilitzades. Tenen la capacitat de reproduir els volums d'elució i les àrees dels pic sense importar els canvis de viscositat o la obstrucció de la columna sempre i quan no es superi el límit de pressió de la bomba.

La pressió de la bomba varia segons el model i el fabricant, però el seu rendiment es valora amb l'habilitat per a generar un flux constant i reproduïble. La pressió pot assolir valors de fins a 40 MPa (unes 400 atmosferes aproximadament). Els aparells més moderns d'HPLC incorporen millores per a poder treballar a pressions més altes i, per tant, poder utilitzar partícules més petites en les columnes inferiors a 2 micròmetres.

Aquests nous aparells, denominats *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) poden treballar amb valors de fins a 100 MPa de pressió (unes 1000 atmosferes).

- **Sistemes d'injecció de mostra:**

El sistema d'injecció introdueix un volum de mostra exacte dins del sistema per tal de dur a terme la seva separació i determinació. La injecció de la mostra al cromatògraf es realitza mitjançant una xeringa que fa arribar la mostra a una vàlvula d'injecció de sis vies que consta de dues posicions, la de càrrega i la d'injecció, seguida d'un bucle de mostreig. Els bucles són intercanviables i permeten escollir el volum de mostra d'entre 5 i 500 μL . La precisió relativa de les injeccions amb un bucle típic és d'una dècima per cent. Tot seguit, es representa el funcionament de la vàlvula de sis vies a la **Figura 1.10**:

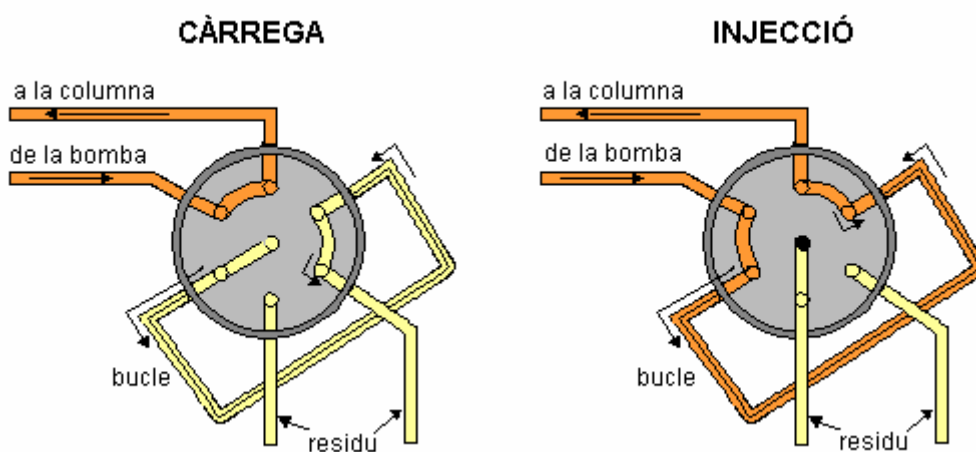


Figura 1.10. Vàlvula de sis vies: (a) posició de càrrega, (b) posició d'injecció [55].

Tal com mostra la figura, la vàlvula té dues posicions, la de càrrega (a) i la d'injecció (b). En la posició de càrrega la fase mòbil passa directament de la bomba cap a la columna. És en aquesta posició quan es carrega la mostra al sistema mitjançant una xeringa. El bucle queda ple de la mostra a analitzar i el volum sobrant passa directament al residu. Tot seguit, es canvia la posició de la vàlvula passant de la càrrega a la injecció i fent que la fase mòbil arrossegui la mostra continguda dins del bucle. Una vegada ha arrossegat tot el volum de mostra, es torna a canviar a la posició inicial de la vàlvula.

- **Columna:**

Després de l'injector hi ha la columna, tot i que de vegades s'instal·la una precolumna per tal de preservar la columna de possibles partícules que puguin quedar a la mostra. La columna és una de les parts més importants de l'equip d'HPLC. Interiorment està empaquetada per la fase estacionària que permet la separació dels diferents compostos de la mostra. La separació es basa en la diferència d'interacció dels components de la mostra i del material de l'interior de la columna. Generalment estan fabricades amb tubs d'acer inoxidable i tenen una longitud d'entre 10 i 30 cm i un diàmetre que va dels 4 als 10 mm. Els empaquetats típics tenen un tamany de partícula d'entre 5 i 10 μm .

El diàmetre intern d'una columna de HPLC és un aspecte crític que determina la quantitat de mostra que es pot carregar a la columna i també influeix en la seva sensibilitat. Les columnes de diàmetre intern més gran, superior als 10 mm, s'utilitzen normalment per la purificació de compostos per a la seva utilització posterior. En canvi, les columnes de diàmetre intern menor, d'entre 4 i 5 mm, s'utilitzen en l'anàlisi quantitativa de les mostres i es caracteritzen per l'augment la sensibilitat i el consum mínim de dissolvents que comporten. Aquestes columnes es solen denominar columnes de rang analític i normalment estan associades a un detector d'ultraviolat-visible. També existeixen altres columnes com les de tipus capil·lar, amb un diàmetre inferior a 0.3 mm, utilitzades principalment en espectrometria de masses.

- **Detector:**

Una vegada s'han separat els components de la mostra, aquests passen a través del detector just abans d'anar al dipòsit de residus. L'objectiu del detector és monitoritzar la fase mòbil a mesura que va sortint de la columna. Permet determinar cada un dels compostos de forma individual. Hi ha molts tipus diferents de detectors. Es pot utilitzar un detector d'índex de refracció, un d'ultraviolat-visible, de fluorescència, conductimètric, electroquímic i amb espectròmetre de masses. L'elecció dependrà de les característiques dels compostos a analitzar, tot i que avui en dia els detectors més utilitzats en cromatografia líquida són els òptics.

- **Sistemes de magatzem i tractament de dades:**

Com que la senyal del detector és electrònica, l'ús de tècniques modernes en l'adquisició de dades ajuda a poder analitzar el senyal del detector a través del software d'un ordinador així es pot treballar amb més exactitud i precisió. L'ordinador rep la senyal i la tradueix en forma de cromatogrames a partir dels quals es poden identificar i quantificar cada un dels pics que hi apareixen.

1.3.3.2. Fase mòbil i fase estacionària.

El tipus i composició de la *fase mòbil* és a dir, l'eluent, és una de les variables que més influencien en la separació per HPLC. Tot i la gran varietat de dissolvents que s'utilitzen, tots tenen unes propietats en comú que cal tenir en compte:

- Puresa.
- Compatibilitat amb el detector.
- Solubilitat de la mostra.
- Baixa viscositat.
- Químicament inert.
- Preu econòmic.

Cada tipologia d'HPLC té els seus propis requeriments. Per la fase normal els solvents són apolars, per fase inversa l'eluent és normalment una barreja d'aigua amb algun solvent polar orgànic com l'acetonitril. L'HPLC d'exclusió per tamany té uns requeriments específics ja que l'eluent ha de poder dissoldre els polímers, però també ha de suprimir qualsevol tipus d'interacció de les molècules de la mostra amb la superfície del material de l'empaquetat de la columna.

La separació en HPLC es basa en les interaccions de la superfície, les quals depenen de la tipologia dels llocs d'adsorció. Els adsorbents que conformen la *fase estacionària* de

L'HPLC moderns són partícules poroses petites i rígides amb una elevada àrea superficial. Els principals paràmetres que un adsorbent ha de complir són:

- Mida de partícula: de 3 a 10 μm .
- Distribució de la mida de partícula: el més estreta possible.
- Mida de porus: de 70 a 100 Å.
- Àrea superficial: de 50 a 250 m^2/g .
- Densitat de la fase d'interacció (nombre de llocs actius d'adsorció per unitat de superfície): de 1 a 5 per 1 nm^2 .

L'últim paràmetre de la llista representa la superfície química d'adsorbent. Depenent del tipus de lligant que s'uneixi a la superfície, l'adsorbent serà de fase normal (-OH, -NH₂), de fase inversa (C8, C18, fenil), o d'intercanvi aniònic (NH₄⁺) o catiònic (-COO⁻).

Moltes fases estacionàries són poroses per tal a proporcionar el màxim de superfície possible. Els porus petits proporcionen una major superfície mentre que els porus de mida més gran proporcionen una cinètica millor, especialment pels compostos de major grandària. Una proteïna que sigui lleugerament més petita que els porus podrà entrar, però no podrà sortir amb facilitat.

La majoria de cromatografies líquides d'alta resolució tradicionals es realitzen amb una fase estacionària amb partícules esfèriques de sílica. Aquestes partícules poden tenir diferents mides tot i que les més utilitzades són les de diàmetre de 5 μm . Les partícules més petites ofereixen una major superfície i una millor separació, però la pressió que es requereix per obtenir una velocitat lineal òptima augmenta de forma inversament proporcional al cub del diàmetre de la partícula. Això significa que disminuir la mesura de les partícules a la meitat, augmentaria la resolució de la columna, però alhora, augmentaria la pressió necessària en un factor de vuit.

1.3.3.3. Mecanismes de separació en HPLC.

La cromatografia líquida es pot classificar en diverses maneres segons el procés de separació i la polaritat relativa. Si la classificació es basa en el procés de separació es poden especificar tres tipologies que es diferencien per la naturalesa de la fase estacionària. Aquestes són la cromatografia d'adsorció, la cromatografia d'intercanvi iònic i la cromatografia d'exclusió per tamany [52, 53]:

- **Cromatografia d'adsorció:**

La fase estacionària és de sílice i la separació es basa en passos repetits d'adsorció-desorció. Quan s'utilitza un empaquetat d'aquest tipus, els punts actius de la superfície de l'empaquetat interaccionen amb l'anàlit competint amb la fase mòbil, fent que la retenció sigui el resultat de les forces d'adsorció.

- **Cromatografia d'intercanvi iònic:**

En cromatografia iònica la fase estacionària és una resina d'intercanvi iònic. La retenció es basa en l'atracció electrostàtica entre els ions en solució i les càrregues immobilitzades a la fase estacionària. Els ions de càrrega del mateix signe es separen per elució de la columna empaquetada amb resina finament dividida, mentre que els ions de càrrega oposada són retinguts per la columna. Aquesta tècnica s'utilitza gairebé de forma exclusiva per mostres iòniques o ionitzables. Una propietat important de totes les resines d'intercanvi iònic és que són pràcticament insolubles en medi aquós, de manera que quan es submergeix en una dissolució aquosa s'estableix ràpidament un equilibri d'intercanvi entre el sòlid i la fase en dissolució. La fase mòbil és un magatzem intermedi aquós, on el pH i la força iònica s'utilitzen per controlar el temps d'elució.

- **Cromatografia d'exclusió per tamany:**

També coneguda com a cromatografia per filtració en gel. Separa les partícules de la mostra en funció del seu tamany i s'aplica sobretot a espècies d'elevat pes molecular. L'empaquetat de la columna consta de petites partícules de sílice o de polímers que contenen una xarxa de porus de mida uniforme per on passa el solut i el dissolvent segons el seu tamany molecular. El temps de residència de l'anàlit depèn de la seva mida. Les molècules significativament més grans que els porus no penetren dins d'ells i són rentades de la columna a la mateixa velocitat que la fase mòbil. Les molècules més petites que els porus penetren dins de les partícules del material de la columna quedant més temps retingudes i sent eluïdes més tard.

Si la classificació de la cromatografia líquida es realitza segons la polaritat relativa de la fase mòbil i de la fase estacionària, hi ha dues maneres més de classificació: la cromatografia de fase normal i la cromatografia de fase inversa. Aquestes varietats cromatogràfiques cobreixen gairebé el 90% de tots els usos cromatogràfics [53].

- **Cromatografia de fase normal:**

Aquest tipus de cromatografia va ser el primer sistema d'HPLC utilitzat en el camp de la química i es caracteritza per separar els compostos segons la seva polaritat. Es duu a terme amb una fase estacionària de naturalesa molt polar i una fase mòbil apolar i s'empra quan el compost d'interès és bastant polar. L'adsorció en un gel de sílice utilitzant l'hexà com a fase mòbil seria un típic sistema de fase normal. Els anàlits polars queden més retinguts a la superfície polar de l'empaquetat de la columna, mentre que el component més apolar és el primer que es detecta. La força d'adsorció augmenta a mesura que augmenta la polaritat del compost, i com que augmenta la interacció entre el compost i la fase estacionària polar, el temps de retenció és major. La utilització de dissolvents molt polars com a fase mòbil fa disminuir el temps de retenció dels compostos, mentre que els dissolvents més hidrofòbics tendeixen a augmentar-lo.

- **Cromatografia de fase inversa:**

És la metodologia més comuna en cromatografia líquida d'alta resolució. S'estima que més de les tres quarts parts de les separacions per HPLC es realitzen en fase inversa. Consisteix en una fase estacionària de naturalesa no polar, hidrofòbica, i una fase mòbil formada per un dissolvent relativament polar. Sovint s'utilitza com a fase estacionària un empaquetat amb base de sílica i com a fase mòbil aigua, metanol o acetonitril. Comercialment existeixen moltes variacions d'aquest tipus de cromatografia en les quals s'afegeixen additius a la fase mòbil per oferir una selectivitat diferent.

Aquest tipus de cromatografia es basa en el principi de les interaccions hidrofòbiques que resulten de les forces de repulsió entre un dissolvent relativament polar, un compost relativament apolar i una fase estacionària apolar. L'efecte hidrofòbic disminueix amb l'addició d'un dissolvent apolar com a fase mòbil, el qual modifica el coeficient de partició de manera que el compost es mou per la columna i s'elueix. Les molècules de naturalesa apolar tenen un temps de retenció superior a les de caràcter polar, les quals s'elueixen més ràpidament. El temps de retenció disminueix amb fases mòbils formades per dissolvents més hidrofòbics.

A part de la hidrofobicitat de la fase mòbil, altres modificacions d'aquesta fase poden afectar la retenció del compost. Per exemple, l'addició de sals inorgàniques provoca un augment lineal de la tensió superficial, i com que l'entropia de la interfase compost-dissolvent està controlada precisament per la tensió superficial, l'addició de sals tendeix a augmentar el temps de retenció. El pH és una altra variable important que pot variar la hidrofobicitat del compost. La majoria de mètodes utilitzen un tampó com el fosfat de sodi per controlar el valor del pH i neutralitzar la càrrega del compost o qualsevol resta de sílica de la fase estacionària que hagi quedat exposada. L'efecte dels tampons sobre la cromatografia pot variar, però en general millora la separació cromatogràfica.

1.3.3.4. Elució isocràtica i elució en gradient.

En els sistemes d'HPLC les elucions poden ser isocràtiques o en gradient. Una *elució isocràtica* consisteix en una composició constant de l'eluent que es bombeja a través de la columna durant tot l'anàlisi. En canvi, en una *elució en gradient* la composició de la fase mòbil canvia constantment durant el seu funcionament. El gradient utilitzat varia en funció de la hidrofobicitat del compost i separa els anàlits de la mostra segons la seva afinitat per la fase mòbil utilitzada respecte l'afinitat per la fase estacionària. L'elecció del tipus d'elució depèn de les característiques de la mostra a analitzar i de les condicions de treball.

A la **Figura 1.11** es poden observar dos cromatogrames de l'anàlisi de quatre compostos amb diferents elucions. El primer cas es tracta d'una elució isocràtica i el segon és una elució en gradient amb una proporció d'acetonitril que comença amb un 30% i arriba al 65%.

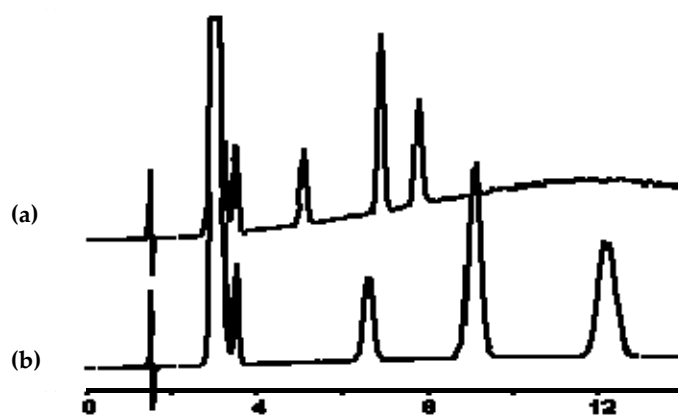


Figura 1.11. Cromatogrames de l'anàlisi de quatre compostos amb elució isocràtica (a) i en gradient (b) [53].

Les diferències entre les separacions són obvies. En el primer cas els pics apareixen durant els primers minuts del cromatograma i la línia base és molt irregular. En canvi, en el segon cas, l'elució en gradient proporciona al cromatograma una línia base molt millor i permet que els pics es separin de forma uniforme al llarg de la durada de tot el cromatograma.

2. ZONA D'ESTUDI.

2.1. SITUACIÓ GEOGRÀFICA.

La zona estudiada comprèn tres municipis del litoral gironí situats a cada una de les comarques que engloben la denominada Costa Brava, aquests són a la zona nord Empuriabrava, a la zona centre Castell d'Aro i a la zona sud d'aquesta franja litoral, Blanes (Figura 2.1).

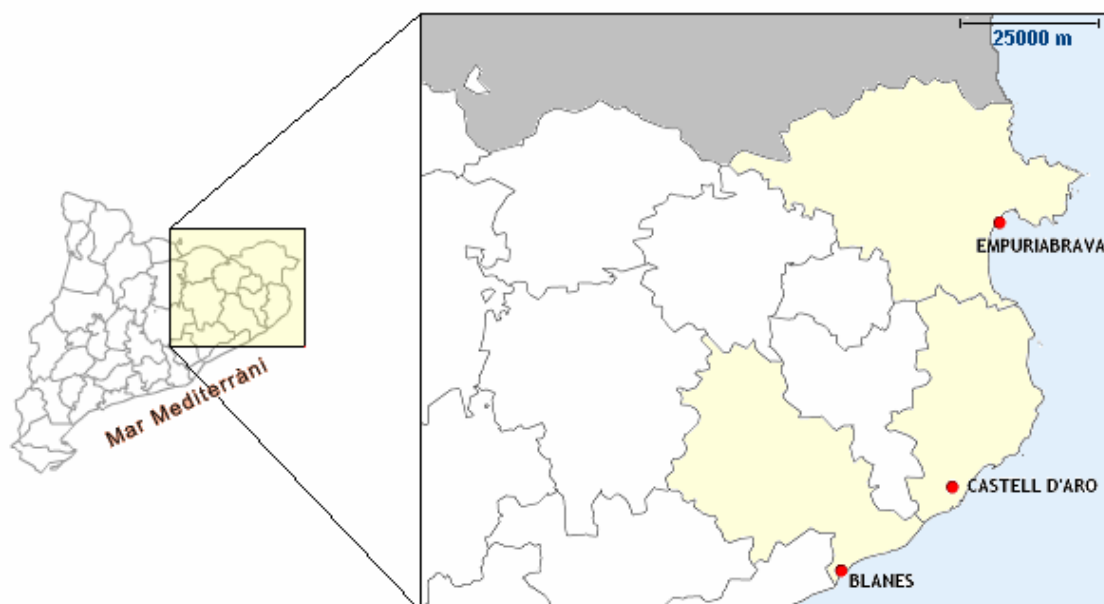


Figura 2.1. Situació geogràfica de les tres EDARs [elaboració pròpia].

S'anomena Costa Brava la zona turística que configuren els 200 quilòmetres de litoral de les comarques de l'Alt Empordà, Baix Empordà i La Selva, totes tres incloses a la província de Girona, Catalunya. La superfície total de les comarques de Girona és de 5.890,74 Km² i engloba un total de 221 municipis, agrupats en vuit comarques. La longitud total de la seva línia de costa és de 221 Km, 57 dels quals corresponen a platges i la resta a zones rocoses. Una de les singularitats d'aquestes terres és el caràcter escarpat amb imponents penya-segats retallats per cales profundes i estretes, separades per caps prominents i cobertures de pi verd. És precisament la singularitat d'aquest

sobtat encontre entre la muntanya i la mar Mediterrània el que va portar el periodista Ferran Agulló a definir aquesta costa com a "Costa Brava", terme que s'aplica de forma ampla per referir-se a la franja de terra i de mar del litoral gironí que comença a la desembocadura de la Tordera i acaba a la Catalunya francesa.

Les tres localitats s'inclouen dins el Consorci de la Costa Brava (CCB), organisme autònom creat l'any 1971 format per la Diputació de Girona i pels ajuntaments dels 27 municipis del litoral gironí amb personalitat jurídica pròpia. Dedica la seva activitat a tot el que faci referència al cicle de l'aigua, des de l'abastament en alta com el sanejament i la reutilització de les aigües depurades, tancant així el cicle i donant una idea de l'interès que té aquesta regió en reutilitzar les seves aigües d'una manera controlada i directa. Els seus principals objectius són la preservació de la salut pública i del medi ambient en un territori amb vocació turística, la construcció d'infraestructures d'abastament en alta d'aigua potable i la recaptació de taxes del conjunt dels municipis costaners per la construcció i el manteniment d'infraestructures de sanejament. El CCB promou estudis, jornades tècniques, projectes i obres per tal de vetllar per una gestió correcta dels recursos hidràulics de la zona, per a la preservació de la qualitat de les aigües apostant per la reutilització d'aquest recurs. Actualment exerceix com a Administració, més concretament com a Agència Catalana de l'Aigua del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya dels 27 municipis consorciats.

Cal remarcar que la situació de les tres poblacions és específica de zona turística, el que implica un augment considerable de la població durant l'estiu, suportant una ocupació potencial que incrementa fins a unes vuit vegades la població censada [56].

Tot seguit es comenten algunes de les principals característiques de les poblacions nomenades.

2.1.1. EMPURIABRAVA (X: 511352 Y: 4676816).

Empuriabrava és una marina residencial que pertany al terme municipal Castelló d'Empúries i està situada a dos quilòmetres en línia recta de la vila comtal. Castelló d'Empúries pertany a la comarca de l'Alt Empordà i consta d'un terme municipal amb 4.284 Km² d'extensió i una població de 10.021 habitants censats l'any 2006 [57].

Empuriabrava va ser construïda l'any 1967. La seva originalitat radica en l'estructura urbanística basada en una xarxa de canals navegables amb sortida al mar que sumen més de 30 Km de longitud. Disposa de 7 km d'àmplies i extenses platges sorrenques. Actualment és una ciutat consolidada que disposa de tots els serveis propis d'una urbs de categoria internacional, amb 5.000 amarradors que fan que Empuriabrava sigui la marina residencial més gran del món.

A Castelló d'Empúries s'hi troba el Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà que s'estén des dels peus de la Serra de Rodes, al nord, fins a la desembocadura del Fluvià Vell, al sud, englobant una superfície de 4.783 Ha. La conversió dels Aiguamolls en Parc data de l'any 1983 i gaudeix de protecció legal. Actualment és el segon parc més important de Catalunya. L'interès de les zones humides es basa en el fet que són llocs productius des del punt de vista biològic i acullen un bon nombre d'espècies animals i vegetals. Els Aiguamolls de l'Empordà són de gran importància a nivell internacional durant les migracions dels ocells, ja que actuen com a refugi de moltes aus migratòries.

2.1.2. CASTELL PLATJA-D'ARO (X: 502769 Y: 4629032).

El terme municipal de Castell-Platja d'Aro i S'Agaró pertany a la comarca del Baix Empordà. Està format per les viles de Castell d'Aro a l'interior i Platja d'Aro i S'Agaró al litoral. S'estén per l'extrem oriental de la Vall d'Aro, una estreta plana drenada pel riu Ridaura i situada entre les muntanyes meridionals del massís de Les Gavarres i la Serra de Cadiretes.

El municipi té una extensió de 21.9 Km² limitat al nord pel terme de Calonge, a ponent amb Santa Cristina d'Aro, al sud amb Sant Feliu de Guíxols i a llevant amb el litoral. L'any 2006 el cens municipal recollia la xifra de 9.768 habitants com a residents empadronats [57].

Una de les característiques més importants del municipi és la seva privilegiada situació en un punt estratègic de la Mediterrània, la qual el converteix en una de les principals destinacions del turisme.

2.1.3. BLANES (X: 482650 Y: 4613925).

El terme municipal de Blanes es situa a l'extrem meridional de la Costa Brava, dins de la plana al·luvial que s'estén al costat del riu Tordera. Pertany a la Comarca de La Selva, província de Girona. Pel nord, limita amb els termes de Tordera i Lloret de Mar; pel nord-est, amb Lloret de Mar; a l'oest amb els termes de Tordera, Malgrat de Mar i Palafolls i pel sud limita amb la Mar Mediterrània. El terme municipal de Blanes té una superfície total de 17.84 Km² i consta d'una població de gairebé 38.000 habitants [57]. Les alçàries més dominants són el turó del Vilar, de 269 metres, i la muntanya de Sant Joan, de 166 metres. El corrent fluvial més important és el riu Tordera que té règim torrencial.

El sector terciari representa la base sobre la qual es sustenta la major part de l'economia blanenca. Una de les principals característiques de l'estructura turística del municipi és el baix percentatge en les places turístiques que representa l'allotjament en hotels, augmentant així l'allotjament en càmpings, apartaments, xalets i les segones residències.

2.2. ESTACIONS DEPURADORES D'AIGÜES RESIDUALS.

S'han escollit tres estacions depuradores d'aigües residuals (EDARs) amb diferents sistemes de depuració per tal de comparar els resultats que s'obtenen amb cada un d'ells. L'EDAR d'Empuriabrava a Castelló d'Empúries, utilitza com a tractament final de les seves aigües un sistema de llacunatge, a Castell-Platja d'Aro s'aplica un sistema de fangs activats convencional amb eliminació de DBO i MES i per últim, l'EDAR de Blanes consta d'un sistema d'aireig prolongat amb eliminació de DBO, MES i nitrogen.

2.2.1. EDAR D'EMPURIABRAVA

L'EDAR d'Empuriabrava va començar a funcionar l'any 1995 ocupant-se del tractament de les aigües residuals d'Empuriabrava amb dues línies d'aigua en paral·lel. Ocupa una superfície de 49.500 Ha i subministra aigua regenerada al Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà, al Up Pitch & Put de Castelló d'Empúries i al riu Muga. Les estacions de bombeig d'aigües residuals (EBAR) associades són: EB Muga, EB Salins, EB Cortalet, EB Muga Aigua Depurada.

El procés està basat en un sistema de llacunatge natural i airejat amb un cabal de disseny màxim de 8.750 m³/dia i una càrrega contaminant màxima de 35.000 habitants equivalents. La regeneració de les aigües residuals produeix una mitja de 320 Tn ms de fangs anuals, els quals s'envien a la planta de compostatge de Prodeasa, a Castelló d'Empúries, on es tracten biològicament per produir compost útil pels agricultors de la zona.

La **Figura 2.2** esquematitza l'EDAR i el sistema d'aiguamolls construïts (SAC) als terrenys adjacents. La depuradora està formada per dues línies de tractament d'aigua en paral·lel. Cada línia conté un pretractament, un reactor biològic, un decantador, tres llacunes d'afinament i un assecat mecànic amb centrífuga pel tractament de fangs.



Figura 2.2. Visió en planta de l'EDAR i SAC d'Empuriabrava [58].

L'EDAR tracta un cabal aproximat de 1.020.000 m³/anuals. Al tractar-se d'una zona altament turística, presenta un increment de cabal durant els mesos d'estiu passant dels 800 m³/dia en temporada baixa fins als 6.000 m³/dia durant la temporada alta.

Les principals característiques tècniques de la depuradora es mostren a la **Taula 2.1**:

CONCEPTE	VALOR
DBO teòrica entrada:	240 mg/L
Volum reactors biològics:	14.000 m ³
Decantació secundària:	2 unitats
Diàmetre decantador:	15 m
Volum decantadors:	1.160 m ³
Volum llacunes d'afinament:	12.000 m ³
Volum total EDAR:	35.600 m ³

Taula 2.1. Característiques tècniques de l'EDAR d'Empuriabrava [58].

Les característiques de qualitat de l'aigua de l'afluent de la depuradora són típicament domèstiques. La **Taula 2.2** resumeix la qualitat de l'aigua mitjana dels últims tres anys (del 2004 al 2006) de l'efluent secundari de l'EDAR.

<i>PARÀMETRE</i>	<i>Entrada</i>	<i>Sortida</i>
DBO₅:	231 mg/L	6 mg/L
DQO:	580 mg/L	57 mg/L
MES:	255 mg/L	11 mg/L
Ph:	7,36	7,67
Conductivitat:	2,63 dS/m	2,38 dS/m
Nitrogen total:	61,67 mg N/L	16,36 mg N/L
Fòsfor total:	9,43 mg P/L	4,73 mg P/L

Taula 2.2. Qualitat de l'efluent secundari de l'EDAR d'Empuriabrava (2004-2006) [58].

Tot i l'excel·lent qualitat que s'obté pel a l'efluent secundari, especialment quan el sistema biològic funciona en aireació perllongada, els nivells de nutrients són elevats segons l'ús que se'n vulgui fer de l'aigua tractada. És per aquest motiu que s'ha creat un sistema de regeneració de l'aigua a partir del sistema d'aiguamolls construïts.

2.2.1.1. Sistema de regeneració de l'EDAR d'Empuriabrava.

Per tal d'aconseguir reduir els nivells de nutrients s'ha construït el sistema d'aiguamolls construïts (SAC) al costat de la depuradora. Està format per tres cel·les de tractament amb una superfície de 8.000 m² cada una i amb una profunditat mitjana de 40 cm. Aquestes cel·les estan impermeabilitzades per una capa de 25 cm d'argila compacta que protegeix l'aquífer de qualsevol possible contaminació. Les tres cel·les estan disposades en paral·lel, de manera que el cabal de l'efluent secundari a tractar es reparteix uniformement entre elles.

Dins de cada cel·la s'ha afavorit l'establiment de vegetació típica de la zona com la balca i el canyís. Aquesta vegetació és l'element essencial del procés de millora de la qualitat de l'aigua tant per l'absorció directa de nutrients, com per la seva funció estructural, ja que les comunitats microbianes que es desenvolupen a l'aigua i que complementen el tractament la utilitzen com a suport. Al final de cada cel·la es deixa una zona lleugerament més profunda amb aigua lliure per afavorir l'oxigenació de l'aigua i augmentar la diversitat d'ambients. En aquestes cel·les de tractament s'hi ha introduït exemplars de gambúsia (**Figura 2.3**), un peix petit depredador, com forma natural de lluita contra les poblacions de mosquits.



Figura 2.3. *Gambusia affinis* [59].

Després del pas per les tres cel·les, l'aigua segueix el seu recorregut per una zona negable adjacent, la Llacuna Europa. Aquesta zona amb una superfície de 44.000 m², una profunditat màxima d'uns 15-20 cm i amb una illa al centre, es va crear per a l'observació d'aus.

2.2.1.2. Utilització de l'aigua regenerada al PNAE.

El Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà (PNAE) (**Figura 2.4**) està situat a l'Alt Empordà, Girona. Consta d'una superfície de 4.866 Ha que pertanyen als municipis de L'Armentera, Castelló d'Empúries, l'Escala, Palau-Saverdera, Pau, Pedret i Marzà, Peralada, Roses i Sant Pere Pescador (PNAE, 2003).

El PNAE és una de les zones naturals més conegudes i emblemàtiques de Catalunya des de la seva creació l'any 1983. La catalogació com a Parc Natural sorgeix a causa

d'una intensa campanya començada el 1976 per aturar un projecte d'urbanització que pretenia construir una marina residencial per a 60.000 persones dins el sistema de llacunes situat entre les desembocadures dels rius Muga i Fluvià. Els aiguamolls de l'Empordà es caracteritzen per reutilitzar aigua regenerada per la depuradora per usos ambientals. Es tracta d'una tecnologia tova per aconseguir una millora de la qualitat de l'aigua depurada i que alhora resulta un excel·lent hàbitat per a les aus aquàtiques.



Figura 2.4. Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà (PNAE) [60].

Es subministra aigua durant les èpoques estivals al primer punt de contacte dels visitants amb el parc, la Llacuna del Cortalet, que tendeix a assecar-se a causa del consum d'aigua pel regadiu agrícola que es produeix aigües amunt del punt d'on s'alimenta aquesta llacuna.

Inicialment hi havia la possibilitat d'utilitzar aigua del riu Muga per alimentar la llacuna del Cortalet, però aquesta opció hagués provocat la intrusió d'aigua marina al tram final del riu i la consegüent salinització dels pous de la zona. Alternativament es va considerar com a opció viable que l'aigua depurada de l'EDAR d'Empuriabrava abastés la llacuna, amb la prèvia reducció dels continguts de nutrients amb el sistema d'aiguamolls construïts evitant una eutrofització de la zona d'aplicació. A més, aquesta alternativa suposa una important disminució de l'abocament de l'afluent secundari de l'EDAR al riu Muga, amb el que la reutilització de l'aigua protegiria al mateix temps la qualitat del tram final d'aquest riu, així com també les aigües marines de la zona costera propera a la desembocadura del riu.

La reutilització maximitza la biodiversitat de la flora i fauna aquàtiques, tant a les instal·lacions de regeneració com al punt d'utilització de l'aigua afavorint la millora de l'ecosistema.

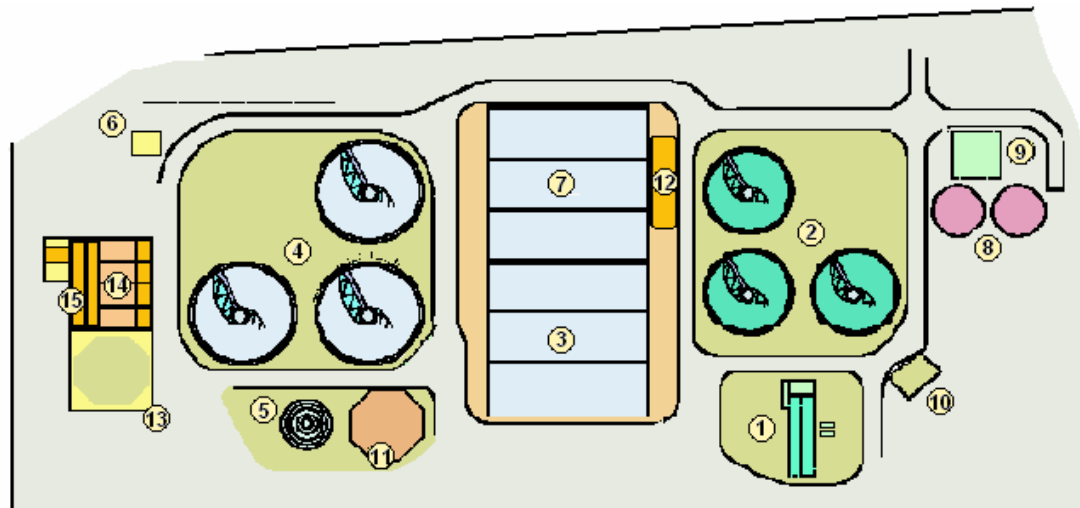
Una vegada l'aigua ha recorregut tot el sistema d'aiguamolls de tractament i la llacuna Europa, es recull i es condueix cap a l'estació de bombeig que la impulsa fins al Parc dels Aiguamolls de l'Empordà a través d'una canonada de 2.4 Km de longitud, que a més de la sortida de la llacuna del Cortalet, té diferents sortides prèvies destinades al manteniment dels prats humits de la zona. Si és necessari es pot interrompre el pas per la llacuna Europa passant directament dels aiguamolls de tractament fins al parc. Aquesta flexibilitat operativa permet escollir a cada moment l'aigua amb la qualitat més adient per les necessitats del parc.

2.2.2. EDAR DE CASTELL-PLATJA D'ARO.

L'EDAR de Castell d'Aro va entrar en servei l'any 1983 i des del seu inici tracta les aigües residuals de les poblacions de Castell d'Aro, Platja d'Aro, S'Agaró, Santa Cristina d'Aro i Sant Feliu de Guíxols, al sud de la comarca del Baix Empordà. Ocupa una superfície de 3.5 Ha i des de 1989 subministra aigua regenerada (fins el 1998, efluent secundari desinfectat, i a partir d'aleshores amb una filtració prèvia a la desinfecció) per a reg agrícola, reg a camps de golf de la zona de la Vall d'Aro (el Golf d'Aro i el Golf Costa Brava), i una part de l'aigua tractada s'aboca directament al riu Ridaura. Les EBARS associades són: EB Platja d'Aro, EB Sant Feliu, EB S'Agaró-Sant Pol, EB Sant Elm, EB Santa Cristina, EB Mun-Ber, EB Castell d'Aro.

La depuradora compta amb un sistema de depuració de fangs activats per un cabal màxim de disseny de 35.000 m³/dia i una càrrega contaminant màxima de 175.000 habitants equivalents. El fang produït es dedica a l'agricultura.

Tal com mostra la **Figura 2.5** el tractament està format per dues línies de pretractament amb reixa automàtica de gruixuts i sistema d'eliminació de sorres i greixos, tres decantadors primaris de 22 metres de diàmetre, tres cubes d'aeració de 2.623 m³ amb 9 equips d'aireig de superfície i tres decantadors secundaris de 30 metres de diàmetre.



- | | | |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Pretractament | 6. Sortida a reutilització | 11. Edifici de control |
| 2. Decantadors primaris | 7. Digestors aerobis | 12. Recepció de fosses sèptiques |
| 3. Reactors biològics | 8. Espessidors de fang | 13. Control del tractament terciari |
| 4. Decantadors secundaris | 9. Edifici de deshidratació de fangs | 14. Filtres |
| 5. Canal de cloració | 10. Centre de transformació | 15. Canal UV |

Figura 2.5. Visió en planta de l'EDAR de Castell-Platja d'Aro [58].

L'EDAR tracta aigües residuals de poblacions turístiques, de manera que les puntes de cabal i de càrrega contaminant arriben a la planta entre els mesos de juny i setembre, coincidint amb la temporada alta del turisme de la zona. La instal·lació posa en funcionament les seves línies de tractament en funció de la càrrega contaminant que li arriba.

L'anàlisi de les dades de la qualitat de l'aigua que surt d'EDAR permet extreure diferents factors que condicionen l'explotació de la instal·lació i que fan variar la quantitat i les característiques de l'efluent secundari produït al llarg de l'any. La **Taula**

2.3 resumeix la qualitat mitjana de l'aigua en els últims tres anys (del 2004 al 2006) de l'efluent secundari de l'EDAR.

<i>PARÀMETRES</i>	<i>Entrada</i>	<i>Sortida</i>
DBO5:	212 mg/L	6 mg/L
DQO:	485 mg/L	46 mg/L
MES:	300 mg/L	12 mg/L
Ph:	7,47	7,60
Conductivitat:	1,34 dS/m	1,09 dS/m
Nitrogen total:	47,63 mg N/L	25,73 mg N/L
Fòsfor total:	10,00 mg P/L	4,77 mg P/L

Taula 2.3. Qualitat de l'efluent secundari de l'EDAR de Castell-Platja d'Aro (2004-2006) [58].

La instal·lació es troba en una zona amb poca activitat industrial, de manera que l'aigua a tractar té una càrrega contaminant fàcilment biodegradable. Aquesta aigua té un origen domèstic i són poc probables els abocaments incontrolats de residus de processos industrials tòxics pels microorganismes que duen a terme el procés biològic.

Pel fet de tractar-se d'una instal·lació amb un tractament biològic de fangs activats convencional, sense la capacitat de dur a terme els processos de nitrificació i desnitrificació, ni de reducció de fòsfor, l'efluent secundari presenta concentracions elevades de nutrients especialment durant els mesos d'estiu, les quals s'aprofiten per la fertirrigació de cultius, permetent un estalvi important en fertilitzants a l'agricultor.

Per altra banda, al comptar amb part de les xarxes de clavegueram no separatives en les poblacions a les que es dona servei, en episodis de pluges l'EDAR rep grans quantitat d'aigües pluvials juntament amb l'aigua residual. Aquest fet justifica que hi puguin haver fluctuacions en el cabal tractat durant els mesos de maig i octubre produïts per la pluviometria variable pròpia del clima de la zona. El cabal tractat és d'uns 5-6 milions de m³ per any.

2.2.2.1. Sistema de regeneració de l'EDAR de Castell-Platja d'Aro.

La construcció de la planta de regeneració de l'EDAR de Castell d'Aro es va iniciar el 27 de juny del 1997 i es va finalitzar el 25 de març de 1998 amb els objectius fixats de millorar la gestió dels recursos hídrics de la conca del Ridaura, reduir els abocaments i millorar la qualitat de l'aigua en l'últim tram del riu Ridaura.

El cabal que aboca l'EDAR al tram final del Ridaura representa una part important del cabal del riu durant la major part de l'any. El tractament terciari és de tipus convencional amb una capacitat màxima de disseny de 625 m³/hora, és a dir, 15.000 m³/dia. L'objectiu d'aquest tractament és la reducció o eliminació de la població de microorganismes patògens, sense eliminar els nutrients presents en l'efluent secundari.

Les etapes per les que passa l'efluent secundari, en les que es modifiquen les seves característiques físico-químiques i microbiològiques, fins aconseguir la qualitat que el fa apte per a la seva reutilització posterior són les següents:

- *Coagulació-floculació*: es duu a terme l'addició de policlorur d'alumini en una cambra de contacte proveïda d'un agitador. Només es realitza aquesta etapa quan la concentració de sòlids de l'efluent secundari es troba per sobre de 20 ppm i cal incrementar el rendiment d'eliminació.
- *Filtració*: es disposa de 4 filtres oberts de llit polsant (**Figura 2.6**) proveïts d'una única capa de matriu filtrant de sorra de quars de gra fi i de 25 cm de gruix. Es produeix un descens en la concentració de la matèria en suspensió i de la terbolesa, facilitant la desinfecció posterior.



Figura 2.6. Filtració de l'efluent secundari a la planta de regeneració.
Funcionament normal del filtre (esquerra) Filtre en fase de contrarentat (dreta) [58].

- *Desinfecció amb llum ultraviolada:* es disposa de 2 equips en canal tancat amb un total de 8 làmpades de mitja pressió. En aquesta etapa es redueix la concentració de microorganismes patògens gràcies a l'efecte germicida de la llum ultraviolada.
- *Post-cloració:* és una etapa d'afinament en la que s'addiciona hipoclorit sòdic en línia (**Figura 2.7**). S'elimina totalment la població de microorganismes patògens i s'afegeix a l'aigua un agent desinfectant que perduri en el temps i permeti mantenir la qualitat microbiològica de l'aigua en els sistemes de conducció fins al punt d'ús.



Figura 2.7. Etapa d'afinament de l'aigua regenerada. Post-cloració.

La utilització de derivats del clor per a la desinfecció d'aigües residuals depurades presenta un potencial molt baix de formació de trihalometans. La presència d'una mínima concentració de nitrogen amoniacal fa que aquest reaccioni preferentment amb el clor per formar cloramines, i que la formació dels compostos cancerígens sigui pràcticament nul·la. La producció d'una aigua amb concentracions elevades d'amoni assegura la inhibició de la formació de trihalometans en el procés de desinfecció per cloració, ja que no es supera el punt de ruptura de l'amoni, quedant tot el clor

acomplexat en forma de cloramines. En conseqüència no es genera clor residual lliure que pugui reaccionar amb la matèria orgànica present en l'efluent terciari. Seria un error greu promoure l'eliminació total d'amoni present en les aigües residuals [61].

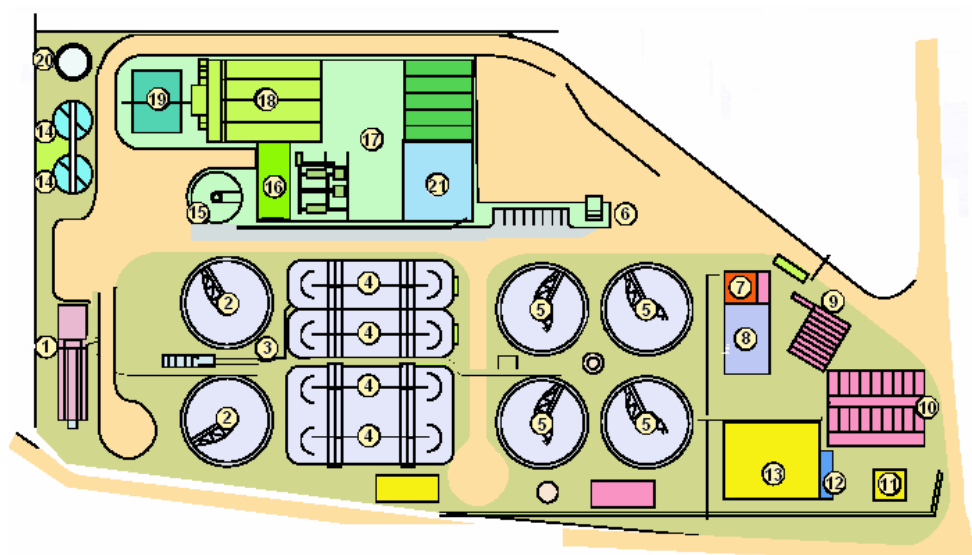
2.2.2. EDAR DE BLANES.

L'EDAR de Blanes va entrar en funcionament l'any 1997 cobrint les necessitats de tractament de les aigües residuals de Blanes. Ocupa una superfície de 3.5 Ha i destina el seu efluent al reg agrícola, a la recàrrega de l'aqüífer i una part s'aboca directament al mar. Les estacions de bombeig associades són: EB Central, EB Sa Palomera, EB Villa Madrid, EB Mas Cremat, EB Sant Francesc nº 1 i 2, EB Port, EB Zona Industrial.

L'EDAR consta de dues línies de tractament d'aigua amb sistema de depuració de fangs activats convencional. El cabal màxim de disseny és de 23.500 m³/dia amb una càrrega contaminant màxima de 109.985 habitants equivalents. Destina les 900 Tn ms anuals de fang a la planta de compostatge adjacent a la depuradora per tal de dur a terme el seu tractament per poder-lo utilitzar amb finalitat agrícola.

El cabal tractat anualment per l'EDAR ronda els 4 milions de m³. La població de Blanes es multiplica durant l'època d'estiueig degut a l'arribada dels turistes, és per aquest motiu que s'observen diferències en la quantitat de cabal tractat entre l'època d'estiueig i la resta de l'any, superant els 400.000 m³ a ple estiu i mantenint un cabal d'entre 200.000 i 300.000 m³ la resta de l'any.

Tal com mostra la **Figura 2.8** l'EDAR està formada per un pretractament, dos decantadors primaris, quatre reactors biològics, quatre decantadors secundaris i un sistema de desinfecció.



- | | | |
|---------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 1. Pretractament | 8. Dipòsit capçalera | 15. Digestor anaerobi |
| 2. Decantadors primaris | 9. Decantadors lamelars | 16. Edifici d'assecatge |
| 3. Mesurador del cabal | 10. Filtres de sorra | 17. Nau de compostatge |
| 4. Reactors biològics | 11. Dipòsit hipoclorit | 18. Túnel de compostatge |
| 5. Decantadors secundaris | 12. Desinfecció | 19. Filtres biològics |
| 6. Cambra presentació | 13. Dipòsit de sortida | 20. Gasòmetre |
| 7. Reactius i bombeig | 14. Espessidor de fangs | 21. Edifici de comandament |

Figura 2.8. Visió en planta de l'EDAR de Blanes [58].

L'efluent és de característiques típiques domèstiques, tal com s'observa en la **Taula 2.4** on s'indiquen els valors mitjans absoluts en els últims tres anys de diferents paràmetres a l'entrada i la sortida de l'EDAR.

PARÀMETRES	Entrada	Sortida
DBO5:	303 mg/L	5 mg/L
DQO:	595 mg/L	37 mg/L
MES:	277 mg/L	13 mg/L
Ph:	7,56	7,48
Conductivitat:	1,40 dS/m	1,29 dS/m
Nitrogen total:	59,00 mg N/L	8,67 mg N/L
Fòsfor total:	9,00 mg P/L	1,60 mg P/L

Taula 2.4. Qualitat de l'efluent secundari de l'EDAR de Blanes (2004-2006) [58].

2.2.3.1. Sistema de regeneració de l'EDAR de Blanes.

La planta de regeneració de Blanes va començar a funcionar el 2002 en fase de proves i a partir del 2003 ja ho va fer a plena producció amb un cabal de disseny de 15.000 m³/dia. Es va dissenyar per un cabal d'efluent de fins a 700 m³/hora. Va començar produint una aigua regenerada desinfectada tan sols mitjançant l'addició d'hipoclorit i assolint l'absència d'*Escherichia Coli* en la majoria de mostres [62]. Més tard es va afegir un equip de llum ultraviolada.

Tot i que el disseny original va ser pensat per subministrar l'aigua regenerada al reg agrícola de la zona, els diferents usos actuals d'aquesta aigua són la recàrrega de l'aqüífer del tram baix del riu Tordera, el reg agrícola i el reg de plantes ornamentals.

Durant el període 2003-2005, es van depurar 11,83 hm³ d'aigua i es va produir un volum total de 10,13 hm³ d'aigua regenerada (86% de regeneració), dels quals 8,59 hm³ (85% de reutilització) es van utilitzar per a la recàrrega de l'aqüífer del tram baix del riu Tordera. El volum d'aigua reutilitzat per a la recàrrega de l'aqüífer representa un 73% del total d'aigua depurada.

Els elements de la planta de regeneració es comenten a continuació:

- *Dipòsit de capçalera*: La canonada de sortida de l'efluent secundari permet derivar fins a 700 m³/hora cap el dipòsit de capçalera de la planta de regeneració d'aigua (**Figura 2.9**). El volum del dipòsit és de 1.500 m³, per tant, el temps de residència de l'efluent secundari és d'uns 130 minuts, a cabal de disseny.



Figura 2.9. Dipòsit de capçalera [58].

- *Coagulació i floculació*: Des del dipòsit de capçalera l'efluent secundari es bombeja cap al tractament físico-químic consistent en una coagulació i una floculació. L'addició de reactius (policlorur d'alumini -PAX 18- com a coagulant i polielectròlit aniònic com a floculant) provoca una agregació de les partícules de matèria en suspensió en forma de flocs, que són retirats del sistema en els processos posteriors del tractament de regeneració.

L'elevada qualitat que té generalment l'efluent secundari al llarg de tot l'any (MES<10 mg/l i terbolesa<5 NTU) fa que habitualment no calgui afegir els reactius per a assolir la qualitat desitjada en l'aigua regenerada (MES< 10 mg/l i terbolesa<2 NTU en percentil 90 en el conjunt anual de dades) (*Consorti de la Costa Brava, 2006b*). Tot i això, les instal·lacions existents estan dissenyades per a aportar unes dosis de fins a 240 mg/L de coagulant i de fins a 230 mg/L de floculant.

- *Decantació lamelar*: L'efluent dels reactors de coagulació i floculació arriba als decantadors lamelars on es produeix la sedimentació dels flocs de mida més gran (**Figura 2.10**). Es disposa de dues unitats de decantació lamelar, amb una superfície total de 110,2 m². A cabal de disseny de 700 m³/h, la velocitat ascensional és de 6,4 m/h.



Figura 2.10. Decantació lamelar [58].

- *Filtració:* L'efluent decantat és conduït fins als filtres Hydroclear, que presenten una única matriu filtrant de sorra de quars de gra fi de 25 cm de gruix i que són de tipus de llit pulsat. La superfície filtrant és de 82,4 m² (quatre cel·les de 20,6 m² cada una) i ofereix a cabal de disseny una velocitat de filtració teòrica de 8,5 m/h. Els filtres retenen les partícules més petites que no han pogut ser eliminades en la decantació lamelar.
- *Desinfecció amb llum ultraviolada:* Els mòduls de llum UV estan ubicats en un canal tancat situat després de la filtració. Són els principals elements de desinfecció de la planta de regeneració d'aigua. Hi ha quatre mòduls amb 8 làmpades cadascun que poden entrar en servei independentment segons les necessitats de desinfecció (**Figura 2.11**). A cabal de disseny i per a una transmissió a 254 nm del 70%, la dosi màxima de llum ultraviolada que pot aportar aquesta instal·lació és de 189 mJ/cm².
- *Cloració d'afinament i dipòsit de sortida:* Finalment, l'aigua regenerada entra en un dipòsit d'emmagatzematge, a l'entrada del qual es realitza l'addició d'hipoclorit sòdic que complementa l'acció desinfectant dels equips de llum ultraviolada. La configuració interna d'aquest dipòsit en forma de laberint, fa que la circulació de l'aigua pel seu interior sigui similar a la que es produiria en un reactor de flux en pistó. El volum del dipòsit és de 2.500 m³, de manera que a cabal de disseny, garanteix un temps de contacte de l'aigua amb el clor d'uns 210 minuts.



Figura 2.11. Equip de desinfecció amb llum ultraviolada [58].

Els tractaments que combinen llum UV i clor presenten una capacitat superior de desinfecció que els tractaments unitaris degut a la major capacitat d'inactivació dels diferents microorganismes.

La planta de regeneració d'aigua de Blanes és capaç de produir una aigua regenerada que durant la major part del temps compleix amb els objectius de qualitat marcats per l'ACA per a la recàrrega de l'aqüífer del tram baix del riu Tordera (**Figura 2.12**). Quan l'aigua regenerada no compleix algun dels criteris principals (per exemple, per concentracions de nitrogen total superiors als 10 mg N/L establerts) és abocada a mar a través de l'emissari submarí existent.

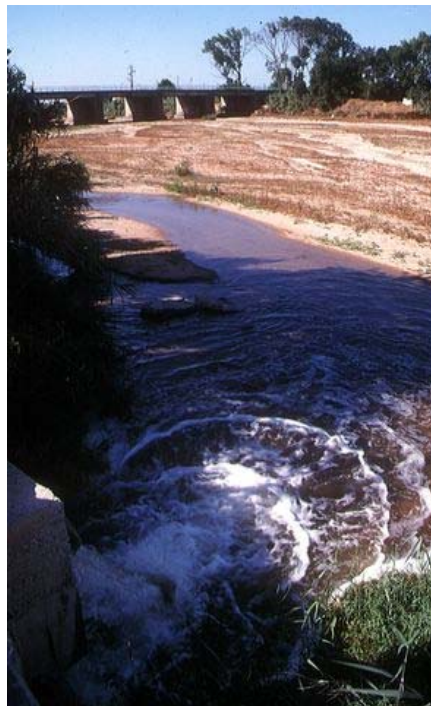


Figura 2.12. Recàrrega de l'aqüífer del riu Tordera per l'EDAR de Blanes [58].

3. OBJECTIUS.



OBJECTIUS.

L'objectiu d'aquest projecte és fer un seguiment de fàrmacs i de cafeïna al llarg del procés de tractament de les aigües residuals de les EDARs d'Empuriabrava, de Castell-Platja d'Aro i de Blanes. Per tal d'aconseguir aquest propòsit, l'estudi s'ha desglossat en l'assoliment dels objectius següents:

1. Posada a punt d'un mètode analític senzill per a la determinació d'àcid clofíbric, cafeïna, carbamazepina, diclofenac, ibuprofè i naproxè en aigües residuals urbanes, basat en extracció en fase sòlida (SPE) seguida de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb detecció UV-visible.
2. Fer un seguiment de la concentració dels fàrmacs en les diferents etapes del procés de tractament de l'aigua a tres EDARs de la Costa Brava.
3. Comparar l'eficiència en l'eliminació dels compostos objecte d'estudi de les tres estacions depuradores mostrejades.

4. MATERIAL I MÈTODES.

4.1. MATERIAL.

4.1.1. APARELLS.

- Balança analítica electrònica A200S amb precisió de ± 0.1 mg (*Sartorius Analytic*).
- Bany d'ultrasons (*Selecta*).
- Bomba peristàltica Minipuls 3 M312 (*Gilson*).
- Cartutx de xeringa Oasis HLB de 30 mg (*Waters*).
- Columna Luna 5 μ m C18 de 150 x 4.60 mm (*Phenomenex*).
- Equip de filtració amb matràs erlenmeyer esmerilat mascle de 1000 mL, embut de filtració de 300 mL, cos amb placa porosa i pinça de subjecció d'alumini.
- Filtres de cel·lulosa.
- Filtres de fibra de vidre amb membrana de nylon (*Whatman*).
- Filtres amb membrana de nitrat de cel·lulosa de 47 mm de diàmetre i 0.45 μ m de porus (*Whatman*).
- Gomes resistents a dissolvents orgànics (*Watson Marlow*).
- Kitasatos, embut büchner, juntes còniques de goma.
- Sistema d'aigua ultrapura Mil-li-Q (*Millipore Ibérica*).
- Sistema instrumental HPLC Spectra System (*Shimadzu*) equipat amb connector SN4000, desgasificador SCM1000, bomba P2000 i detector UV6000LP amb bucle de 20 μ L.
- Xeringa per a HPLC de 100 μ L (*Hamilton*).

4.1.2. REACTIUS I PRODUCTES QUÍMICS.

- Acetat d'etil de qualitat HPLC (Romil).
- Àcid fòrmic i dihidrogenfosfat potàssic de qualitat HPLC (Fluka).
- Acetona, acetonitril, metanol i *n*-hexà tots de qualitat HPLC (Carlo-Erba).
- Fàrmacs àcid clofíbric, cafeïna, carbamazepina, diclofenac, ibuprofè i naproxè (Sigma-Aldrich).

4.1.2. DISSOLUCIONS.

- Dissolucions estoc d'àcid clofíbric, cafeïna, carbamazepina, diclofenac, ibuprofè i naproxè de 500, 50 i 10 ppm: es pesa el sòlid i s'arrasa amb metanol.
- Dissolucions d'àcid clofíbric, cafeïna, carbamazepina, diclofenac, ibuprofè i naproxè amb concentració de 1, 2, 5, 10 i 15 ppm a partir de les dissolucions estoc.
- Dissolució de treball metanol:aigua Mil·li-Q 5:95 (v/v).
- Dissolució de dihidrogenfosfat potàssic 50 mM per la fase mòbil del'HPLC (es pesen 6.80gr de la sal i es dissolen en 1L d'aigua Mil·li-Q).

4.2. MÈTODES.

Per tal d'assolir els objectius marcats en aquest estudi s'ha elaborat una metodologia de treball que inclou totes les etapes a seguir des de la recollida de les mostres fins al tractament dels resultats finals. La metodologia desenvolupada s'ha aplicat a l'anàlisi de 24 mostres d'aigües residuals procedents de tres EDARs de la Costa Brava.

Les aigües residuals són mostres d'una gran complexitat amb composició variada que procedeixen de les descàrregues dels usos municipals, industrials, comercials, agrícoles, domèstiques i similars. Degut a la naturalesa d'aquestes mostres, tant el tractament com l'anàlisi ha de ser molt minuciós per aconseguir purificar els anàlits i alliberar la mostra de la major quantitat d'interferències que impossibilitarien la correcta determinació dels fàrmacs.

El mètode utilitzat per l'extracció en fase sòlida i per la cromatografia líquida d'alta resolució per la injecció de mostres amb compostos farmacèutics, es basa en el treball de J.L. Santos *et.al.* [2] tot i que s'han fet algunes modificacions.

El tractament amb SPE de cada una de les mostres requereix un temps mínim d'unes 3 hores aproximadament, sempre i quan no hi hagi cap problema ocasional. En la determinació amb HPLC cada cromatograma té una durada de 45 minuts, i primer cal injectar els patrons i llavors la mostra.

4.2.1. PRESA DE MOSTRA.

La realització del mostreig comença amb l'elecció del quatre punts de cada una de les tres depuradores estudiades.

Pel seguiment dels fàrmacs a l'EDAR d'Empuriabrava s'han seleccionat els punt següents:

- Entrada de la depuradora (**Figura 4.1 i 4.2**).
- Reactor biològic (**Figura 4.3**).
- Decantador secundari (**Figura 4.4 i 4.5**).
- Tractament terciari: llacunes de decantació i d'afinament (**Figura 4.6 i 4.7**).
- Sistema d'Aiguamolls Construïts (SAC) (**Figura 4.8, 4.9, 4.10 i 4.11**).



Figura 4.1. Punt d'arribada de l'aigua d'entrada a l'EDAR.



Figura 4.2. Detall de l'aigua d'entrada.



Figura 4.3. Reactor biològic.



Figura 4.4. Decantador secundari.



Figura 4.5. Detall del sobreexidor del decantador secundari.



Figura 4.6. Llacunes de sedimentació i d'afinament.



Figura 4.7. Cigne dins de la llacuna d'afinament.



Figura 4.8. Punt d'entrada de l'aigua procedent de l'EDAR al SAC.



Figura 4.9. Cel·la 1 del SAC.



Figura 4.10. Punt de sortida de l'aigua del SAC.



Figura 4.11. Estany Europa.

Els punts escollits per la presa de mostra a l'EDAR de Blanes són:

- Entrada de la depuradora (inici del tractament primari) (**Figura 4.12**).
- Reactor biològic (**Figura 4.13 i 4.14**).
- Decantador secundari (**Figura 4.15**).
- Tractament terciari: Sistema de desinfecció amb clor i llum UV (**Figura 4.16**).



Figura 4.12. Tractament primari, desarenador-desengreixador.



Figura 4.13. Reactor biològic.



Figura 4.14. Detall de la recollida de mostra del reactor biològic.



Figura 4.15. Decantador secundari.



Figura 4.16. Sistema de desinfecció amb clor i llum UV.

Per últim, els punts escollits per l'EDAR de Castell-Platja d'Aro han sigut els següents:

- Entrada de la depuradora (**Figura 4.17**).
- Decantador primari (**Figura 4.18**).
- Reactor biològic (**Figura 4.19**).
- Decantador secundari (**Figura 4.20**).



Figura 4.17. Inici del procés de depuració.



Figura 4.18. Decantador primari.



Figura 4.19. Reactor biològic.



Figura 4.20. Decantador secundari.

En aquesta última EDAR es mostregen punts diferents a les d'Empuriabrava i Blanes a causa de que durant el període de recollida de mostres el tractament terciari de la depuradora de Castell-Platja d'Aro no funcionava per a problemes tècnics.

A cada un dels punts mostrejats es recull un volum d'1L d'aigua i es disposa en ampolles de vidre correctament etiquetades amb la data i el punt al qual corresponen. El transport de les ampolles fins al laboratori es realitza en refrigeració, i quan arriben al lloc de l'anàlisi s'emmagatzemen a una temperatura d'entre 1 i 4°C fins al seu tractament, que es realitza sempre dins dels quinze dies següents.

Les mostres analitzades corresponen al 18 de gener, el 20 de març, el 17 d'abril, el 4 i 18 de juny i l'11 de juliol del 2007.

4.2.2. TRACTAMENT DE MOSTRES.

4.2.2.1. Filtració.

Ja al laboratori, les mostres es filtren amb l'ajuda d'un equip de filtració (**Figura 4.21**) per evitar que la matèria en suspensió que pugui contenir la mostra impedeixi el seu correcte tractament. Primer s'utilitza paper de filtre de cel·lulosa i tot seguit filtres de fibra de vidre de 47 mm de diàmetre i amb mida de porus de 0.45 μm .



Figura 4.21. Equip de filtració.

El temps aproximat requerit per filtrar les aigües és entre 15 minuts i 1 hora segons la mostra. Amb les aigües de les etapes inicials del tractament de depuració la filtració és més difícil que en les mostres de les etapes finals.

4.2.2.2. Extracció en fase sòlida (SPE).

S'ha desenvolupat un mètode basat en l'extracció en fase sòlida considerant les diferents característiques fisicoquímiques dels compostos seleccionats, així com els baixos nivells que s'esperen en les aigües ambientals.

Una vegada es té l'aigua neta de partícules en suspensió indesitjades, es procedeix al tractament amb extracció en fase sòlida de la mostra. Com ja s'ha comentat anteriorment la tècnica de SPE es basa en el mecanisme d'adsorció de l'anàlit sobre una fase estacionària i la seva posterior elució. El procés consta de quatre etapes que consisteixen en l'activació i condicionament del cartutx, la càrrega de la mostra, el

rentat d'interferències i l'elució selectiva. Tot seguit es comenta la metodologia de cada una de les quatre etapes de forma detallada:

a) Activació i condicionament del cartutx:

S'utilitza el cartutx Oasis HLB de 30 mg que es condiciona amb 3 mL d'acetat d'etil, 3 mL de metanol i 3 mL d'aigua desionitzada a un flux aproximat de 3 mL/minut.

b) Càrrega de la mostra:

Es transfereix la mostra filtrada a través del cartutx mitjançant una xeringa de plàstic i forçant un flux aproximat de 5 mL/minut amb l'ajuda de la bomba peristàltica tal com mostra la **Figura 4.22**. El volum d'aigua que es fa passar pel cartutx depèn de quina és la procedència. Si l'aigua correspon a l'entrada o al tractament primari de la depuradora es tracta un volum de 300 mL. En canvi, si l'aigua procedeix del tractament secundari o terciari de l'EDAR, el volum de mostra que es tracta és de 500 mL.



Figura 4.22. Transferència de la mostra pel cartutx amb ajuda de la bomba peristàltica.

c) Rentat:

Una vegada s'ha passat tot el volum de mostra desitjat, el cartutx es neteja de possibles interferències amb 5 mL d'una solució metanol:aigua Mil·li-Q (5:95 v/v) i 5 mL de n-hexà a un flux de 1 mL/min. Tot seguit es seca el cartutx amb l'ajuda d'un sistema de filtració al buit.

d) *Elució selectiva:*

Una vegada es té el cartutx sec, s'elueixen els anàlits al vial corresponent i etiquetat de forma adequada amb 3 alíquotes d'1mL cada una d'acetat d'etil a un flux de 1 mL/min. Finalment les 3 alíquotes d'elució s'evaporen amb nitrogen i es reconstitueix el residu amb 250 µL de metanol que ja es pot injectar al sistema d'HPLC.

El temps necessari per portar a terme l'extracció en fase sòlida de cada una de les mostres des del condicionament del cartutx fins que s'evapora i es reconstitueix el residu és d'unes 2 hores i 30 minuts aproximadament.

4.2.3. MÈTODE CROMATOGRÀFIC.

El mètode emprat es basa en el proposat per Santos *et. al.* [2] el qual s'ha posat a punt i optimitzat pels fàrmacs objecte d'estudi en aquest treball.

Les millors tècniques per la determinació de compostos farmacèutics són les cromatogràfiques. En aquest estudi s'utilitza la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) mostrat a la **Figura 4.23**.



Figura 4.23. Equip d'HPLC.

El sistema de cromatografia líquida d'alta resolució es basa en la separació cromatogràfica dels anàlits mitjançant un conjunt de solvents que actuen com a fase mòbil i un material que empaqueta la columna com a fase estacionària. Es força el pas dels components de la solució per la columna cromatogràfica sota condicions d'alta pressió i els anàlits es van separant de la solució inicial en funció de les interaccions que es donen entre els mateixos i la fase estacionària, oferint diferents temps de retenció.

S'utilitzen bombes de flux constant per mantenir un flux de 1 mL/minut al llarg de tot el procés cromatogràfic. La pressió varia segons la proporció entre solvents de la fase mòbil i per problemes que pugui patir la columna com la possible obturació i per la temperatura de la mostra que s'injecta entre altres.

La cromatografia és de fase inversa. La fase estacionària de Si-C18 empaquetada dins la columna és hidrofòbica, apolar, i la fase mòbil està formada per dissolvents relativament polars, aquests són l'acetonitril i el tampó dihidrogenfosfat potàssic 50 mM (KH_2PO_4). Els dos dissolvents de la fase mòbil s'introdueixen en ampolles de vidre, es filtren amb filtres de membrana de nitrat de cel·lulosa de 47 mm de diàmetre i 0.45 μm de porus i es soniquen durant 20 minuts per eliminar els gasos que puguin tenir en dissolució.

Es realitza una elució en gradient per tant, la composició de la fase mòbil varia constantment al llarg del cromatograma combinant els dissolvents acetonitril i dihidrogenfosfat potàssic 50 mM.

A mesura que va passant el temps després d'una injecció, la fase mòbil canvia segons el gradient i els compostos s'elueixen de la columna anant directes al detector UV-visible. El detector mesura a les longituds d'ona de 224, 273 i 282 nm i fa un escombrat entre 210 i 300 nm.

El mètode òptim per l'elució dels fàrmacs permet crear diferents condicions que van des d'una proporció acetonitril:KH₂PO₄ 50 mM 15:85 fins a 45:55 (v/v) tal com mostra la **Taula 4.1:**

<i>Temps (minuts)</i>	<i>% Acetonitril</i>	<i>% KH₂PO₄</i>
0	15	85
5	15	85
10	20	80
15	25	75
30	45	55
45	45	55

Taula 4.1. Mètode d'elució dels fàrmacs per HPLC.

Cada dia abans d'injectar les mostres tractades es realitza un calibrat amb els patrons de 1, 2, 5, 10 i 15 ppm fets a partir de les solucions estoc inicials de 500 ppm de cada compost. S'han escollit aquestes concentracions tenint en compte referències bibliogràfiques d'estudis similars i considerant el factor de preconcentració que s'assoleix durant l'etapa de SPE. Es realitza la recta de calibrat i quan es confirma la seva linealitat es procedeix a l'injecció de les mostres.

Una vegada s'han obtingut els cromatogrames es duu a terme el tractament de dades primer confirmant la identificació del pic, i segon, quantificant-lo mesurant la seva àrea. Per confirmar que un pic correspon a un dels fàrmacs estudiats, aquest ha de complir unes condicions determinades:

- En primer lloc, el temps de retenció ha de coincidir amb el temps assolit per aquell mateix compost als patrons.
- En segon lloc, les àrees dels pics de cada longitud d'ona adquirides amb la mostra, s'han de correspondre de forma proporcional amb els pics de les tres longituds d'ona obtinguts amb els patrons.

- I per últim, no s'ha de confondre el pic amb el soroll de la línia de fons del cromatograma. Les fluctuacions de la línia poden ser degudes a petites variacions de la pressió, bombolles d'aire, variacions de la temperatura i inestabilitat de la làmpada del detector entre altres factors. Quan el pic és molt gran no hi ha cap problema per distingir-lo, però quan es tracta de pics petits, poden haver-hi confusions. Per evitar aquestes confusions, considera que un pic és tal quan és com a mínim tres vegades superior al soroll de la línia de fons, tal com mostra la **Figura 4.24**.

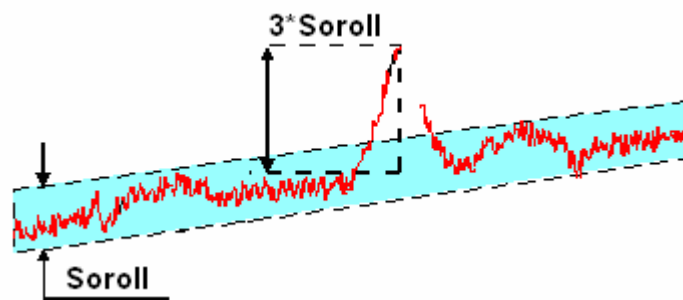


Figura 4.24. Definició de soroll per reconèixer un pic petit detectable de la línia de base d'un cromatograma. [53].

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ.

5.1. MÈTODE CROMATOGRÀFIC.

Abans de procedir al tractament de la mostra amb extracció en fase sòlida s'ha elaborat el mètode cromatogràfic. Per establir quin és el mètode més adequat per aquest estudi s'han realitzat varies proves amb les metodologies establertes en els treballs de M. Bayona [13] i J.L. Santos [2].

En primer lloc es va seguir el mètode utilitzat per M. Bayona i altres en un estudi, on acidifiquen les mostres fins a un valor de pH de 2 amb àcid clorhídric concentrat abans de realitzar el procés d'extracció en fase sòlida, i durant l'anàlisi amb HPLC utilitzen com a fase mòbil acetonitril i aigua Mil-li-Q acidificada amb àcid fòrmic fins un valor de pH de 3. Abans de procedir a l'extracció en fase sòlida seguint el mètode d'aquest l'article, es van fer varies injeccions al cromatograma amb els patrons de les solucions acidificades de cada fàrmac de forma individual i també de la solució conjunta amb tots els compostos. Després de varies proves i de l'observació detinguda dels cromatogrames, es va decidir que no era una metodologia adient per la determinació dels compostos. Els cromatogrames presentaven una línia base molt dolenta i amb l'acidificació de les mostres varies substàncies interferents es podien extreure junt amb els fàrmacs durant el procés de SPE. Es va optar per canviar de metodologia.

Tot seguit es va provar amb l'alternativa del treball de J.L. Santos, a partir del qual s'ha basat el mètode cromatogràfic definitiu, tot i que presenta algunes modificacions respecte l'original tal com es comenta a continuació.

Inicialment per conèixer el temps de retenció de cada fàrmac, les injeccions al sistema de HPLC s'han realitzat amb el mateix gradient descrit per Santos, però a mesura que s'han obtingut els cromatogrames s'ha anat modificant per millorar els resultats amb la finalitat d'acotar l'aparició dels pics i facilitar la seva identificació i quantificació. El

gradient amb el que es duu a terme el present estudi comença amb una proporció acetonitril:dihidrogenfosfat potàssic 50 mM 15:85 (v/v) i finalitza amb una proporció dels mateixos solvents de 45:55 (v/v). El gradient s'ha descrit amb anterioritat al Capítol 4.2 titulat "Mètodes". Els cromatogrames tenen una durada de 45 minuts, igual que els cromatogrames de l'equip de Santos.

En l'article, Santos injecta un volum de 20 µL de mostra i utilitza detectors de UV-visible i de fluorescència. En aquest estudi s'injecta el mateix volum de mostra, però tan sols s'utilitza el detector UV-visible. Pel que fa a la fase mòbil, Santos utilitza metanol, acetonitril i dihidrogenfosfat potàssic 50 mM com a solvents per la fase mòbil, en canvi, en el aquest estudi tan sols s'empren dues de les tres fases nomenades, l'acetonitril i el tampó dihidrogenfosfat potàssic 50 mM. Aquesta diferència es deu a que Santos determina el fàrmac acetaminofè, el qual requereix la combinació entre metanol i dihidrogenfosfat potàssic 50 mM per eluir de la columna. Com que en aquest treball els fàrmacs que es determinen tan sols necessiten acetonitril i dihidrogenfosfat potàssic 50 mM per eluir-se, no cal un tercer dissolvent per al a separació dels compostos.

En cada injecció tan de les mostres com dels patrons, s'obtenen tres cromatogrames corresponents a les longituds d'ona de 224, 273 i 282 nm. S'han escollit concretament aquestes longituds per les consultes bibliogràfiques realitzades en que es conclou que l'àcid clofíbric, el naproxè i ibuprofè tenen la màxima absorció a la longitud d'ona de 224 nm, la cafeïna a 273 nm i la carbamazepina i el diclofenac absorbeixen tant a 224 com a 282 nm. Aquestes són les longituds d'ona en que els compostos tenen la màxima absorbància, això no vol dir que per exemple, un compost que absorbeixi de forma màxima a una longitud de 273 nm, no absorbeixi també a les altres dues longituds d'ona mesurades, tot i que ho faci d'una manera inferior mostrant pics amb una àrea més petita.

Com a exemple dels cromatogrames, les **Figures 5.1, 5.2 i 5.3** mostren els corresponents a cada una de les longituds d'ona del patró de 10 ppm de la solució conjunta dels sis fàrmacs.

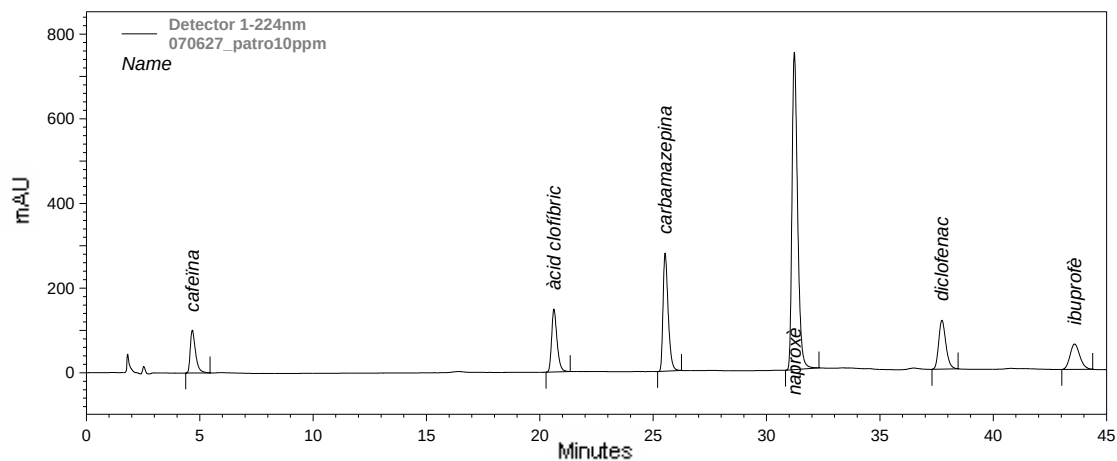


Figura 5.1. Cromatograma corresponent a la longitud d'ona de 224 nm del patró de 10 ppm.

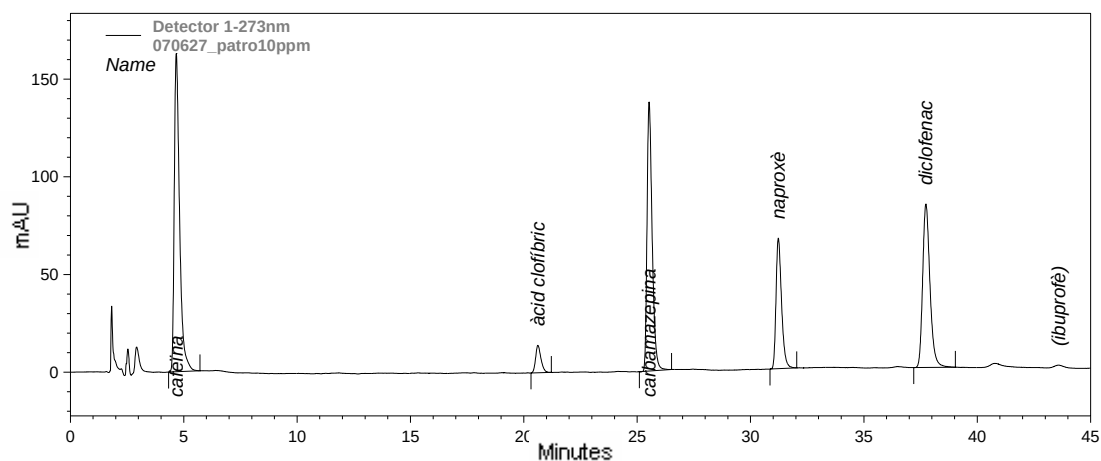


Figura 5.2. Cromatograma corresponent a la longitud d'ona de 273 nm del patró de 10 ppm.

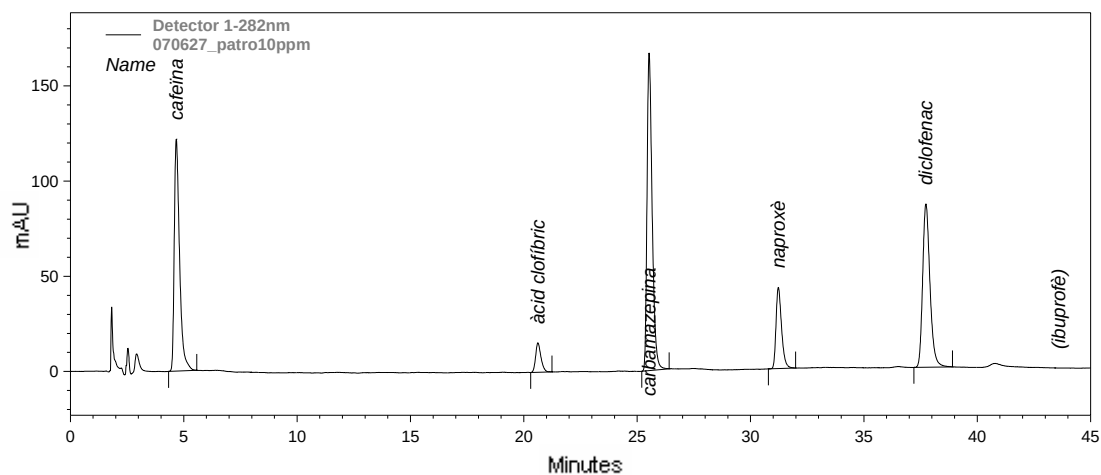


Figura 5.3. Cromatograma corresponent a la longitud d'ona de 282 nm del patró de 10 ppm.

Amb els resultats de la injecció dels patrons es fa un calibrat diari per poder integrar les mostres. La **Taula 5.1** es mostra un dels calibrats on es presenta l'àrea dels pics dels patrons de 1, 2, 5 i 10 ppm, l'equació de la recta i el coeficient de regressió, r^2 , que expressa la bondat de l'ajust lineal. Les mesures dels fàrmacs corresponen a la longitud d'ona de 224 nm excepte per la cafeïna, que es mesura a 273 nm. Com es pot observar, la linealitat és molt bona en tots els casos. Tot seguit la **Figura 5.4** mostra la representació gràfica del calibrat.

FÀRMACS	Concentració patrons (ppm)				Equació de la recta	r^2
	1	2	5	10		
Àcid clofíbric	235932	497349	1233609	2459025	$y = 246374x - 2202.6$	1
Cafeïna	290716	333418	1341530	2645238	$y = 272827x - 74996$	0.9918
Carbamazepina	414402	892561	2231262	4380181	$y = 439282x + 2832.6$	0.9998
Diclofenac	223379	495439	1251163	2535872	$y = 256173x - 26313$	1
Ibuprofè	163171	360984	911357	1798099	$y = 181054x - 6341.9$	0.9998
Naproxè	1270370	2584349	6478054	12895524	$y = 1000000x - 2264.3$	1

Taula 5.1. Calibrat dels patrons de 1, 2, 5 i 10 ppm amb l'àrea dels pics, l'equació de la recta i la r^2 .

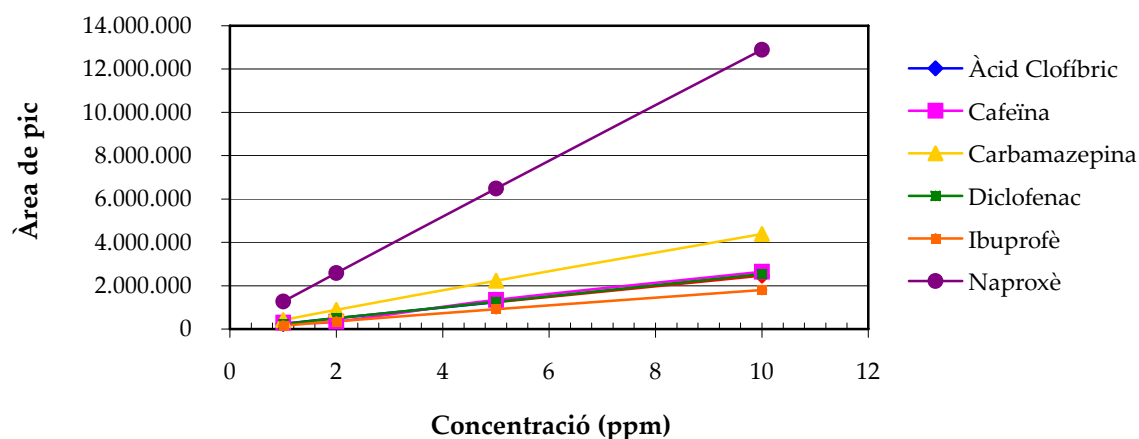


Figura 5.4. Representació gràfica del calibrat.

El mètode cromatogràfic seguit en l'estudi presenta un límit de detecció d'aproximadament 0.2 ppm.

5.2. TRACTAMENT DE LA MOSTRA: SPE.

Una vegada s'ha comprovat que el mètode cromatogràfic és eficient, es comença a elaborar la metodologia pel tractament de la mostra mitjançant extracció en fase sòlida.

Considerant que les mostres tractades són aquoses, que els anàlits a determinar són relativament polars i solubles en solvents orgànics, el mecanisme de separació que s'empra és de fase inversa i s'utilitza un sorbent relativament apolar.

5.2.1. ELECCIÓ DEL CARTUTX: Oasis HLB.

Una vegada es coneix quin és el tipus de sorbent que cal emprar, es procedeix a l'elecció del cartutx. Com ja s'ha comentat en altres capítols, l'elecció del sorbent determinarà l'eficàcia de l'extracció i per tant, a l'hora d'escollir-lo és important tenir en compte l'estructura química dels anàlits i de la matriu de la mostra per aconseguir la màxima retenció dels analits i la mínima retenció de substàncies interferents.

S'han fet proves amb tres sorbents diferents per comprovar quin obté una major retenció i recuperació dels compostos. Dos dels sorbents són polimèrics, Strata X i Oasis HLB i el tercer és de matriu de sílica, Accubond C18. Els millors resultats s'han obtingut amb les fases sòlides polimèriques. En el cas de l'Accubond no s'ha aconseguit una bona recuperació dels fàrmacs degut a que es tracta d'un material bastant apolar, i com els fàrmacs són majoritàriament polars no tenen una gran afinitat amb el sorbent. Comparats tots els resultats i donades les característiques dels compostos amb un ampli rang de polaritat i valor de pKa, es considera que el sorbent més adient per realitzar l'extracció en fase sòlida és l'Oasis HLB.

La fase sòlida Oasis HLB és un empaquetat polimèric dissenyat especialment per SPE per fase inversa. El nom prové de l'acrònim anglès “Hydrophilic-Lipophilic Balance”, ja que està format per un copolímer macroporós amb una proporció equilibrada d'un monòmer hidrofílic, N-vinilpirrolidona, i d'un de lipofílic, el divinilbenzè (**Figura 5.5**).

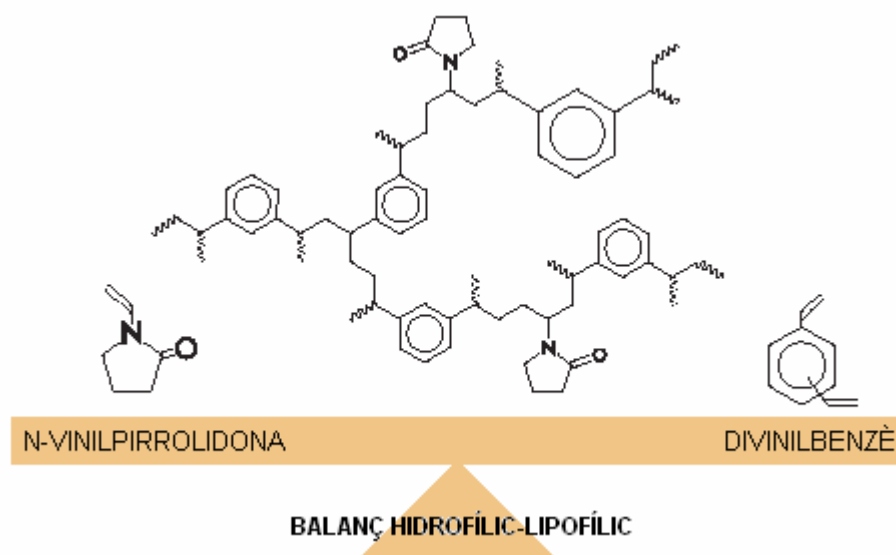


Figura 5.5. Estructura del polímer Oasis HLB [63].

La doble natura polar i apolar facilita el contacte entre l'adsorbent i les mostres aquoses, fent que el sorbent sigui versàtil i es pugui aplicar per a l'extracció de compostos àcids, neutres i bàsics amb elevades recuperacions [64]. Aquesta composició amb equilibri hidrofílic-lipofílic proporciona una sèrie de característiques especials, tals com l'estabilitat dins d'un ampli interval de pH, la resistència a valors de pH extrems i una capacitat relativa tres vegades superior a la que ofereixen els empaquetats tradicionals de base sílice com el C18. Les principals característiques del cartutx Oasis HLB es mostren a la **Taula 5.2**:

Estructura:	DVB-VP
Àrea superficial específica:	810 m ² /g
Diàmetre dels porus:	80 Å
Volum total dels porus:	1.3 cm ³ /g
Diàmetre de partícula:	30-60 µm

Taula 5.2. Característiques del cartutx Oasis HLB.

Degut a que l'empaquetat és humectant en aigua, manté la capacitat de retenció i les elevades recuperacions fins i tot si l'empaquetat s'arriba a assecar.

Segons un estudi teòric de Dias i Poole [65] es donen a conèixer les interaccions involucrades en els mecanismes de retenció del sorbent Oasis HLB, mitjançant el càlcul de les constants característiques del sorbent segons el solvent utilitzat i la matriu de la mostra. Conclou que quan la matriu de la mostra a tractar és aquosa, en el mecanisme de retenció del sorbent Oasis HLB hi predominen les interaccions hidrofòbiques, dipol-dipol, ponts d'hidrogen i les fortes interaccions per parell electrònic que incrementen la retenció dels compostos electrodonadors com els compostos aromàtics. En canvi, amb una matriu amb mescla d'aigua i solvent orgànic, el sorbent Oasis HLB no seria el més adient per extreure els compostos de polaritat moderada.

La utilització d'Oasis HLB no requereix la preparació prèvia de la mostra, propiciant que els resultats de diferents anàlisis siguin més reproduïbles. Cahill *et al.* [66] van estudiar aquest fet en la determinació d'un grup de fàrmacs d'estructura química molt variada comparant l'eficiència de tres cartutxos: l'Oasis HLB, un de sílice enllaçada amb C18 i un de carbó. Els autors van destacar que sense tractar prèviament la mostra amb Oasis HLB s'obtenien elevades recuperacions una reproductibilitat que no oferien els altres tipus de sorbents.

Les destacades característiques que s'atribueixen a les fases sòlides Oasis HLB han estimulat el seu ús en diversos camps d'aplicació per determinar compostos en matrius líquides molt variades. Bàsicament es poden dividir les seves aplicacions en neteja i extracció de compostos de matrius biològiques [67, 68] i extracció de contaminants com fenols [69], plaguicides [70, 71], i fàrmacs [72-74] en mostres aquoses. També s'han comparat a altres sorbents comercials de sílice [65-67, 75-80], carbó [65, 78, 79] o polimèrics convencionals [65, 75,76]. En la majoria d'aplicacions, el sorbent Oasis HLB ha obtingut un major potencial per a l'extracció de compostos d'elevada polaritat.

5.2.2. MÈTODE D'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPE).

El procediment de SPE s'ha obtingut a partir de l'article de J.L. Santos. A l'article es tracten volums de mostra de 500 mL per les aigües d'entrada i 1000 mL per les aigües de sortida. En les primeres mostres tractades en aquest estudi es transferia al cartutx 500 mL per a totes les mostres. Van haver problemes d'interferències que dificultaven l'anàlisi sobretot amb les mostres d'entrada i del tractament primari, ja que corresponen a etapes del procés de depuració en que les aigües presenten major contingut de matèria orgànica. Per aquest motiu, es va decidir disminuir el volum de mostra a tractar fins a 300 mL per les mostres amb aquestes dues procedències, considerant també que els fàrmacs es troben a majors concentracions. Per les aigües procedents dels tractaments secundaris i terciaris s'ha mantingut el volum de 500 mL.

La fase sòlida Oasis HLB s'ha condicionat amb 3 mL d'acetat d'etil, 3 mL de metanol i 3 mL d'aigua Mil-li-Q. Com ja s'ha comentat, la transferència de la mostra s'ha realitzat amb volums inferiors als utilitzats en l'esmentat treball a un flux màxim de 5 mL/min. Pel que fa a l'etapa de neteja del cartutx, és el punt en que hi ha hagut una major modificació. S'han assajat diferents volums de dissolució de rentat començant per 3 mL de solució metanol:aigua Mil-li-Q (5:95 v/v) i 3 mL de *n*-hexà. Els cromatogrames obtinguts presentaven una línia base molt irregular i es va optar per rentar el cartutx amb un volum superior. Cada cartutx s'ha rentat amb 5 mL de cada solució mencionada. L'hexà elimina les interferències hidrofòbiques presents en les aigües residuals, però no elimina els compostos ni les interferències polars de la matriu.

L'elució es realitza amb 3 alíquotes d'1 mL d'acetat d'etil les quals, posteriorment, s'evaporen amb un lleuger flux de nitrogen. Finalment, es reconstitueix el residu obtingut de l'evaporació amb 250 µL de metanol.

Com a exemple representatiu de les mostres de les depuradores, a continuació s'exposen els cromatogrames de l'EDAR d'Empuriabrava corresponents a l'entrada (**Figures 5.6, 5.7 i 5.8**) i la llacuna d'afinament (**Figures 5.9, 5.10 i 5.11**). S'observa la

diferència de magnitud dels pics una vegada han passat pel procés de depuració, encara que tot i així, alguns dels compostos no s'han eliminat completament.

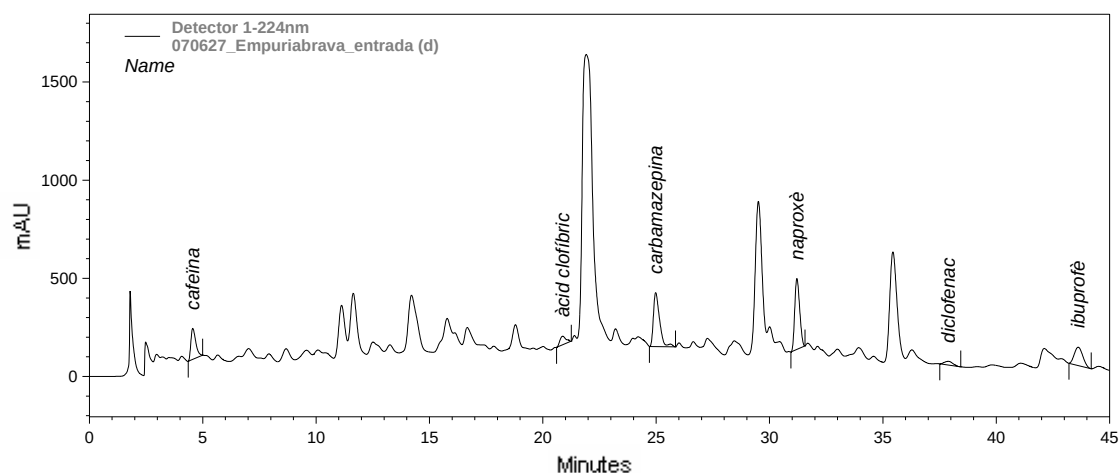


Figura 5.6. Cromatograma corresponent a la longitud d'ona de 224 nm de la mostra d'entrada del dia 27/06/2007 a l'EDAR d'Empuriabrava.

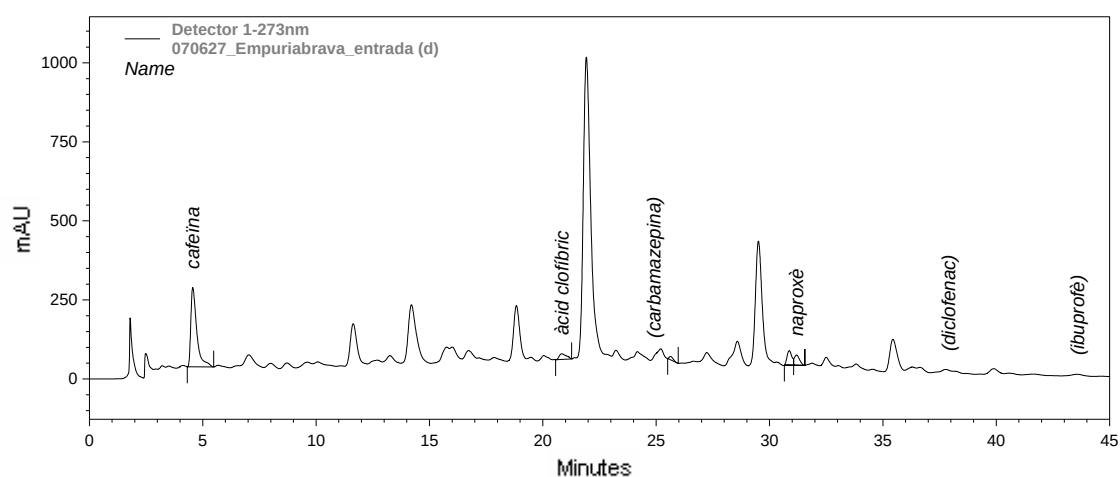


Figura 5.7. Cromatograma corresponent a la longitud d'ona de 273 nm de la mostra d'entrada del dia 27/06/2007 a l'EDAR d'Empuriabrava.

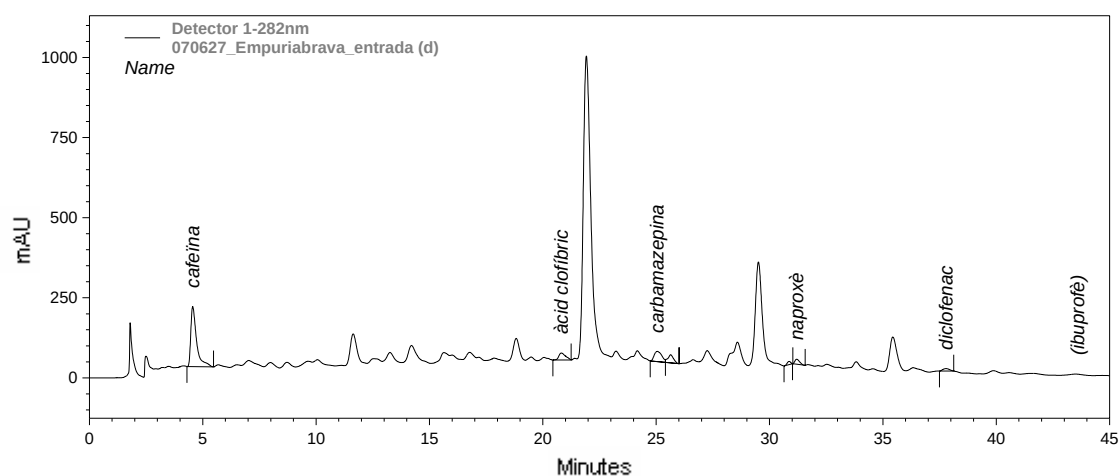


Figura 5.8. Cromatograma corresponent a la longitud d'ona de 282 nm de la mostra d'entrada del dia 27/06/2007 a l'EDAR d'Empuriabrava.

Els cromatogrames de la sortida de l'EDAR, corresponents a la llacuna d'afinament que forma part del tractament terciari de la depuradora són els següents:

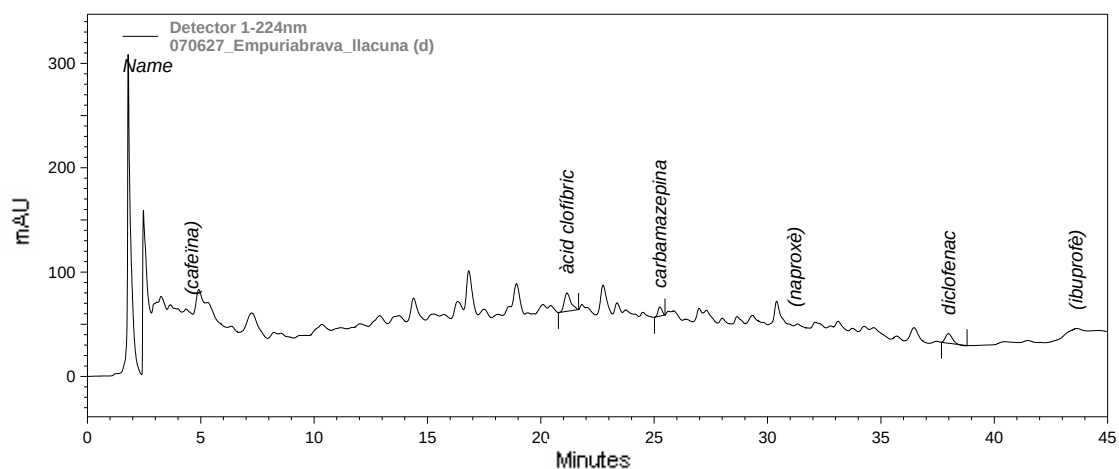


Figura 5.9. Cromatograma corresponent a la longitud d'ona de 224 nm de la mostra de la llacuna d'afinament del dia 27/06/2007 a l'EDAR d'Empuriabrava.

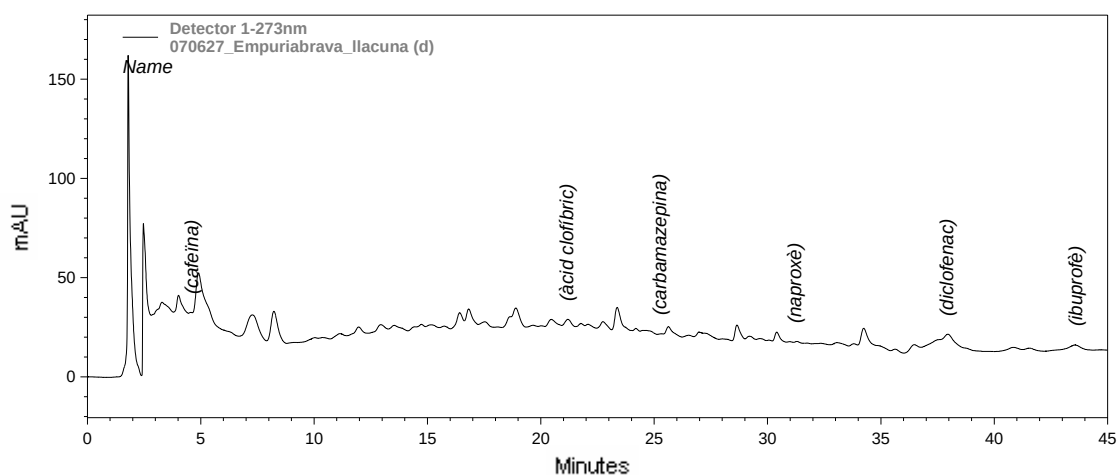


Figura 5.10. Cromatograma corresponent a la longitud d'ona de 273 nm de la mostra de la llacuna d'afinament del dia 27/06/2007 a l'EDAR d'Empuriabrava.

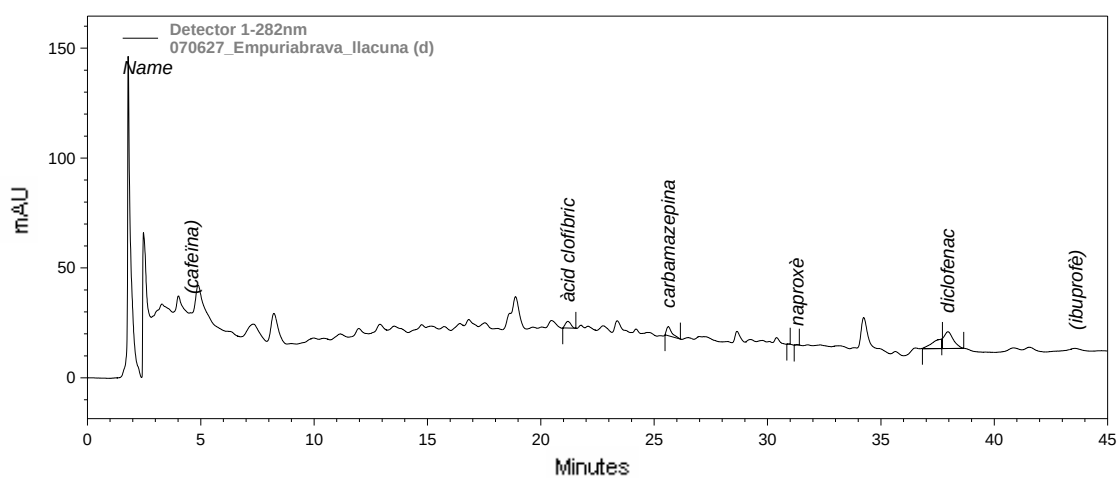


Figura 5.11. Cromatograma corresponent a la longitud d'ona de 282 nm de la mostra de la llacuna d'afinament del dia 27/06/2007 a l'EDAR d'Empuriabrava.

Tal com es pot observar, els pics dels cromatogrames de les mostres d'entrada de la depuradora són més grans que els de la sortida. En el primer cas, amb els pics més grans corresponents als fàrmacs objectes d'estudi s'assoleixen uns valors d'absorbància d'aproximadament 900 mAU. En canvi, en els cromatogrames de la sortida de l'EDAR com a molt s'assoleixen al voltant dels 100 mAU. Aquesta disminució evidencia el procés de degradació que pateixen dins del procés de depuració de l'EDAR.

Seguint la metodologia d'extracció en fase sòlida comentada les mostres d'entrada i del decantador primari assoleixen una concentració de 1200 vegades. La resta de les mostres ho fan en 2000 vegades respecte la concentració inicial.

El límit de detecció de tot el mètode és de 0.17 µg/L per les mostres d'entrada i del decantador primari, i de 0.1 µg/L per les mostres del reactor biològic, del decantador secundari i dels tractaments terciaris.

5.3. SEGUIMENT DELS FÀRMACS AL LLARG DE LES EDARS.

Com ja s'ha comentat a la introducció, aquest estudi té com a objectiu fer un seguiment de sis fàrmacs al llarg de tot el procés de depuració de tres estacions depuradores d'aigües residuals, l'EDAR d'Empuriabrava al nord, l'EDAR de Castell-Platja d'Aro al centre i l'EDAR de Blanes al sud de la Costa Brava.

Inicialment l'objectiu de les EDARs era eliminar els sòlids en suspensió i flotants, la matèria orgànica biodegradable i els organismes patògens, però degut a l'augment del coneixement sobre el tractament biològic, l'augment de sensibilització de la població i

la necessitat de reutilitzar les aigües residuals, entre altres, els objectius s'han ampliat afegint l'eliminació de nutrients, dels compostos orgànics tòxics i dels metalls pesants.

Les principals fonts d'abocament de fàrmacs al medi són les agrícoles i les urbanes, entre elles l'ús creixent de fàrmacs a nivell mundial. Els compostos farmacèutics de consum humà poden entrar al sistema d'aigües residuals a través de l'orina i dels excrements que van a parar a les estacions depuradores. La quantitat de fàrmacs que es troba al medi depèn majoritàriament de la quantitat produïda, de la freqüència de dosificació i de la quantitat que s'excreta.

Els processos convencionals de tractament d'aigües residuals no estan específicament dissenyats per eliminar els fàrmacs i sovint aquests no són eliminats eficientment. La seva eliminació a les depuradores, com totes les substàncies químiques, depèn tan sols de la seva capacitat per adsorbir-se a les partícules sòlides o per biodegradar-se, que és el que es vol confirmar a continuació mitjançant el tractament de les dades.

A les **Taules 5.3, 5.4, 5.5 i 5.6** es mostren els resultats obtinguts en el seguiment de cada fàrmac a les tres depuradores objecte d'estudi per cada dia vàlid de mostreig.

<i>Data mostreig: 17 d'abril</i>		<i>Àcid Clofibríic</i>	<i>Cafeïna</i>	<i>Carbamazepina</i>	<i>Diclofenac</i>	<i>Ibuprofè</i>	<i>Naproxè</i>
EMPURIA- BRAVA	Entrada	3.5	65.4	2.1	2.8	51.5	20.2
	Reactor biològic	2.9	1.9	2.0	2.2	<0.1	8.6
	Decantador 2ari	1.7	1.8	1.8	1.4	<0.1	0.5
	Tractament 3ari	1.4	0.5	1.2	1.3	<0.1	0.3
CASTELL- PLATJA D'ARO	Entrada	2.2	39.0	1.7	1.4	18.8	6.3
	Decantador 1ari	2.2	19.9	1.5	1.3	14.1	5.3
	Decantador 2ari	2.2	1.4	1.4	1.1	<0.1	1.9
	Tractament 3ari	2.1	1.1	1.1	0.8	<0.1	0.4
BLANES	Entrada	1.9	70.4	1.4	0.9	40.4	5.4
	Reactor biològic	1.6	1.6	1.2	0.7	1.7	0.8
	Decantador 2ari	1.6	0.9	0.4	0.6	0.8	0.5
	Tractament 3ari	1.2	0.8	0.4	0.2	<0.1	0.1

Taula 5.3. Resultats obtinguts en el seguiment dels fàrmacs ($\mu\text{g L}^{-1}$) en les tres depuradores mostrejades el dia 17 d'abril del 2007.

<i>Data mostreig: 4 de juny</i>		<i>Àcid Clofibríc</i>	<i>Cafeïna</i>	<i>Carbamazepina</i>	<i>Diclofenac</i>	<i>Ibuprofè</i>	<i>Naproxè</i>
EMPURIA-BRAVA	Entrada	2.7	52.4	0.6	1.7	11.2	4.6
	Reactor biològic	2.1	3.1	0.2	1.1	2.6	0.2
	Decantador 2ari	1.5	2.7	0.2	1.3	0.3	0.1
	Tractament 3ari	1.2	1.4	0.2	0.7	<0.1	<0.1
CASTELL-PLATJA D'ARO	Entrada	1.5	57.9	1.4	1.6	30.5	9.8
	Decantador 1ari	1.2	20.7	1.1	1.4	28.7	8.5
	Decantador 2ari	1.1	1.0	0.8	0.9	<0.1	2.0
	Tractament 3ari	1.1	1.0	0.6	0.8	<0.1	1.7
BLANES	Entrada	1.8	49.3	0.8	2.3	16.1	7.9
	Reactor biològic	1.6	2.5	0.2	2.5	1.6	0.5
	Decantador 2ari	1.4	<0.1	0.2	2.3	<0.1	0.3
	Tractament 3ari	1.1	<0.1	0.2	2.3	0.6	0.7

Taula 5.4. Resultats obtinguts en el seguiment dels fàrmacs ($\mu\text{g L}^{-1}$) en les tres depuradores mostrejades el dia 4 de juny del 2007.

<i>Data mostreig: 18 de juny</i>		<i>Àcid Clofibríc</i>	<i>Cafeïna</i>	<i>Carbamazepina</i>	<i>Diclofenac</i>	<i>Ibuprofè</i>	<i>Naproxè</i>
EMPURIA-BRAVA	Entrada	1.9	34.9	2.5	0.8	18.7	3.8
	Reactor biològic	0.5	2.8	0.9	1.1	2.5	0.4
	Decantador 2ari	<0.1	1.6	1.1	0.5	2.3	0.2
	Tractament 3ari	<0.1	0.7	1.7	0.3	2.0	0.5
CASTELL-PLATJA D'ARO	Entrada	<0.17	47.1	0.5	1.3	39.5	7.9
	Decantador 1ari	<0.17	19.2	0.3	1.2	32.9	6.7
	Decantador 2ari	<0.1	<0.1	0.3	0.8	2.0	3.9
	Tractament 3ari	<0.1	<0.1	0.3	0.5	1.8	1.5
BLANES	Entrada	2.5	54.1	0.9	1.6	19.5	6.0
	Reactor biològic	2.3	2.8	0.8	1.3	0.3	0.4
	Decantador 2ari	1.9	1.9	0.6	0.9	<0.1	0.1
	Tractament 3ari	1.7	<0.1	0.6	0.5	<0.1	0.1

Taula 5.5. Resultats obtinguts en el seguiment dels fàrmacs ($\mu\text{g L}^{-1}$) en les tres depuradores mostrejades el dia 18 de juny del 2007.

<i>Data del mostreig: 11 de juliol</i>			<i>Àcid Clofibríc</i>	<i>Cafeïna</i>	<i>Carbamazepina</i>	<i>Diclofenac</i>	<i>Ibuprofè</i>	<i>Naproxè</i>
EMPURIA-BRAVA	Entrada		2.1	67.4	1.3	0.9	61.9	0.3
	Reactor biològic		0.8	<0.1	0.8	0.4	1.1	0.1
	Decantador 2ari		0.6	<0.1	0.7	0.5	1.3	0.1
	Tractament 3ari		0.5	<0.1	0.9	0.4	1.4	0.1
	Aiguamolls de tractament	Entrada	0.7	<0.1	0.8	0.4	1.4	0.5
		Sortida	0.5	<0.1	0.8	0.3	<0.1	0.2
CASTELL-PLATJA D'ARO	Entrada		0.2	68.2	1.1	0.5	24.7	7.5
	Decantador 1ari		0.2	27.4	0.8	0.5	21.2	6.6
	Decantador 2ari		0.2	1.9	0.7	0.3	1.0	0.4
	Tractament 3ari		0.1	1.9	0.6	0.3	<0.1	0.3
BLANES	Entrada		1.1	67.2	1.0	1.5	18.9	2.9
	Reactor biològic		0.9	<0.1	0.7	1.5	<0.1	2.1
	Decantador 2ari		0.7	<0.1	0.7	1.4	<0.1	1.5
	Tractament 3ari		0.5	<0.1	0.7	1.0	<0.1	1.3

Taula 5.6. Resultats obtinguts en el seguiment dels fàrmacs ($\mu\text{g L}^{-1}$) en les tres depuradores mostrejades el dia 11 de juliol del 2007.

Com s'observa a les taules les concentracions dels fàrmacs oscil·len entre el límit de detecció i uns pocs $\mu\text{g/L}$. Els fàrmacs amb una major concentració detectada a l'aigua d'entrada són el naproxè, l'ibuprofè i la cafeïna amb 20.2, 61.9 i 70.4 $\mu\text{g/L}$ respectivament. La resta dels compostos s'han detectat a l'entrada de les depuradores amb concentracions màximes de 2.5, 2.8 i 3.5 $\mu\text{g/L}$ corresponents a la carbamazepina, el diclofenac i l'àcid clofíbric. Pel que fa a les mostres de sortida de les EDARs les concentracions es redueixen de forma considerable respecte els valors detectats a l'entrada, però no en la seva totalitat. S'han detectat concentracions màximes als efluents de les depuradores amb valors que oscil·len entre 1.7 $\mu\text{g/L}$ detectats d'àcid clofíbric i 2.3 $\mu\text{g/L}$ de diclofenac, no superant aquest últim valor en cap dels casos.

La cafeïna és el compost que s'ha detectat amb major concentració a les mostres d'entrada de les depuradores. Generalment és una de les substàncies amb major índex de detecció en aigües residuals d'entrada de les depuradores [2, 11]. Aquest fet és degut a que a part de prendre's com a fàrmac, és una de les substàncies més consumides arreu del món diàriament que tan es pot trobar en aliments com en begudes. Com ja s'ha comentat anteriorment, s'estima que el consum mitjà global és de 70 mg per persona i dia [20], encara que pot variar segons els països. Un alt percentatge de la cafeïna passa sense alterar-se a través del cos humà i s'elimina amb l'orina, i com a conseqüència, cada dia grans quantitats de te i de cafè arriben a les plantes de tractament d'aigües residuals. Per aquest motiu es considera que la presència de cafeïna a les aigües és un indicador d'influències antropogèniques.

Molts estudis han detectat cafeïna. Un treball sobre el seguiment de la cafeïna en les diferents etapes del tractament de les aigües residuals de tres EDARs de Catalunya [51], ha obtingut resultats en molt similars als d'aquest estudi. Cal destacar que una de les estacions depuradores estudiada en el treball és també la d'Empuriabrava. Les concentracions d'entrada i de sortida de la cafeïna a les EDARs eren de l'ordre de les detectades en el present estudi, i l'eficiència de l'eliminació de la cafeïna també coincideix amb l'establerta a les EDARs de la Costa Brava. En aigües d'entrada d'EDARs d'Estats Units d'Amèrica s'han detectat concentracions de cafeïna superiors a

100 µg/L, a Canadà entre 20 i 300 µg/L i a Suècia una concentració mitjana de 34 µg/L [18]. En un petit riu després de que l'aigua fos tractada a Texas es van detectar fins a 2.4 µg/L. Les aigües del riu Mississipí contenen entre 0.01 i 0.07 µg/L i en pous d'aigües subterrànies de Barcelona s'han detectat concentracions amb valors entre 0.04 i 0.23 µg/L [3].

Els resultats obtinguts són comparables amb altres estudis com el de J.L. Santos *et. al.* [2] realitzat amb les aigües residuals d'entrada i sortida de quatre EDARs de Sevilla, on determinen de forma simultània set fàrmacs entre els quals hi ha antiinflamatoris (acetaminofen, diclofenac, ibuprofè, ketoprofè i naproxè), un antiepilèptic (carbamazepina) i un estimulant nerviós (cafeïna). Santos obté unes concentracions màximes d'entrada de l'ordre de ppb molt similars a les trobades en aquest estudi excepte per alguns dels fàrmacs. La concentració màxima de cafeïna detectada per Santos és de 16.3 µg/L, bastant inferior a la d'aquest estudi. En canvi, la màxima concentració d'ibuprofè detectada per Santos és de 143.0 µg/L, la qual dobla el valor detecta. Pel que fa a les concentracions mitjanes els valors són de l'ordre dels trobats en aquest treball. Les concentracions màximes detectades durant el treball de Santos van ser per l'ibuprofè amb una mitjana d'uns 73 µg/L, seguit del naproxè amb 5 µg/L. A la sortida les concentracions havien disminuït tot i que no totalment, mantenint-se entre els 6.4 µg/L de l'ibuprofè i els 0.43 µg/L de la carbamazepina.

A nivell europeu destaca l'estudi dels científics suïssos Céline Tixier *et. al.* [12] que van determinar el comportament i el destí de sis fàrmacs (carbamazepina, àcid clofíbric, diclofenac, ibuprofè, ketoprofè i naproxè) en les aigües superficials corresponents als efluent de tres EDARs, dos rius i el llac suís Greifensee. Les concentracions de sortida de les depuradores es trobaven entre 0.06 i 2.6 µg/L corresponents a l'àcid clofíbric i al naproxè, respectivament. Tant els dos rius com el llac rebien directament els efluent de les EDARs junt amb els fàrmacs no eliminats durant el tractament de les aigües. Les concentracions detectades a la sortida de les EDARs de la Costa Brava són d'ordres similars a les trobades a les EDARs suïsses.

Pel que fa a la detecció de fàrmacs a rius un cas molt proper és el cas de l'Ebre, a Catalunya. Un estudi del CSIC [10] va detectar una llarga llista de compostos farmacèutics en els 18 punts del riu analitzats. Les concentracions més elevades van ser per dos reguladors de colesterol, l'àcid clofíbric i el gemfibrozil, els analgèsics naproxè i diclofenac, l'antiinflamatori ibuprofè, l'antiepilèptic carbamazepina, i l'atenolol, un β -bloquejant. La resta dels compostos es van trobar a nivells que oscil·len entre 0.2 i 0.6 $\mu\text{g/L}$.

5.3.1. PERCENTATGE D'ELIMINACIÓ TOTAL.

El percentatge d'eliminació dels compostos varia segons la depuradora. La **Taula 5.7** presentada a continuació mostra el percentatge d'eliminació dels fàrmacs a les tres depuradores estudiades, comparant les concentracions detectades a l'entrada i a la sortida de cada una de les estacions depuradores d'aigües residuals.

<i>% Eliminació</i>	<i>EMPURIABRAVA</i>	<i>CASTELL- PLATJA D'ARO</i>	<i>BLANES</i>	<i>Promig de les tres EDARs</i>
Cafeïna	98.44 %	96.12 %	97.51 %	97.36 %
Ibuprofè	95.19 %	97.31 %	93.73 %	95.41 %
Naproxè	97.01 %	90.43 %	87.75 %	91.73 %
Diclofenac	55.48 %	35.48 %	52.16 %	47.70 %
Carbamazepina	36.45 %	53.57 %	44.58 %	44.87 %
Àcid clofíbric	59.59 %	35.88 %	16.21 %	37.23 %

Taula 5.7. Percentatge d'eliminació total dels fàrmacs dins de cada EDAR.

Tal com mostra la taula, els majors percentatges d'eliminació corresponen a la cafeïna, l'ibuprofè i el naproxè. La cafeïna és el compost que més eficientment s'elimina superant una eliminació del 96% a les tres EDARs. Una eliminació molt similar s'obté per l'ibuprofè, del qual un mínim del 93% s'elimina a cada depuradora. Pel que fa al naproxè existeix poca diferència respecte els dos compostos comentats. Fent promig amb les tres depuradores s'aconsegueix eliminar el 91%, tot i que cal mencionar les

petites diferències dels percentatge segons la depuradora. L'EDAR de Blanes elimina gairebé el 88% de la quantitat total de naproxè que li arriba, molt proper al 91% de l'EDAR de Castell-Platja d'Aro. Destaca l'elevada eliminació que s'obté per aquest compost a l'EDAR d'Empuriabrava, on s'assoleix una eliminació del 97% de naproxè que arriba a la planta.

Pels altres compostos els percentatges d'eliminació no són tan elevats. A les depuradores d'Empuriabrava i Blanes el diclofenac s'elimina en un 50% aproximadament, però a Castell-Platja d'Aro tan sols s'arriba a eliminar el 35% del compost. Els fàrmacs que més perduren després del procés de depuració són la carbamazepina i l'àcid clofíbric. La carbamazepina obté valors d'eliminació inferiors als del diclofenac, amb un promig de gairebé 45%, persistint en major grau a l'EDAR d'Empuriabrava on només s'elimina un 36%. L'àcid clofíbric és el fàrmac amb més persistència. Les depuradores no aconsegueixen eliminar més d'un 37% quan es té en compte el promig de les tres estacions, destacant que en alguna l'eliminació és inferior com és el cas de l'EDAR de Blanes, on tan sols s'elimina el 16% de la concentració inicial del compost.

Amb els percentatges d'eliminació dels fàrmacs fins ara comentats es pot estimar el comportament general dels compostos dins de les depuradores, el qual és atribuïble a les propietats físico-químiques de cada fàrmac. Es pot elaborar una primera diferenciació dels compostos classificant-los segons si es s'eliminen o si persisteixen al sistema.

Els fàrmacs que es poden considerar que s'eliminen més o menys eficientment a les depuradores són la cafeïna, l'ibuprofè i el naproxè. En canvi, els que s'han de considerar com a persistents són el diclofenac, l'àcid clofíbric i la carbamazepina. A partir d'ara els fàrmacs es tractaran segons la classificació establerta en base al seu comportament d'eliminació o persistència.

5.3.2. PERCENTATGE D'ELIMINACIÓ A CADA ETAPA.

Fins ara s'han comparat les eliminacions obtingudes dels fàrmacs a nivell general a partir de les concentracions d'entrada i de sortida de cada depuradora. Tot seguit es comenten i s'analitzen les dades dels fàrmacs corresponents a cada una de les etapes dels processos de depuració de les tres EDARs mostrejades.

No existeixen gaires estudis previs que indiquin quin és el procés del tractament de les aigües residuals responsable de l'eliminació d'aquests fàrmacs. Les **Figures 5.12, 5.13 i 5.14** mostren el percentatge d'eliminació dels compostos a cada etapa del tractament de depuració de les tres EDARs a partir de les dades mitjanes detectades.

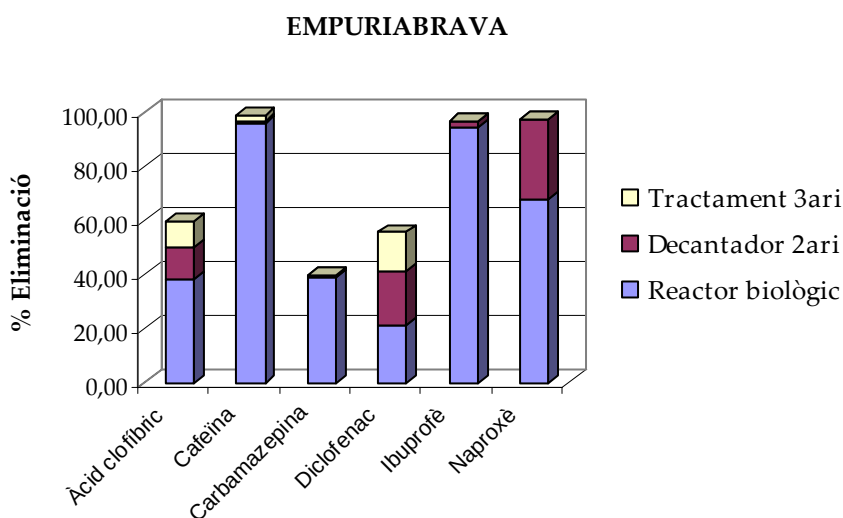


Figura 5.12. Percentatge d'eliminació dels fàrmacs corresponent a cada etapa del procés de depuració de l'EDAR d'Empuriabrava.

El sistema de tractament de l'EDAR d'Empuriabrava aconsegueix unes molt bones eliminacions de la cafeïna, l'ibuprofè i del naproxè. Per la cafeïna i l'ibuprofè la major part d'eliminació (més d'un 90%) té lloc en el reactor biològic, on els microorganismes degraden la matèria orgànica en zones aeròbies i anaeròbies. El naproxè s'elimina també quasi totalment al tractament secundari. Aproximadament el 70% del compost s'elimina en el reactor biològic i gairebé el 30% ho fa en el decantador secundari, que elimina partícules fines on s'hi ha adsorbit els fàrmacs.

Pel que fa als compostos més persistents, la carbamazepina assoleix la seva màxima eliminació en el reactor biològic, tot i que tan sols es degrada el 40% de tota la quantitat de fàrmac que entra junt amb les aigües residuals. L'àcid clofíbric i el diclofenac aconseguixen eliminacions mitjanes del 55 i del 60% respectivament, però destaquen en que entre un 10 i un 15% de l'eliminació dels mateixos es produeix en el tractament terciari i la resta s'elimina durant el tractament secundari.

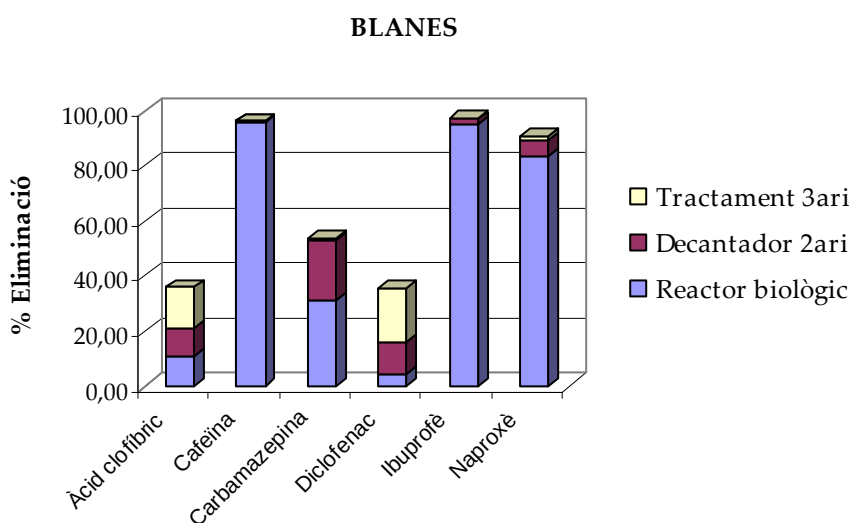


Figura 5.13. Percentatge d'eliminació dels fàrmacs corresponent a cada etapa del procés de depuració de l'EDAR de Blanes.

La depuradora de Blanes també és molt eficient per l'eliminació de la cafeïna, l'ibuprofè i el naproxè. Més del 95% de la cafeïna i l'ibuprofè s'elimina en el tractament biològic, tot i que el naproxè només es degrada en un 83% en el mateix reactor.

Els fàrmacs que no s'eliminen tan bé són els tres restants, la carbamazepina, el diclofenac i l'àcid clofíbric. El 53% de la carbamazepina s'elimina durant el tractament secundari, degradant-se una part més important en el reactor biològic i en menor proporció al decantador secundari. Les eliminacions del diclofenac i l'àcid clofíbric a Blanes són d'aproximadament el 36% en els dos casos. L'àcid clofíbric s'elimina de forma més uniforme en les tres etapes analitzades, i el diclofenac és el fàrmac que presenta una menor degradació en el reactor biològic, repartint la responsabilitat de l'eliminació entre el decantador secundari i el tractament terciari.

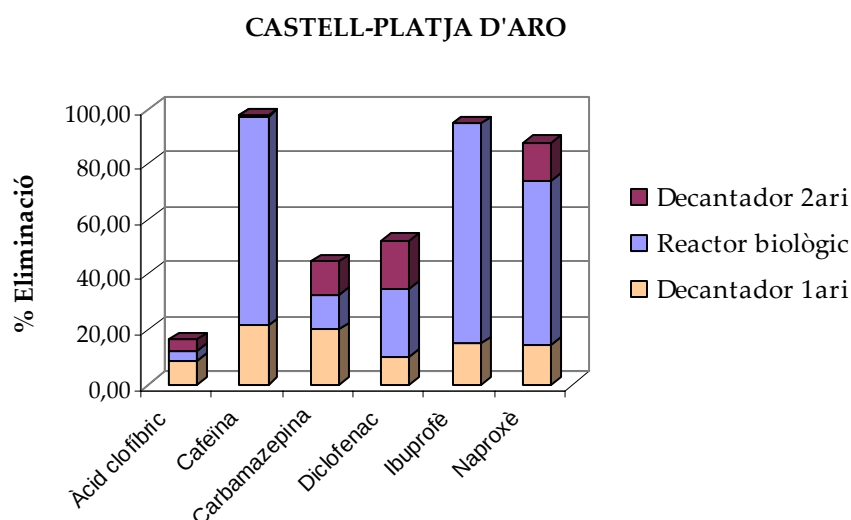


Figura 5.14. Percentatge d'eliminació dels fàrmacs corresponent a cada etapa del procés de depuració de l'EDAR de Castell-Platja d'Aro.

Per últim, l'EDAR de Castell-Platja d'Aro és la que obté resultats una mica diferents a les dues depuradores fins ara comentades degut a que en aquesta no s'ha pogut mostrejar el tractament terciari, ja que estava no estava en funcionament, i en canvi s'han analitzat mostres del decantador primari. Amb aquesta diferència de mostreig s'ha pogut observar que el tractament primari també intervé en l'eliminació dels fàrmacs amb proporcions que oscil·len entre el 8 i el 20% segons el compost.

Els fàrmacs amb una major eliminació segueixen sent la cafeïna, l'ibuprofè i el naproxè amb percentatges d'eliminació de 98, 95 i 88% respectivament. La major part de la degradació d'aquests fàrmacs es produeix al reactor biològic, igual que passa a les EDARs d'Empuriabrava i de Blanes. L'eliminació del diclofenac és del 52% i de la carbamazepina del 44%, obtenint eliminacions en els tres processos de depuració, tot i que en el diclofenac destaca el paper del tractament biològic i en la carbamazepina el del tractament primari. Pel que fa a l'àcid clofibrí és el fàrmac que més persisteix a l'EDAR de Castell-Platja d'Aro. Només s'obtenen eliminacions del 16% en les que el tractament primari és el principal responsable.

Cal tenir en compte que aquests gràfics s'han elaborat a partir dels valors mitjans de les concentracions detectades i per tant, cal considerar la possibilitat de que en dies concrets alguns dels compostos es puguin comportar d'una manera diferent de la que evidencien els gràfics. També és possible que valors puntuals màxims hagin pogut alterar el valor mitjà que aquí es representa distorsionant lleugerament alguna de les tendències. Tot i això, les figures que es mostren a continuació permeten observar el grau d'eliminació dels fàrmacs dins del sistema, estimant de forma qualitativa i fins i tot quantitativa el percentatge que s'elimina a cada etapa de la depuració.

Observades les tres figures anteriors amb els percentatges d'eliminació de cada fàrmac durant tot els tres processos de depuració d'aigües residuals detallant quina és la part responsable de l'eliminació, es pot fer una comparació de les tres depuradores.

Les tres depuradores presenten una gran eficiència molt similar en l'eliminació de la cafeïna i l'ibuprofè, ja que es degraden en més d'un 95% a totes elles, obtenint la major part de l'eliminació al reactor biològic. Les EDARs també assoleixen eliminacions importants de naproxè que s'elimina en aproximadament un 90% a Castell-Platja d'Aro i Blanes, i en un 97% a Empuriabrava. La màxima degradació d'aquests tres fàrmacs succeeix al reactor biològic. L'eliminació al tractament primari i terciari és mínima en comparació a la obtinguda al secundari. La cafeïna, l'ibuprofè i el naproxè es poden considerar com a fàrmacs altament biodegradables degut a l'elevat percentatge d'eliminació que s'obté al reactor biològic de les depuradores.

L'EDAR d'Empuriabrava obté les majors eliminacions pel diclofenac i l'àcid clofíbric, però la carbamazepina és el fàrmac que més persisteix en aquesta depuradora. Al contrari que passa a Castell-Platja d'Aro, en que la carbamazepina s'elimina en un 54% i el diclofenac i l'àcid clofíbric no superen el 36% d'eliminació. Per l'EDAR de Blanes la màxima eliminació dels compostos considerats com persistents s'assoleix amb el diclofenac, seguida de la carbamazepina amb un 52 i 45% respectivament. De l'àcid clofíbric tan sols s'aconsegueix eliminar un 16%, la menor eliminació d'aquest fàrmac de les tres depuradores.

Ara que ja es tenen els percentatges d'eliminació dels sis fàrmacs durant el procés de depuració de cada EDAR, es pot assignar quina és la part responsable de l'eliminació:

- **TRACTAMENT PRIMARI:**

En el tractament primari es separa la matèria en suspensió per mitjans físics dins del decantador primari, una vegada s'han eliminat els sòlids més grans, els olis i els greixos en el pretractament.

Pel tractament primari només es poden contrastar les dades dels diferents mostres a l'EDAR de Castell-Platja d'Aro. Només una petita porció (0-21%) s'elimina durant aquesta part del tractament.

- **TRACTAMENT SECUNDARI:**

Durant el tractament secundari els microorganismes eliminen la matèria orgànica, produint biomassa que es va retirant en forma de fangs activats del reactor secundari. Degraden les molècules orgàniques mitjançant processos d'oxidació química en zones aeròbies i anaeròbies. És durant aquest procés que s'elimina la gran part (16-96%) dels compostos farmacèutics que es troben junt amb les aigües residuals. Les majors degradacions en aquesta etapa de la depuració s'obtenen per la cafeïna, l'ibuprofè i el naproxè. A la sortida del tractament biològic hi ha els decantadors secundaris, les unitats de sedimentació que eliminen la matèria en suspensió resultant del reactor biològic aconseguint un bon espessiment dels fangs i la clarificació de l'aigua del sistema. També s'eliminen partícules fines on s'hi ha adsorbit els fàrmacs, aconseguint un petit percentatge d'eliminació (6-16%). Aquests percentatges corresponen al naproxè, el diclofenac, la carbamazepina i l'àcid clofíbric.

La part degradada al reactor biològic junt amb la part eliminada al decantador secundari, fa que el tractament secundari sigui l'etapa de la depuració més eficient a l'hora d'eliminar compostos farmacèutics, afirmant que la major part de l'eliminació dels compostos (23-99%) té lloc en aquest tractament.

- **TRACTAMENT Terciari:**

Els tractaments terciaris utilitzats per l'afinament final de l'aigua s'apliquen quan es vol reutilitzar l'aigua residual o si després de tot el procés de depuració encara queden contaminants com orgànics no biodegradables, metalls pesants, color de l'aigua, etc.

Paral·lelament a aquest tractament es realitza una desinfecció per disminuir el nombre d'agents patògens que puguin haver subsistit als processos anteriors. Moltes vegades es fa referència a la desinfecció com a tractament terciari quan, per les característiques de l'aigua, no se'n disposa de cap d'específic com és el cas de l'EDAR de Blanes.

En aquests tipus de tractament les eliminacions són bastant ínfimes (0-17%), similars a les obtingudes durant el tractament primari, en que destaquen les eliminacions obtingudes per l'àcid clofíbric i el diclofenac.

Els resultats obtinguts en el percentatge d'eliminació dels fàrmacs a cada tractament de les depuradores són comparables amb estudis elaborats per determinar l'eficiència d'EDARs en l'eliminació de compostos farmacèutics. A Amèrica, Paul M. Thomas i Gregory D. Foster [11] van realitzar un seguiment a través dels processos de tractament d'una EDAR per determinar el percentatge i els mecanismes d'eliminació dels contaminants que tenen lloc a cada un d'ells. Al llarg del tractament de les aigües es va fer el seguiment de cinc fàrmacs (ibuprofè, diclofenac, naproxè, ketoprofè i àcid mefenàmic) i es van utilitzar com a traçadors un estimulants nerviosos (cafeïna) i un agent antimicrobiològic que es troba en els sabons (triclosan). Les concentracions d'entrada eren de l'ordre de ppb. Van concloure que el principal responsable de l'eliminació dels fàrmacs era el tractament secundari, assolint una eliminació entre el 51 i el 99%, valors molt similars als obtinguts en aquest estudi pel tractament secundari de 23 a 99%. Tot i aquest percentatges, a la sortida encara es detectaven concentracions dins del rang de 0.010 i 0.072 µg/L.

5.3.3. MECANISMES D'ELIMINACIÓ DELS FÀRMACS.

Les diferències tan remarcades en les eliminacions dels fàrmacs es deuen a les seves estructures i propietats físico-químiques. L'estructura química de cada compost defineix les propietats que determinaran el seu comportament dins de cada etapa de depuració de les EDARs, definint des de la possibilitat de degradació fins aspectes més físics com l'adsorció al sòl o al fang de depuradora. Mentre que la cafeïna, l'ibuprofè i el naproxè s'eliminen a les EDARs convencionals, el diclofenac, l'àcid clofíbric i la carbamazepina mostren una persistència remarcada a l'ambient aquàtic.

Els mecanismes d'eliminació dels fàrmacs dins dels processos de depuració de les EDARs són l'adsorció i la degradació mitjançant processos físics o microbiològics.

Es pot intuir quin d'aquests dos mecanismes es donarà a través de l'anàlisi de propietats dels fàrmacs com la solubilitat, el pK_a i el log K_{ow} descrites per a cada fàrmac al capítol 1.2 titulat "Els compostos".

Les sis substàncies estudiades són relativament polars i per tant, solubles en aigua. L'àcid clofíbric, l'ibuprofè, el diclofenac i el naproxè són fàrmacs àcids i els dos restants, la cafeïna i la carbamazepina, a les mostres es troben en estat neutre.

Per saber en quin estat es troben els fàrmacs a les mostres es compara el seu valor de pK_a amb el pH de l'aigua. El pH habitual de l'aigua residual acostuma a ser entre 7 i 8. Com que tots els compostos excepte la cafeïna i la carbamazepina tenen un pK_a inferior al pH de les mostres, l'àcid clofíbric ($pK_a=2.84$), el diclofenac ($pK_a=4.15$), el naproxè ($pK_a=15$) i l'ibuprofè ($pK_a=4.31$) estaran a les mostres en forma desprotonada. Un compost desprotonat és àcid i per tant, queda carregat aniónicament de manera que l'adsorció al sòl és menys probable a causa de les forces de repulsió que es produeix entre càrregues iguals.

Els fàrmacs àcids a pH neutre es troben en forma iònica i passen per tot el procés de tractament d'aigües amb una petita adsorció en els fangs sòlids. L'adsorció en el fang és un important mecanisme d'eliminació de fàrmacs. Com més elevat sigui el K_{ow} , més adsorció significant dels fàrmacs àcids hi haurà a les partícules. Les substàncies lipofíliques es poden eliminar de les aigües residuals per adsorció a les partícules sòlides mitjançant processos físico-químics, mentre que les substàncies hidrofíliques tendeixen a romandre a la fase aquosa.

La *cafeïna* és un compost considerat fàcilment biodegradable per moltes referències bibliogràfiques i també per aquest estudi. L'eliminació que s'ha obtingut és molt similar a estudis previs [2, 11, 51]. Es tracta d'una substància aniònica i polar. El pK_a de 10.4 indica que a les mostres romandrà en forma neutra i desprotonada. Algun dels nitrògens que conté en la seva estructura es podria protonar però a valors de pH molt baixos, els quals no s'assoleixen mai en aigües residuals urbanes.

En el cas de l'EDAR de Castell-Platja d'Aro s'han analitzat mostres de la sortida del tractament primari que té per objectiu eliminar una part dels sòlids que conté l'aigua a l'entrada. S'observa que en aquesta etapa no es produeix una eliminació important de la cafeïna. Aquest fet es pot explicar si es té en compte que la cafeïna mostra una elevada solubilitat en aigua (21.7 g/L) i un baix valor del coeficient de partició octanol-aigua ($\log K_{ow} = -0.07$), per tant presenta una baixa adsorció en els sòlids.

Els resultats analítics indiquen una eliminació superior al 95% en el tractament per fangs activats de les tres depuradores, atribuïble a la degradació microbiològica i en una petita mesura a l'adsorció en el fang. No s'observen diferències significatives en l'eficiència de les tres plantes de tractament mostrejades per l'eliminació de cafeïna. A la sortida dels tractaments terciaris pràcticament no es detecta cafeïna. Les llacunes de tractament de l'EDAR d'Empuriabrava també es mostren eficients en l'eliminació d'aquest compost.

Els altres dos compostos considerats també com a biodegradables són l'ibuprofè i el naproxè. Aquests es biodegraden majoritàriament al reactor biològic de les depuradores sense cap diferència i com passa amb la cafeïna, el tractament primari no és significatiu pel que fa a la seva eliminació. El mecanisme d'eliminació més eficient per l'ibuprofè és la biodegradació obtinguda al reactor biològic. Un estudi realitzat en sistemes d'aiguamolls construïts de diferents profunditats [13] conclouen que l'ibuprofè es biodegrada en l'ambient de l'aiguamoll. En el SAC profund el potencial redox era major, afavorint les reaccions bioquímiques fent que hi hagi una major oxidació i una major eficiència en l'eliminació de matèria orgànica. Aquesta informació es pot adaptar pel sistema d'aiguamolls de l'EDAR d'Empuriabrava en el cas que el fàrmac arribés a aquesta etapa de la depuradora, ja que com s'ha comentat, el compost es biodegrada quasi totalment durant el tractament secundari. Existeix molta informació sobre la seva bona eliminació d'aquest compost en EDARs convencionals.

El naproxè també es biodegrada fàcilment durant el tractament secundari de les depuradores. Les concentracions detectades una vegada ha passat pel reactor biològic no són les mínimes assolides durant tota la depuració, les quals s'obtenen després del decantador secundari i el tractament terciari. El naproxè s'elimina aproximadament un 90% a l'EDAR de Castell-Platja d'Aro i Blanes i en un 97% a Empuriabrava.

El diclofenac és el fàrmac que es s'elimina poc més d'un 50% a les depuradores d'Empuriabrava i de Blanes, i en un 35% a Castell-Platja d'Aro. Durant un estudi fet a Suïssa [12] ja citat, es van realitzar anàlisis de laboratori amb aigua del llac. Va destacar una elevada eliminació del diclofenac per fototransformació. En aquest estudi no s'han pogut realitzar aquest tipus d'anàlisis, per tant, es desconeix quin és el mecanisme exacte d'eliminació del fàrmac.

La carbamazepina, amb un pK_a de 7.00, es troba a les mostres en estat neutre tot i que una petita part pot estar en forma protonada. Té un comportament refractari i és el fàrmac més recalcitrant que existeix a l'ambient aquàtic. S'ha suggerit com a traçador de la contaminació urbana en aigües superficials i subterrànies [13]. Tot i que és capaç

d'absorbir la llum solar, els estudis destaquen una insignificant eliminació per fototransformació [12]. D'acord amb el seu caràcter refractari la seva eliminació s'explica per l'adsorció a les superfícies orgàniques disponibles. La diferència d'eliminació entre les depuradores pot ser deguda a la diferència dels volums d'aigua que ofereixin, ja que implica una major o menor superfície específica d'adsorció.

La forma aniònica de l'àcid clofíbric i el seu comportament refractari li provoca una mínima eliminació. És un fàrmac que es podria utilitzar com a traçador per la seva poca eliminació que pateix a les plantes depuradores. S'ha descrit com un compost recalcitrant [13] i s'ha detectat en llacs i mars [12]. Es comporta de manera diferent segons l'EDAR, aquest fet s'explicaria amb l'adaptació microbiològica de cada reactor biològic necessària per aconseguir una eliminació significant.

5.3.4. PERSPECTIVES DE FUTUR.

La problemàtica dels fàrmacs no és actual. Fa anys que els fàrmacs estan a les aigües, però és ara quan la millora de les tècniques analítiques han permès detectar la seva presència i ens han fet adonar del problema que suposen en els ecosistemes. Es considera que és un problema que anirà en augment degut al progressiu envelliment de la població que provoca un major consum de fàrmacs i per tant, un increment de les aportacions a les aigües.

La concentració dels medicaments al medi, la seva evolució temporal i els seus possibles efectes no depenen només de la quantitat abocada des de les EDARs, sinó que també depèn de factors com l'àrea geogràfica i les condicions climàtiques de la zona on es troben, els quals ajudaran a determinar el risc dels efectes negatius que puguin causar sobre el medi.

Cada vegada hi ha més plantes depuradores i les directives europees obliguen a estendre aquestes instal·lacions a municipis cada vegada més petits. Però és ben conegut, que les actuals depuradores tenen una capacitat limitada d'eliminació de residus contaminants i hi ha una part considerable de compostos que no són eradicats abans que aquestes aigües arribin als rius.

La solució per aquest tipus de contaminació és complexa. No es pot limitar el consum de fàrmacs ja que la gent que els necessita han de seguir prenent-se'ls. La única solució és millorar els processos de depuració. A Europa, els països que més han treballat en aquest camp són Alemanya i Dinamarca, que destaca pel nombre de depuradores que ja té operatives amb els mitjans suficients per eliminar les restes de medicaments abans de que arribin als rius. En els altres països els investigacions són escasses, i a Espanya es coneix molt poc sobre el grau de contaminació real que provoquen aquestes substàncies.

En el cas de fàrmacs com l'ibuprofè, es coneix que n'hi hauria prou amb que l'aigua residual romangués més temps en les plantes depuradores per a la seva millor extracció. D'altra banda, s'estan estudiant nous sistemes per eliminar els fàrmacs de l'aigua, entre ells, nous filtres de membranes i l'ús de l'ozó. Els efectes del tractament biològic només eliminen parcialment un ampli rang de contaminants emergents, els quals encara es detecten als efluent finals.

És evident que l'aplicació de noves tecnologies és crucial per satisfer els requeriments de reciclatge de les aigües residuals urbanes i industrials, i de l'aigua potable. En els últims anys s'han estudiat noves tecnologies no només pel tractament de les aigües superficials, sinó també per l'aigua potable. El tractament amb membranes utilitzant processos biològics (MBR) i no biològics (osmosis inversa, ultrafiltració, nanofiltració) i els processos d'oxidació avançada (AOP) són les tecnologies més freqüentment considerades per l'eliminació de concentracions traça de contaminants polars emergents.

Els processos de membrana estan considerats la millor tecnologia disponible. La tecnologia de MBR es considera el desenvolupament més prometedor en el tractament biològic de les aigües residuals. Quan els motius econòmics no limitin el seu ús en les EDARs industrials i municipals i es fixin nous requisits pel tractament de les aigües residuals, els MBR seran la clau tan directa com indirecta del reciclatge de les aigües. S'han escrit molts articles sobre les aplicacions dels MBR en el tractament de les aigües residuals urbanes i industrials, però pocs estudien el comportament dels contaminants emergents durant el tractament amb MBR.

Els processos d'oxidació avançada (AOP) combinant ozó amb altres agents oxidants (radiació UV, peròxid d'hidrogen, TiO_2) augmenta l'eliminació de fàrmacs àcids [81]. En l'estudi de Ternes *et. al.* [82] es descriu una planta pilot per ozonització i desinfecció amb UV pels efluent d'una EDAR municipal alemanya que conté antibiòtics, β -bloquejadors i metabòlits de reguladors de lípids entre altres compostos. Quan utilitzava entre 10-15 mg/L d'ozó amb temps de contacte de 18 minuts, no es detectava cap fàrmac.

En un altre estudi [83] es va demostrar que l'ozonització era una eina adequada per la disminució de la carbamazepina, inclòs sota les condicions de procés adoptades generalment a les instal·lacions de la potabilització d'aigua. No obstant, tot i la bona eliminació primària, es va observar un baix grau de mineralització i no es produïa l'equilibri total apropiat del carbó, fins i tot després d'una ozonització perllongada, que indica la presència de productes de degradació no identificats.

L'eficiència de degradació de AOP és limitat. Per una degradació superior al 90% dels fàrmacs de l'aigua residual, la concentració d'ozó ha de ser igual al valor de carboni orgànic total, el qual significa unes consideracions econòmiques que han de qüestionar la viabilitat del procés de tractament d'aigües residuals.

S'ha estudiat l'eliminació d'una selecció de fàrmacs (àcid clofibrí, diclofenac, carbamazepina i bezafibrat) durant el tractament de potabilització d'aigües a escala

d'una planta pilot i en la realitat a plantes alemanyes [84]. La filtració amb sorra sota condicions aeròbiques i anòxiques, com la floculació utilitzant clorur fèrric, no eliminaven de forma significativa aquests fàrmacs, mentre que l'ozonització era molt més efectiva. El diclofenac i la carbamazepina es reduïen en un 90%, el bezafibrat un 50%, mentre que l'àcid clofíbric era estable fins i tot amb una dosi alta d'ozó. La filtració amb carbó actiu granular (GAC) sota condicions de treball va ser molt efectiva en l'eliminació de fàrmacs, excloent l'àcid clofíbric, el qual es va adsorbir en molt poca quantitat.

Cal potenciar els estudis per arribar a conèixer quin és el risc al que estem exposats per prendre les mesures convenients. També seria convenient impulsar projectes d'investigació que estableixin si seria necessari regular la quantitat màxima de cada fàrmac que pot sortir amb l'efluent d'una depuradora, igual que es fa actualment amb varis paràmetres. També s'haurien de fer els estudis convenients per determinar com de perjudicial és un fàrmac pel medi o per la salut pública, forçant a la supressió o substitució del fàrmac per altres amb els mateixos efectes en el cas que fos convenient.

Incrementar el grau de conscienciació ciutadana també seria part de la solució. Es podria començar receptant productes que fossin més degradables. Per altra banda, els fàrmacs caducats o que ja no cal consumir s'han d'abocar en el contenidor blanc dels punts de recollida per tal de que rebin el tractament mediambiental correcte. Aquesta seria una part de l'educació ambiental que fa falta per no empitjorar el problema.

6. CONCLUSIONS.

CONCLUSIONS.

Tots els resultats obtinguts en aquest projecte han permès extreure les conclusions següents:

1. S'ha posat a punt un mètode per determinar simultàniament els fàrmacs objecte d'estudi (àcid clofíbric, cafeïna, carbamazepina, diclofenac, ibuprofè i naproxè) en aigües residuals, basat en l'extracció en fase sòlida seguida de cromatografia líquida d'alta resolució amb detecció de díodes en línia. El límit de detecció obtingut per les aigües d'entrada i les procedents del tractament primari és de 0.17 µg/L. En canvi, per les aigües procedents dels tractaments secundaris i terciaris, el límit de detecció és de 0.1 µg/L.
2. El mètode desenvolupat s'ha aplicat al seguiment de la concentració dels fàrmacs en el procés de tractament d'aigües residuals urbanes en tres estacions depuradores de la Costa Brava (Empuriabrava, Castell-Platja d'Aro i Blanes).
3. Les concentracions dels fàrmacs oscil·len entre el límit de detecció i uns pocs µg/L. Els fàrmacs detectats a una major concentració en les mostres d'entrada de les depuradores són el naproxè, l'ibuprofè i la cafeïna amb 20.2, 61.9 i 70.4 µg/L respectivament. La resta dels compostos s'han detectat a concentracions màximes de 2.5, 2.8 i 3.5 µg/L corresponents a la carbamazepina, el diclofenac i l'àcid clofíbric. Pel que fa a les mostres de sortida les concentracions es redueixen de forma considerable respecte els valors detectats a l'entrada, però no en la seva totalitat. S'han detectat concentracions màximes que oscil·len entre 1.7 µg/L de l'àcid clofíbric i 2.3 µg/L del diclofenac.

4. Els majors percentatges d'eliminació corresponen a la cafeïna, l'ibuprofè i el naproxè. La cafeïna és el compost que s'elimina més eficientment superant una eliminació del 96% a les tres EDARs. Un percentatge molt similar s'obté per l'ibuprofè, del qual un mínim del 93% s'elimina a cada depuradora. Pel que fa al naproxè existeix poca diferència respecte els dos compostos esmentats.
5. Els percentatges d'eliminació més baixos són pel diclofenac, la carbamazepina i l'àcid clofíbric. El diclofenac s'elimina un 35-50% segons la depuradora. Els fàrmacs que més perduren després del procés de depuració són la carbamazepina i l'àcid clofíbric. La carbamazepina s'elimina aproximadament en un 45% fent promig amb les tres depuradores. L'àcid clofíbric és el fàrmac amb més persistència. Tan sols s'elimina un 37% de la concentració total que arriba a les tres EDARs.
6. S'han obtingut diferències entre les tres depuradores pel que fa als percentatges d'eliminació d'alguns dels fàrmacs. L'EDAR de Blanes elimina gairebé el 88% de la quantitat total de naproxè que li arriba, molt proper al 91% de l'EDAR de Castell-Platja d'Aro, tot i que destaca l'elevada eliminació que s'obté per aquest compost a l'EDAR d'Empuriabrava, que elimina el 97%. El diclofenac a les depuradores d'Empuriabrava i Blanes s'elimina en un 50% aproximadament, però a Castell-Platja d'Aro tan sols s'arriba al 35%. La carbamazepina s'elimina aproximadament en un 45%, persistint en major grau a l'EDAR d'Empuriabrava ho fa en un 36%. En el cas de l'àcid clofíbric destaca la poca eliminació que s'obté a l'EDAR de Blanes, on tan sols s'elimina el 16% de la concentració inicial del compost. A Castell-Platja d'Aro i Empuriabrava les eliminacions són del 36 i del 60% respectivament.
7. L'assignació del grau de responsabilitat en l'eliminació dels fàrmacs a cada etapa del procés de depuració és la següent: tractament primari (0-21%), reactor biològic (16-96%), decantador secundari (6-16%) i tractament terciari (0-17%). No s'observen diferències significatives entre les EDARs respecte els percentatges d'eliminació generals obtinguts a cada etapa.

7. REFERÈNCIES.

REFERÈNCIES.

- [1] M. Petrovic, M. Dolores Hernando, M. López de Alda, D. Barceló. *Eliminació de contaminants emergents de les aigües residuals*. Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB-CSIC), **2004**, 11, 114-119.
- [2] J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, M. Callejón. *Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors*. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 550, 116-122.
- [3] D. Barceló, M. Petrovic, E. Ethel, M.J. López de Alda, A. Kampioti. E. Heftmann (Ed.), *J. Chromatogr. Library*, Elsevier Science Ltd., Oxford, **2004**, Vol. 69B, Chapter 21, 6th Ed., 987-1036.
- [4] S.E. Jorgensen, B. Halling-Sorensen. *Drugs in the environment* (Ed), *Chemosphere*, **2000**, 40, 691-699.
- [5] Christian G. Daughton. *Chemicals from pharmaceuticals and personal care products*. www.waterencyclopedia.com (Pàgina web visitada per última vegada el juny del 2007).
- [6] P. E. Stackelberg, E. T. Furlong, M. T. Meyer, S. D. Zaugg, A. K. Henderson, D. B. Reissman. *Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking water treatment plant*. *Science of the Total Environment*, **2004**, 329, 99-113.
- [7] S. Sans, G. Paluzie, T. Puig, L. Balañá, I. Balaguer-Vintró. *Prevalencia del consumo de medicamentos en la población adulta de Cataluña*. Institut d'Estudis de la Salut. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya. Barcelona, **2002**, 121-130.
- [8] R. Rosal. *Contaminantes emergentes: compuestos con actividad farmacológica*. Universitat d'Alcalà. www.uah.es (Pàgina web visitada per última vegada el gener del 2007).
- [9] C. Rodríguez. *Un estudio del CSIC halla vertidos domésticos de medicamentos en el Ebro*, (2006). www.websalud.com (Pàgina web visitada per última vegada el gener del 2007).
- [10] D. Arbós. *Los fármacos son el principal contaminante emergente*. *Diario Médico (España)*, **2004**. www.boletinfarmacos.org (Pàgina web visitada per última vegada el gener del 2007).
- [11] P. M. Thomas, G. D., Foster. *Tracking acidic pharmaceuticals, caffeine, and triclosan through the wastewater treatment process*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2005**, 24, 25-30.
- [12] C. Tixier, H. P. Singer, S. Oellers, S. R. Müller. *Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters*. *Environmental Science and Technology*, **2003**, 37, 1061-1068.

- [13] V. Matamoros, J. García, J.M. Bayona. *Behavior of selected pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetlands: a pilot-scale study*. Environmental Science and Technology, **2005**, 39, 5449-5454.
- [14] *Medicamentos en el agua, los nuevos contaminantes*. Revista Consumer Eroski. Gener **2007**, nº 106. www.consumer.es (Pàgina web visitada per última vegada el febrer del 2007).
- [15] J.L. Oaks, M. Gilbert, M.Z. Virani, R.T. Watson, C.U. Meteyer, B.A. Rideout, H.L. Shivaprasad, S. Ahmed, M.J. Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A.A. Khan. *Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan*. Nature, **2004** 427 (6975): 630-3.
- [16] D.C. Brater. *Renal effects of cyclooxygenase-2-selective inhibitors*. J Pain Symptom Manage, **2002**, 23 (4 Suppl): S15-20; discussion S21-3.
- [17] J.E. James. *Caffeine and health*. San Diego: Academic Press, **1991**. p.42-57.
- [18] Z. Chen, P. Pavelic, P. Dillon, R. Naidu. *Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode-array detection*. Water Research, **2002**, 36, 4830-4838.
- [19] *Las drogas tal cual: la cafeína*. www.mind-surf.net (Pàgina web visitada per última vegada el juny del 2007).
- [20] *Cafeína*. www.d-lamente.org (Pàgina web visitada per última vegada el maig del 2007).
- [21] I. Sirés, Tesi Doctoral. *Electrochemical advanced oxidation processes for the removal of the drugs paracetamol, clofibric acid and chlorophene from waters*. Universitat de Barcelona (**2006**) Barcelona.
- [22] S.D. Richardson, *Anal. Chem.*, 71 (**1999**) 181R.
- [23] R.E. Clement, P.W. Yang, C.J. Koester, *Anal. Chem.*, 71 (**1999**) 257R.
- [24] M-C. Hennion, P. Scribe in D. Barceló (ed.), *Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance*. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [25] L.A. Berruela, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia*, 40 (**1995**) 474.
- [26] A. Martín Esteban, P. Fernández, A.R. Fernández-Alba, C. Cámara, *Quim. Anal.*, 17 (**1998**) 51.
- [27] I. Liska, *J. Chromatogr. A* 885 (**2000**) 3.
- [28] V Pichon, *J. Chromatogr. A* 885 (**2000**) 195.
- [29] L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia* 40 (**1995**) 474.
- [30] V. Lopez Avila, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 29 (**1999**) 195.
- [31] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 839 (**1999**) 253.

- [32] J. Pawliszyn, *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH Inc., New York, **1997**.
- [33] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Trenes Anal. Chem.*, **18** (1999) 557.
- [34] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, **778** (1997) 161.
- [35] C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrull, R.M. Marcé, D. Barceló, *Anal. Chem. Acta*, **386** (1999) 237.
- [36] M.W.F. Nielen, *Selective On-Line Precolumn Sample Handling and Trace Enrichment in Liquid Chromatography*, Tesi Doctoral, Free University, Amsterdam, **1987**.
- [37] R.M. Marcé, H. Prosen, C. Crespo, M. Calull, F. Borrull, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **696** (1995) 63.
- [38] M-C Hennion, *J. Chromatogr. A* **856** (1999) 3.
- [39] D. Puig, D. Barceló, *Trenes Anal. Chem.*, **15** (1996) 362.
- [40] J.S. Fritz, *Analytical Solid-Phase Extraction*, Wiley-VCH, New York, **1999**.
- [41] E.M. Thurman, M.S. Mills, *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*, John Wiley & Sons, New York, **1998**.
- [42] J. S. Fritz, J.J. Masso, *J. Chromatogr. A* **909** (2001) 79.
- [43] D. Barceló, S. Chiron, S. Lacorte, E. Martinez, J.S. Salau, M-C. Hennion, *Trenes Anal. Chem.*, **13** (1994) 352.
- [44] M.T. Galceran, O. Jáuregui, *Anal. Chem. Acta*, **304** (1995) 75.
- [45] E.M. Thurman, M.S. Mills. *Solid-phase extraction. Principles and practice*. John Wiley & Sons, New York, NY (USA), **1998**, ISBN: 0-471-61422-X
- [46] C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal, *Toma y tratamiento de muestras*, Editorial Síntesis, S.A., Madrid (Spain) (2004), ISBN 84-7738-962-4.
- [47] M-C. Hennion, P. Scribe, D. Barceló (Editor), *Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance*, Elsevier Science, Amsterdam, **1993**, p. 23.
- [48] I. Rodríguez, M.P. Llompart, *J. Chromatogr. A* **840** (1999) 21.
- [49] Chromatography Department. (Pàgina web visitada per última vegada el juny del 2007). www.cerij.or.jp/06_05_english/Chromato/En_L_spec.html
- [50] M-C Hennion, *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 73.
- [51] S. Moret, Tesi Doctoral. *Desenvolupament de metodologia analítica per al seguiment d'herbicides fenoxiacètics i cafeïna en el medi ambient*. Universitat de Girona (2006) Girona.

- [52] Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler. *Fundamentos de química analítica*. Editorial Reverté, S. A. 4^{ta} edició, **1997**.
- [53] Basic liquid chromatography. <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC> (Pàgina web visitada per última vegada l'agost del 2007).
- [54] Upchurch Scientific, HPLC Center. www.upchurch.com/TechInfo/hplcIntro.asp (Pàgina web visitada per última vegada l'agost del 2007).
- [55] Técnicas analíticas. (Pàgina web visitada per última vegada el juny del 2007).
http://rsa.aga.com/International/Web/LG/Br/likelgspgbr.nsf/DocByAlias/anal_gaschrom
- [56] M. Serra. *L'abastament, la depuració i la reutilització a la Costa Brava*. Jornada sobre la gestió integral de l'aigua a les comarques gironines, **2006**.
- [57] *Estadística oficial de Catalunya*. www.idescat.cat (Pàgina web visitada per última vegada el juny del 2007).
- [58] *Consorti de la Costa Brava*. www.ccbgi.org (Pàgina web visitada per última vegada el setembre del 2007).
- [59] *Water gardeners international*. www.watergardenersinternational.org (Pàgina web visitada per última vegada l'agost del 2007).
- [60] *III. Congrés nacional de digiscoping*. <http://fotodigiscoping.info/congreso06/index.html> (Pàgina web visitada per última vegada l'agost del 2007).
- [61] Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC). *Investigadors del CSIC demostren que la desinfecció d'aigües residuals no genera trihalometans*. Barcelona, 11 de gener de **2006**.
www.dicat.csic.es (Pàgina web visitada per última vegada el gener del 2007).
- [62] A. Costan, E. Dalmau, J. Jofre, F. Lucena, M. Montemayor, R. Mujeriego, A. Payán Ll. Sala, M. Soler. *Acció combinada d'agents desinfectants en la planta de regeneració d'aigua de Blanes, Girona, 2006*, ccb.
- [63] *Cienytech, Ciencia y Tecnología*. Waters. www.cienytech.com (Pàgina web visitada per última vegada l'agost del 2007).
- [64] C.W. Huck, G.K. Bonn, *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 51.
- [65] N.C. Dias, C.F. Poole, *Chromatographia* **56** (2002) 269.
- [66] J.D. Cahill, E.T. Furlong, M.R. Burkhardt, D. Kolpin, L.G. Anderson, *J. Chromatogr. A* **1041** (2004) 171.
- [67] D.C. Delinsky, K. Srinivasan, H.M. Solomon, M.G. Bartlett, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **25** (2002) 113.
- [68] M. Rizzo, D. Ventrice, F. Monforte, S. Procopio, G. De Sarro, M. Anzini, A. Cappelli, F. Makovec, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35** (2004) 321.

- [69] D.A. Azebedo, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *Chromatographia* 53 (2001) 113.
- [70] R. Bossi, K.V. Vejrup, B.B. Mogensen, W.A.H. Asman, *J. Chromatogr. A* 957 (2002) 27.
- [71] L. Gomides, C.W. Götz, M. Ruff, H.P. Singer, S.R. Müller, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 277.
- [72] S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 225.
- [73] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1202.
- [74] M.D. Prat, J. Benito, R. Compañó, J.A. Hernández-Arteseros, M. Granados, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 27.
- [75] M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 145.
- [76] E. Ayano, H. Kanazawa, M. Ando, T. Nishimura, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 211.
- [77] T.N. Decaestecker, E.M. Coopman, C.H. Van Peteghem, J.F. Van Bocxlaer, *J. Chromatogr. A* 789 (2003) 19.
- [78] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, *J. Chromatogr. A* 960 (2002) 109.
- [79] T. Koal, A. Asperger, J. Efer, W. Engewald, *Chromatographia* 57 (2003) S93.
- [80] M. Peruzzi, G. Bartolucci, F. Cioni, *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 169.
- [81] M. Petrovic, S. Gonzalez, D. Barceló. *Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water*. Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22, 685-696.
- [82] T.A. Ternes, J. Stüber, N. Herrmann, D. McDowell, A. Ried, M. Kampmann, B. Teiser, *Water Res.* 37 (2003) 1976.
- [83] R. Andreozzi, R. Marotta, G. Pinto, A. Pollio, *Water Res.* 36 (2002) 2869.
- [84] T.A. Ternes. *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3855.

